

Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

6) Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion-mediated cytotoxicity in a differentiated neurosphere culture. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

7) Kuroda M, Kono J, Sato Y, Ohashi T, Yokoyama T, Ushiki Y, Onodera T, Yukawa M. Application of micro-ELISA for detection of prion protein from small volume of sample. Asian Pacific Prion Symposium 2012. Yokohama, July 29-30, 2012.

8) Kasai K, Hirata A, Ohyama T, Nokihara K, Yokoyama T, Mohri S. Novel assay with fluorescence-labelled PrP peptides for differentiating L-type atypical and classical BSEs, and scrapie. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

9) Dorj D, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Mohri S, Yokoyama T. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

10) Nagasawa Y, Takahashi Y, Hondo T, Watanabe H, Terada S, Saito C, Someya S, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Imamura M, Yokoyama T, Sakaguchi S, Nishida N, Mohri S, Aso H. Prion protein binding proteins of bovine intestine M cell. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

11) Fukuda S, Fujii T, Kageyama S, Okada H, Yokoyama T, Murayama Y. Preclinical detection of PrP^{Sc} in eyes of BSE-affected cattle. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

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 難治性疾患等克服研究事業（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

孤発性 CJD-MM2 cortical form の伝達試験

研究分担者：毛利資郎 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所
 研究協力者：松浦裕一 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所
 研究協力者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科病態神経学講座

研究要旨 我々はこれまで種々の CJD のマウスへの伝達試験をおこない、感染性を検討してきた。今回は伝達性海綿状脳症に広い感受性を有することが知られている bank vole (*Myodes glareolus*) のプリオンたんぱく質遺伝子 (BVPrP) を発現するトランスジェニック (TgBV) マウスとノックイン (KiBV) マウスを作成し、CJD の接種試験を行った。その結果、TgBV マウスは自発性にプリオン病様症状を呈したが、pK 抵抗性のプリオンたんぱく質 (PrP^{res}) は検出できず、野生型マウスならびに KiBV マウスへの伝達も成立しなかった。KiBV マウスは CJD-MM1、vCJD などのプリオン病が伝達可能であった。注目すべきは、これまで伝達できなかった孤発性 CJD-MM2 cortical form の伝達が初めて成立した。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者から性状の異なる複数のプリオンが検出されていることはよく知られている。これらの CJD を分類し、原因となるプリオンの性状を明らかにすることは、プリオン病の感染疫学解析、予防や治療に重要である。CJD の伝達性の有無と分離プリオンの性状解析には動物実験が唯一の方法である。

この研究では、それらプリオンの分類をより明確にするために導入遺伝子配列の異なるヒト型ノックインマウス、ウシ型その他の動物のノックインマウスを用いて、プリオンの伝達性を指標に CJD プリオンの分離と性状の解析を行うことが目的である。

本年度は CJD の伝達性に対して高い感受性を有する bank vole のプリオン蛋白質遺伝子改変マウスを作成し、CJD 由来のプリオンの伝達性を調べた。

B. 研究方法

(1) bank vole (*Myodes glareolus*) のプリオンたんぱく質遺伝子 (BVPrP) を過剰発現するトランスジェニック (TgBV) マウスとノックイン (KiBV) マウスを作製した。

(2) 異常プリオン蛋白質の蓄積が起こり、自然発症した TgBV マウスの脳乳剤を KiBV マウス、野生型マウスに継代接種した。
 (3) KiBV マウスの各種プリオンに対する感受性を調べるために CJD 由来プリオン 5 種類、BSE プリオン 3 種類の脳内接種 (20 μ l) を行い、伝達性の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

この動物実験計画は「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験指針」にもとづき、(独)農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験規程により、動物衛生研究所の審査を受け、承認されている。

C. 研究結果

(1) TgBV マウスは生後平均 450 日で中枢神経に異常なプリオン蛋白質を蓄積し、立毛、後肢の不調、首を振る、削瘦、衰弱するなどの臨床症状を示す個体があり、安楽死を行った。すかしながら、蓄積されたプリオン蛋白質 (PrP) はプロテナーゼ K (PK) 感受性であった。
 (2) 自発性に臨床症状を呈した個体を KiBV マウス、野生型マウスに継代接種したが、これまで変化は認められていない。

(3) KiBV マウスは、孤発性 CJD-MM1 および-MM2C、変異型 CJD (vCJD)、GSS 由来 F1 株に高感受性を示したが、孤発性 CJD-VV2 は伝達出来なかった。孤発性 CJD-MM2C (cortical form) はこれまでマウスに伝達出来なかったが、BV 遺伝子導入マウスに初めて伝達可能となった(表 1)。

D. 考察

bank vole (*Myodes glareolus*) のプリオンたんぱく質遺伝子 (BVPrP) を過剰発現するトランスジェニックはすでに、米国のグループにより作製されており、プリオン病を自然発症し、発症マウスから得られた異常プリオン蛋白質は野生型マウスにも伝達することが報告された。今回作製した過剰発現系の TgBV マウスは KiBV マウスのプリオン蛋白質発現量の 4~5 倍の過剰発現系であり、自然発症し、中枢神経に異常プリオン蛋白質の蓄積を認めたが、pK 感受性であり、KiBV および野生型マウス (C57BL/6) への継代伝達も成功しなかったことから、過剰発現によるいわゆる over-expression syndrome と考えられた。

KiBV マウスへの伝達試験で、数種のヒト由来プリオンが伝達出来たが、これまでマウスに伝達できなかった孤発性 CJD-MM2C の伝達が初めて成立したことである。

E. 結論

TgBV マウスは自発性にプリオン病様症状を呈したが、PK 抵抗性のプリオン蛋白質 (PrP^{res}) は検出できず、野生型マウスならびに KiBV マウスへの伝達も成立しなかった。KiBV マウスは CJD-MM1、vCJD などのプリオン病が広く伝達可能であった。これまでマウスに伝達できなかった孤発性 CJD-MM2C (cortical form) の伝達に初めて成立した。

[参考文献]

1) Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, Cartoni C, Ingrosso L,

Boyle A, Galeno R, Sbriccoli M, Lipp HP, Bruce M, Pocchiari M, Agrimi U. Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* 2:e12.2006.

2) Watts JC, Giles K, Stöhr J, Oehler A, Bhardwaj S, Grillo SK, Patel S, DeArmond SJ, Prusiner SB. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *PNAS* 109:3498-3503, 2012

F. 健康危険情報

ありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville R A., Kitamoto T, Mohri S, Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

2) Matsuura Y, Ishikawa Y, Somerville R A, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Yokoyama T, Kitamoto T, Mohri S. A rapid bioassay for classical and L-type bovine spongiform encephalopathies. *J Vet Med*, in press.

2. 学会発表

なし

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

表 1. 孤発性 CJD-MM2 cortical form のモデルマウスへの伝達試験成績

Transmission sCJD-MM2C to Ki-mice		
Mouse strain	Mean incubation periods (days)	positive / tested*
KiHu129MM	628	0/7
KiHu129MM/219EK	712	0/6
KiHu129MM/219KK	561	0/7
KiHu129MV	612	0/6
kiHu129VV	677	0/7
KiChM	768	0/5
KiBV	539	4/5

* : 伝達確認数/接種頭数

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

プリオン病発症およびプリオン蛋白質機能発現メカニズムの解析

研究分担者：作道章一 琉球大学医学部保健学科生体代謝学

研究協力者：小野寺節 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター

研究要旨 プリオン感染時の脳内では異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の増加と正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の減少が生じていることが示されつつあり、PrP^C 欠乏による抗酸化能低下と PrP^{Sc} 蓄積による酸化ストレス増大が起きている可能性が考えられている。それを支持するデータとして、我々はプリオン感染動物の脳内では、DNA 損傷、脂質過酸化、蛋白質酸化が起きていることを示してきた。さらに、プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株 (HpL) を用いた解析で、PrP 遺伝子発現と抗酸化ストレス活性が相関することを示してきた。本研究では、これらの研究を進展させ、抗酸化ストレス活性に変化が起こることが知られているボルナ病ウイルス (BDV) の持続感染状態下において、PrP^C に変化が起きているかの解析を行った。

A. 研究目的

これまでに我々はプリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株 (HpL) を樹立し、この HpL が無血清培地においてアポトーシスを起こすとともに、PrP 遺伝子の再導入により細胞内 Superoxide dismutase (SOD) 活性上昇およびアポトーシス抑制が観察されることを報告してきた (参考文献 1, 2)。加えて、DNA 酸化損傷や蛋白質酸化損傷など酸化ストレスマーカーがプリオン感染により増加していることから、プリオン感染時の脳内では異常型 PrP (PrP^{Sc}) の増加により酸化ストレス発生と正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の減少による抗酸化ストレス活性低下が起きていることが示唆されると報告した。本年度の研究では、このような PrP^C の変化により、酸化ストレス感受性の変化がもたらされる場合が他にないかを調べた。

B. 研究方法

ラット C6 グリオーマ細胞のボルナ病ウイルス (BDV) 持続感染細胞と非感染細胞の PrP を Sodium dodecyl sulfate (SDS)-電気泳動後、抗 PrP 抗体 SAF32 および SAF83 を用いたウェスタンブロッティングにより比較を行った。また、細胞密度が PrP および BDV 複製に与える影響についても検討した。PrP の N 型糖鎖付加に関わることが知られている N-アセチルグルコサミ

ン (GlcNAc) 転移酵素 (GnT) I, II, III, IVa, IVb, V および GnTV 発現を制御する転写因子 Ets-1 発現を RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより解析した。さらに、BDV 持続感染細胞と非感染細胞の SOD 活性の比較を行った。

(倫理面への配慮)

琉球大学医学部病原体等安全管理委員会、動物実験委員会の規定に従い行った。

C. 研究結果

細胞密度の増加により PrP は低分子量へと移行した。BDV 複製および PrP 発現量は細胞密度により大きな変化を受けなかったが、細胞密度上昇に伴い BDV 持続感染細胞の PrP は大きく低分子量へと移行した (図 1)。GnTI, II, III, IVa, IVb は BDV 持続感染により発現量に大きな変化が見られなかった (図 2)。一方、GnTV 発現および Ets-1 発現は BDV 持続感染により低下した (図 2, 3)。BDV 感染により GnTV, Ets-1 発現が低下したことから、BDV 持続感染による PrP の N 型糖鎖構造変化が Ets-1 発現低下に伴う GnTV 発現低下により生じていることが考えられた。細胞密度の上昇と共に SOD 活性は低下し、その低下の程度は BDV 持続感染細胞の方が非感染細胞よりも顕著であった (図 4)。

D. 考察

BDV は神経親和性のモノネガウイルスであり、細胞増殖に影響を与えることなく中枢神経系細胞へ持続感染を成立させることが知られている。また、BDV 持続感染グリア系培養細胞が Heat shock, 過酸化水素付加, 血清除去などの酸化ストレスに対して脆弱性を示すことが報告されている(文献3)。今回の結果より、BDV が持続感染した細胞では抗酸化ストレス能が低下しており、さらに GnTV 発現低下に伴う PrP の N 型糖鎖構造変化が見られることが分かった。さらに、我々は、プリオン蛋白質が抗酸化ストレス活性制御に関与することをこれまでに明らかにしている。これらのことから、BDV 持続感染による抗酸化ストレス能低下は、PrP の N 型糖鎖構造変化と関連があるのではないかと考えられた。

これまでの研究で、プリオン感染脳において DNA 損傷、脂質過酸化、蛋白質の酸化が観察されていることから、プリオン感染時には酸化ストレス動態に変化がおり、発症時には脳内において酸化的損傷が生じていることが示唆されている。今回の結果から、PrP の N 型糖鎖構造変化も抗酸化ストレス活性に影響を与える可能性が示されたため、プリオン病発症時にもこのような変化が起きているかについて、今後の検討が必要である。

E. 結論

BDV の持続感染は PrP の糖鎖構造を変化させる可能性がある。また、PrP の N 型糖鎖構造変化も抗酸化ストレス活性に影響を与えている可能性がある。

[参考文献]

- 1) Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226, 1999.
- 2) Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6:589-601, 2006.

- 3) Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Lee BJ, Tsuji S, Ikuta K, Tomonaga K. Persistent borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress. *J Virol* 79:2033-2041, 2005.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ano Y, Sakudo A, Onodera T. Role of microglia in oxidative toxicity associated with encephalomyocarditis virus infection in the central nervous system. *Int J Mol Sci* 13:7365-7374, 2012.
- 2) Xue G, Aida Y, Onodera T, Sakudo A. The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS One* 7:e32870, 2012.
- 3) Sakudo A. Hot bioorganic chemistry for medicine and health sciences. *Mini-Rev Org Chem* 9:2, 2012.
- 4) Uraki R, Sakudo A, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Zanusso G, Toniolo A, Onodera T. Penetration of infectious prion protein in the intestine during the lactation period. *Mini-Rev Org Chem* 9:27-30, 2012.
- 5) 小野寺節, 作道章一. 遅発性感染症に関する研究とフランス国立ヒト遺伝研究所訪問. *日仏生物学会誌 (Bulletin de la Societe Franco-Japonaise de Biologie)* 52:73-80, 2012.
- 6) Onodera T, Sakudo A. Introduction. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Current Progress in Advanced Research*, Horizon Scientific Press, Norwich, in press.
- 7) Onodera T, Sugiura K, Matsuda S, Sakudo A. Function of cellular prion protein. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Current Progress in Advanced Research*, Horizon Scientific Press, Norwich, in press.
- 8) Sakudo A. Prion protein and the family members, doppel and shadoo. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Current Progress in Advanced*

Research, Horizon Scientific Press, Norwich, in press.

9) Sakudo A. CWD and other prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Current Progress in Advanced Research, Horizon Scientific Press, Norwich, in press.

10) Sakudo A, Onodera T. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). In: Liu D Ed. Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins, Taylor & Francis, New York, in press.

11) 作道章一. はじめに. 作道章一・編 食・健康の高安全化－殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp1, 2012.

12) 高山正彦, 作道章一. 殺菌, 滅菌, 消毒, 不活化技術に関する基礎用語の意味. 作道章一・編 食・健康の高安全化－殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp27-33, 2012.

13) 作道章一, 松田 盛. 滅菌処理の評価法と無菌性保証. 作道章一・編 食・健康の高安全化－殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp34-41, 2012.

14) 作道章一. ウイルス. 作道章一・編 食・健康の高安全化－殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp233-243, 2012.

15) 作道章一. プリオン. 作道章一・編 食・健康の高安全化－殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp263-271, 2012.

2. 学会発表

1) 作道章一. プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損細胞株を用いた PrP の機能解析. 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京, 3.28-30, 2013.

2) 平田あずみ, 古賀雄一, 田中俊一, 作道章一, 生田和良, 金谷茂則, 高野和文. Tk-subtilisin による異常型プリオンタンパク質分解効果の生物学的検討. 第 23 回日本生体防御学会学術集会, 東京, 7.9-11, 2012.

3) 松田 盛, 花城日向子, 作道章一. プリオン蛋白質ファミリー Shadoo の組織局在解析. 第 23 回日本生体防御学会学術集会, 東京, 7.9-11, 2012.

4) Koga Y, Tanaka S, Sakudo A, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of PrP^{Sc} with a thermostable protease and the analysis of its infectivity. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

5) Hori Y, Hirata A, Koga Y, Sakudo A, Ikuta K, Kanaya S, Takano K. Degradation of abnormal prion protein by a hyper-stable protease. Amsterdam, Prion 2012, May 9-12, 2012.

6) 花城日向子, 松田 盛, 小野寺節, 作道章一. プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損株を用いたプリオン関連蛋白質 Shadoo の発現解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

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

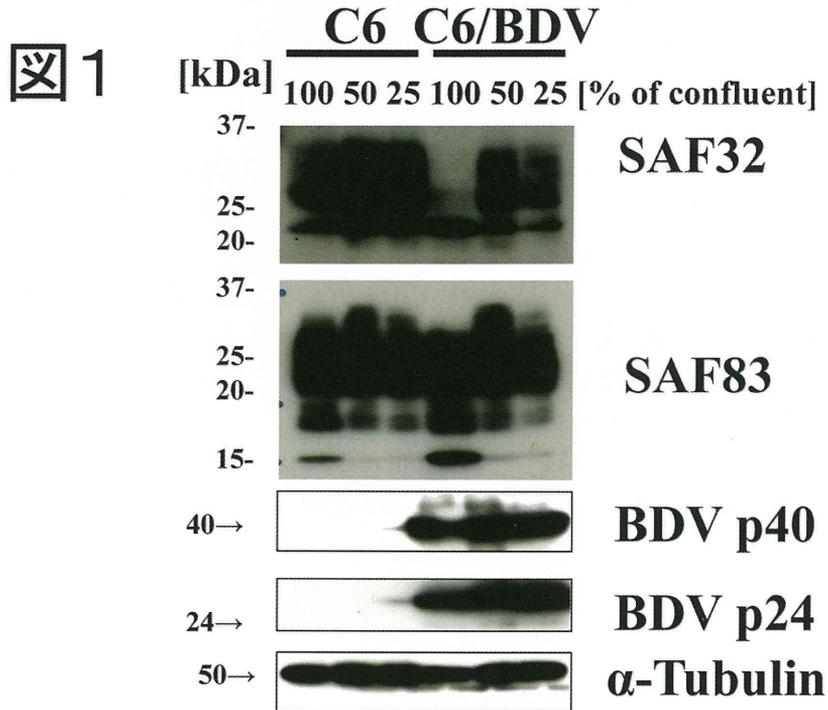
2. 実用新案登録

なし

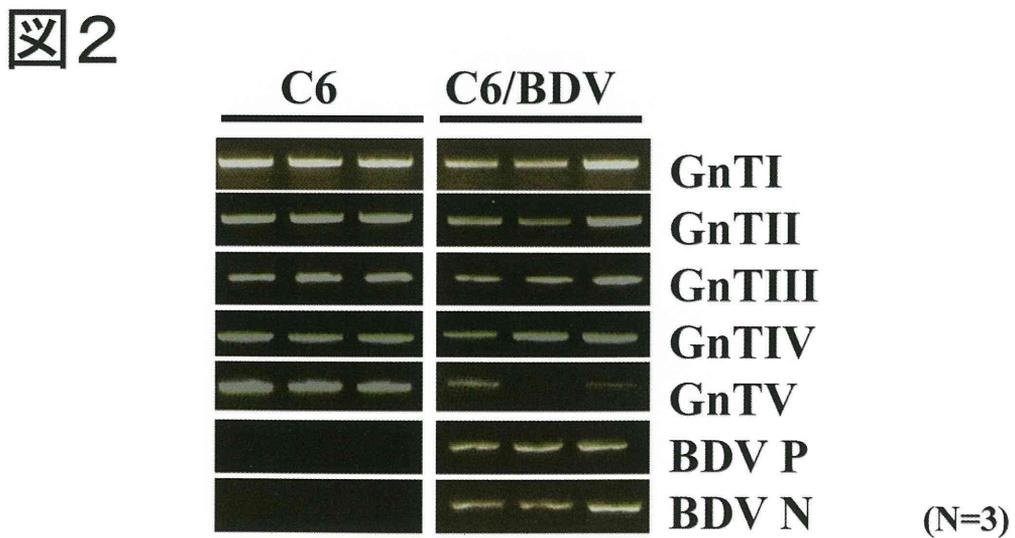
3. その他

なし

BDV持続感染細胞においてPrPは低分子量化している



BDV持続感染細胞においてGnTV発現が低下している



BDV持続感染細胞においてEts-1発現が低下している

図3

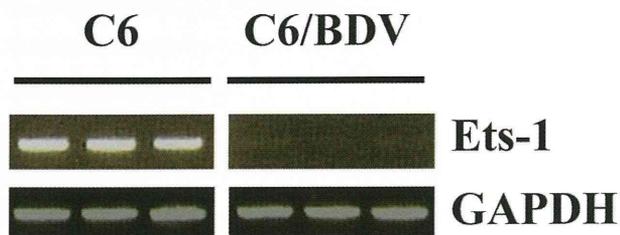
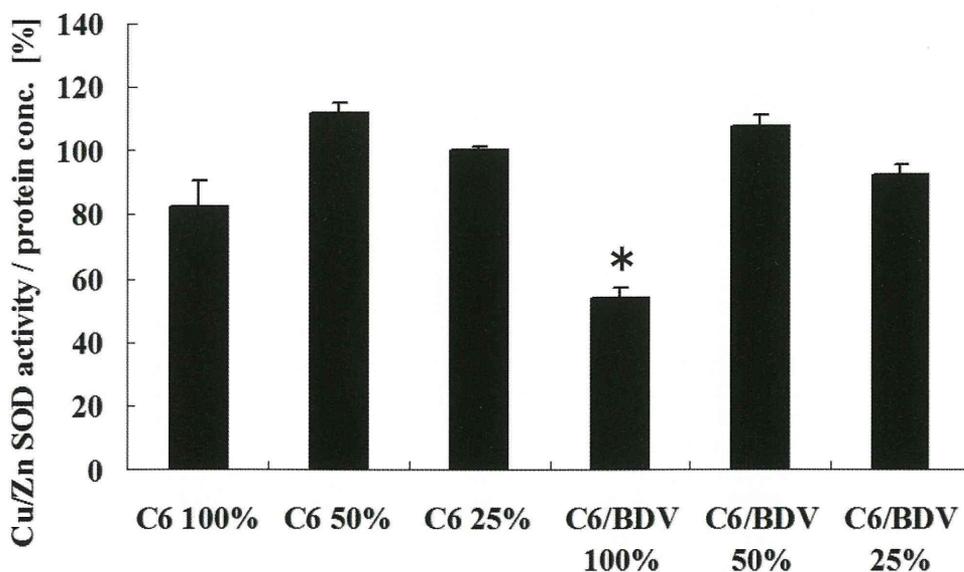


図4 BDV持続感染はSOD活性を低下させる



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

PrP によるミトコンドリア凝集機構の解析

研究分担者：金子清俊 東京医科大学神経生理学講座
研究分担者：八谷如美 東京医科大学神経生理学講座
研究協力者：加藤大樹 東京医科大学神経生理学講座
研究協力者：西島佳奈 東京医科大学神経生理学講座

研究要旨 正常型プリオンタンパク質が関与する神経細胞死機構を解析するため、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を用いて再構成系を構築した。このとき、細胞質 14-3-3 タンパク質のアイソフォームの一つである ζ が、プリオンタンパク質が異常局在しているミトコンドリアにリクルートされ、ミトコンドリア外膜上の Miro1 と複合体を形成した。これにより、ミトコンドリアの正常な細胞内分布が阻害され、結果として、神経細胞内のエネルギー供給が絶たれることが、細胞死の大きな要因であることが示唆された。

A. 研究目的

細胞にプロテアソーム障害がおこったときや遺伝性プリオン病である GSS の Y145STOP 変異では、分泌系を経由して細胞膜上に局在する PrP が、あやまってミトコンドリアに移行する。このことがミトコンドリア膜電位を低下させ、ミトコンドリアの核近傍への凝集を引き起こし、神経細胞死が起こる原因のひとつとなる。PrP 依存性ミトコンドリア凝集の過程は微小管依存性であり、14-3-3 タンパク質アイソフォームである 14-3-3 ζ が必須であることから、今年度は 14-3-3 ζ /PrP 依存性のミトコンドリア凝集体形成における詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

生細胞内におけるミトコンドリアは、微小管に沿ってキネシン依存性に順方向（核近傍；中心体および微小管形成中心から細胞膜側）、ダイニン依存性に逆方向（細胞膜側から核近傍側）に絶え間なく動いている。PrP 依存性のミトコンドリア凝集が起こっている状態では、核近傍に凝集体が形成されていることから、順方向のミトコンドリア輸送に特異的な障害が起こっていると考えられた。順方向のミトコンドリア輸送には、ミトコンドリア外膜タンパク質である Mitochondrial Rho GTPase 1 (Miro1) と細胞

質のタンパク質である γ -Aminobutyric acid receptor interacting factor (GRIF1) とが複合体を形成し、その複合体がキネシンと結合することが必須である。そこで、PrP 依存性のミトコンドリア凝集の分子機構として、(1) PrP がミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア内膜の電子伝達系を阻害することでミトコンドリア膜電位が低下する、(2) (何らかの認識機構により) 14-3-3 ζ は膜電位が低下したミトコンドリアに集積する、(3) 14-3-3 ζ がミトコンドリア外膜上を覆うことで、Miro1 と GRIF1 の複合体の形成が阻害される、(4) その結果、ミトコンドリアの順方向の輸送障害が起こり、逆方向のみの輸送によって核近傍に凝集する、と考え、以下の実験を行った。すなわち、マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞を用い、薬剤を使わずにミトコンドリア凝集をおこすことが可能な EGFP 融合のトランケート PrP を発現させ回収した。細胞をホモジナイズしたのち遠心し、PrP が移行したミトコンドリア画分を調製後、1% TX-100 で可溶化し、Miro1 あるいは 14-3-3 ζ 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降後、サンプルをゲルにかけ、ウェスタンブロットを用いて複合体の構成成分を検討した。

(倫理面への配慮)

培養細胞での実験であり該当しない。

C. 研究結果

PrP が移行したミトコンドリアでは、14-3-3 ζ と Miro1 が複合体を形成していた。このとき Miro1 と GRIF1 の複合体は見られなかった。一方、コントロールの細胞から得られたミトコンドリアでは、Miro1 と GRIF1 の複合体が検出された。

D. 考察

分泌系を經由して細胞膜上に局在する PrP があやまってミトコンドリアに移行すると、ミトコンドリア外膜上に 14-3-3 ζ が集積し、そこに Miro1 が結合することで GRIF1 との複合体形成が阻害され、キネシンとの相互作用の障害がおこり、ミトコンドリア凝集を起こしてしまうと考えられる。

E. 結論

加齢等によるプロテアソーム活性の低下により、14-3-3 ζ が PrP 異常局在を起こしているミトコンドリアにリクルートされ、ミトコンドリアの細胞内の分配に関わる Miro1 と複合体を形成し、その活性を阻害する。これにより、ミトコンドリアの分配不全からミトコンドリア凝集を起こし、神経細胞内の正常なエネルギー供給が絶たれる。以上の現象が、正常型プリオン蛋白質が関与する神経細胞死機構の大きな要因である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishijima K, O'hara K, Kaneko K, Hachiya N. Calmodulin-like skin protein (CLSP) is a novel biomarker candidate for Pick's disease by Unfoldin-modified proteomic analysis. *J Neurol neurophysiol* S11-003, 2012. electric version

2. 学会発表

1) Hachiya N. Application of new scientific discovery to the detection and destruction of pathogens. Neuro 2012, Las Vegas, May 14-16, 2012.

2) Kato H, Kaneko K, Hachiya N. Molecular interaction between 14-3-3 ζ and mitochondrial trafficking factors plays an important role in aggregation of PrP^C-targeted mitochondria. Asian Pacific Prion symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

3) 八谷如美. 神経変性疾患由来細胞内凝集体の解析. 第5回京大原子炉研究所セミナー, 泉佐野, 11.1, 2012.

4) 八谷如美. タンパク質不溶化問題解決のための画期的手法の開発. 第55回北摂循環器研究会, 大阪, 11.12, 2012.

5) Hachiya N, Leszek J. Possible nuclear transport-related biomarkers for the neurodegenerative disease. Keystone symposia, Tokyo, October 23, 2012.

6) 八谷如美. プリオン病の基礎. 第6回食と医療の安全にかかわるプリオン病市民講座, 東京, 12.2, 2012.

7) 市村 徹, 八谷如美, 勝二郁夫. 14-3-3タンパク質はTRIM32ユビキチンリガーゼの機能性プールを維持する. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.11-14, 2012.

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: タンパク質の可溶化活性を有する多量体タンパク質およびその用途

出願人: 東京医科大学

発明者: 八谷如美, 西島佳奈

出願番号(出願日): 特願 2012-270532 (2012/12/11)

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 難治性疾患等克服研究事業（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

プリオン感染はインスリンシグナルを阻害する

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：内山圭司 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 インスリンシグナルの低下は、アルツハイマー病等の神経変性疾患の神経細胞死に関与することが示唆されている。しかし、プリオン病の神経細胞死におけるインスリンシグナルの関与は不明である。本研究では、プリオン感染によるインスリンシグナルの影響及びそのメカニズムについて解析した。その結果、プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリング・エンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、その結果インスリン受容体は細胞膜まで運ばれず、インスリンシグナルが抑制されることが分かった。

A. 研究目的

インスリンシグナルの低下は、アルツハイマー病等の神経変性疾患の神経細胞死に関与することが示唆されている(1)。しかし、プリオン病の神経細胞死におけるインスリンシグナルの関与は不明である。本研究では、プリオン感染細胞を用いて、プリオン感染によるインスリンシグナルの影響及びそのメカニズムについて解析した。

B. 研究方法

細胞：マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞にマウスプリオン蛋白質を過剰発現したクローン細胞 N2aC24、N2aC24 細胞に 22L プリオン株を感染しクローン化した N2aC24L1-3 細胞、N2aC24L1-3 細胞に SAF32 抗プリオン蛋白質抗体を反応させ治療した N2aC24L1-3 (cured) 細胞を用いた。

ウェスタンブロッティング(WB)：細胞ライセートを SDS-ポリアクリルアミドゲルにて展開し、各抗原に対する抗体を用いて行なった。

細胞免疫染色：常法に従い行なった。異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の検出は mAb132(北海道大学、堀内教授より分与)を用いて行なった(2)。

インスリン刺激：細胞を 10^{-7} M インスリンで 10 分間処理した後に、ライセートを作製し、WB に供した。

細胞膜蛋白質の検出：細胞膜蛋白質を常法に従いビオチンラベルし、アビジンビーズにて精

製した後、WB に供した。

細胞内小胞輸送アッセイ：GFP 融合温度感受性変異体 vesicular stomatitis virus G 蛋白質(VSV-G(ts045)-GFP)をコードするプラスミドを細胞に非許容温度下でトランスフェクションし、16 時間後に許容温度に戻し、経時的に細胞を抗 GFP 抗体とゴルジマーカ GM130 に対する抗体を用いて免疫染色した。細胞全体の蛍光強度に対するゴルジ装置に局在する GFP の蛍光強度の比を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた研究であるので、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

プリオン感染によるインスリンシグナルの影響を調べるために、インスリンで刺激した N2aC24, N2aC24L1-3, N2aC24L1-3 (cured) 細胞のインスリン受容体βサブユニットのリン酸化の程度を WB にて解析した。その結果、N2aC24L1-3 細胞では、コントロールの N2aC24 細胞と比べて、インスリン添加後のインスリン受容体βサブユニットのリン酸化が著明に低下していた(図 1)。また、N2aC24L1-3 (cured) 細胞のβサブユニットのリン酸化は、N2aC24 細胞と同程度であった(図 1)。これらの結果は、プリオン感染によりインスリンシグナルが抑制されることを示した。

次に、プリオン感染によるインスリンシグナルの抑制のメカニズムを解析するために、細胞膜表面に発現するインスリン受容体の量を定量的に解析した。まず、ビオチンにて細胞膜蛋白質を標識し、標識した蛋白質をアビジンビーズにより回収した。回収した蛋白質は抗インスリン受容体 α サブユニット抗体を用いた WB に供した。その結果、 α サブユニットの総発現量は同程度であるにもかかわらず、コントロールの N2aC24 と比べて、N2aC24L1-3 細胞の細胞膜上の α サブユニットは低下していた(図 2)。この結果は、感染細胞では、インスリン受容体の細胞膜への輸送が障害されている可能性が示唆された。

インスリン受容体の細胞膜への輸送の障害のメカニズムを解析するために、VSV-G(ts045)-GFP を用いた細胞内小胞輸送アッセイを行なった。N2aC24L1-3 細胞では、ゴルジ装置から細胞膜までの小胞輸送が遅延していた(図 3)。以上の結果は、プリオンが感染すると、ゴルジ装置から細胞膜までの小胞輸送が障害されることを示した。

最後に、PrP^{Sc}の細胞内局在を、mAb132を用いて検索した。その結果、PrP^{Sc}はエンドソーム分画に検出でき、特にリサイクリング・エンドソームに多く検出された(data not shown)。

D. 考察

以上の結果から、プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリング・エンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害する可能性が考えられた。このため、インスリン受容体は細胞膜まで運ばれず、その結果インスリンシグナルが抑制されると考えられた。

E. 結論

プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリング・エンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、その結果インスリン受容体は細胞膜まで運ばれず、インスリンシグナルが抑制されることが分かった。

[参考文献]

1) Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's

disease? *Trends Pharmacol Sci* 23:288-293, 2002.

2) Yamasaki T, *et al.* Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol* 93:668-680, 2012.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi Y, Miyata H, Uchiyama K, Ootsuyama A, Inubushi S, Mori T, Muramatsu N, Katamine S, Sakaguchi S. Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions. *PLoS One* 7:e43540, 2012.

2) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with human IgG1 antibody specific for β -form prion protein. *J Biol Chem* 287:14023-14039, 2012.

3) 坂口末廣. 44 章スローウイルスとプリオン. 吉開泰信, 西山幸廣・編 レビンソン微生物学・免疫学[原書 11 版], 丸善出版, 東京, pp321-325, 2012.

2. 学会発表

1) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染は神経細胞におけるインスリンシグナル異常を引き起こす. 第 27 回中国四国ウイルス研究会, 米子, 6.23-24, 2012.

2) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送の抑制 Inhibition of post-Golgi membrane traffic in prion-infected cells. 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ メンブレントラフィックと疾患, 福岡, 12.11-14, 2012.

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

図 1: N2aC24, N2aC24L1-3, N2aC24L1-3(cured) 細胞をインスリン(Ins)で 10 分間刺激した後、インスリン受容体βサブユニット(IRβ)及びリン酸化インスリン受容体βサブユニット(Phospho-IRβ)に対する抗体で WB を行なった。N2aC24L1-3 細胞では、N2aC24 細胞と比べて、インスリン添加後のインスリン受容体βサブユニットのリン酸化が著明に低下していた。N2aC24L1-3(cured)細胞のβサブユニットのリン酸化は、N2aC24 細胞と同程度であった。

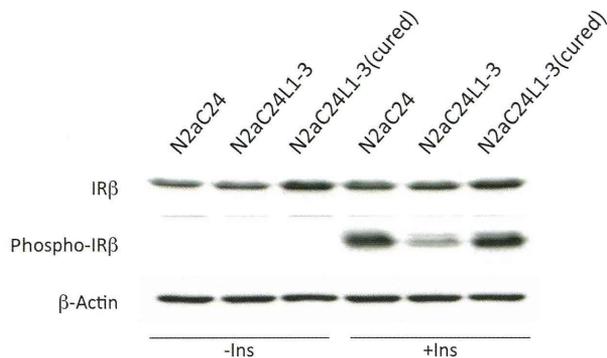


図 2: N2aC24, N2aC24L1-3, N2aC24L1-3(cured) 細胞の細胞膜蛋白質をビオチンにて標識し、標識した蛋白質をアビジンビーズにより回収した。回収した蛋白質は抗インスリン受容体αサブユニット(IRα)抗体を用いた WB に供した。αサブユニットの総発現量は同程度であるにも関わらず、コントロールの N2aC24 と比べて、N2aC24L1-3 細胞の細胞膜上のαサブユニットは低下していた。

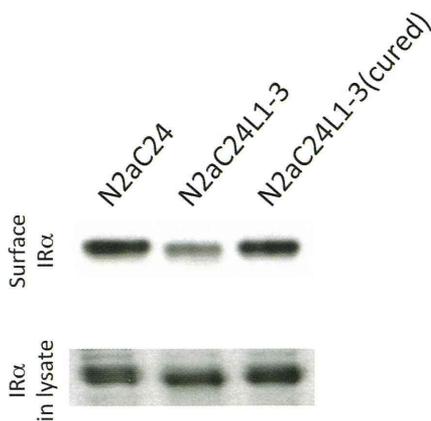
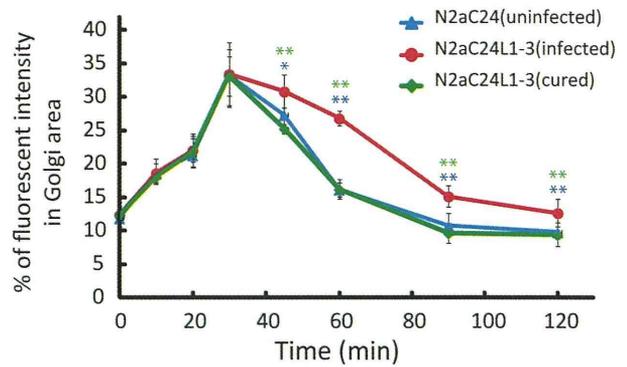


図 3: VSV-G(ts045)-GFP をコードするプラスミドを細胞に非許容温度下でトランスフェクションし、16 時間後に許容温度に戻し、経時的に細胞を抗 GFP 抗体とゴルジマーカーGM130 に対する抗体を用いて免疫染色した。細胞全体の蛍光強度に対するゴルジ装置に局在する GFP の蛍光強度の比を求めた。N2aC24L1-3 細胞では、ゴルジ装置から細胞膜までの小胞輸送が遅延していた。



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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
 研究協力者：林 諒 北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室
 研究協力者：平井佑治 北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室
 研究協力者：宋 昌鉉 北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室
 研究協力者：鈴木章夫 北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室
 研究協力者：堀内基広 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 (PrP^{Sc}) 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)。しかしこれは異種移植実験であったため、同種移植の実験系でより詳細な解析が必要であると考えられた。マウス骨髄 (BM)、緻密骨 (CB)、脂肪組織 (AT) より MSCs を分離し、スクレイピー Chandler 株感染マウスの臨床期に脳内移植したところ、BM 由来 MSCs 移植群は非移植対照群と比較して 10 日程度生存期間が延長した ($p < 0.05$, Logrank 検定)。CB 由来と AT 由来 MSCs 移植群の生存期間は対照群と有意差がなかった。MSCs で報告されている表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、AT 由来 MSCs では CD105 が、CB 由来 MSCs では CD105、CD90.2、CD73、CD106 が二峰性を示し、分離した MSCs には複数の細胞集団が含まれることが示唆された。それにより治療効果が希釈されている可能性が考えたため、MACS を用いて CD105 の発現を基にサブフラクションに分離することを試みた。分離前は CB、AT 由来 MSCs とともに CD105 陽性細胞は全体の 40-50%程度であったが、分離後は 100%が CD105 陽性となった。AT 由来 MSCs では解析した全てのマーカーの発現が均一となったが、CB 由来 MSCs では CD90.2 が二峰性のままであった。AT 由来 CD105 陽性 MSCs は 6 代継代後も 100%の細胞が CD105 を発現していた。脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を解析したところ、CD105 陽性細胞群は分離前の細胞とほぼ同等の分化能を有していた。hMSCs はプリオン感染マウスの脳内に移植すると、病変部に走化し、神経栄養因子を産生するが、PrP^{Sc} の増殖を抑制しない。そこで、PrP^{Sc} 増殖抑制効果を持つ抗マウス PrP モノクローナル抗体 (mAb) 44B1 の scFv を恒常的に発現する hMSCs を作製した。44B1scFv 遺伝子をレンチウイルスベクターにより hMSCs に導入し、培養上清に分泌される scFv を ELISA により検出した。44B1scFv 遺伝子を導入した hMSCs は、7 代継代後も培養上清中にリコンビナントマウス PrP (rPrP) と結合可能な scFv を産生していた。また、44B1scFv 産生 hMSCs はプリオン感染マウス脳乳剤に対する走化能を有していた。今後はこれらの MSCs をプリオン感染マウスに移植し、治療効果を検討していく。

A. 研究目的

昨年度はマウス組織より MSCs (mMSCs) を分離し、同種移植によるプリオン病治療モデルの確立を試みた。表面抗原の発現解析により mMSCs は複数の細胞集団から構成されることが示唆されたため、さらに治療効果を高めるために、表面抗原の発現によりサブフラクション

に分離し、最も治療効果の高い細胞集団を選択する。また、hMSCs の移植では PrP^{Sc} の増殖は抑制されないことから、PrP^{Sc} 増殖抑制効果を示す 44B1scFv を恒常的に発現する hMSCs を作製し、神経保護・修復作用と PrP^{Sc} 増殖抑制効果を併せた治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

1. MACS による CD105 陽性細胞の分離

CB 由来、AT 由来 mMSCs を抗 CD105 ラットモノクローナル抗体と反応させ、その後、抗ラット IgG 結合マイクロビーズと反応させた。MACS セパレーターと MS カラムを用いて、ビーズに結合した細胞を分離した。

2. 分化能の解析

細胞の培養液を分化誘導培地に交換し、4 日ごとに新しい分化誘導培地に交換した。分化誘導は 5 %酸素条件下で行った。アリザリンレッド染色、オイルレッド染色により骨組織、脂肪組織への分化を解析した。

3. mAb31C6 および 44B1 の Fab, scFv 遺伝子配列を組み込んだレンチウイルスベクターの作製と Fab, scFv による PrP^{Sc} 増殖抑制効果の評価

mAb31C6 および 44B1 の重鎖、軽鎖をコードする遺伝子をレンチウイルスベクタープラスミド CS-CAG-MCS-IRES-2-Bsd (理化学研究所三好浩之博士より分与) に組み込んだ。パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp)、エンベローププラスミド (pCMV-VSV-G-Rev) とともに 293T 細胞に導入し、レンチウイルスベクター粒子を作出した。同粒子を 293T 細胞に感染させ、上清中に Fab, scFv が放出されていることをウエスタンブロッティング (WB) により確認した。一価の可変領域あたりのモル濃度に換算し、希釈した同上清を Chandler 持続感染 N2a 細胞に添加し、4 日後に PrP^{Sc} 量を WB により評価した。

4. 44B1scFv を恒常的に発現する hMSCs の作製

44B1scFv 遺伝子配列を有するレンチウイルスベクターを 100 multiplicity of infection でヒトテロメアーゼにより不死化された hMSCs に感染させた。プラストサイジンにより選択を行い、目的の遺伝子配列が挿入された細胞を選択した。

5. ELISA による scFv 産生の検出

方法 5 で作製した hMSCs の培養上清を継代毎に回収し、rPrP を抗原とした ELISA により scFv を検出した。

6. in vitro 走化試験

試験開始 15 時間前に血清を含まない DMEM で細胞を培養した。Chandler 株感染または非感染マウス脳乳剤を 1% (w/v) となるように DMEM に懸濁し、24 ウェルプレートのウェルに加えた。上からインサートウェルを設置し、 5×10^4 個/ml の MSCs 懸濁液を加え、24 時間培養した。インサートウェルをクリスタルバイオレットにより染色し、ウェルの下側に遊走した細胞を計数した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、北海道大学動物実験委員会で承認された実験計画書に基づいて実施した (承認番号 09-104, 09-105)。

C. 研究結果

1. CD105 陽性 MSCs の分離と表面抗原の解析

フローサイトメトリーによる表面抗原の解析では、CD105 の発現は CB 由来と AT 由来 MSCs の双方で二峰性を示した。CD105 (Endoglin) は TGF- β 受容体の共受容体であり、細胞増殖マーカーとして用いられる。また、マウス骨髄の Sca1 陽性造血系幹細胞のうち、長期自己複製能を持つ細胞集団に発現することが報告されている (Chen et al., 2002)。CD105 により選択することで増殖能の高い細胞集団を得られ、移植後の MSCs の生着率が向上する可能性が考えられた。MACS により CD105 陽性細胞を分離し、表面抗原の発現を分離前の細胞と比較した (図 1)。CT 由来 MSCs では、陽性フラクションの 100% の細胞が CD105 陽性を示したが、CD90.2 は二峰性のままであった。その他のマーカーの発現は分離前と同様であった。AT 由来 MSCs では、陽性フラクションの 100% が CD105 陽性を示し、CD105 以外のマーカーの発現は分離前の細胞と同様であった。AT 由来 CD105 陽性 MSCs を 6 代継代も表面抗原の発現に大きな変化が認められなかった

2. CD105 陽性 MSCs の分化能の解析

分離した AT 由来 CD105 陽性 MSCs が分化能を維持していることを確認するために、脂肪細胞および骨芽細胞への分化誘導を行った (図 2)。骨芽細胞への分化誘導では、CD105 陽性

MSCs は分離前の細胞と同様に分化誘導開始 8 日目からカルシウムの沈着が確認された。また、脂肪滴は分離前の MSCs、CD105 陽性 MSCs とともに分化誘導前から認められたが、脂肪細胞への分化誘導 8 日目以降、脂肪滴を含む細胞の割合は DMEM で培養したものよりも多くなった。

3. 31C6 および 44B1 の Fab、scFv による PrP^{Sc} 増殖抑制効果の解析

mAb31C6 と 44B1 をプリオン感染マウスの脳室に持続的に投与すると、PrP^{Sc} の増殖が抑制され、生存期間が延長する (Song et al., 2008)。しかし、抗体の分布は脳室周囲に限局していることから、治療効果を高めるためには抗体の分布を改善する必要がある。IgG よりも分子量の小さい Fab および Fab の可変領域から構成される scFv を用いることで組織浸透性が向上することが報告されている (Holliger and Hudson, 2008)。そこで、mAb31C6 および 44B1 の Fab、scFv 遺伝子発現レンチウイルスベクターを作製した。Fab、scFv による PrP^{Sc} 増殖抑制効果を評価するために、Fab、scFv 遺伝子を導入した 293T 細胞の培養上清を Chandler 持続感染 N2a 細胞に添加した (図 3)。添加後 4 日目に PrP^{Sc} 量を解析したところ、44B1 scFv が最も低い濃度で PrP^{Sc} 増殖抑制効果を示した。

4. 44B1 scFv を恒常的に産生する hMSCs の作製

Fig. 4 より、44B1scFv が PrP^{Sc} の増殖を最も効率よく抑制したため、44B1scFv 遺伝子をレンチウイルスベクターにより hMSCs に導入し、遺伝子が導入された細胞をブラストサイジン耐性を指標に選別した (44B1scFv-hMSCs)。培養上清に scFv が分泌されているかを確認するために、rPrP を抗原とした ELISA により scFv を検出した (図 4)。その結果、44B1scFv-hMSCs は rPrP に結合可能な scFv を産生しており、7 代継代後まで産生量に変化は認められなかった。

5. 44B1scFv-hMSCs の走化能の評価

hMSCs はプリオン感染マウス脳の病変部に走化し、in vitro でも hMSCs はプリオン感染マウス脳乳剤に対して走化するため、in vitro 走化試験の結果から in vivo での走化性を推測

することが可能である (Song et al., 2011)。44B1scFv-hMSCs の走化能を in vitro 走化試験により解析した (図 5)。Chandler 感染マウス脳乳剤に走化する 44B1scFv-hMSCs の細胞数は非感染マウス脳乳剤に対して走化する細胞数よりも有意に多かった ($p < 0.01$, student's t test)。従って、44B1scFv-hMSCs はプリオン感染マウスの脳内の病変部位に対して走化能を有していることが推測された。

D. 考察

CB および AT 由来 MSCs を CD105 の発現によりサブフラクションに分離した。AT 由来 MSCs では、陽性フラクションの 100% が CD105 陽性を示し、その他のマーカーも二峰性パターンを示さなかった。また、AT 由来 CD105 陽性 MSCs は 6 代継代後でも表面抗原の発現を維持していた。従って、AT 由来 MSCs は CD105 発現の有無により、2 つの細胞集団にと分画できるものと考えられた。AT 由来 CD105 陽性 MSCs はフラクション分離前の MSCs と同等の分化能を有しており、MSCs としての性質を維持していることが示唆された。一方で CB 由来 MSCs では CD105 陽性フラクションの細胞でも CD90.2 は二峰性のパターンを示すが、CD105 陽性細胞群では大部分が CD73 陰性、CD106 陰性であることから ①CD105+, CD90.2+, CD73-, CD106-, ②CD105+, CD90.2-, CD73-, CD106-, ③CD105-, CD90.2+, CD73+, CD106+, ④CD105-, CD90.2-, CD73+, CD106+, の細胞集団が存在することが示唆された。今後は CD105 陽性および陰性フラクションの細胞をプリオン感染マウスに移植して、治療効果を比較する。その結果次第では、CB 由来 MSCs に関してはさらにサブフラクションに分離する必要があるかもしれない。

神経保護・修復作用と PrP^{Sc} 増殖抑制効果を併せた治療法の開発を目指して、44B1scFv を恒常的に発現する hMSCs を作製した。scFv を用いることで分子の小型化による脳組織への浸透率の向上すること、hMSCs の病変部への走化性を利用し、ベクターとして用いることで、scFv が病変部に広範囲に分泌されることが期待される。実際、44B1scFv-hMSCs は in vitro 走化試験でプリオン感染マウスの脳乳剤に対して走

化性が認められ、in vivo でも病変部に走化しうることが推測された。hMSCs はプリオン感染マウスの静脈内に投与した場合でも、脳の病変部に走化する (Song et al., 2009)。44B1scFv-hMSCs が同様に末梢から脳の病変部への走化性を有している場合、末梢からの MSCs の移植による治療法の開発が可能になるかもしれない。脳内への移植は侵襲性が高く、患者への負担が大きいこと、手技が煩雑であること、医原性プリオン病発生のリスクが伴うことなどが問題として挙げられ、末梢からの移植が可能になれば、より安全なプリオン病治療法の開発が実現可能となる。

抗 PrP 抗体の Fab あるいは scFv など一価の抗体がプリオン持続感染細胞での PrP^{Sc} 産生を阻害することが報告されている (Donofrio et al., 2005; Shimizu et al., 2010)。44B1scFv の PrP^{Sc} 増殖抑制効果は可変領域あたりのモル濃度で換算すると、IgG 型よりも 10 数倍から 20 倍程度高い濃度が必要となる。細胞の蛍光抗体染色の結果から、今回得られた 44B1scFv-hMSCs は 7 代継代後も安定して scFv を産生しており、in vitro でプリオン感染マウス脳乳剤に対して走化性を有していた。しかし、44B1scFv が細胞内に検出されたものは全体の 3 割程度であったことから (データ未掲載)、この細胞群全体での scFv 産生能は必ずしも高いとは言えない。今後は 44B1scFv-hMSCs をプリオン感染マウスに移植して治療効果を検討していくが、十分な効果が得られなかった場合は、アデノウイルスやバキュロウイルスなど、一過性ではあるが遺伝子の高発現が期待できるウイルスベクターにより 44B1scFv 遺伝子を発現させ、マウスに繰り返し投与することにより scFv 供給量を維持するなどの検討が必要かもしれない。

E. 結論

増殖マーカー CD105 の発現を指標とした mMSCs のサブフラクション分離方法を確立し、AT 由来 MSCs は CD105 発現の有無で均一な細胞集団に分けることができた。今後はプリオン感染マウスに移植し、治療効果を調べることで、最も治療効果の細胞群を選択する。その成果は、MSCs を用いたプリオン病治療法の開発に有益な情報を得られるものと考えられる。また、

44B1scFv を恒常的に発現する hMSCs を作製した。これにより MSCs の持つ神経保護作用と PrP^{Sc} 増殖抑制効果の双方を併せ持つ治療法の開発が期待される。

[参考文献]

- 1) Chen CZ, Li M, de Graaf D, Monti S, Gottgens B, Sanchez MJ, Lander ES, Golub TR, Lodish HF. Nonlinear partial differential equations and applications; Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15468-15473, 2002.
- 2) Donofrio G, Heppner FL, Polymenidou M, Musahl C, Aguzzi A. Paracrine inhibition and of prion propagation by anti-PrP aingle-chain Fv miniantibodies. *J Virol* 79:8330-8338, 2005.
- 3) Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23:1126-1136, 2005.
- 4) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. A novel anti-prion monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol* 54:112-121, 2010.
- 5) Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. *J Gen Virol* 89:1533-1544, 2008.
- 6) Song CH, Honmou O, Furuoka H, Horiuchi M. Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions. *J Virol* 86:11069-11078, 2011.
- 7) Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol* 83:5918-5928, 2009.

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) Hasebe R, Kabuki H, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Distribution of PrP^{Sc} and microglial activation in brains of CD14 knockout mice infected with prions. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 2) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Construction of mAb132-EGFP fusion proteins as a PrP^{Sc}-specific probe. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 3) 長谷部理絵, 蕪木洋之, 鈴木章夫, 山崎剛士, 堀内基広. プリオン感染 CD14 ノックアウトマウスにおけるミクログリアの活性化と PrP^{Sc} の沈着の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 11.13-15, 2012.
- 4) 鈴木章夫, 山崎剛士, 長谷部理絵, 堀内基広. 抗原への二価結合により付与される mAb132 の PrP^{Sc} 特異性. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11.13-15, 2012.

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