

2) Takeuchi A, Komiya M, Kitamoto T, Morita M. Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve. *Microbiol Immunol* 7:502-509, 2011.

2. 学会発表

1) Takeuchi A. Accurate assessment for diagnosing vCJD patients with codon129Val/Val. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 11-12, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

プリオン病の治療予防に関する基礎研究

研究分担者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：濱中大一 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：西澤桂子 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：河田真樹 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野

研究要旨 プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物や生物因子を探索し、それらの評価を行った。プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな化合物として、インドール環よりなる色素性化合物を発見した。また、プリオン脳内感染マウスにおいて効果の程度は低いものの、感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインを発見した。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物や生物因子を探索し、それらの評価を行った。

B. 研究方法

各種化合物の評価は、プリオン持続感染細胞やプリオン感染早発系マウスにおいて、すでに報告している方法(参考文献 1,2)に基づき実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験及び動物実験は、所属機関の許可を受けた後に、法令等を遵守して実施した。

C. 研究結果

新たに色素性化合物（インドール誘導体）に抗プリオン活性を発見した。調べた3種類のいずれのプリオン持続感染細胞（RML プリオン感染 N2a 細胞、22L プリオン感染 N2a 細胞、Fukuoka-1 プリオン感染 N2a 細胞）においても、濃度依存的に抗プリオン活性を発揮しプロテアーゼ処理耐性プリオン蛋白（PrPres）の形成を抑制した。作用機序としては、①LC3-II（オートファジーの指標蛋白質）の発現は誘導されないことから、プリ

オンの分解促進に関係すると報告されているオートファジーの関与はない。②正常型プリオン蛋白については、細胞全体での発現量や細胞膜上での発現量・局在への影響は認められなかった。また、③細胞の脂質ラフトや脂質ラフト微小膜分画中の正常型プリオン蛋白の局在に影響しなかった。さらに、④色素性化合物を構成する類似化合物には抗プリオン活性は観察されなかった。

一方、プリオン持続感染細胞を用いた既製薬のスクリーニングでは、新たに有効なものは見つからなかった。しかし、プリオンを脳内感染させた早発系マウスを用いた研究では、効果の程度は低いものの感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインを発見した。ハムスター型プリオン蛋白を発現する Tg7マウスにハムスター順化263Kプリオンを脳内感染させ、52日目よりマウス組換え型サイトカインを一日一回（週5日間）、一回に500 ngを皮下に投与したところ、発病末期となったのが対照群では脳内感染後61.1±1.2日目（平均±SD, n=8）であるのに対して、サイトカイン投与群では65.1±3.4日目（平均±SD, n=10）であった。効果の程度は低いものの、有意な延長がみられた（ログランク検定, p<0.05）。

D. 考察

今回報告した色素性化合物は、これまでに抗プリオン活性が報告されている化合物の中では、アミロイド親和性化合物とは一部に類似の共通構造があるものの、その部分だけの化学構造だけでは活性がなく、アミロイド親和性化合物と同様な作用機序を発揮しているとは考え難い。また、この色素性化合物は生理的に存在する色素性化合物に類似しており、調べた限りにおいて正常型プリオン蛋白代謝への影響や脂質ラフトへの影響などは認めなかったことより、これまでに解っていないプリオン産生・分解に関わる分子メカニズムの解明につながる可能性がある。活性を持つ化学構造の特定、作用機序の特定や生理学的意義について、今後さらに解明を進める必要が残されている。

一方、早発系マウスにおいて感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインについては、さらに投与量の最適化や他のプリオン感染動物モデルでの有効性の確認が必要であり、発症後の投与で症状の改善が期待できるかどうかも検討課題である。このサイトカインは海外では既製薬として臨床で使われていることより、発症後投与での有効性が複数の疾患モデルで確認できれば、早期に患者への応用が可能である。

E. 結論

プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな色素性化合物を発見した。また、プリオン脳内感染マウスにおいて効果の程度は低いものの感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインを発見した。

[参考文献]

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 405:285-290, 2011.
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging

the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81:12889-12898, 2007.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology*, in press.
- 2) Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and selectivity of the marine toxin neodysierbaine A and its synthetic analogues to GluK1 and GluK2 kainate receptors. *J Mol Biol* 413:667-683, 2011.
- 3) Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem* 46:2917-2929, 2011.

2. 学会発表

- 1) Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 2) Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 3) Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. Acidic CC chemokines are upregulated in RML-prion-infected neuroblastoma N2a cells. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 4) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T, Doh-ura K, Ando T, Ohmoto A. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected

cells and animals. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

5) 堂浦克美. プリオン病研究の最前線. 第 16 回日本神経感染症学会学術集会, 東京, 11.5, 2011.

6) 堂浦克美. ヤコブ病克服の基礎研究. 第 5 回食と医療の安全関わるプリオン病の市民講座 プリオン病・口蹄疫・インフルエンザ・放射能, 福岡, 10.23, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

プリオン立体構造変換原理の解明とその制御

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
 研究協力者：鎌足雄司 岐阜大学生命科学総合研究支援センター機器分析分野
 研究協力者：山口圭一 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
 研究協力者：石川岳志 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
 研究協力者：福岡万佑子 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨 プリオン立体構造変換過程は、正常プリオンの(1)立体構造変化、及びそれに引き続いて起きる(2)核依存性複製過程に分けられる。(1)に関しては、CPMG 緩和時間分散法測定により、ポリ A とポリ T 領域に遅い交換が見られたことから、これらの接触が構造変換の引き金になると考えられた。(2)では、試料中の超音波強度を定量化する手法を確立し、凝集体形成過程に対する影響を調べた結果、超音波強度が核形成の確率に比例することを見出した。

A. 研究目的

プリオン立体構造変換過程を(1)モノマーでの構造変化過程、及び(2)核依存性複製過程に分けて、その詳細を解明し、細胞型(PrP^C)からスクレイピー型(PrP^{Sc})への反応過程の制御方法を開発することが目的である。

B. 研究方法

15N ラベルしたリコンビナント・プリオンを用い、CPMG 緩和時間分散法を測定した。また、強度の異なる超音波をリコンビナント・プリオンに照射し、凝集体(アミロイド)形成反応を、CD スペクトル、赤外吸収、電子顕微鏡などで観測した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1)CPMG 緩和時間分散法を測定した結果、ポリ T 領域(190-193、TTTT)とポリ A 領域(115-118、AAAA)のみに、マイクロ秒からミリ秒の遅い揺らぎが観測された。これは両領域が、ミリ秒に近いオーダーの非常に遅い揺らぎを行っている可能性があることを示している。また、これらの領域

は、A120 における 2 面角の回転により、接触と離散を行うことが分かった。当該領域が、モノマーレベルでの初期核形成に関与する可能性がある。

(2)リコンビナントプリオンの凝集体形成における超音波照射の影響を系統的に調べた。試料が感ずる超音波のパワーは、位置などの条件により異なるため、カロリメトリー法や KI 酸化法によりそのパワーを実測した。パワーの上昇に比例して、核形成に必要なラグタイムが減少した。このことは、核形成確率が、超音波パワーに比例することを示している。また、線維形成に最適なパワーが存在し、それが決定できることも明らかとなった。

D. 考察

ポリ A 領域は、哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類を通じて保存されている。一方、ポリ T 領域は、哺乳類にのみ存在する。プリオン病は、哺乳類でのみ見られることから、ポリ T がその発症に関わっていることが示唆される。また、これら二つの領域の接触が初期核形成に関与している、と考えられる。

一方、プリオンの線維形成に最適な超音波パワーが存在することは、プリオン病発症に際しての

環境要因を考える手掛かりとなる可能性がある。また、核依存性複製機構を厳密に制御する手段として、出力を調整した超音波を利用できる可能性があることを示している。

E. 結論

ポリ A 領域と、ポリ T の接触がプリオンの初期核形成に関与している、と考えられる。また、核依存性複製機構を厳密に制御する手段として、出力を調整した超音波を利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi K, Matsumoto T, Kuwata K. Proper calibration of ultrasonic power enabled the quantitative analysis of the ultrasonication-induced amyloid formation process. *Protein Sci* 21:38-49, 2012.
- 2) Hosokawa-Muto J, Kimura T, Kuwata K. Respiratory and cardiovascular toxicity studies of a novel anti-prion compound, GN8, in rats and dogs. *Drug Chem Toxicol*, in press.
- 3) Kimura T, Hosokawa-Muto J, Asami K, Murai T, Kuwata K. Synthesis of 9-substituted 2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *Eur J Med Chem* 46:5675-5679, 2011.
- 4) Sanghera N, Correia BE, Correia JR, Ludwig C, Agarwal S, Nakamura HK, Kuwata K, Samain E, Gill AC, Bonev BB, Pinheiro TJ. Deciphering the molecular details for the binding of the prion protein to main ganglioside GM1 of neuronal membranes. *Chem Biol* 18:1422-1431, 2011.
- 5) 石川岳志, 石倉孝一, 桑田一夫. フラグメント分子軌道法プログラム「PAICS」と統合創薬プログラム「NAGARA」. *Mol Sci* 5:NP0015, 2011.
- 6) 桑田一夫. 量子ロボット. *生物物理* 51:205, 2011.

2. 学会発表

- 1) Kuwata K. Regulating the Prion Conformation by Logical Drug Design. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 2) 山口圭一, 松本友治, 桑田一夫. マウスプリオン蛋白質のアミロイド線維形成を促進する超音波パワーの定量. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 3) 桑田一夫. Prion Dynamics and Logical Drug Design. Israel-Japan Joint Symposium on Biophysics "Protein Dynamics: From single molecules to whole cell", Kobe, September 16, 2011.
- 4) Motoyoshi S, Ishikawa T, Yamagishi K, Kuwata K, Tokiwa H. All-Electronic Calculations(AEC)-Docking procedure based on the FMO-ONIOM method. Ninth Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists 2011, Santiago de Compostela, July 17-22, 2011.
- 5) 桑田一夫. 立体構造進化と論理的創薬を担う岐阜大 NMR 拠点. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端的 NMR 拠点から生まれる新たな潮流：最新成果, 役割, 利用」, 大阪, 7.28-29, 2011.
- 6) 桑田一夫. プリオン分子内におけるポリ A とポリ T の稀な出会い. 新学術領域「天然変性蛋白質」第 2 回領域会議, 宮崎, 6.29-7.1, 2011.
- 7) 桑田一夫. バイオ分子間相互作用形態の階層的モデリングに関する総合討論. バイオ分子間相互作用形態の階層的モデリングの研究打ち合わせ, 東京, 7.27, 2011.
- 8) 岡本拓也, 小谷野哲之, 石川岳志, 桑田一夫, 長岡正隆. FMO-QM/MM 分子動力学シミュレーションに向けた AMBER-PAICS インターフェイスの開発. 第 5 回分子科学討論会, 札幌, 9.20-23, 2011.
- 9) 桑田一夫. プリオン蛋白質のコンホメーションスイッチ. 第 4 回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会, 熊取, 11.10, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 発明の名称：プリオンタンパク質構造変換抑

制剂及びその利用

出願人：国立大学法人岐阜大学

発明者：桑田一夫

出願番号(出願日)：特願 2011-513378 (2010/5/13)

公開番号(公開日)：WO2010/131717 (2010/11/18)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

蛋白質のアミロイド構造を決定する残基の役割

研究分担者：大橋祐美子 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター
研究協力者：田中元雅 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター

研究要旨 プリオン病及び蛋白質凝集関連疾患において、凝集体の構造は感染性や病態を決定する重要なファクターであることが示唆されている。しかしその凝集体多形形成のメカニズムは明らかではない。本研究では、酵母プリオン Sup35 をモデル蛋白質として用い、凝集体多形形成のメカニズム解明に向け、凝集前駆蛋白質の揺らぎや部分構造に着目した核磁気共鳴法解析を行った。その結果、凝集体のコアとなりうる領域内に特殊な揺らぎを持つ 2 領域を発見した。その領域はクロス β 構造の形成に重要であると報告されているアスパラギン残基が多く、また分子間相互作用が確認できた。さらに、アスパラギン残基を他の残基に置換することで、凝集コアの変化が確認でき、その領域が凝集体形成の開始点であることが示唆された。この結果から、我々は分子内に凝集開始点が複数存在し、環境や分子の状態により、どれか一つの開始点が選択されることで凝集体多形が作り出されると考える。

A. 研究目的

プリオン病及び他の蛋白質凝集関連疾患において、凝集体の構造は、その感染性や病態を決定する重要なファクターである。この研究では 1 つの蛋白質から複数の構造の違う凝集体が形成されるメカニズムを解明し、治療及び予防方法の新たな基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

凝集体形成前の Sup35 蛋白質を核磁気共鳴装置で測定する。分子内揺らぎは ^1H - ^{15}N NOE 法、溶媒への露出度を表すアミド水素の交換速度は CLEANEX-PM 法を用い、分子間相互作用の測定には飽和移動差-NMR 法を用いた。また、凝集体の構造（凝集体のコア領域）はプロテアーゼ処理により凝集体コアのみを回収し、Mass 及び MSMS 測定によって確認した。

（倫理面への配慮）

本研究は酵母由来の精製蛋白質を用いた試験管内の実験を行っており、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

凝集体のコアとなり得る領域内に特殊な揺らぎを持つ 2 領域を CLEANEX-PM 測定により発見した。その領域はクロス β 構造の形成に重要であると報告されているアスパラギン残基が多く、また飽和移動差-NMR 測定により分子間相互作用が確認できた。さらに、アスパラギン残基を他の残基に置換することで、凝集コアが大きく変化することが確認でき、その領域が凝集体形成の開始点であることが示唆された。

D. 考察

1 つの分子内に凝集体の形成開始点が 2 つ以上存在するという事は、変異等の蛋白質の状態や、他分子の結合による揺らぎや構造の変化、そして周囲の環境に依存して、一番有利な開始点が選択されることが考えられ、これが凝集体多形を作るメカニズムのひとつであると考えられる。

E. 結論

本研究では、これまで知られていなかった凝集開始点の揺らぎ、分子間相互作用、配列特性を明らかにすることができた。この結果は、他の凝集

蛋白質への応用も期待できるものである。

[参考文献]

1) Ohhashi Y, Ito K, Toyama BH, Weissman JS, Tanaka M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat Chem Biol* 3:225-230, 2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Ohhashi Y, Tanaka M. Role of protein fluctuation in determination of amyloid conformation. The International symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, Yokohama, November 15-18, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の分子内切断に関与する分解酵素の同定

研究分担者：金子清俊 東京医科大学神経生理学講座

研究協力者：八谷如美 東京医科大学神経生理学講座

研究要旨 正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) と異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の分子内切断に関与する酵素が異なっていることを見出した。

A. 研究目的

正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の生理機能について示唆される情報は多々あるが実際のところ現状では確たるものがない。そこで我々はおもに生細胞を用い PrP^C の細胞内輸送を全可視化し、併せて PrP^C および PrP^{Sc} の生理的切断に関与する因子群を同定することを目的とする。

B. 研究方法

本申請では、2つのアプローチ、1. 可視化技術を駆使した PrP^C 細胞内局在と輸送の解析、2. 生化学的解析を中心に PrP^C が関与する細胞死機構の解明、の2つの側面から、PrP^C の細胞内での機能を解析する。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA を用いた実験は、国が定めた「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、事前に組み換え DNA 実験安全委員会の審査および認可を受けたもののみ使用する。

C. 研究結果

本年度は、特にプリオン蛋白質の分子内切断について、PrP^C の分子内切断にはカルパインが特異的に関与していることを明らかにした。さらに、プリオン持続感染細胞 (ScN2a) を用いカルパインが ScN2a 細胞内でもプリオン蛋白質の切断に関与しているかどうかをウエスタンブロットで検討したところ、N2a 細胞とは異なり、カルパスタ

チンによる切断阻害効果は検出されず、カルパインは異常型プリオン蛋白質の切断には関与しないことが判明した。さらに、ScN2a 細胞では、正常型とは異なる長さの切断断片が生じており、この切断産生は数種の ADAM プロテアーゼの活性阻害剤の添加により減少することを見出した。

D. 考察

N2a 細胞ではカルパインが、ScN2a 細胞では膜内在型タンパク質分解酵素が、各々内在性のプリオン蛋白質の切断に関与していることから、プリオン蛋白質の切断部位を含む代謝経路が異なることが示唆された。

E. 結論

PrP^C と PrP^{Sc} では生理的切断に関与するプロテアーゼが異なっており、それらのプロテアーゼの局在の差から切断される細胞内局在にも差があることが明らかになった。

[参考文献]

- 1) Hachiya N, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K. Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 313:818-823, 2004.
- 2) 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 (編) プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, pp360-365, 2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hachiya N, Komata Y, Harguem S, Nishijima K, Kaneko K. Possible involvement of calpain-like activity in normal processing of cellular prion protein. *Neurosci Lett* 490:150-155, 2011.
- 2) Shirakawa T, Nakano K, Hachiya N, Kato N, Kaneko K. The involvement of P2X₁ receptor in pyramidal cell degeneration in the rat hippocampus after trimethyltin administration. *Neurosci Res* 71:396-404, 2011.
- 3) 八谷如美, 金子清俊. プリオン感染のリスクファクターとしての慢性炎症. *実験医学* 29:174-179, 2011.
- 4) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (上): プリオン蛋白. *日本臨床* 69:119-123, 2011.
- 5) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (下): プリオン病の疫学と概論. *日本臨床* 69:405-410, 2011.
- 6) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (下): 変異型 Creutzfeldt-Jakob 病. *日本臨床* 69:419-422, 2011.
- 7) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. 医学書院 (編) 今日精神疾患治療指針, 医学書院, 東京, in press.

2. 学会発表

- 1) Hachiya N, Nishijima K, Kaneko K. Analytical and Diagnostic Use of a Protein-Unfolding Factor,

Oligomeric Aip2p/Unfoldin, for protein Misfolding Diseases. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

2) Hachiya N, Komata Y, Kaneko K. Intracellular processing of Pr^{PC} and Pr^{PSc}. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

3) Kato H, Hachiya N, Kaneko K. 14-3-3-dependent molecular interaction and mitochondrial aggregation of PrP^C. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

4) Nishijima K, Hachiya N, Kaneko K. The contents of PrP-targeted mitochondrial aggregate. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

5) Hachiya N, Kaneko K. Possible involvement of calpain-like activity in normal processing of cellular prion protein. the Montreal International Translational Medicine Conference, Montreal, November 3-4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

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：三輪律子 動物衛生研究所プリオン病研究センター
 研究協力者：多辺田奈保子 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究要旨 プリオンの主要構成成分である異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）は、株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例がある。PrP^{Sc}の細分化を目的として、プロテイナーゼ K 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc}断片のバンドを解析した。2種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した PrP^{Sc}のバンド型により、スクレイピーChandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP^{Sc}の区別が可能であった。

A. 研究目的

プリオンの主要構成成分である異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）は、株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例がある。牛海綿状脳症（BSE）由来 PrP^{Sc}とスクレイピー由来 PrP^{Sc}では、プロテイナーゼ K（PK）消化後の分子量、糖鎖型に明瞭な差が認められるが、多くのスクレイピー株では、生物学的性状の異なる株でも PK 消化後のバンドは類似している。一方、スクレイピー感染動物の脳内に蓄積する PrP^{Sc}が、不均一な集合体であることを示唆する結果が得られており、プリオン株の性状解明には、PrP^{Sc}の分類をさらに細分化する必要がある。プリオン株の選択・変異の機構を明らかにすることを目指して、各種蛋白質分解酵素に対する抵抗性とその出現する断片を指標に、PrP^{Sc}の性状解析を試みる。

B. 研究方法

PrP^{Sc}の細分化を目的として、PK 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc}断片のバンド型別を行った。さらに蛋白質分解酵素処理後の試料について、糖鎖を除き、モノクローナル抗体との反応性から出現する PrP 断片を推定した。

（倫理面への配慮）

プリオン感染動物および材料の取り扱いが動

物衛生研究所内のバイオセーフティレベル（BSL）2（スクレイピープリオン）または3（その他のプリオン）実験施設にて行い、汚染物は 135℃、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

プロナーゼ、パパイン処理により PrP^{Sc}は PK と類似した 3 本のバンドへの収束が認められた。アミノペプチダーゼ、パパイン、ベスタチン、ロイペプチン、ペプスタチン A では PK 消化で得られる断片に加えてさらに高分子量の断片が出現したが、プリオン株間にバンド型の差は認められなかった。

2種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した PrP^{Sc}のバンド型により、スクレイピーChandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP^{Sc}が区別することが可能であった。

D. 考察

エンドプロテアーゼ Arg-C と Lys-C による、PrP^{Sc}の新たな型別の可能性が示唆された。PK 抵抗性領域である PrP_{core} および N 末領域を含んだフラ

グメントが混在し、そのモル比による違いと考えられた。PrPcore 領域の Arg および Lys の多くは、エンドプロテアーゼ Arg-C, Lys-C 消化に対して抵抗性を示した。PrP203/207 の領域の酵素に対する感受性と、PrPcore の構造（株の分類）との関連について検討が必要である。

E. 結論

2 種類のエンドプロテアーゼ Lys-C または Arg-C で消化した PrP^{Sc} のバンド型により、スクレイパー-Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP^{Sc} が区別することが可能であった。新たな PrP^{Sc} 分類法の可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Yokoyama T. Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. *Prion* 5:103-108, 2011.

2. 学会発表

1) Masujin K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type

BSE prions. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

2) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Yokoyama T. Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

3) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the Structural Stability of Various Mammalian Cellular Prion Proteins Based on the Fragment Molecular Orbital Calculations. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

4) Yokoyama T, Kaku-Ushiki Y, Mohri S. PrP^{Sc} heterogeneity in inter- and intra-species transmission. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

プリオン感染によるオートファジー活性化のメカニズム

研究分担者：坂口末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究協力者：森 剛志 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究要旨 我々は、正常プリオン蛋白(PrP^C)を培養細胞 HEK293T に過剰発現させると、オートファジーが活性化し、細胞死を誘導することを見出した。この PrP^Cによるオートファジーの活性化は、Src ファミリーの Fyn の活性化型(CA-Fyn)により増強され、ドミナントネガティブ型(DN-Fyn)により抑制された。また、PrP 結合分子として同定した Lrp11 (low density lipoprotein receptor-related protein 11)も同様にオートファジーを活性化させた。プリオン感染細胞 N2a においても、LC3 II の発現が増強しており、Lrp11 の発現も上昇していた。これらの結果は、過剰な PrP^Cまたは PrP^{Sc}が Lrp11 と結合し、Fyn の活性化を介してオートファジーを活性化させる可能性を示唆した。

A. 研究目的

プリオン病は、正常プリオン蛋白(PrP^C)が異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})へと構造変換をおこすことで起こる神経変性疾患である。実際我々は、PrP^C欠損(PrP^{-/-})マウスがプリオンに感染せず、プリオン病を発症しないことを明らかにした¹⁾。しかし、PrP^Cから PrP^{Sc}への構造変換がどのようにプリオン病に関与するのかはいまだ不明である。

今回我々は、培養細胞株に PrP^Cを過剰発現させると、オートファジーが活性化し、細胞死を誘導するという興味深い現象を見出した。本研究では、この PrP^Cの過剰発現によるオートファジーのメカニズムについて解析した。

B. 研究方法

1. 細胞内遺伝子導入法

全長 PrP、Lrp11、CA-Fyn(Y531F)、DN-Fyn(K299M)をコードする cDNA を哺乳動物発現ベクター-pcDNA3.1(-)に挿入した。LC3 は pEGFP-C1ベクターに挿入した。これら発現ベクターは HEK293T 細胞および N2a 細胞にリポフェクション法を用いて遺伝子導入した。

2. ウェスタンブロット解析

トランスフェクション 48 時間後の細胞、また

はマウス脳を、細胞溶解液(0.5% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)にて乳剤化し、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験や動物実験については、徳島大学の遺伝子組み換え安全委員会や動物実験委員会の承認を得て行なった。

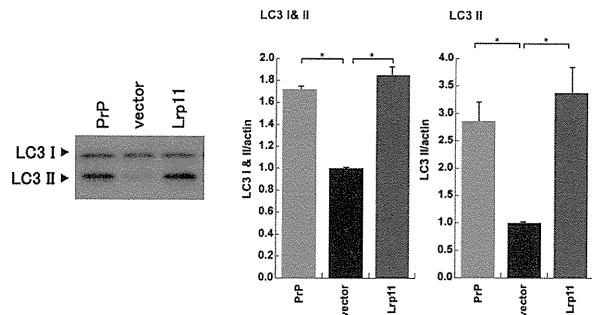
C. 研究結果

以前我々は、HEK293T 細胞に PrP^Cを過剰発現させると、オートファジーが活性化され、細胞死を誘導することを報告した。また、プリオン感染脳内においてもオートファジーが活性化されていることを報告した。本年度は、この PrP によるオートファジーの活性化メカニズムを解明するために PrP 結合分子を同定した。酵母 two hybrid 法により、Lrp11 (low density lipoprotein receptor-related protein 11) を PrP 結合分子として同定した。その結合は、GST pull-down 法により確認した。Lrp11 は LDL 受容体ファミリーの一つで膜貫通型蛋白であるがその機能は不明である²⁾。

Lrp11 を HEK293T 細胞に過剰発現させたところ、PrP^Cと同様に顕著にオートファジーを誘導し、

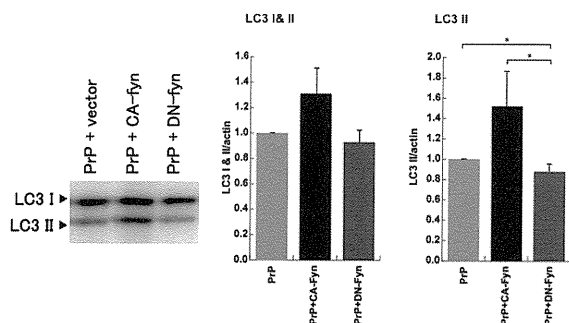
オートファジーの活性化を示す LC3 II のシグナルが増強されていた (図 1)。

図 1. Lrp11はHEK293T細胞のオートファジーを活性化させる



さらに我々は、Srcファミリーであるfynが、PrP^Cにより誘導されるオートファジーに関与していることを見出した。Fynの活性化型CA-FynをPrPと同時にHEK293T細胞に導入したところ、LC3の活性が増強された。逆にDN-fynを導入するとPrP^C過剰発現によるLC3の活性が抑えられた (図2)。

図 2. PrPにより誘導されるオートファジーはSrcファミリーであるFynキナーゼを介している



また、我々はプリオン感染 N2a 細胞においても、Lrp11 がオートファジーに関与していることを見出した。感染細胞では、非感染の N2a と比較して LC3 II のシグナルが増強しており、また、Lrp11 の転写レベルが上昇していた (図 3)。これら N2a 細胞に Lrp11 を過剰発現させると、LC3 II のシグナルがさらに強くなった (図 4)。

図 3. プリオン感染N2a細胞はLrp11の発現が上昇している

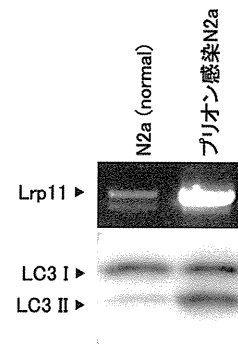
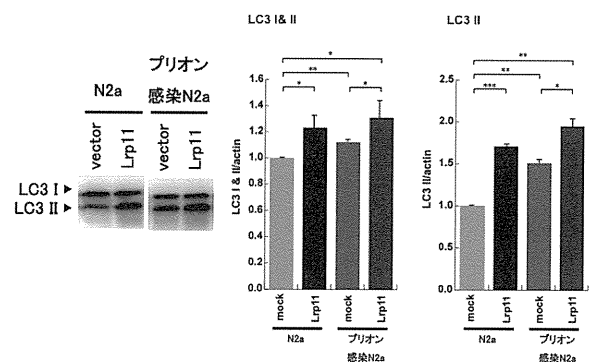


図 4. 感染細胞にLrp11を発現させると、さらにオートファジーの活性が増強される



D. 考察

プリオン病は、PrP^Cが PrP^{Sc}へと構造変換することにより起こる神経変性疾患である。以前、HEK293T 細胞に PrP^Cを過剰発現させることでオートファジーが活性化され、細胞死を誘導することを報告した。今回我々は、HEK293T 細胞に Pr P 結合分子である Lrp11 がオートファジーを活性化することを見出した。また、PrP によるオートファジー活性が Fyn を介したものであることを示した。さらに、プリオン感染細胞でも、オートファジーが活性化されており、Lrp11 の発現が上昇していた。プリオン感染細胞では、PrP^{Sc}が過剰に蓄積する。これらの結果は、過剰な PrP^Cまたは PrP^{Sc}が Lrp11 と結合し、Fyn の活性化を介してオートファジーを活性化させる可能性を示唆した。

E. 結論

PrP の結合分子として同定された Lrp11 は HEK293T に過剰発現させると PrP^Cと同様に、オートファジーを誘導した。また、PrP^Cによるオー

トファジー誘導は src ファミリーである Fyn の経路を介していることが示唆された。これらの結果は、PrP^C が細胞膜上にある Lrp11 と結合し、Fyn 経路を介してオートファジーを誘導することを示唆している。プリオン感染細胞においても Lrp11 が関与していることから、PrP^C を過剰発現させた HEK293T 細胞とプリオン感染させた N2a 細胞では同様なオートファジーの活性化メカニズムを介している可能性を示唆している。

[参考文献]

- 1) Sakaguchi S, et al. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* 69:7586-7592, 1995.
- 2) Hald J, et al. Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia* 55:154-165, 2012.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine* 29:9321-9328, 2011.
- 2) Fujita K, Yamaguchi Y, Mori T, Muramatsu N, Miyamoto T, Yano M, Miyata H, Ootsuyama A, Sawada M, Matsuda H, Kaji R, Sakaguchi S. Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. *Cell Mol Neurobiol* 31:999-1008, 2011.

2. 学会発表

- 1) Sakaguchi S. Roles of a prion protein family in neurodegeneration. Enzyme Research Forum 2011 in Nantong University, Nantong, March 15-17, 2011.
- 2) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染細胞における細胞内小胞輸送の抑制. 第 26 回中国四国ウイルス研究会, 徳島, 6.18-19, 2011.
- 3) 坂口末廣, 宮田博規, 山口仁孝, 村松直美, 森 剛志, 内山圭司, 犬伏祥子. 異なるプリオン株の産生メカニズムについて. 第 26 回中国四国ウイルス研究会, 徳島, 6.18-19, 2011.
- 4) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. 細菌由来の蛋白 succinylarginine dihydrolase の免疫によるプリオン病の予防効果.(英語) Immunization with bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase induces antigenic mimicry-mediated anti-prion effects in mice. 第 40 回日本免疫学会, 千葉, 11.27-29, 2011.
- 5) Sakaguchi S. The role of the N-terminal region of prion protein in prion disease. 8th IBRO World Congress of Neuroscience International Brain Research Organization, Florence, July 14-18, 2011.

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

非定型 BSE に関する解析

研究分担者：桶本（中村）優子 国立感染症研究所細胞化学部

研究要旨 非定型 BSE プリオンは従来型の BSE プリオンに比べ、ウシや霊長類（サル）に対しより強い感染性を示す。本研究ではヒト神経細胞株（ニューロblastoma）を用いることで、非定型 BSE 由来プリオンの霊長類（ヒト）への伝播の可能性の有無、感染成立後の生化学的特徴を明らかにし、また、ヒト-ヒト間の感染性リスク等の検証を行う。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症（BSE）は 1980 年代にイギリスで報告されて¹⁾以来、単一のプリオン株により引き起されるプリオン病であると考えられてきた。しかし 2003 年以降、日本^{2,3)}、イタリアをはじめ、複数の国より従来型の BSE とは異なる生化学的・病理学的性質を有する BSE プリオンの存在が報告された。従来型の BSE は定型 BSE（C-BSE）、新たなタイプの BSE は非定型 BSE と名付けられ、異常型プリオンタンパク質（PrP^{res}）の分子量の違いにより非定型 BSE はさらに H-BSE と L-BSE とに分類される。ヒトのプリオン病である変異型 CJD（vCJD）は C-BSE の感染によるものと考えられているが、L-BSE のヒトへの感染性の有無については不明である。しかし、我が国で摘発された L-BSE は霊長類（カニクイザル）への脳内接種実験において C-BSE より強い感染性を示すことが明らかとなっており⁴⁾、L-BSE が vCJD とは異なるヒトプリオン病の原因になる可能性が危惧される。また、霊長類に対する L-BSE の感染性の強さを考慮しヒトでの感染を防ぐ対策が必要と考えられ、L-BSE のヒト-ヒト間の感染性に関する知見も必要とされる。これらの点を検証すべく、ヒト培養細胞株を用いて L-BSE と C-BSE の感染性および性状を比較・評価することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は L-BSE および C-BSE プリオンをカニ

クイザルに初代伝播して得られた L-、C-BSE 由来プリオン⁴⁾を感染材料としてヒト培養細胞株への感染実験を試み、解析系の確立を目指し検討を行った。複数のヒトニューロblastoma細胞株（SK-N-SH, SH-SY5Y, BE(2)-M17）の培養上清中に L-、C-BSE 感染サルの脳乳剤（個体 No.7, 10, 14, 15）を添加し、感染を試みた。プリオン不含の通常培地に変換後継代を重ね、細胞を回収・ウェスタンブロッティング法にてプロテアーゼ抵抗性の PrP^{res} が検出されるか解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験等は無く倫理面での配慮は必要とされないが、プリオンタンパク質の取り扱いや組換え DNA に関する実験においては国立感染症研究所の規定に従った。

C. 研究結果

L-、C-BSE 由来プリオンの感染を試みたニューロblastoma細胞株のうち、継代 2 代目の SK-N-SH および BE(2)-M17 の 2 株において C-BSE 由来プリオン感染群とともに L-BSE 由来プリオン感染群においても PrP^{res} が検出された（図 1）。しかし、現在までに継代 10 代目以降では PrP^{res} が検出限界以下となり、持続感染細胞株の樹立は確認されていない。感染成立初期（継代 2 代目）における PrP^{res} の糖鎖型パターンは、双方の細胞株ともに C-BSE 由来プリオン感染群では二糖鎖型 PrP^{res} の割合が最も多く、L-BSE 由来プリオン

感染群では一糖鎖型 PrP^{res} の割合が最も多いことが明らかとなった (図 2)。

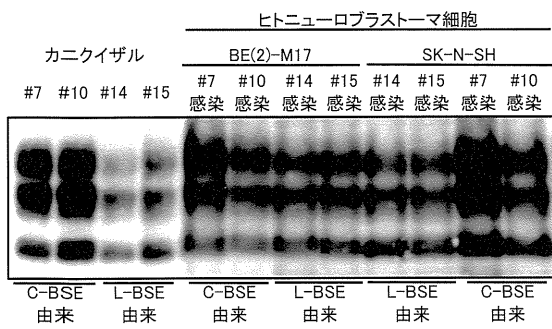


図1. C-BSEおよびL-BSE由来プリオンの検出

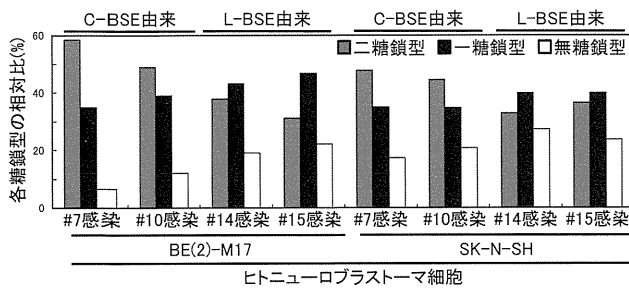


図2. C-BSEおよびL-BSE由来プリオンの糖鎖型パターン

D. 考察

複数のヒトニューロblastoma細胞株においてL-BSE由来プリオン感染群でPrP^{res}が検出されたことにより、L-BSE由来プリオンはカニクイザルのみならず、ヒトの神経細胞に対し感染性を有することが示唆された。また、L-BSE由来プリオン感染細胞におけるPrP^{res}の糖鎖型プロファイルはC-BSE由来プリオン感染細胞における糖鎖型プロファイルとは異なり、オリジナルのウシL-BSEプリオンと同様に一糖鎖型PrP^{res}の割合が多いことが明らかとなった。このことは、L-BSEのヒトへの感染が成立した場合、vCJDとは異なる生化学的特徴を有するプリオン病の原因となる可能性を示している。

現在、継代を重ねていない状態で検出されるPrP^{res}の性状の比較を行っているが、L-、C-BSEのヒト-ヒト間の感染性および性状解析には持続感染株の樹立が有用であると考えられる。そこで、正常型プリオンタンパク質の発現量の高い細胞をクローニングするあるいは遺伝子導入により

作出するなどを検討しており、BSEプリオンに対して感受性および感染持続性の高い細胞株の作出を試みている。今後はこれらを用い、感染初期(感染直後)およびヒト細胞に馴化した(継代を重ねた)状態でのL-、C-BSE由来プリオンの感染性および性状解析を行うことを目指す。

E. 結論

L-BSE由来プリオンがヒトニューロblastoma細胞へ感染するか否かを複数の細胞株を用い検討した。結果、BE(2)-M17およびSK-N-SH細胞でC-BSEとともにL-BSE由来プリオンの感染が確認された。また、両者は異なる糖鎖型プロファイルを示し、オリジナルのウシL-BSEおよびC-BSEプリオンの特徴に各々類似していることが明らかとなった。このように、L-BSE由来プリオンのヒト神経細胞への感染およびC-BSE由来プリオンとの生化学的特徴の違いが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419-420, 1987.
- 2) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T. Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis* 56:221-222, 2003.
- 3) Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrPSc in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn J Infec Dis* 60:305-308, 2007.
- 4) Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohya 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* 64:81-84, 2011.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Okemoto-Nakamura Y, Hara H, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hanada K, Hagiwara K. Analysis of Synaptic Protein and Cyclin-dependent Kinase 5 in Prion Protein-deficient Cells. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

間葉系幹細胞を用いたプリオン病治療モデルに関する研究

研究分担者：長谷部理絵 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究要旨 発症後にプリオン病を治療するためには、異常型プリオンタンパク質の増殖を阻害することに加え、神経保護や変性した組織の修復が必要である。我々は、不死化ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) をプリオン感染マウスに移植すると、hMSCs は病変部に走化して神経栄養因子を産生し、マウスの生存期間が延長することを報告した (Song et al., J Virol. 2009)。今回、間葉系幹細胞の自己移植系モデルによりプリオン病治療効果を評価する目的で、マウス組織より MSCs (mMSCs) を分離し、表面抗原や分化能などの性状解析を行うとともに、mMSCs をプリオン感染マウスの脳内に移植し、生存期間を評価した。マウスの骨髄 (BM)、緻密骨 (CB)、脂肪組織 (AT) から mMSCs を分離、培養し、表面抗原の解析を行った。MSCs で発現が報告されている表面抗原のうち、Sca1 は BM-、CB-、AT-mMSCs でほぼ全ての細胞群が陽性を示したが、CD73、CD105、CD90.2、CD44、CD106 は由来する組織により発現の程度に違いがみられた。BM-mMSCs と CB-mMSCs では、検索した表面抗原の多くについて、陽性と陰性を示す細胞が混在し、複数の細胞集団が含まれることが示唆された。骨、脂肪組織への分化を誘導すると、BM-mMSCs は骨および脂肪組織への分化が顕著に認められた。CB-mMSCs でも骨および脂肪組織への分化が認められたが、BM-mMSCs と比較すると軽度であった。AT-mMSCs では、脂肪細胞への分化は認められたが、骨組織への分化は認められなかった。これらの mMSCs をプリオン感染マウスの臨床期初期に脳内移植し、生存期間を評価した。非移植群の生存期間は 152.3 ± 6.2 (平均±標準偏差) 日、BM-mMSCs 移植群では 161.8 ± 9.9 日であり、生存期間が有意に延長した ($p < 0.05$, Logrank 検定)。AT-mMSCs 移植群では、非移植群と比較して有意差は認められなかった。表面抗原の解析結果から、分離した mMSCs には複数の細胞集団が含まれ、これが治療効果に影響を与える可能性も考えられたため、今後は表面抗原により mMSCs を選別し、より治療効果の高い細胞群を選択していく。

A. 研究目的

これまで、我々はプリオン病発症後の治療法開発を目指して、hMSCs を用いた研究を行ってきた。hMSCs の移植により、プリオン感染マウスの生存期間は延長したが、移植した MSCs の生着などを考慮すると、同種移植のモデルを確立することが必要であると考えられた。本研究では、マウスの骨髄、緻密骨、脂肪組織より分離した mMSCs をプリオン感染マウスに移植し、治療効果を検討することである。

B. 研究方法

1. mMSCs の分離、培養

BM-mMSCs は大腿骨および下腿骨骨髄か

ら回収した。CB-mMSCs は骨髄を除去した緻密骨の骨片を培養し、細胞を遊離させた。AT-mMSCs は皮下脂肪組織をコラーゲナーゼ処理し、細胞を回収した。

回収した細胞は低酸素条件下(5%)で培養した。コンフルエントに達した細胞をトリプシン処理により剥離し、CD11b Microbeads と CD45 Microbeads に結合しなかった細胞を回収した。

2. 表面抗原の発現解析

過去に mMSCs で陽性であることが報告されている Sca1、CD73、CD105、CD90.2、CD29、CD44、CD106、陰性であることが報告されている CD11b、CD35、CD45、CD117、CD86 についてフローサ