

いて解析した。PrP^{Sc}陽性ドナー細胞とレシピエント細胞を人工フィルターを介して培養し、ドナー細胞から分泌された PrP^{Sc} が培養液を介してレシピエント細胞へ伝播されるかどうかを検査した。人工フィルターを介する位置関係をドナー細胞およびレシピエント細胞で取り換えても、PrP^{Sc}の伝播は、成功しなかった。この結果は、細胞間での PrP^{Sc} の伝播には、細胞同士の直接接触が必要であることを示唆している。

D. 考 察

動物プリオン病は、経口的に摂取したプリオンが腸管のリンパ系組織（パイエル板）の上皮から取り込まれ、免疫系組織の中で蓄積後、神経系に移行するものと考えられている。しかし、自然発症の BSE などでは、摂取される時期が不明であることから、腸管の免疫系組織にプリオンの蓄積が検出することはまれである。また、実験的なプリオンの投与実験においても、腸管系リンパ組織でのプリオンの動態や免疫系から神経系への移行動態を解析するには限界があり、神経節にてプリオンの蓄積を確認するのみである。今回、初生牛と2ヶ月齢牛での腸管の免疫組織の発達と分化程度を CD 抗原やサイトカインレセプターの発現で解析した。どの抗原とも初生牛より2ヶ月齢の牛の腸管リンパ組織の方が、発現が旺盛であり、牛はパイエル板で外部からの抗原を取り入れながら発達することが確認された。特に、ドーム領域から濾胞にかけての免疫系細胞の発達は顕著であり、摂取されたプリオンがドームの表層からドーム内に、あるいは粘膜下組織に取り込まれる過程が想像された。しかし、ドーム内にはマクロファージや樹状細胞など免疫系細胞が多く局在していることから、ドーム内に取り込まれたプリオンが、そのままの形で腸管深部や各部位に移行するかどうかは不明である。

生体内での免疫系から神経系へのプリオンの動態解析は困難を伴うことから、培養細胞を用いた解析を本研究では行った。まず、スクレイピー感染マウスの免疫系組織で、プリオンの蓄積量の多い脾臓の脾臓細胞から神経系細胞への伝播を解析した。その結果、低率であるが脾臓細胞から神経系細胞へプリオンが伝播することを確認した。しかし、脾臓細胞中のどの細胞群が伝播に直接関与したのかは明らかにできなかった。脾臓内の多くの細胞がプリオンを保有していることが、間接蛍光抗体法にて観察されたことから、多くの

細胞群が関与している可能性が高い。また、脾臓細胞をコンデショナル培地で一旦活性化すると PrP^{Sc} の検出が上昇することは、レシピエント細胞の増殖と同様にドナー側の細胞の活性化も細胞間でのプリオン伝播に大きく影響する要因であることを示している。脾臓細胞をドナー細胞として用いた場合とは別に、培養系の M ϕ Raw 細胞に一旦プリオンを取り込ませた後、神経細胞への伝播を試みたが、PrP^{Sc} 陽性細胞の樹立には至らなかった。これは、伝播に至る前に M ϕ 内でプリオンが分解されるものと考えられる。

培養系細胞でのプリオンの伝播に細胞間の直接接触が必要なのか？あるいは培養液を介した伝播が起きているのか？を明らかにする目的で、PrP^{Sc} 陽性神経細胞をドナーとして、直接接触と人工フィルターを介した培養液系を用いて解析した。結果的には、神経細胞同士の直接接触の場合、神経細胞間での伝播が高率に起きるのに比べて、培養液のみを介した伝播試験では PrP^{Sc} 陽性のレシピエント細胞は検出されなかった。培養液を介した伝播が成立するとの報告がこれまでに一部でなされているが、今回の結果から判断する限り培養液を介した伝播は極めて低率であることが示唆される。腸管でのプリオンの自然感染を考えた場合、リンパ系細胞以外の細胞が神経系細胞への伝播のドナーとして機能することも考えられることから、今後とも、生体内を想定した各種細胞間でのプリオンの伝播解析を検討する必要がある。

E. 結 論

牛の回腸遠位部でのリンパ系組織の分化・成熟を CD 抗原やサイトカインレセプターの発現により免疫組織化学的に解析し、初生牛と2カ月齢牛で比較した。その結果、プリオンを取りこむと考えられるドーム領域から濾胞域にかけて、出生後、数か月でリンパ系の各細胞が発達することが示された。

また、免疫系細胞から神経系細胞への PrP^{Sc} の伝播を培養細胞を用いて検討した。その結果、免疫系細胞から神経系細胞への伝播は、神経細胞間での伝播に比べて低率であり、細胞間での PrP^{Sc} の伝播には細胞同士の直接接触が重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka Y, Ishiguro N, Inoshima Y :Proteasome activity and biological properties of normal prion protein : a comparison between young and aged cattle. J. Vet. Med. Sci. 72:1583-7,2010.
- 2) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N :The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. Microbiol. Immunol. 54:763-8, 2010.
- 3) Elmonir W, Inoshima Y, Elbassiouny A, Ishiguro N :Intron 1 mediated regulation fo bovine prion protein gene expression : Role of donor splicing sites, sequences with potential enhancer and suppressor activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 397: 706-10, 2010.
- 4) Sassa Y, Kataoka N, Inoshima Y, Ishiguro N : Anti-PrP antibodies detected at terminal stage of prion-affected mouse. Cell Immunol. 263: 212-218, 2010.
- 5) Sassa Y, Inoshima Y, Ishiguro N.:Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrP^{Sc}. Vet. Immunol. Immunopathol. 133: 33-39, 2010.

2. 学会発表

- 1) Elmonir W, Inoshima Y, Elbassiouny A, Ishiguro N. : Intron 1 and splicing sites arekey regulators for expression of the bovine prion protein gene. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases (Sapporo) 2010 年 7 月
- 2) Sassa Y, Kataoka N, Inoshima Y, Horiuchi M, Ishiguro N. : The 9th International Veterinary Immunology Symposium. (Tokyo) 2010 年 8 月
- 3) 石黒直隆、猪島康雄 : 牛プリオン遺伝子の発現に影響するイントロン1の役割。第150回日本獣医学会学術集会(帯広) 2010 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

6. ヒト型プリオン蛋白ノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験

研究分担者 北本 哲之 東北大学大学院 医学系研究科

研究要旨 ヒト型プリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いて vCJD プリオンの感染実験を行っている。昨年明らかになったコドン129V/V のヒト型ノックインマウスで高率に感染することから、129V/V のヒトが vCJD になったときの診断法を確立する必要性がでてきた。そこで、ウシ型のノックインマウスを用いて vCJD の診断法を開発したので報告する。

A. 研究目的

我が国のヒトのプリオン蛋白多型性には、以下のような遺伝子型が存在する。コドン 129 に関しては、129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型があり、コドン 219 に関しては、219E/E, 219E/K, 219K/K がある。現時点までの遺伝子解析の結果、コドン 129 とコドン 219 の関係に関しては、コドン 129M のプリオン蛋白の中にコドン 219E と 219K が存在し、コドン 129V のプリオン蛋白は全てコドン 219 に関しては 219E である。この遺伝子型のプリオン蛋白が vCJD プリオン感染に対して感受性をもつかは、vCJD プリオンの輸血などの 2 次感染を考える上で必要な情報である。この感受性検討に関して、直接ヒト型のプリオン蛋白遺伝子の多型性を導入したノックインマウスを複製して、vCJD プリオンに対する感受性を検討するのが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

【材料】 感染因子として、vCJD を発病したヒト型 129V/V のマウス脳とコントロールとして弧発性 CJD である VV2 の脳を用いた。マウスは、ヒト型ではなく、ウシ型のプリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いた。

【方法】 感染は腹腔内に 10% 脳乳剤を 50 μ l 投与後、75 日経過を観察した。マウスの脾臓の半分を免疫染色検査 (Kitamoto et al, 1991) に、残りの半分を Western blot 検査 (Asano et al, 2006) に利用した。

C. 研究結果

今年度の実験結果は以下のようにまとまる。

接種材料	脾臓陽性率	陽性 FDC/Follicles
Hu129V/V[vCJD]	5/5	33/481(6.86%)
sCJD VV2	0/4	0/424
sCJD VV2	0/5	0/484

Hu129MV[vCJD]	6/6	129/741(17.41%)
sCJD MV2	0/5	0/471
sCJD MV1	0/5	0/416

上の表で、Hu129V/V[vCJD]は、ヒト型ノックインマウスの遺伝子型[接種材料]を示している。よって、Hu129MV[vCJD]は、vCJD を接種したヒト 129MV のノックインマウスの脳を接種材料としたという意味である。

組織学的には、vCJD の感染が成立したマウスからの感染のみ、FDC が陽性に染色された。sCJD では、MV1, MV2, VV2 のいずれの症例でもウシ型ノックインマウスに感染は認められなかった。

ウエスタンブロットでも、免疫組織学的検索と同様の結果が得られた。vCJD に感染したマウスの脳からの感染実験のみ、異常プリオン蛋白の沈着を認めた。

D. 考察

昨年度の報告でコドン 129V/V のヒトが vCJD になる可能性が高いことを見出したが、問題はコドン 129V/V のヒトが sCJD を発病するとタイプ 2 の異常型プリオン蛋白をもち、アミロイド斑が多数みられるので sCJD なのか vCJD なのかを正確に鑑別できる方法の開発が急務であるというのが去年の報告であった。ほとんどの VV2 の症例と、vCJD を発病した 129V/V の症例では、アミロイド斑、タイプ 2 とともに陽性の可能性が高く、sCJD と vCJD が容易には区別不可能であるからである。

我々は、以前から trace back 現象を報告しており、これは BSE 由来の vCJD プリオンのみがウシ型ノックインマウスに感染するまたは感染しやすいという現象である。vCJD プリオンをウシ型ノックインマウスの腹腔内に投与したところ、vCJD のみが脾臓での異常プリオ

ン蛋白の沈着を引き起こし、他の CJD では全く感染が成立しなかったから、プリオン感染にはトレーサビリティが存在することを報告したわけであるが、この現象が 129Val/Val の vCJD プリオンでも存在するのか検討したところ、予想通りトレーサビリティが認められた。トレスバック現象は、129Met/Val の症例でも認められ、広く全ての遺伝子型で応用できる可能性が示唆された。

E. 結論

プリオンの脳内投与ではコドン 129V/V のヒト型ノックインマウスでも高率に感染することが明らかとなった。129V/V のヒトでも vCJD なのか sCJD なのかを鑑別する方法を確立した。

F. 健康危機情報

平成 20 年度から始まった本研究で、我々は日本人に特徴的な codon 219Glu/Lys の遺伝子型が、sCJD を発病することはないものの、vCJD 感染には高い感受性を持つことを報告してきた。2010 年 Arch. Neurol. 誌で、英国の vCJD に 2 例 codon 219Glu/Lys をもつ症例が発病したこととの報告があった。英国ではこの遺伝子型はほとんど存在しない遺伝子型であるので、日本人は vCJD に感染しやすいことを再認識する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K.: Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. Acta Neurol Scand. 2010 Feb;121(2):127-30.

- 2) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T.: Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. J. Virol. 2010 ;84(7):3230-3238
- 3) Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto T.: Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 391(4):1681-1686
- 4) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. : A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. Microbiol Immunol. 2010 Feb;54(2):112-21.
- 5) Saito Y, Iwasaki Y, Aiba I, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y. : An autopsy case of MM2-cortical + thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 2010 (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

7. 非定型 BSE プリオンの「種の壁」の解析

研究分担者 横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者 舛甚賢太郎、岩丸祥史、今村守一、岡田洋之、毛利資郎
(動物衛生研究所 プリオン病研究センター)

研究要旨 BSE/JP24(L-BSE)プリオンを伝達したハムスターの初代の潜伏期は 576.8 日(発病率:75%)であったが、2代目では 208 日(発病率:100%)に短縮した。PrP^{Sc}の脳内での蓄積パターンおよび PrPcore の分子量はハムスター馴化 C-BSE プリオンと異なっていたが、空胞変性の分布およびプロテイナーゼ K 抵抗性 PrP 領域 (PrPcore) の糖鎖型は、C-BSE プリオンと類似していた。ハムスターに継代した L-BSE プリオンの一部の性状は C-BSE と類似したことから、非定型 BSE の不安定性が示唆された。

A. 研究目的

定型 BSE(C-BSE)およびマウス継代 BSE プリオンについて、各種トランスジェニックマウスでの潜伏期を指標としたプリオンの生物学的性状の解析ならびに異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的性状の変化を解析する手法を開発した (Yokoyama et al., 2009)。この手法を用いて、非定型 BSE(BSE/JP24 : L-BSE)の各種マウスへの伝達試験を行い、その性状を明らかにし、定型 BSE との相違点を明確にする。昨年度までの成果により、L-BSE はハムスターへの伝達性が示唆された。そこで、BSE/JP24 および C-BSE を継代したシリアンゴールドン・ハムスター (以下、ハムスター) の病態および脳内に蓄積した PrP^{Sc} の性状を比較解析した。

本研究により、わが国の非定型 BSE の性状が明らかとなり、リスク管理のための重要な知見が得られる。

B. 研究方法

L-BSE および C-BSE を、ハムスターに伝達試験を行い、潜伏期、病変分布、PrP^{Sc} の性状解析を行う。BSE 感染動物の飼育およびプリオンの解析は、動物衛生研究所内動物衛生高度研究施設 (BSL3)にて実施する。

C. 研究結果

前年度までの遺伝子改変マウスを用いた伝達試験の結果から、L-BSE プリオンのハムスターへの伝達性が示唆された。ハムスターへ BSE プリオンおよび L-BSE プリオンの接種を行い、その病態および PrPcore の性状を比較した。C-BSE プリオン (初代) を接種したハムスターの脳内に PrP^{Sc} の蓄積は認められなかったが、L-BSE プリオンは潜伏期 576.8 ± 127.8 日(3/4)、2代目の潜伏期は 208 日 (4/4)に短縮した。一方、ハムスタ

ーに馴化させたマウス継代 C-BSE プリオンの潜伏期は約 270 日であった。空胞変性の程度は、C-BSE の方が強かったが、L-BSE と C-BSE の間に空胞の分布に関して差は認められなかった。しかし、両者の PrP^{Sc} の蓄積パターンは異なっていた。生化学的検査では、PrPcore の糖鎖型はスクレイピー、C-BSE、L-BSE で差が認められなかったが、PrPcore の分子量はそれぞれのプリオンの特徴を維持していた。

D. 考察

遺伝子改変マウスの結果から、L-BSE プリオンの PrP^{Sc} 変換には、ハムスター PrP189-231 に存在する 3 か所のアミノ酸 (202I, 204I, 214T) または全長のハムスター PrP 配列が必要と考えられた。ハムスターは L-BSE に感受性を示し、C-BSE に抵抗性を示すことが示され、遺伝子改変マウスの結果が検証された。ハムスター伝達 L-BSE の性状の一部 (病変分布、PrPcore の糖鎖型) はハムスター伝達 C-BSE と類似していたが、他の性状 (PrP^{Sc} の蓄積パターン、PrPcore の分子量) は C-BSE とは異なっていた。継代に伴って認められる PrP^{Sc} の性状の不安定性が、L-BSE の特徴と考えられた。BSE/JP24 は C-BSE とは異なる起源と考えられる。

E. 結論

わが国の L-BSE は、C-BSE とは異なりハムスターへの伝達性を示した。ハムスターに伝達すると L-BSE の一部の性状を保持されたが、一部の性状は C-BSE 様に変化した。このことは、L-BSE の性状の不安定性を示していると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada H, Sato Y, Sata T, Sakurai M, Endo J, Yokoyama T, Mohri S.: Antigen Retrieval Using Sodium Hydroxide for Prion Immunohistochemistry in Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *J Comp Pathol.* 2010, PMID: 21112058
- 2) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S.: Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One.* 2010, 5(11):e15450.
- 3) Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Sato Y, Kono J, Sugiura K, Yokoyama T, Itohara S, Nakayama H, Yukawa M, Onodera T.: Enhanced enteric invasion of scrapie agents into the villous columnar epithelium via maternal immunoglobulin. *Int J Mol Med.* 2010, 26(6):845-51.
- 4) Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S.: Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS One.* 2010, 5(10): e13152.
- 5) Okada H, Masujin K, Imamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Czub S, Yokoyama T. :Experimental Transmission of H-type Bovine Spongiform Encephalopathy to Bovinized Transgenic Mice. *Vet Pathol.* 2010 PMID: 20921323
- 6) Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S.: Examination of the Offspring of a Japanese Cow Affected with L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Vet Med Sci.* 2011, 73(1): 121-3.
- 7) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Yokoyama T, Mohri S.: Immunohistochemical detection of disease-associated prion protein in the intestine of cattle naturally affected with bovine spongiform encephalopathy by using an alkaline-based chemical antigen retrieval method. *J Vet Med Sci.* 2010, 72(11):1423-9.
- 8) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T.: Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16(7):1151-4.
- 9) Nagaoka K, Yoshioka M, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S. : Sensitive detection of scrapie prion protein in soil. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 397(3):626-30.
- 10) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. : A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol.* 2010, 54(2):112-21.
- 11) Okada H, Sakurai M, Yokoyama T, Mohri S.: Disease-associated prion protein in the dental tissue of mice infected with scrapie. *J Comp Pathol.* 2010, 143(2-3):218-22.
- 12) Ushiki-Kaku Y, Endo R, Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Masujin K, Yamamoto T, Hattori S, Itohara S, Irie S, Yokoyama T.: Tracing conformational transition of abnormal prion proteins during interspecies transmission by using novel antibodies. *J Biol Chem.* 2010, 285(16):11931-6.
- 13) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T.: Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein. *Prion.* 2010 4(1):38-44.
- 14) An SS, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Zukic E, Ju YR, Yokoyama T, Kim SY, Welker E.: Differentiating blood samples from scrapie infected and non-infected hamsters by detecting disease-associated prion proteins using Multimer Detection System. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 392(4):505-9.
- 15) Gomi H, Yokoyama T, Itohara S.: Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. *Brain Res.* 2010, 1312:156-67.

2. 学会発表

- 1) Yokoyama T., and Ushiki-Kaku Y. Generation of conformation-specific anti-prion protein monoclonal antibodies by using prion protein-knockout mice. 2nd annual Congress of antibodies-2010, 24-26, March 2010, Beijing, China.
- 2) Yokoyama T. Advance in TSE diagnosis and updated global situation on TSE. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with NVRQS, MIFAFF, 24-26 February, 2010, Seoul, Republic of Korea
- 3) Yokoyama T. Advance in prion distribution. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine of Chiang Mai University, MIFAFF, 30 August-3 September, 2010, Cheng-mai, Thailand.
- 4) Yokoyama T., Okada H., Iwamaru Y., Imamura M., Masujin K., Matsuura Y., Mohri S. Limited neuroinvasion of CH1641-like prions in sheep. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, 2010. 24-25 July, 2010. Sapporo, Hokkaido.
- 5) Yokoyama T. Masujin K., Schmerr M.J., Yujing S., Okada H., Iwamaru Y., Imamura Y., Matsuura Y., Murayama Y., Mohri S. Intra- and inter-species prion transmission results in selection of sheep scrapie strains 8-11 September, 2010, Prion2010, Salzburg, Austria.
- 6) Yokoyama T., Masujin K., Yujing, S., Okada H., Iwamaru Y., Imamura M, Matsuura Y. Mohri S. Species barrier of BSE in rodent model. Prion Japan & Canada, 11-12, November, 2010, Tokyo, Japan.
- 7) Yokoyama T. A challenge to elucidate the existing enigmas of prion diseases-bovine spongiform encephalopathy and scrapie. International research on epidemiology of zoonosis and training for young researcher. 18 December, 2010, Fujisawa, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2004-226164 プリオン蛋白質に特異的に結合する核酸分子

2. 実用新案登録

なし

8. 非定型 BSE の高感度検出法の開発

研究分担者 村山 裕一 動物衛生研究所 プリオン病研究チーム

研究要旨 非定型 BSE (A-BSE)は、BSE の起源や定型 BSE (C-BSE) 撲滅後のリスク管理を考える上で重要な事例である。したがって、食の安全性確保には C-BSE のみならず、A-BSE 由来異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度検出技術の開発が必要である。本課題では、A-BSE PrP^{Sc} の高効率試験管内増幅法を開発することを主な目的とする。本年度は、デキストラン硫酸化合物を用いた PMCA 法を A-BSE 由来の牛 PrP^{Sc} の増幅に応用したところ、バイオアッセイを上回る感度で A-BSE 牛 PrP^{Sc} が検出可能になった。また、昨年度までに開発したカニクイザル PrP^{Sc} の超高感度検出法を用いて、vCJD 霊長類モデルにおける脳脊髄液や血液を用いた生前診断を可能にした。

A. 研究目的

非定型 BSE (A-BSE) は、プロテアーゼ切断点や病態、感染力が定型 BSE (C-BSE) と異なっており、BSE の起源や BSE 撲滅後のリスク管理を考える上で重要な事例である。C-BSE が食品を介して牛からヒトに感染したと考えられる例(vCJD)の他に、A-BSE も霊長類 (カニクイザル) に対して感染性を示し、その感染力は C-BSE よりも強い可能性が明らかになっている。したがって、畜産分野のみならず、食の安全性確保のためにも、定型、非定型両 BSE 由来異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc}) の超高感度検出技術の開発が必要である。本課題では、特に A-BSE PrP^{Sc} の高効率試験管内増幅法を開発することを目的とする。

また、霊長類を用いた感染モデルは、C-BSE 感染による vCJD の発症機序や病態を解明する上で、優れた動物モデルである。本課題では上記目的に加えて、C-BSE 増幅法を霊長類由来 PrP^{Sc} の増幅に応用し、高効率増幅法を開発するとともに、感染ザルにおける PrP^{Sc} の分布や動態を解析し、生前診断・早期診断への応用可能性を検討することを目的とする。

本年度は、A-BSE 由来牛 PrP^{Sc} 増幅法の改良を行った。また、カニクイザル vCJD モデルにおいて、脳脊髄液や血液を用いた生前診断が可能か検討するため、感染ザルサンプルを追加・解析した。

B. 研究方法

1) A-BSE 由来 PrP^{Sc} の増幅

我が国 24 例目(BSE/JP24)の感染個体由来脳乳剤を牛に脳内接種して得た、10%脳乳剤を希釈し、PMCA シードとして用いた。C-BSE 由来牛 PrP^{Sc} の増幅に有効なデキストラン硫酸カリウム(DSP)-PMCA 法を用いて、増幅条件を改変し、最適化を試みた。

2) BSE 感染カニクイザル由来サンプル

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで作出された BSE 実験感染ザル 2 頭(#10 および#11)を解析した。BSE 感染牛脳乳剤をカニクイザルに脳内接種し、体液 (血液、脳脊髄液) を経時的に採取した。安楽死後、解剖時に採材された各組織および体液類を霊長類医科学研究センターより導入した。

3) BSE 感染カニクイザルにおける PrP^{Sc} の分布

発症カニクイザルの各組織から 10%乳剤を作製し、シードとして用いた。カニクイザル PrP^{Sc} は DSP-PMCA 法により増幅し、ウェスタンブロット法で解析した。また、体液類における PrP^{Sc} の動態も解析した。

C. 研究結果

1) A-BSE 感染牛由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅

昨年度まで、PMCA 産物を希釈・再増幅を繰り返す連続 PMCA を用いても、PrP^{Sc} の検出限界は 10⁻⁴ 希釈サンプルまでであった。本年度は増幅条件を改変することにより、10⁻⁷ に希釈したサンプルからラウンド 5 で PrP^{Sc} シグナルが検出可能になり、検出感度は 1,000 倍に向上した。

2) BSE 感染カニクイザルにおける PrP^{Sc} の分布・動態

昨年度解析した#7 サルと同様、#10 および#11 サルでは、末梢神経、脾臓、扁桃およびリンパ節など調べたすべての組織から PrP^{Sc} が検出された。また脳脊髄液中の PrP^{Sc} は#7 サルと同様、両サルにおいても神経症状が認め始められる感染初期から検出され、症状の進行とともに PrP^{Sc} 量が増加する傾向があった。

末梢リンパ球分画の PrP^{Sc} は、#7 サルでは死亡時に検出されることを昨年度明らかにした。死亡まで約5年を要した#11 サルでは、同様に発症中期に採取したリンパ球分画からも PrP^{Sc} を検出したが、#10 サルでは死亡時においても検出されなかった。

D. 考察

JP24 感染牛由来脳乳剤中の PrP^{Sc} に関しては、DSP-PMCA 法を用いることにより、バイオアッセイを上回る検出感度を達成した。しかしながら、連続 PMCA の初期段階における増幅効率は低く、超高感度検出には至らなかった。A-BSE PrP^{Sc} の効率的増幅には、C-BSE PrP^{Sc} の増幅に有効な要因に加えて、未知の因子が必要である可能性が高い。今後、新たな視点から増幅法の開発に取り組む必要がある。

一方、vCJD 霊長類モデルにおいて DSP-PMCA 法は、カニクイザル PrP^{Sc} の増幅に極めて有効であることを示した。C-BSE 感染牛脳乳剤を脳内接種したサル3頭では、調べたすべての末梢組織から PrP^{Sc} が検出され、脳脊髄液や血液など体液類からも PrP^{Sc} を検出可能であった。3例とも発症初期から脳脊髄液 PrP^{Sc} が検出され、本法により生前診断が可能であることが判明した。一方、血液中の PrP^{Sc} には個体差が認められた。3例中2例では、発症中期以降もしくは死亡時に採取された末梢リンパ球から PrP^{Sc} が検出されたが、他の1例では検出されなかった。また、血漿中の PrP^{Sc} は3例とも陰性であった。カニクイザル末梢リンパ球の分離はヒトに比べて良好でなく、実際血液から回収したリンパ球分画には赤血球等が多く混入していた。血漿サンプルに関しては、夾雑蛋白質による非特異的シグナルが高く、シード量をあまり上げられないという問題がある。発症前診断を実現するには、増幅法の開発

に加えて、サンプル調整法の確立も不可欠である。

E. 結論

デキストラン硫酸化合物を用いた PMCA 法を応用することによって、バイオアッセイを上回る感度で非定型 BSE(JP24) PrP^{Sc} が検出可能になった。また vCJD 霊長類モデルにおいて、カニクイザル PrP^{Sc} の超高感度検出法を適用し、脳脊髄液や血液を用いた生前診断を可能にした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y: Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor-dependent stimulation pathway required for generation of baculovirus-derived recombinant scrapie prion protein. *J. Virol. in press.*
- 2) Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S: Examination of the offspring of a Japanese cow affected with L-Type bovine spongiform encephalopathy. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73(1):121-123.
- 3) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S: Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One* 2010, 5(11):e15450.
- 4) Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S: Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP^{Sc} and enable ultrasensitive detection of bovine PrP^{Sc}. *PLoS One* 2010, 5(10):e13152.
- 5) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T: Accumulation of L-type bovine

prions in peripheral nerve tissues. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, 16(7):1151-1154.

- 6) Nagaoka K, Yoshioka M, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S: Sensitive detection of scrapie prion protein in soil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 397(3):626-630.

2. 学会発表

- 1) 岩丸祥史、竹之内敬人、清水善久、今村守一、村山裕一、横山隆、木谷裕：P2X7 受容体阻害剤 Brilliant Blue G は持続感染細胞におけるプリオン増殖を阻害す。 *Biochemistry and Molecular Biology 2010* (神戸) 2010.12.8.
- 2) 村山裕一：プリオンの試験管内増殖法の研究。プリオン病の市民講座 食と医療の安全-BSE、ヤコブ病、鳥インフルエンザ、口蹄疫- (東京) 2010.11.23.
- 3) Iwamaru Y, Fukuda S, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Murayama Y, Shimizu Y, Kasai K, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T: Intraspecies transmission of atypical BSE detected in Japan. *Prion, Japan & Canada* (Tokyo) 2010.11.12.
- 4) Tsutsumi Y, Bang H, Murayama Y, Yoshioka M, Noguchi T: Recycling of bovine meat and bone meal by sub-critical water. *Prion, Japan & Canada* (Tokyo) 2010.11.12.
- 5) Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y: Baculovirus-derived protease-resistant prion protein generated *in vitro*. *Prion, Japan & Canada* (Tokyo) 2010.11.11.
- 6) Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S: Sensitive detection of bovine PrP^{Sc}. *Prion, Japan & Canada* (Tokyo) 2010.11.11.
- 7) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S: Intra- and inter-species prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *Prion 2010* (Salzburg) 2010.9.9.
- 8) Ono F, Yamakawa Y, Tobiume M, Sato Y, Katano H, Hagiwara K, Itagaki I, Hiyaoka A,

Komatuzaki K, Emoto Y, Shibata H, Murayama Y, Terao K, Yasutomi Y, Sata T: Transmission of classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to cynomolgus macaques. *Prion 2010* (Salzburg) 2010.9.9.

- 9) Iwamaru Y, Fukuda S, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Murayama Y, Shimizu Y, Kasai K, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T: Atypical BSE. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases* (Sapporo) 2010.7.25.
- 10) Nagaoka K, Yoshioka M, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S: Sensitive detection of scrapie prion protein in soil. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases* (Sapporo) 2010.7.24.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

9. 食肉検査における高感度検査法の開発

研究分担者 新竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染分子解析学

研究協力者 佐野和憲 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

西田教行 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究要旨 BSE 由来異常型プリオンタンパクの高感度検査法を開発するため我々は、すでにヒトプリオン病に対して確立した高感度検査法 (Real-time QUIC 法) を BSE に対して最適化するための条件検討を行ってきた。感度の向上はみられたが、現時点での感度は依然実用レベルには達していないため、今後さらに別の条件を検討し、最適化を図る予定である。

A. 研究目的

感染性ではなく孤発性に発症すると考えられている非定型 BSE の存在が明らかとなり、BSE によるヒトへの感染の危険性はいまだ完全に無くなっていない状況である。本研究では、分担研究者らが新規に開発した異常型プリオンタンパク試験管内増幅法 (QUIC 法: QUaking-Induced Conversion) を用いて、BSE 感染牛の組織・髄液・血液などに含まれる、通常では検出できない微量の異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を検出が容易なレベルまで増幅することにより、BSE の高感度検査法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (rPrP) の精製

ウシ PrP 配列の発現ベクターを作製後、大腸菌に transformation し、発現誘導する。PrP の N 末側には銅結合領域があり、ヒスチジンタグがなくても金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製可能である。大腸菌に rPrP を発現させると封入体を形成するため、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで徐々に勾配させて rPrP を refold させた後、イミダゾールにより溶出する。イミダゾールは透析により除去する。精製した rPrP は小分けして急速凍結し -80°C で保存し、使用直前に融解して用いる。

2) BSE に対する QUIC 反応の最適化

これまでの研究により QUIC 法では、rPrP-sen

(Protease-sensitive rPrP) から rPrP-res (Protease-resistant rPrP) への変換が高い効率で起こるには界面活性剤や変性剤を一定量加える必要があり、その種類と濃度が大きな影響を与えることを研究分担者らは見出している。これらの結果は rPrP-sen が部分的に unfold した状態の場合に rPrP-res への変換が促進されることを示すものと考えられる。また間欠的な超音波処理や攪拌を行うことで PrP-res 凝集体が断片化され、増幅反応の核 (シード) の量が増え反応が劇的に促進されることも判明した。病原体プリオンには同種の動物に接種しても潜伏期の長さや病理像の異なる“株”が存在することが知られており、それぞれの株の PrP-res の構造の違いがその主因であるとする仮説が有力である。研究分担者らは異なるプリオン株 (ハムスター、マウス由来) では変換への最適条件 (前述したような界面活性剤・変成剤の種類や濃度、超音波・攪拌の強さや継続時間など) が違うことを発見している。そのため、BSE でもすでに増幅に成功したハムスタープリオン 263K 株の系とは異なる条件が要求されることが予想されるため、様々な試行を行い、反応のパラメータを決めていく必要がある。また、アミロイド線維と結合すると強い蛍光を発するチオフラビン T (ThT) はアミロイド線維の検出試薬として用いられるが、研究分担者らは、ThT が rPrP-res にも反応することを確認している。この ThT 試薬と攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを組み合わせれば、ほぼ real time に rPrP-res の増幅過程が測定可能なアッセイ系を開発することが

可能となった (Real-time QUIC)。

最適条件検討の際には、反応のシードとして BSE 感染牛脳乳剤を用い、negative control として非感染牛脳乳剤を用いる。最適条件決定の後には BSE 感染牛由来の髄液中の PrP^{Sc} の検出を試みる予定である。

(倫理面への配慮)

BSE 感染牛脳乳剤は、国立感染症研究所感染病理部より、髄液は北海道立畜産試験場基盤研究部より共同研究として提供される。それらは牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し、許可を得たものである。

C. 研究結果と D. 考察

これまでの研究では、rPrP-sen から rPrP-res への変換が高い効率で起こるには界面活性剤や変成剤を一定量加える必要があると考えられていたが、CJD 脳乳剤を用いた検討により、界面活性剤や変成剤を用いない方がシードに対する検出感度、特異度が高いことを明らかにした (図 1)。

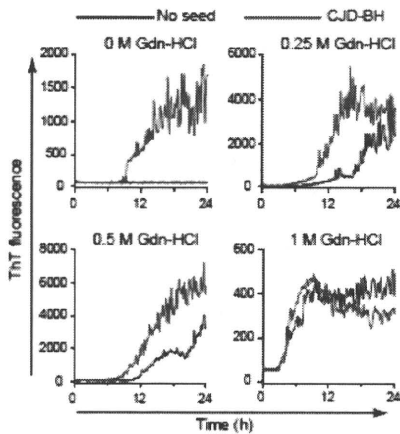


図1 Real-time QUIC法におけるCJD脳乳剤による rPrP-res 形成に対するグアニジン塩酸塩の影響

そこで、BSE 感染牛脳乳剤を用いた検討においても界面活性剤、変性剤なしの条件で検討を行った。

まず、rBoPrP (recombinant bovine PrP) 濃度変化による BSE 感染牛脳乳剤の検出感度・特異度を検討した。シードは、 5×10^{-6} 希釈した BSE 感染牛脳乳剤を用いた。2.5 μ g rBoPrP を用いた場合、シードなしの条件でも自然発生的に rPrP-res が早期より形成されてしまい、検出特異度が無かった。5, 10 μ g rBoPrP を用いた場合は、シード特異的に rPrP-res が形成され、また、5 μ g の方が検出感度、特異度とも高いことが分かった (図 2)。

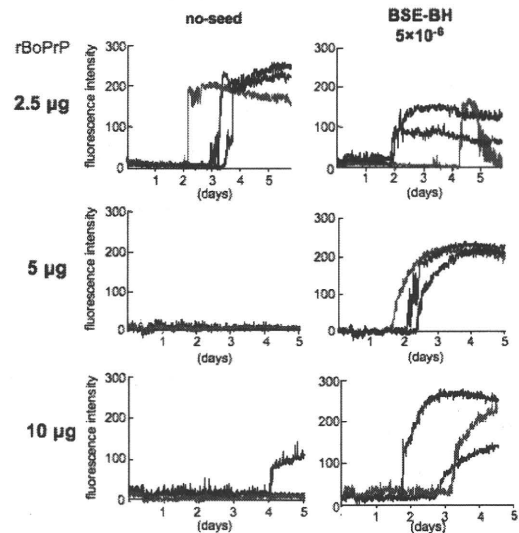
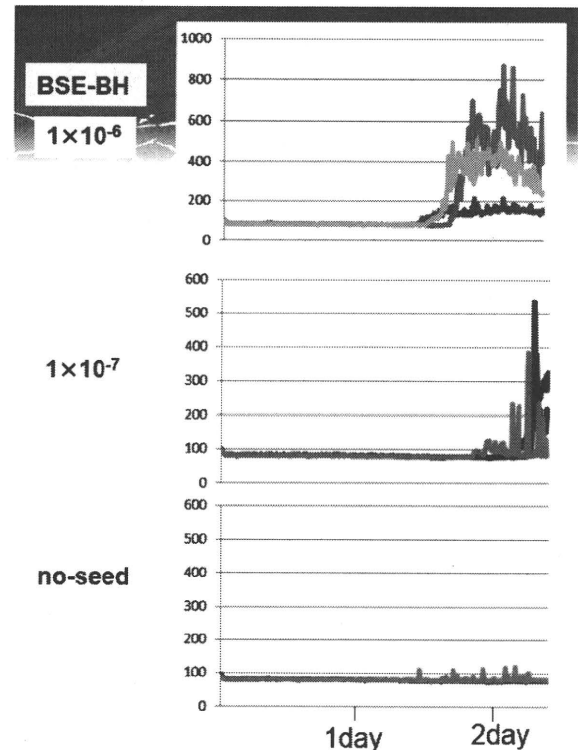


図2 Real-time QUIC法におけるrBoPrP濃度変化の影響

しかしグアニジン塩酸塩なしの条件ではそれ以上感度を上げることが難しいと考えられてため、再度グアニジン塩酸塩を加えて Real-time QUIC 法を行った。その結果今まで陽性となることがなかった 1×10^{-7} の濃度において ThT の上昇が観察された (下図)。



E. 結論

Real-time QUIC 法により、BSE 感染牛脳乳剤の検出に成功した。しかしながら、現在の条件では検出感度、特異度がまだ低いことが明らかとなっ

た。今後、さらに反応液中のグアニジン塩酸塩濃度、pH、塩濃度、EDTAなどの因子の条件検討を行うことによって、検出感度、特異度を改善し、実用的なアッセイを確立したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine*, 2011 Jan 30.[Epub ahead of print]
- 2) Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B: Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathogens*, 2010 Dec 2;6(12):e1001217.
- 3) Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK: Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*, 2010; 285(19):14083-7

2. 学会発表

- 1) 新竜一郎 第15回日本神経感染症学会(招待講演:シンポジウムI「プリオン病の疫学から治療まで」) 平成22年10月8日・福島
- 2) 新竜一郎 Prion2010 Diagnosis, therapy and decontamination: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion. 平成22年9月9日・オーストリア(ザルツブルグ)
- 3) 新竜一郎 Asia-Oceania Symposium on Prion diseases 2010 Hot topics: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion. 平成22年7月25日・札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

10.プリオンの細胞および組織における病理学的研究

研究分担者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所・感染病理部

研究協力者 飛梅 実 (国立感染症研究所・感染病理部)

松田 潤一郎 (医薬基盤研究所・疾患モデル小動物研究室)

研究要旨 プリオン感染に感受性および非感受性培養細胞株の比較検討から、両細胞間で発現に差異のある *Peripherin* を同定した。*Peripherin* 高発現培養細胞および *Peripherin* 過剰発現トランスジェニックマウスを用いたプリオン感染実験を行い、プリオン感染に与える *Peripherin* の影響について解析した。培養細胞を用いた検討から *Peripherin* はプリオン感染成立に直接の影響を与えなかったが、細胞内へのプリオン取り込みを増強させる事が示唆された。また、*Peripherin* 過剰発現トランスジェニックマウスへの BSE 由来プリオン接種実験では病期の短縮が認められた。これらのことから、今回同定された宿主因子 *Peripherin* は、プリオンの細胞への取り込みを増強することでプリオン感染成立を促進させ、プリオン病態の進行に関与すると考えられた。

A. 研究目的

感染・伝達性を有するプリオン (PrP^{Sc}) およびその正常型である PrP^{C} の性状に関する知見は蓄積されつつあるが、その機能の解明には至っていない。また、さまざまな細胞種をノックアウトしたマウスの解析から特定の分子が外来 PrP^{Sc} の取り込み及び感染成立に必要なことが推察されているが、その分子の同定には至っていない (*Nature* 390, 687-690, Klein et al)。これらに関与する分子を同定することは、感染初期の防御法を開発する上で非常に重要である。本研究では、 PrP^{Sc} に感受性および非感受性細胞株を用いた比較解析から PrP^{Sc} への感受性に関与する分子の同定を進め、 PrP^{Sc} の細胞内への取り込みから感染成立までの機序の解析を行う。さらに、同定した分子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、病態の解析とともに病原性診断への応用を図る。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrP^{Sc} の感染成立および増幅が可能な細胞株として知られている。この N2a 細胞のサブクローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、 PrP^{Sc} に対し非感受性または高感受性細胞株として北大・堀内教授らのグループにより樹立された。本研究では、これらの細胞株を用いた比較検討から PrP^{Sc} の感染成立に関与する生体側分子を同定し、その作用機序について解析する。

1) プリオン高感受性細胞に高発現している分子の同定

解析には Fluorescence 2D Difference Gel

Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた。蛍光色素 Cy2 で標識された N2a-1 細胞溶解液、Cy3 で標識した N2a-5 細胞溶解液、および Cy5 により標識された等量の N2a-1 および N2a-5 細胞溶解液を調整し 2 次元電気泳動を行った。タンパク質スポットの蛍光輝度を指標として、N2a-1 および N2a-5 細胞間で発現に差異のあるタンパク質を検索した。アミノ酸配列の検索には LC/MS 解析を行った。同定された分子の各 N2a 細胞での発現については WB 法を用いて確認した。

2) プリオン取り込み量との関係

N2a 細胞の外来 PrP^{Sc} 取り込み量に与える *Peripherin* の関与について検討した。細胞培養液中へ添加する PrP^{Sc} として、マウス順化 BSE/JP6 株感染マウス脳乳剤を用いた。200ug 及び 400ug 組織当量の脳乳剤を N2a-1 および N2a-5 細胞へ添加し 24 時間後の細胞内へ取り込まれた PrP^{Sc} 量を抗プリオン抗体 (44B1) を用いてウエスタンブロット法により測定した。また、*Peripherin* 発現プラスミドのトランスフェクションにより過剰発現させた細胞を作成し、同様に取り込まれた PrP^{Sc} 量を測定した。検出された PrP^{Sc} が新たにコンバージョンされたものか、添加された PrP^{Sc} に由来するものかについて検討するため、添加された PrP^{Sc} には存在しない 3F4 エピトープを有する PrP^{C} 発現を発現するベクターをトランスフェクションした細胞へも同様に脳乳剤を添加し、3F4 エピトープを認識する抗体を用いて PrP^{Sc} を検出した。

3) プリオン添加時における細胞内での *Peripherin* の動態

Peripherin は typeIII 中間フィラメントでその機能の詳細は不明である。PrP^{Sc} の取り込みに際しての細胞内での局在を観察するため、Peripherin と PrP^{Sc} の蛍光標識 2 次抗体を用いた 2 重染色法を行い、両分子の局在について観察した。

4) Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスへの BSE 由来プリオンの投与

マウス順化 BSE/JP6 株感染マウス脳乳剤を C57BL6 及び Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウス脳内へ接種し、Peripherin の発現とプリオン病の進行の関係について解析した。Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスは医薬基盤研・松田潤一郎博士研究室により CAG プロモーターにより発現される全身過剰発現系として作製されたマウスを用いた。

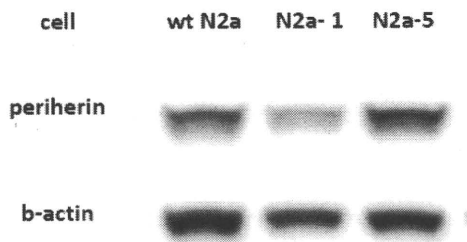
(倫理面への配慮)

動物を用いる実験に関して国立感染症研究所・実験動物委員会の定める規程を遵守するとともに、動物愛護法に基づいた配慮を行う。

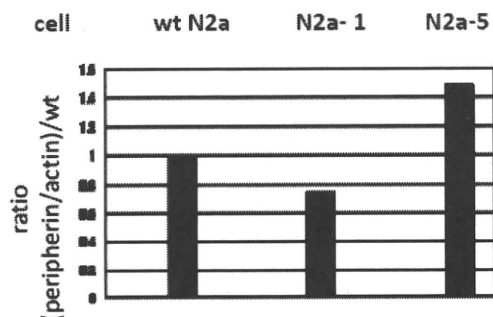
C. 研究結果

1) 2 次元電気泳動法である 2D DIGE を用いた検討の結果、N2a-1 および N2a-5 細胞間で発現に差異のある分子として Peripherin を同定した。Peripherin の発現は N2a-5 細胞で多く、N2a-1 では少ない。N2a 親細胞での Peripherin 発現量は N2a-5 と N2a-1 の中間に位置していた。結果を下に示す。

a



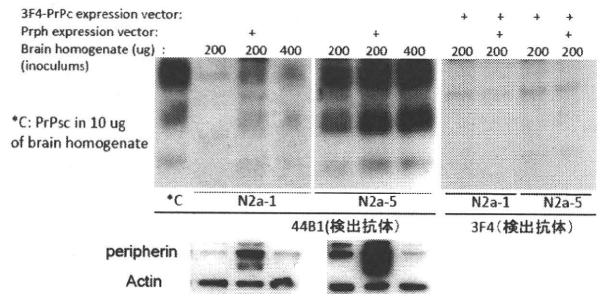
b



a: ウエスタンブロットによる Peripherin の発現

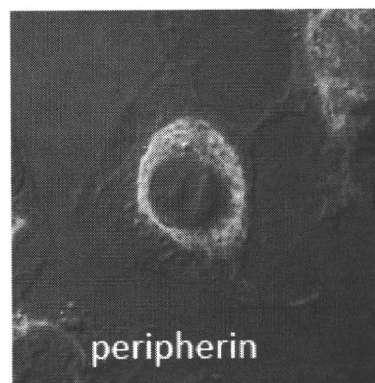
確認。b: ウエスタンブロットの結果を数値化し、N2a 親細胞 (wtN2a) を 1 とした場合の N2a-1 および N2a-5 細胞の Peripherin の発現量比。

2) N2a-5 および N2a-1 細胞にマウス順化 BSE/JP6 株感染マウス脳乳剤を添加し、24 時間後の細胞内へのプリオンの取り込み量を計測した。N2a-1 及び N2a-5 細胞へ Peripherin または及び 3F4 エピトープタグをもった PrP^C 発現ベクターをトランスフェクションし 12 時間後に脳乳剤を添加した。結果を下に示す。



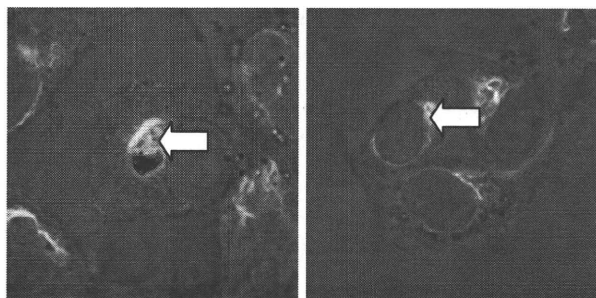
プリオン添加 24 時間後の細胞内への取り込み量は N2a-5 細胞が N2a-1 細胞に比べ優位に多かった。また、Peripherin の過剰発現により N2a-1 および N2a-5 細胞においてプリオン取り込みの増強が認められた。3F4 エピトープタグ含有 PrP^C 発現細胞において抗 3F4 抗体に反応するプリオンが検出出来なかったことから、検出されたプリオンは新たにコンバージョンされた PrP^{Sc} ではなく、細胞内へ取り込まれたプリオンを検出したものであることを確認した。

3) ホルマリン固定した N2a-5 細胞を抗 Peripherin モノクローナル抗体を用いて蛍光染色し、Peripherin の局在を観察した。結果、Peripherin はフィラメント様に細胞質内に局在していた (下図)。



N2a-5 細胞へマウス順化 BSE/JP6 株感染マウス脳乳剤を添加し 24 時間後の Peripherin 及びプリオンの局在を同様に検討したところ、細胞内へプリオンの進入が認められる細胞では、核近傍に存

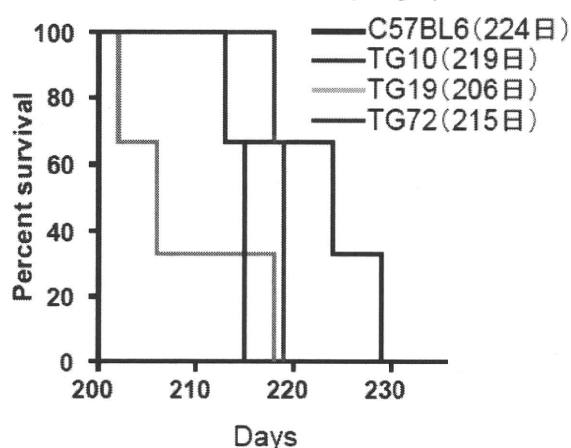
在するプリオンを取り囲む様に Peripherin が凝集する像を認めた (下図)。



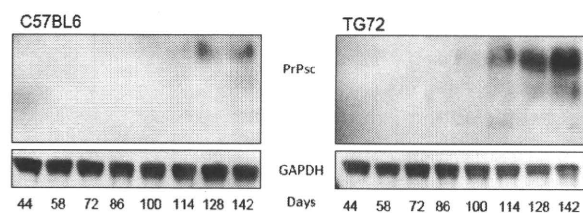
矢印：プリオンの存在部位

4) Peripherin 高発現トランスジェニックマウスを作成し、本邦で分離、マウスで継代された BSE/JP6 株を感染材料とした。マウス順化 BSE/JP6 株感染マウス脳乳剤を 0.02% に希釈し 25ul を脳内に接種し、その後の生存曲線を下に示す。

Survival after infection (Days)



Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスでは C57BL6 マウスに比べ病期の短縮が認められた。また、プリオン脳内接種後の経時的なプリオン蓄積状況の観察からは、Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスでは早期からプリオンの脳内への蓄積を認めた (下図)。



C57BL6: コントロールマウス

TG72: Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウス

D. 考察

PrP^{Sc} に高感受性の N2a-5 および非感受性の N2a-1 細胞の比較検討から、発現に差異のある分子として peripherin を同定し、プリオン感染における関与について検討を行った。結果、Peripherin の発現が多いほど外来プリオンの細胞への取り込み量が増加することが分かった。しかし、取り込み量の増加とプリオン持続感染成立の相関性は認められなかった。細胞内での Peripherin の局在はプリオンが存在しない場合、細胞質の細胞骨格に沿った局在を示した。しかし、その局在はプリオンが存在することで破綻し、核周囲に存在するプリオンを取り囲む様な存在様式に変化する事が明らかとなった。Peripherin の機能として細胞内外の分子の輸送に関与していることが報告されており、プリオンの輸送にも関与していることが示唆された。また、Peripherin トランスジェニックマウスへの感染実験では、病期の短縮と早期からのプリオンの蓄積が認められた。この結果は *in vitro* で認められたプリオンの細胞内への取り込み増強能と同様に *in vivo* においても Peripherin が過剰に存在することで外来プリオンの取り込みを増強することが示唆された。

E. 結論

今回我々が解析した Peripherin はプリオンの生成そのものを制御するのではなく、外来性プリオンを細胞内、生体内へ効率よく取り込むことで新たなプリオンの生成を促進していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 英文論文発表

- 1) Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Nishijima M, Hanada K, Hagiwara K.: Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator protein-2 in a murine model of prion diseases. *Proteome Sci.* 2010 Oct 20;8:53.
- 2) Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H.: Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology.* 2010 Nov 9. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01158.x. [Epub ahead of print]
- 3) Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K,

Nishida N, Shiga Y, Eguhchi K, Shirabe S, Sata T.: Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. Lab Invest. 2010 Nov;90(11):1637-44

- 4) Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Terao K, Sata T.: Atypical L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy (L-BSE) Transmission to Cynomolgus Macaques, a Non-Human Primate. Jpn J Infect Dis. 2011 Jan;64(1):81-4.
- 5) Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T.: Experimental Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) to Cynomolgus Macaques, a Non-Human Primate. Jpn J Infect Dis. 2011 Jan;64(1):50-4.
- 6) Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T. : Predominant Involvement of the Cerebellum in Guinea Pigs Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). J Comp Pathol. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]
- 7) Okada H, Sato Y, Sata T., Sakurai M, Endo J, Yokoyama T, Mohri S.: Antigen Retrieval Using Sodium Hydroxide for Prion Immunohistochemistry in Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. J Comp Pathol. 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 8) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T., Mohri S, Okada H, Yokoyama T.: Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. Emerg Infect Dis. 2010 Jul;16(7):1151-4..
- 9) Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T., Schätzl H, Doh-ura K.: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. FEBS Lett. 2010 Mar 19;584(6):1193-8. Epub 2010 Feb 14.
- 10) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki K, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T., Nakajima N.: ImmunoAT method: An initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. J Virol Methods. 2010 May;165(2):261-7. Epub 2010 Feb 10.

2. 学会発表

- 1) 飛梅 実, 黒澤 明日香, 佐多 徹太郎・プリオン感染に関わる生体側因子の探索・日本ウイルス学会総会・徳島市あわぎんホール・2010. 11. 7
- 2) Minoru Tobiume, Asuka Kurosawa, Yoshio

Yamakawa, Tetsutaro Sata・Proteomic analysis of N2a neuroblastoma cell clones・Prion2010 Salzburg・2010.9.9-11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

11. トランスクリプトームによるプリオン病の病態解析 (プリオン感染 CD14 遺伝子欠損マウスにおける病態解析)

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究協力者 長谷部 理絵 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

研究要旨 CD14 欠損(CD14^{-/-})マウスでは、プリオン Obihiro 株および Chandler 株を接種した場合、野生型(WT)マウスと比較して有意に生存期間が延長することから、特にミクログリアを中心に CD14^{-/-}マウスの脳における病態を解析した。感染後 60-90 日では、抗炎症性サイトカインの IL-10 および TGF-β は主にミクログリアと思われる CD11b⁺陽性細胞が産生していた。感染後 120 日になると、ミクログリアに加えて神経細胞でも産生が認められたが、アストロサイトでは産生が認められなかった。IL-10 がミクログリアで産生されていたことから、プリオン感染マウス脳内では、感染後早期からミクログリアの少なくとも一部は alternative deactivation と呼ばれる脱活性化状態にある可能性が示唆された。プリオン感染 CD14^{-/-}マウスでは、WT マウスよりも早期から抗炎症性サイトカインである TGF-β や IL-10 の発現が亢進しており、生存期間が延長することから、CD14 分子はミクログリアの活性化や抗炎症性サイトカイン産生の制御、および抗炎症性サイトカインに対する応答の制御を通じてプリオン病の病態進行に関与すると考えられた。

A. 研究目的

プリオン病における病態機序を解析する目的で、プリオンの増殖により引き起こされる宿主の応答、特に感染後早期におこる宿主遺伝子の発現変化を DNA マイクロアレイ法により解析してきた。プリオン接種後比較的早期から発現が上昇した遺伝子の中から、Toll-like receptor 2/4 とともに LPS レセプターとして働き、自然免疫に関与する CD14 分子に着目し、CD14^{-/-}マウスを用いた感染実験を行った。その結果、CD14^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して有意に潜伏期が延長すること、ミクログリアがより活性化していること、および IL-10 および TGF-β などの抗炎症性サイトカインの産生が感染早期から亢進していることを見出した。そこで、これらのサイトカインがプリオン病の病態にどのように関与するかを調べる目的で、IL-10 および TGF-β を産生する細胞種、および出現領域と時期の解析を行った。

B. 研究方法

1) マウスおよびプリオン株

CD14^{-/-}マウス (congenic line) は Jackson Laboratories から購入した。対照となる C57B6/J マウス(WT マウス)は日本クレアから購入した。これらのマウスには Obihiro 株および Chandler 株感染 C57B6/J マウスの脳乳剤(2.5%, 20 μl)を脳内

接種した。

2) バイオアッセイによるプリオン感染価の評価

CD14^{-/-}マウスと WT マウスの脳におけるプリオン感染価を比較するために、プリオン接種後、60 dpi、90 dpi、120 dpi の脳を採材して、1%脳乳剤を作製した。これを tga20 マウスに接種して、生存期間を測定した。

3) ミクログリアの分離

マウス脳を Neural tissue dissociation kit (Milteni biotech) で消化し、percoll による密度勾配遠心で、ミエリンを除去して細胞を回収した。細胞に磁性体標識抗 CD11b 抗体 (Milteni biotech) を加え、氷上で 15 分反応させた。遠心により結合していない磁性体標識抗 CD11b 抗体を除去した後、MACS separation column を通過させた。未吸着の画分を回収するとともに(CD11b⁻)、吸着した画分をカラムから回収した(CD11b⁺)。

4) 定量 RT-PCR

分離回収した細胞から Torizlo 試薬 (Invitrogen) により totalRNA を回収し、First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare)を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、TaqMan probe および TaqMan Master Mix からなる反応液を作製して、ABI7900 リアルタイム PCR 装置を用いて、定量解析を行なった。TaqMan probe は Gene Expression

Analysis(Applied Biosystem)のライブラリーより購入した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。 $\Delta\Delta C_T$ 法により遺伝子発現の比較定量解析を実施した。

5) 間接蛍光抗体法(Indirect immunofluorescence assay, IFA)

凍結切片を、一次抗体として抗 CD11b 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 IL-10 抗体、pan-neuronal marker(神経細胞マーカーに対する抗体の混合物)、二次抗体として Alexa Fluor 488 F (ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)、Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (H+L) で染色した。VECTASHIELD Mounting Medium で封入し、蛍光レーザー顕微鏡システム LSM-700 (Zeiss) により検鏡した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている(実験番号 2010-1-41)。また、動物実験は北海道大学大学の実験動物委員会にて承認された動物実験計画書(実験番号 09-0103, 09-0104, 09-0105)に従って実施した。

C. 研究結果

1) CD14^{-/-}マウス脳におけるプリオンの増殖

Chandler 株感染マウスで接種後 120 日の時点でのプリオン感染価を WT と CD14^{-/-}マウスで比較した場合、WT マウス (n=2) で tga20 マウスの生存期間が 60.0 ± 2.4 および 58.8 ± 3.4 日であったのに対し、CD14^{-/-}マウス (n=2) で 62.0 ± 2.8 および 60.3 ± 1.7 日であった。CD14^{-/-}で tga20 マウスの生存期間が若干延長していたが、有意差は認められなかった。一方、Obihiro 株感染マウスの接種後 120 日では、WT マウス (n=2) で tga20 マウスの生存期間が 85.3 ± 3.3 および 89.3 ± 2.9 日であったのに対し、CD14^{-/-}マウス (n=2) で 91.0 ± 7.7 および 93.4 ± 4.2 日であった。僅かな差ではあるが有意な差であることから(p = 0.028)、Obihiro 株感染マウスの接種後 120 日の脳内のプリオン感染価は CD14^{-/-}で若干低いと考えられる。従って、CD14^{-/-}マウスでは WT マウスに比べてプリオンの増殖あるいは蓄積が若干遅いことが示唆された。

2) ミクログリアの分離と IL10 および TGF- β 産生細胞の解析

プリオン感染 CD14^{-/-}マウスでは、接種後 60 日から IL-10 陽性細胞が認められたことから、プリオン感染マウスの脳内で IL-10 を産生する細胞の

同定を行った。脳組織を酵素で消化後、磁性ビーズにより CD11b 陽性細胞と CD11b 陰性細胞を分離した。CD11b 陽性細胞の精製度は 70%程度であった(図 1)。プリオン感染マウスから回収した CD11b 陽性細胞では IL10 の mRNA は非感染マウスの 3-4 倍程度発現しており、CD11b 陰性細胞では IL-10 mRNA の発現は非常に低かったことから、プリオン感染マウスの脳内では、IL-10 は主に CD11b 陽性細胞のミクログリアが産生することが明らかとなった。TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインも CD11b 陽性細胞が産生することが確かめられた。

接種後 60 日の時点では、プリオン感染 WT マウスと比べて CD14^{-/-}マウスでは、主に視床と脳梁で IL-10 陽性細胞が多い傾向が認められた。蛍光 2 重染色の結果、ミクログリアと思われる CD11b 陽性細胞で IL-10 が発現している像が観察された(図 2)。接種後 120 日では、プリオン感染 WT マウスと CD14^{-/-}マウスともに、大脳皮質、海馬、視床など広範囲で IL-10 陽性細胞が認められ、IL-10 陽性細胞が出現する領域に差は認められなかった。また、視床では CD11b 陽性細胞で IL-10 が発現していたが、GFAP 陽性アストロサイトでは IL-10 は発現していなかった。一方、海馬では pan-neuronal marker で染色される神経細胞で IL-10 の発現が認められた。

TGF- β 陽性細胞は、接種後 60 日の時点では、プリオン感染 WT マウスと比べて CD14^{-/-}マウスでは、視床で陽性細胞が多く、CD11b 陽性細胞が TGF- β となる傾向が観察された。また、接種後 120 日では、CD11b 陽性細胞に加え、神経細胞や脳室上衣細胞でも TGF- β の発現が認められるようになった(結果は示さず)。

D. 考察

我々は、昨年までに本研究班で、プリオン感染 CD14^{-/-}マウスでは、野生型マウスよりも生存期間が長いこと、また、接種後 120 日の時点で、WT マウスと比較して CD14^{-/-}マウスでは PrP^{Sc} の蓄積量が少ないことを報告した。今回、脳内に存在するプリオン感染価を比較したところ、接種後 120 日の時点では、WT マウスと比較して CD14^{-/-}マウスの脳内に存在するプリオン感染価が若干低い傾向が認められたことから、PrP^{Sc} 量と合わせて考えると、CD14^{-/-}マウスではプリオンの増殖が遅い結果、生存期間が延長したと考えられる。

今回、プリオン感染マウス脳内のミクログリ

アが IL-10 および TGF- β を産生することが確認できた。マクロファージの活性化状態と同様に、ミクログリアの活性化状態も産生するサイトカイン、ケモカイン、およびその関連分子群のプロファイルにより M1 および M2 タイプに分類される。IL-10 は M2 タイプの中でも acquired deactivation と呼ばれる M2c タイプの特徴的なサイトカインであることから、プリオン感染マウス脳のみクログリアの一部は脱活性化状態にある可能性がある。CD14^{-/-}マウスで IL-10 の発現が WT マウスよりも早期から認められ、生存期間が延長することから、ミクログリアの脱活性化は、プリオン病の病態進行に抑制的に働くのかもしれない。プリオン感染マウスの脳内では TNF- α 、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生も増加している。これらのサイトカインはマクロファージを M1 タイプの活性化状態に導くことが知られている。一方、M2c タイプの脱活性化状態では、IL-1 β や IL-6 に対する応答が低下する。IL-10 は TNF- α や IL-1 β 、IL-6 といった炎症性サイトカインとそのレセプターの発現を抑えることで、シグナルの調節に関わっていると考えられていることから、今後これらのレセプターの発現を調べ、炎症性サイトカインが炎症を進める方向に機能し得るかを解析する必要がある。

E. 結論

CD14^{-/-}マウスでは、WT マウスと比較して、プリオン接種後の生存期間が有意に延長するが、CD14^{-/-}マウスではプリオンの増殖あるいは蓄積が WT マウスに比べて若干遅いことが判明した。また、プリオン感染マウス脳内で、IL-10 は主にミクログリアと思われる CD11b⁺陽性細胞が産生していたことから、ミクログリアの少なくとも一部は alternative deactivation と呼ばれる脱活性化状態にある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, and Kinjo M.: Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11; 87-95.
- 2) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N.: ImmunoAT method: an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods.* 2010; 165: 261-267.
- 3) Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, and Inanami O.: A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394: 522-528.
- 4) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N.: The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol. Immunol.* 2010; 54: 763-768.

2. 学会発表

- 1) Sakai K, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of pathobiology of prion infection in Cd14 gene deficient mice. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases. Sapporo, Japan, July 24-25, 2010
- 2) Yamasaki, T., Suzuki, A., and Horiuchi, M. Clint-1 mediated clathrin-dependent retrograde transport is involved in PrPSc trafficking in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 3) Hasebe, R., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of complement factors differs with prion strains in vitro and in vivo. Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 4) Sakaguchi, S., Horiuchi, M., Yamakawa, Y., Sata, T., and Furuoka, H. Temporal kinetics of prion protein accumulation and its effect on neurotransmitters in the cerebellum of guinea pigs infected with BSE prion Prion2010 Salzburg, Austria, Sept. 8-11, 2010
- 5) Horiuchi, M. Application of anti-PrP antibody recognizing the most amyloidogenic region for the detection of PrPSc in immunocyto- and immunohistochemistry. Prion Japan & Canada, Tokyo, Japan, Nov. 11-12, 2010
- 6) 堀内 基広 プリオン持続感染細胞における異常型プリオン蛋白質の細胞内輸送 大阪