

2. 食品および原材料に応用可能な高感度プリオン検出技術の開発と BSE の感染病態・増殖機構の解明

分担研究者 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究協力者 祖母井香織（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）

福田茂夫（北海道立総合研究機構 畜産試験場）

研究要旨

我々が新規に開発した異常型プリオンタンパク（PrP）試験管内増幅法（real-time QUIC 法）は、プリオン病の簡便な診断方法となりうる可能性がある。本研究で我々は、BSE（C-BSE）と非典型 BSE（L-BSE）感染動物由来の組織・体液に含まれる、通常では検出できない微量の異常型 PrP を、増幅し検出する高感度検査法を確立することを目的とする。これまで real-time QUIC 法の基質としてシード側（C-BSE あるいは L-BSE）と同種である牛配列のリコンビナントプリオンタンパク（rBoPrP）を用いてきたが、大量精製が比較的難しいこと、また満足のいく感度に到達するためには 37°C で 1 週間程度保温する必要があることなどの不利な点が存在した。そこで今年度の研究では異種の PrP（具体的にはマウス、ヒト、ハムスター配列 PrP）を基質として C-BSE あるいは L-BSE に対する real-time QUIC 法について検討したところ、L-BSE をシードとした場合、特にマウス配列 rPrP（rMoPrP）では rBoPrP 以上に反応が高いことが判明した。この結果は real-time QUIC 法による L-BSE の高感度な検出法を可能にしたことを示している。今後は C-BSE の改善を図るとともに今回観察された結果をもたらした根本的なメカニズムの理解を目指すことが重要であると考えられる。

A. 研究目的

① 我々が以前開発した異常型プリオンタンパク（PrP）試験管内増幅法（real-time QUIC法）を用いて、BSE（C-BSE）と非典型BSE（L-BSE）感染動物由来の組織・体液に含まれる、通常では検出できない微量の異常型PrPを増幅し検出する高感度検査法を確立する。またreal-time QUIC法とend-point dilutionによる異常型PrPの定量法（シード量の測定）を確立することも目指す。

② BSEは他のプリオン株に比べ異種へ伝達しやすく、また株の特徴（病理像等）がほとんど変化しないことが示されているが、その理由・分子機構については解明されていない。したがって本研究では異常型PrP試験管内増幅法を中心としたin vitroレベルの解析を行うことにより、上記に挙げたようなBSE株の特異的な性質をもたらす分子機構の解明を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (rPrP) の精製

ウシ、マウス、ヒト、ハムスター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) を用いて一晩かけ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で保存する。

2) C-BSE, L-BSE に対する QUIC 反応

C-BSE, L-BSE に対する real-time QUIC 法の最適化を図るため、リコンビナント PrP (rPrP) の種類を変えて検討する。反応のシードとして C-BSE, L-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。

(倫理面への配慮)

C-BSE, L-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

1) マウス配列 rPrP (rMoPrP) による real-time QUIC 法

rMoPrP を反応基質として用い、ハムスタープリオン 263K、マウスプリオン mBSE、C-BSE、L-BSE をそれぞれシードとして real-time QUIC 法を行なった (図 1 & 図 2)。263K、mBSE、C-BSE に対しては精製日の異なる rMoPrP の 2 つの Lot を使用した。その結果、mBSE に対しては両方の Lot とも高い感度 (10^{-9} 以上) を示したのに対して、C-BSE では Lot 間で反応の違いが観察された。263K では両 Lot とも mBSE に比べ 10^{-2} から 10^{-1} 以上程度感度が低かった。L-BSE をシードとした場合は C-BSE に対して感度の低かった Lot を用いたにもかかわらず、非常に高い感度 (10^{-9} 以上) を示した。

2) ヒト配列 rPrP (rHuPrP) による real-time QUIC 法

rHuPrP を反応基質として用い、C-BSE、L-BSE をそれぞれシードとして real-time QUIC 法を行なった (図 3)。C-BSE に対しては蛍光値の上昇が全く観察されなかった一方、L-BSE に対しては視床 (thalamus) 由来の Brain homogenate をシードとした場合は 10^{-8} 、延髄 (medullary) 由来の Brain homogenate をシードとした場合は 10^{-7} までの希釈系列で陽性であった。

D. 考察

非定型 BSE (L-BSE) に対しては rMoPrP が非常に感度の高い (10^{-9} 以上) の QUIC 反応を示すことが

わかった。現在 detection limit を測定する実験を行なっている。

一方、C-BSE の QUIC 反応においては rBoPrP, rMoPrP, rHuPrP いずれも lot 間の違いが大きかった。この違いが何に基づいているのか、また克服方法等については今後の検討課題である。

C-BSE と L-BSE のシード活性の顕著な違いをもたらすメカニズムの解明もまた今後の検討課題であろう。

E. 結論

rMoPrP を基質とした real-time QUIC 法により L-BSE の高感度な検出法が可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sano K., Satoh K., Atarashi R., Takashima H., Iwasaki Y., Yoshida M., Sanjo N., Murai H., Mizusawa H., Schmitz M., Zerr I., Kim YS. and Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. PLoS One., 8(1):e54915, 2013
- 2) Ishibashi D., Atarashi R. and Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. Prion., 6(5):443-6, 2012
- 3) Nakato G., Hase K., Suzuki M., Kimura M., Ato M., Hanazato M., Tobiume M, Horiuchi M., Atarashi R., Nishida N., Watarai M., Imaoka K. and Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J Immunol., 189(4):1540-4, 2012
- 4) Ishibashi D., Atarashi R., Fuse T., Nakagaki T., Yamaguchi N., Satoh K., Honda K. and Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. J Virol., 86(9):4947-55, 2012

2. 学会発表

- 1) 祖母井香織, 新 竜一郎, 西田教行
プリオン蛋白の構造安定性に対する金属イオ

ンの影響 第 60 回日本ウイルス学会学術集会
(Nov, 13-15, 2012, Osaka)

- 2) 祖母井香織, 新 竜一郎, 西田教行
プリオン蛋白の構造安定性に対する金属イオ
ンの影響 第 85 回日本生化学会大会 (Dec,
14-16, 2012, Fukuoka)
- 3) 高月英恵, 新竜一郎, 佐野和憲, 佐藤克也, 西
田教行
RT-QUIC 法を用いたヒトプリオンサンプル中
の Seeding Activity の測定 第 85 回日本生化学
会大会 (Dec, 14-16, 2012, Fukuoka)
- 4) Takatsuki H., Atarashi R., Sano K., Satoh K., and
Nishida N. Quantitation of seeding activity of
human prion using real-time quaking induced

conversion assay. Prion2012 (May, 10-12, 2012,
Amsterdam, Netherland)

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

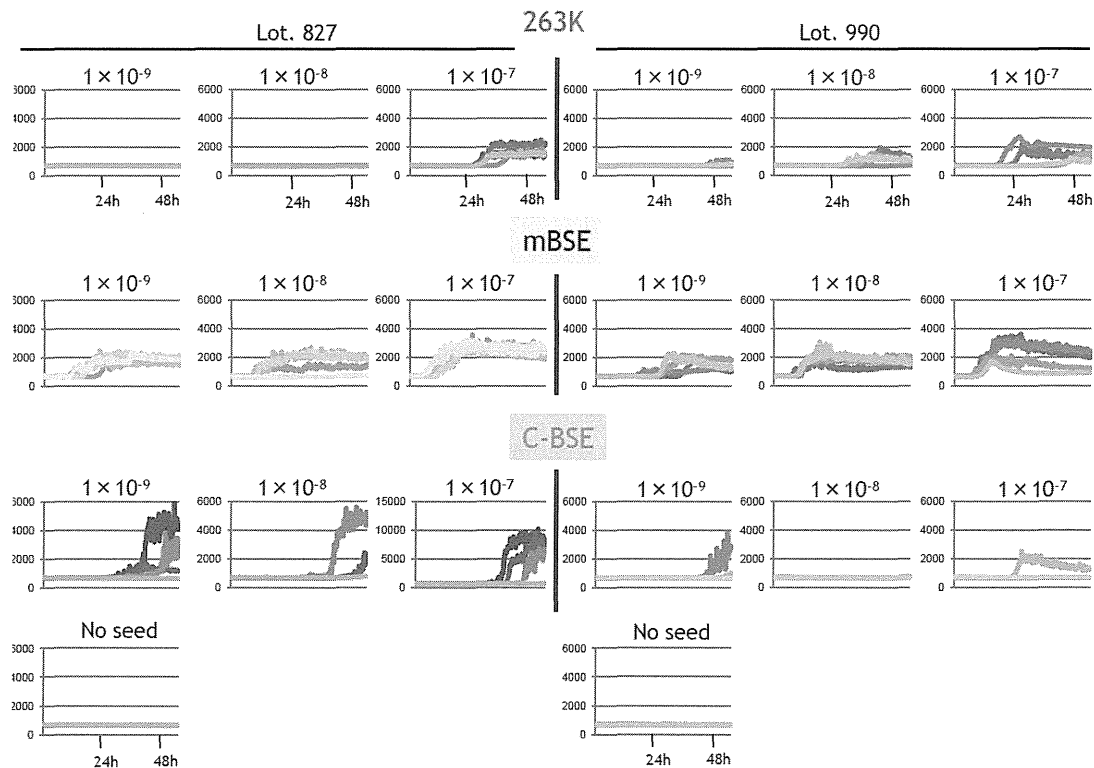


図 1 rMoPrP を反応基質として用いた real-time QUIC (シードとして 263K, mBSE, C-BSE を添加)

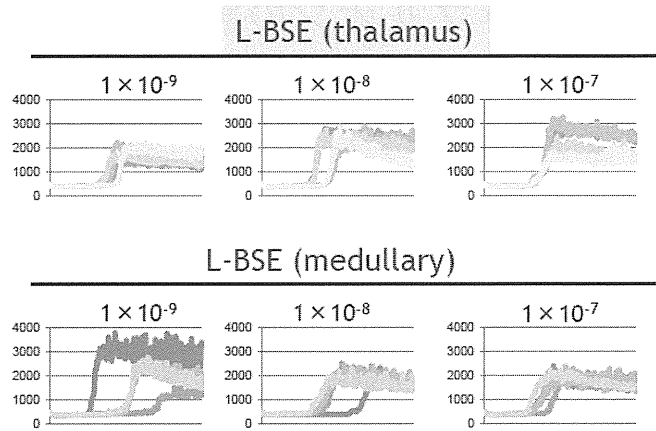


図2 rMoPrP を反応基質として用いた real-time QUIC (シードとして L-BSE を添加)

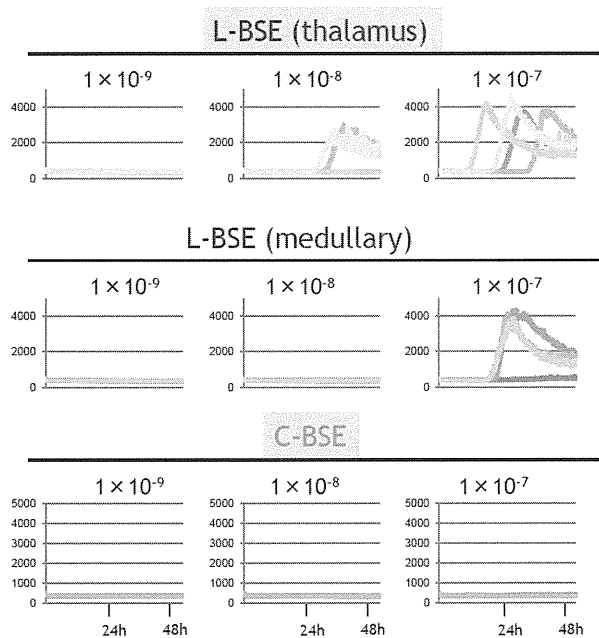


図3 rHuPrP を反応基質として用いた real-time QUIC (シードとして L-BSE、C-BSE を添加)

3. 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

分担研究者 北本 哲之 東北大学大学院 医学系研究科 教授

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、昨年度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が、その方法は、腹腔内投与による FDC への異常型プリオン蛋白の沈着で判定したものであった。今年度は、頭蓋内投与による感染実験の結果と比較した。発病率、観察期間、感染力の評価などを総合的に判断して、腹腔内投与による FDC 判定での優位性が明らかとなった。

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。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のかは、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。例えば、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がノックインマウスの結果通りとなったわけである。

このように、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作製して、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 や sCJD を用いた。また、発病したノックインマウスの感染脳も感染因子として用いた。使用した実験動物モデル

は、基本的にヒト型プリオン蛋白のノックインマウスとウシ型プリオン蛋白の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。頭蓋内投与の感染実験では、10%脳乳剤を20 μ l投与後発病まで観察し、マウスの脳半球を組織学的検索に、残りの半球を凍結し Western や感染実験に用いた。

C. 研究結果

腹腔内投与による FDC アッセイ

接種材料は、ノックインマウスの10%脳乳剤を Ki-Bov へ腹口腔内投与し、75日後に判定したものの。結果は、以下の通りである。

接種材料	感染率(FDC 陽性率)
Ki-129M/M[vCJD]	6/6 (28.32%)
Ki-129M/V[vCJD]	6/6 (17.41%)
Ki-129V/V[vCJD]	5/5 (6.86%)
sCJD VV2a	0/4
sCJD VV2b	0/5

FDC アッセイでは、vCJD を感染させたヒト化マウスの脳は、接種した全ての Ki-Bov で感染が

確認された。一方、VV2などの sCJD プリオンでは、感染成立は認められなかった。

頭蓋内投与による Ki-Bov への感染

接種材料は、vCJD の感染が成立したノックインマウスの10%脳乳剤か、ヒトの sCJD プリオンの脳乳剤を用いた。脳乳剤を、Ki-Bov マウスの頭蓋内に20 μ l投与後、投与されたノックイン・マウスが発病するまで観察し、発病した後、左脳半球を組織検索、右脳半球を凍結保存しウエスタン解析や次の感染実験に用いた。結果は、以下の通りである。

接種材料	感染率	潜伏期間
Ki-129M/M[vCJD]	5/5	605.2 \pm 53.5
Ki-129M/V[vCJD]	5/5	598.2 \pm 47.3
Ki-129V/V[vCJD]	4/4	772.8 \pm 35.5
sCJD VV2	0/6	

頭蓋内投与では、vCJD の感染が成立したマウスの脳は、Ki-Bov への2次感染も接種した全てのマウスで成立することが明らかとなった。一方、陰性対象として用いた、sCJD プリオンの VV2 は、頭蓋内投与でも感染は成立しなかった。

D. 考察

腹腔内投与による FDC アッセイは、75 日という短期間で結論を得ることが解っているが、感度として頭蓋内投与に劣るのは周知の事実である。今年度は、129V/V のヒトが vCJD に感染した場合の最終診断として、FDC アッセイと頭蓋内投与を比較して、それぞれのアッセイ法の感度、陽性率などを比較検討した。

腹腔内投与と頭蓋内投与で、感染率はそれぞれ100%発病しているのでこれによる差はなかった。また、頭蓋内投与を行っても sCJD の VV2 プリオンは、1 匹の発病も認められず、陰性対象でも差がなかった。

腹腔内投与と頭蓋内投与の際立った差は、潜伏期間の差で、M/M や M/V に比べて V/V の発病脳からは潜伏期間の延長が認められた。これは、投与するプリオンのシークエンスが異なるため直ちに感染力価を反映することにはならないが、Ki-Bov に対する感染力を推し量るには重要な情報と言えよう。しかしながら、この感染力の情報も、FDC の陽性率を算出すると有る程度腹腔内投

与でも得ることができ、2 年間を必要とする頭蓋内投与実験に比べると、腹腔内投与による FDC アッセイが短期間で同じ結論が得られるという利点が今回の検討で明らかとなった。

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. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem.* 2012, 60:761-769.
- 2) Takeda N, Yokota O, Terada S, Haraguchi T, Nobukuni K, Mizuki R, Honda H, Yoshida H, Kishimoto Y, Oshima E, Ishizu H, Satoh K, Kitamoto T, Ihara Y, Uchitomi Y. Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different disease courses: A clinicopathological study. *J Neurol Sci.* 2012, 312:108-116
- 3) Iwasaki Y, Yokoi F, Tatsumi S, Mimuro M, Iwai K, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene codon 232 and type 1+2 prion protein. *Neuropathology.* 2013 (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

4. プリオン蛋白は Cargo Receptor の Sortilin と結合する

分担研究者 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 教授
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

我々は、最近、プリオンが感染するとポストゴルジ小胞輸送が障害され、細胞膜蛋白質の細胞膜発現が抑制されることを見出した。Sortilin は VPS10P domain receptor family に属する Cargo receptor である。脳組織で多く発現する。プリオンが感染すると、Sortilin の蛋白量が低下した。また、プリオンが感染すると、プリオン蛋白と Sortilin の結合が障害を受けた。これらの結果は、プリオンが Sortilin の蛋白量を低下させ、さらにプリオン蛋白以外の細胞膜蛋白と Sortilin の結合も障害し、細胞膜蛋白の細胞膜への運搬を抑制する可能性を示した。

A. 研究目的

我々は、最近、プリオンが感染するとポストゴルジ小胞輸送が障害され、細胞膜蛋白質の細胞膜発現が抑制されることを見出した。Sortilin は VPS10P domain receptor family に属する Cargo receptor である。脳組織で多く発現する。そこで我々は、プリオンによるポストゴルジ小胞輸送障害に Sortilin が関与するのか解析することにした。

B. 研究方法

1) 細胞

本研究では、我々が独自に確立した 22L プリオン感染マウス神経芽細胞(N2aC24L1-3)、非感染細胞(N2aC24)、及び SAF32 抗プリオン抗体で治療した細胞(cured N2aC24L1-3)を用いた。

2) マウス脳

ICR マウスの脳内に RML 及び 22L プリオン株を接種した。プリオン病を発症したマウスの脳を摘出し、凍結保存した。

(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

1) プリオンは Sortilin の蛋白量を抑制する

我々は、まず、プリオン感染細胞及びマウス脳における Sortilin の蛋白量を Western blotting にて調べた。N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin は、N2aC24 非感染細胞と比べて少なく検出された(図 1 左)。しかし、cured N2aC24L1-3 治療細胞の Sortilin は非感染細胞と同程度に検出された(図 1 右)。また、RML 及び 22L プリオン感染脳の Sortilin も、非感染脳と比べて少なく検出された(図 1 右)。次に、Sortilin の mRNA 発現量を RT-PCR 法により判定量的に測定した。N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin mRNA の発現量は N2aC24 非感染細胞や cured N2aC24L1-3 治療細胞と同程度だった(図 2)。これらの結果は、プリオンが Sortilin の mRNA 発現には影響を与えないが、蛋白量の低下を引き起こすことを示した。

2) プリオン蛋白は Sortilin と結合する

我々は、次に、Sortilin がプリオン蛋白と結合するのか免疫沈澱法を用いて調べた。非感染マウス脳ホモジネートのプリオン蛋白を IBL-N 抗体を用いて沈澱させると、Sortilin が沈澱した(図 3)。N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin は、N2aC24 非感染細胞や cured N2aC24L1-3 治療細胞と比べて、少なく沈澱した(図 4)。これらの結果は、Sortilin はプリオン蛋白と結合し、プリオンが感染するとその結合が阻害される傾向にあることを示した。

D. 考察

今回我々は、細胞膜蛋白質であるプリオン蛋白が Sortilin に結合することを明らかにした。従って、プリオン蛋白が Sortilin を介して細胞膜に運搬される可能性が考えられた。プリオンが感染すると、Sortilin の蛋白量が低下した。また、プリオンが感染すると、プリオン蛋白と Sortilin の結合が障害を受けた。従って、プリオンが感染すると、Sortilin が低下し、プリオン蛋白をはじめとした細胞膜蛋白との結合が阻害され、Sortilin は細胞膜蛋白を細胞膜に正常に運搬できない可能性が考えられる。今後、異常プリオン蛋白と Sortilin は結合するのか、またこの結合は他の細胞膜蛋白と Sortilin との結合を阻害するのか等を明らかにし、プリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送障害のメカニズムを解明していく。

E. 結論

プリオンは、Sortilin の蛋白量を低下させ、またプリオン蛋白と Sortilin の結合を障害し、プリオン蛋白の細胞膜への運搬を抑制している可能性が考えられた。

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(8):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 ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing β -form but not α -form of prion protein. *J Biol Chem* 287(17):14023-14039, 2012.
- 3) 坂口末廣. 44 章スローウイルスとプリオン. In: 吉開泰信/西山幸廣・レビンソン微生物学・免疫学[原書 11 版], 東京, 丸善出版, 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, 米子コンベンションセンター・ビッグシップ(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, 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡 (福岡), 12/11-14, 2012.

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。

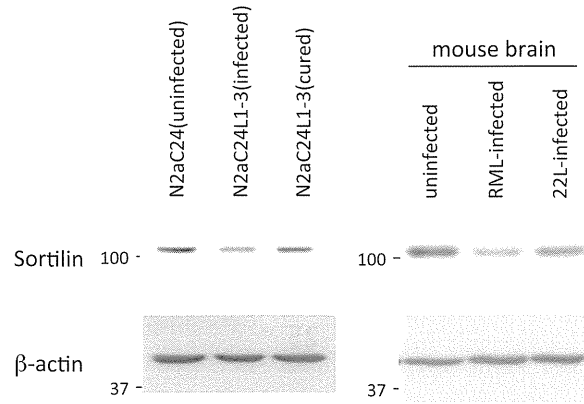


図1：プリオンは Sortilin の蛋白量を抑制する。

N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin は、N2aC24 非感染細胞と比べて少なく検出された（左図）。しかし、cured N2aC24L1-3 治療細胞の Sortilin は非感染細胞と同程度に検出された（左図）。また、RML 及び 22L プリオン感染脳の Sortilin も、非感染脳と比べて少なく検出された（右図）。

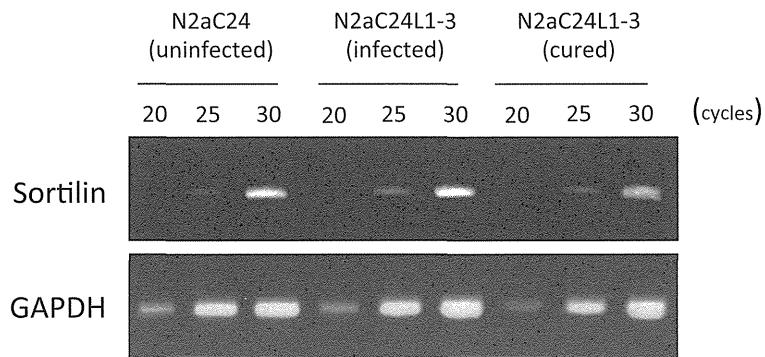


図2：プリオンは Sortilin の mRNA 発現には影響を与えない。

N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin mRNA の発現量は N2aC24 非感染細胞や cured N2aC24L1-3 治療細胞と同程度だった。

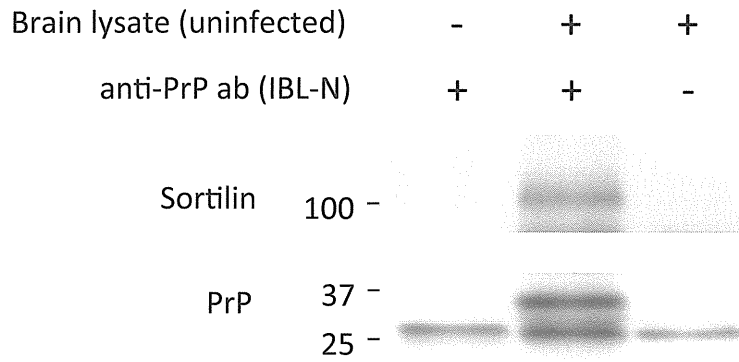


図 3 : プリオン蛋白は Sortilin と結合する。

非感染マウス脳ホモジネートのプリオン蛋白を IBL-N 抗体を用いて沈降させると、Sortilin が供沈した。

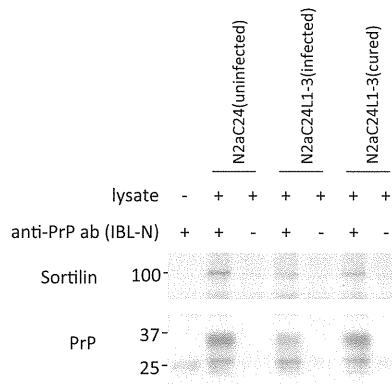


図 4 : プリオンはプリオン蛋白と Sortilin との結合を阻害する傾向にある。

N2aC24L1-3 感染細胞の Sortilin は、N2aC24 非感染細胞や cured N2aC24L1-3 治療細胞と比べて、少なく供沈した。

5. カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価

分担研究者 柴田宏昭（独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 小野文子（社団法人予防衛生協会）

萩原健一、山河芳夫（国立感染症研究所・細胞化学部）

佐藤由子、飛梅実、佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨

非定型 BSE プリオンのヒトへの感染リスク評価指標の確立および定型と非定型 BSE 感染による病態比較をおこなうために、これまでの研究により、ヒトと同じ霊長類であるカニクイザルに BSE プリオンを接種し、まずはプリオン病感染モデル系を確立した。このカニクイザルの感染モデル系により、ウシからサルへの種の壁を越えた C-BSE（定型 BSE JP/8 和歌山）継代接種では、潜伏期間の短縮が観察された。そこで、L-BSE（非定型 BSE JP/24 佐世保）でも同様の傾向になるのか継代接種実験を行った。また、長期末発症の C-BSE 由来プリオンを経口接種したサル 1 頭を安楽死し、各組織中の異常型プリオン蛋白質を検索したところ、ごく微量ながら腸や延髄等の一部に蓄積が認められ、感染が示唆された。そこで、L-BSE 由来プリオンの経口接種実験も開始した。これらの感染モデル系を用い、動物プリオン病のヒトへの感染リスク、プリオンの伝搬・増殖機構および神経変性機構・発病機構の解明を行うために、脳 MRI 画像、プリオン蛋白および病理組織について解析を行ったが、今年度、安楽死直後の脳の MRI Diffusion シークエンスデータを解析し、新たに拡散テンソル画像の構築を行ったところ、発症カニクイザルの脳幹部から皮質までの神経繊維経路が断裂している可能性が示唆された。

A. 研究目的

非定型 BSE プリオン(BSE-P)のヒトへの感染リスク評価指標の確立および定型と非定型 BSE 感染による病態比較をおこなう目的に、カニクイザル 21 頭を用いて、定型および非定型 BSE 感染牛脳乳剤の接種実験を行った。接種後、発症まで定期的臨床症状、運動機能、高次脳機能、脳波を観察、測定し、安楽死後の MRI 所見についての臨床病態解析を行うとともに蛋白および組織病理学的解析を行った。併せて、BSE-P 接種後定期的に採取したサルの血液、脳脊髄液、尿、唾液および主要組織を研究班共通の研究資源として提供することも目的とした。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

1.4~2.4歳の育成雄カニクイザル21頭を用いた。

使用動物は、P3 実験動物施設内の 2 頭飼育型アイソレーターにおいて馴化飼育後感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27℃、相対湿度 50-60%、12 時間証明（7 時~19 時）に設定し、ステンレス製個別ケージの間を透明アクリル板で仕切り、相互の体動、声を感じることでできる環境とした。飼料は固形飼料（Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.）70g とリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する（表 1）。

第 1 群：C-BSE 初代接種初期検索群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE（BSE JP/8 和歌山）感染ウシの 10%脳乳剤を接種した。

経口接種（脳乳剤 2.0 ml） 2 頭(#1, 2)

腹腔内接種（脳乳剤 2.0 ml） 2 頭(#3, 4)

各群 1 頭づつ各々接種後 3 か月、6 か月目に安楽死を行い異常プリオン蛋白の初期対内分布について検索を行った。

第 2 群：C-BSE 初代接種群

カニクイザル 6 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10%脳乳剤を、それぞれの経路で接種した。

経口接種 (脳乳剤 2.0 ml×3 回) 3 頭(#5, 6, 9)

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 3 頭(#7, 10, 11)

脳内接種群 3 頭は発症後、経口投与群 3 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

第 3 群：C-BSE 第 2 継代接種群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、第 2 群で発症したカニクイザル(#7)の材料を用いて、それぞれの経路で接種した。

静脈内接種 (血液 40.0 ml) 2 頭(#12, 13)

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭(#16, 17)

脳内接種群 2 頭は発症後、静脈内投与群 2 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

第 4 群：C-BSE 第 3 継代接種群

カニクイザル 2 頭に第 3 群で発症したカニクイザル(#17) 10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭 (#20, 21)

第 5 群：L-BSE 初代接種群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10%脳乳剤の脳内接種および 20%脳乳剤の経口投与を行った。

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭(#14, 15)

経口接種 (脳乳剤 5.0 ml×8 回) 2 頭(#18, 19)

脳内接種群 2 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

第 6 群：L-BSE 第 2 継代接種群

カニクイザル 2 頭に第 5 群で発症したカニクイザル(#15) 10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭 (#22, 23)

高次脳機能検査 (食物回収試験) データおよび睡眠脳波データ蓄積後接種を行う予定である。

3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、前述の投与量にて実施した。

脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後、イソジンで消毒し、頭皮を切開、側頭部頭蓋骨に直径 2 mm の穿孔部を作製し、視床に脳乳剤 0.2 ml を注入した。注入

後、皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

輸血は、ACD 液で採取した血液を塩酸ケタミン麻酔下で点滴により 40 ml を輸血した。レシピエントの輸血時体重はいずれも 1.7 kg で全血量の約 30%に相当した。

接種後、定期的に血液および脳脊髄液 (CSF) の採取を行った。動物は塩酸ケタミン麻酔下で血液は大腿静脈より採取した。脳脊髄液は背部剃毛後イソジンで消毒し、第 3～第 5 腰椎椎間より採取した。

体表リンパ節、腸管膜リンパ節および脾臓の生検を実施した。動物は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で鼠経部および腹部の剃毛を行いイソジンで消毒し、皮膚切開後、鼠経リンパ節は、皮下組織を鈍性剥離後、基部血管を結紮し摘出した。腸管膜リンパ節および脾臓生検の場合は腹部正中を切開し、リンパ節の基部を結紮後摘出した。脾臓の部分生検は摘出部分の脾動静脈結紮後脾臓を切除し、切断面の縫合を行った。採取後腹膜、皮下組織および皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

安楽死は塩酸ケタミン筋肉内投与による麻酔後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔下において放血後過剰量のペントバルビタールを投与により行った。

4) 解析方法

1. 行動観察

行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト (運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

2. 高次脳機能解析

i: 指迷路試験

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4 段の指迷路装置内に置かれた報酬を移動させ、最終的に取りだし口から獲得する方法を学習させたうえで、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト (24 試行) の成功率を長期記憶の評価とした。また、指迷路試行中にみられる折り返し行動、停止行動に着目し、思考経過についての検討を行った。本評価系は#5～#11 に実施した。

ii : 食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルは報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行う。本評価系は#18~#23に実施した。

3. MRI 撮像および画像解析

P3 動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI 撮像は安楽死直後に密封コンテナに封じ込めて MRI 室に搬送した。発症したカニクイザルは塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により安楽死を行った。アクリル製密封型コンテナに動物を保定して MRI 撮像室への移動を行った。MRI 撮像は 3T MRI 装置 (MAGNETOM Allegra [Siemens 社]) を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高い S/N を持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルの CP 型コイルを用いて T1-3D、T2、プロトン強調画像、Flair 画像を撮像した。また、拡散テンソル画像再構築にあたり 12 軸 Diffusion シークエンスの撮像を行った。

画像解析にあたり、正常カニクイザルにおいて、生存麻酔下および BSE 感染サルと同様の条件での安楽死直後の画像について比較検討し、死後変化による影響が少ないことを確認した。画像解析は、解析ソフト dTV (東大医学部附属病院放射線科画像情報処理・解析研究室開発) を用い、視床枕からの神経線維の走行の再構築を試みた。処理手順として、まず、撮影されたテンソル情報を PC に取り込み、解析ソフトにより、神経路の絞り込みを行った。視床枕を、起点を設定し、皮質レベルの MRI 画像にて終点を設定し、トラッキング解析を行った。

4. 蛋白解析

安楽死を行った 2 頭について、血液、脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) について、ウェスタンブロット法 (WB) により検索を行った。WB は細切組織を PBS 中で 2 mmΦ のジルコニアビーズとともに攪拌 (2500 rpm, 5 min) して 5-10% 乳剤を作成した。乳剤は BSE 確認検査マニュアルに準じて、界面活性剤存在下に DNase、コラーゲナーゼおよび PK で消化した後に PrP^{Sc} をアルコール沈殿 (2-BuOH:MeOH=5:1;1/3 vol.) で濃縮・精製して少量の SDS-サンプルバッファーに溶解して試料とした。マニュアルに準じて電気泳動、PVDF 膜への転写を行ない、一次抗体には clone 3F4 または 6H4 を、2 次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いてプリオンタンパクを ECLplus 試薬で化学発光検出を行なった。

5. 病理組織検索

病理組織検索では、ホルマリン固定後、BSE 確認検査マニュアルに準じて、蟻酸処理後、パラフィン包埋し薄切標本を作製した。標本は脱パラフィン後、HE 染色を実施した。免疫染色は 135°C オートクレーブ処理後、C-末ペプチド由来の抗プリオン抗体 (T4) による IHC 法を実施した。また、GFAP 染色によりグリア増生レベルについて解析を行った。

空胞変性領域の計測は、HE 染色組織標本において、前頭葉および頭頂葉の白質及び灰白質の顕微鏡写真を撮影し、ポリウム解析プログラム VG studio max. を用いて計測した。

(倫理面への配慮)

PrP^{Sc} 接種動物はすべて改良型の P3 アイソレータケージ内に收容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。また、材料採取および脳波測定においては麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応及び輸液療法等による維持管理を行った。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与により行った。

本動物実験計画は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、基盤研動物実験委員会の審査承認

を受けた。

C. 研究結果

1) 臨床経過

今年度は新たに C-BSE 3 代目継代および L-BSE 2 代目継代の脳内接種を実施した。表 1、図 1 に各実験群の発症経過を示す。脳内接種を行い、1 年以上経過を観察した群では全ての動物で神経症状の発現が認められ、安楽死後病理組織検索により、プリオン病の発症を確認した。新規に脳内接種を行った 2 群、4 頭では、11 か月を経過した現在、明らかな臨床症状は認められていないが、これまでの感染実験から、いずれも早期発症が予測される。食物回収試験による高次脳機能評価による高次脳機能評価と定期サンプリングによる検索を実施した。

C-BSE 牛脳乳剤の経口接種を行った 3 頭中 1 頭 (#6) において、接種後 7 年を経過した時点で、明らかな臨床症状は認められなかったが、安楽死を行い、各組織について病理組織検索および PrP^{Sc} の検索に供した。残り 2 頭については接種後 9 年を経過しているが、臨床症状は認められておらず、高次脳機能検査として実施している指迷路試験においても高い正答率を維持していた。

C-BSE 発症サル血液を輸血した 2 頭中 1 頭 (#13) において接種後 4 年 9 か月を経過した時点で、明らかな臨床症状は認められなかったが、安楽死を行い、全臓器について同様の検索を実施した。もう 1 頭は接種後 6 年を経過した現在も明らかな臨床症状は認められていない。















材料	接種ルート	通番	国籍	接種年齢	発症年齢	解剖年齢	接種後年数	潜伏期間	発症期間
C-BSE (BSE JP/8 和歌山)	経口	#001	混血	1.7		2.0	0.2	0.2	
		#002	混血	1.7		2.2	0.5	0.5	
	腹腔内	#003		1.6		1.8	0.2	0.2	
		#004	混血	2.0		2.5	0.5	0.5	
	経口	#005		2.3			9.5	9.5	
		#006		2.2		9.6	7.4	7.4	
		#009		2.4			9.4	9.4	
	脳内	#007		2.0	4.3	5.1	3.1	2.2	0.8
		#010		2.3	4.6	5.2	2.9	2.3	0.6
		#011		2.4	6.1	7.2	4.8	3.7	1.1
	初代発症サル血液 (#7) 静脈内	#012		1.4			6.4	6.4	
		#013	混血	1.7		6.4	4.8	4.8	
	初代発症サル脳乳剤 (#7) 脳内	#016		2.1		3.7	1.6	1.5	0.2
#017		混血	2.0		3.6	1.6	1.1	0.5	
2代発症サル脳乳剤 (#17) 脳内	#022		1.4			0.9	0.9		
	#023		1.4			0.9	0.9		
C-BSE (BSE JP/24 佐世保)	牛脳乳剤 脳内	#014	混血	2.1		4.2	2.1	1.7	0.4
		#015	混血	2.0		4.0	2.0	1.6	0.4
	経口	#018		1.2			1.4	1.4	
		#019		1.3			1.4	1.4	
	初代発症サル脳乳剤 (#15) 脳内	#020	混血	1.7			0.9	0.9	
#021		1.7			0.9	0.9			

表 1. 接種群と発症経過

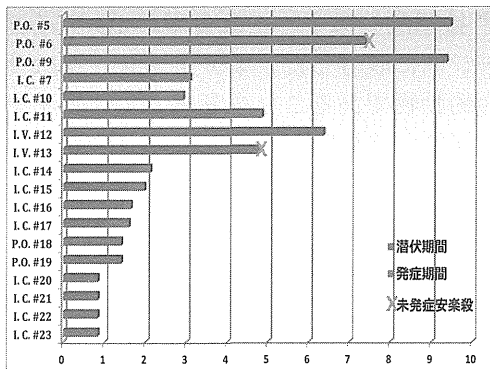


図 1. 感染実験経過

2) ウェスタンブロッティング法 (WB) による PrP^{Sc} の検出

C-BSE を経口投与後、7 年 5 ヶ月の経過観察で発症を認めなかった #6 を解剖し、WB による感染性プリオン (PrP^{Sc}) の検出を行った。脳、座骨神経、リンパ節、脾臓において、PrP^{Sc} は検出限界以下であった。しかしながら、PrP^{Sc} 高感度検出測定系である PMCA 法を用いたところ、血漿、回腸、脾臓、深頸リンパ節、延髄で PrP^{Sc} が検出された (図 2 ; 動衛研 村山先生のデータより)。

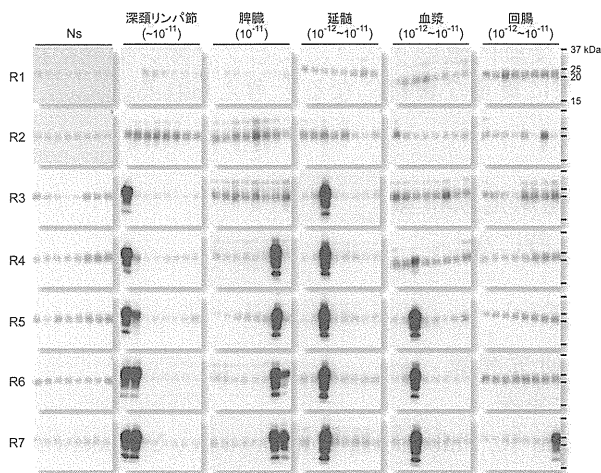


図2. C-BSE 経口接種・未発症サル(#6)における PrP^{Sc} 検出結果 (投与後 7 年 5 ヶ月)

4) 脳 MRI 画像解析

安楽殺直後の MRI 撮像において、BSE 脳内接種カニクイザルでは、全頭著しい脳室拡張を伴う萎縮の所見が認められた。一方、未発症の輸血接種および経口投与サル各 1 頭については、萎縮等の異常は認められなかった。

非感染コントロールサルの生前および安楽死後の MRI Diffusion シークエンスデータを解析し、拡散テンソル画像の再構築を行ったところ、著しい差は認められなかった事を確認し、発症カニクイザル (#17) の安楽死直後の画像について解析を実施した(図3)。同じ抽出部位からのトラッキング画像において、非感染サルでは脳幹部から皮質への神経線維の連絡の再構築されていたのに対し、感染発症サルでは脳幹部から皮質までの繊維連絡が十分に再構築されていなかった。

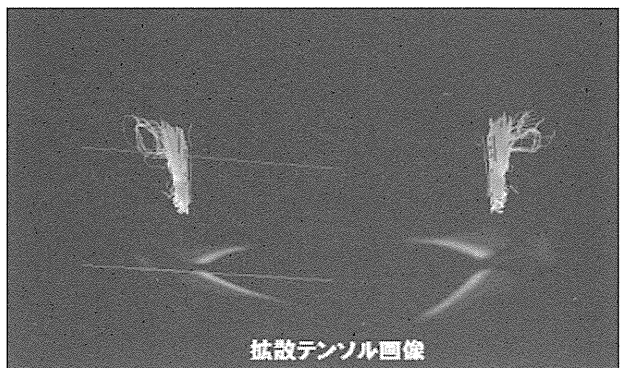
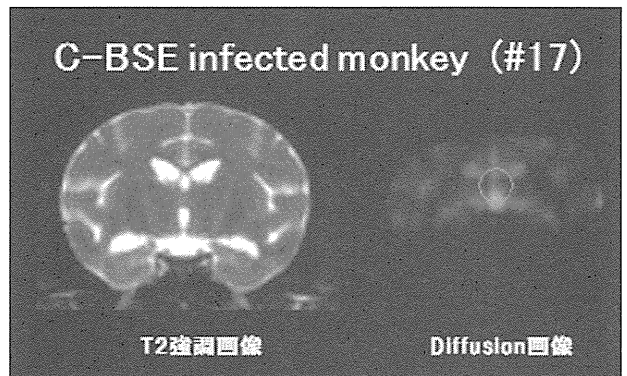
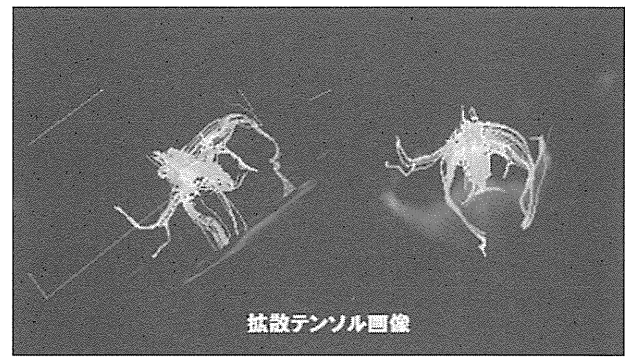
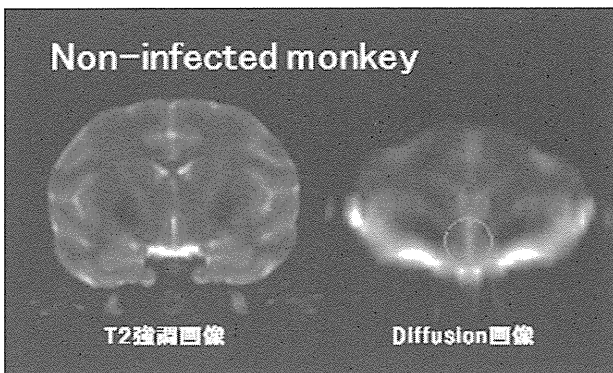


図3. 未発症および C-BSE 感染発症カニクイザル脳の拡散テンソル画像

D. 考察

BSE プリオンを脳内接種し、1 年以上経過を観察したカニクイザルは顕著な神経症状を伴って全頭発症した。一方、C-BSE 牛脳乳剤経口投与サル、C-BSE 感染サル血液輸血サルにおいてはそれぞれ接種後 9 年、6 年を経過しているが、未だ神経症状は認められていない。経口投与 7 年 5 ヶ月後の未発症のサル 1 頭を安楽死し、MRI 撮像、解剖を行い、全身臓器について、WB による蛋白解析および組織病理検索を行ったところ、PrP^{Sc} は検出されなかったが、PMCA 法では、回腸、延髄等から、PrP^{Sc} が検出された。このことにより、PrP^{Sc} は感染し、今後、上向性に PrP^{Sc} が広がり、発症

する可能性が示唆された。現在継続して長期経過観察を行っている経口接種サル2頭、輸血サル1頭について、定期的に採材している血漿、WBC、CSF、唾液、尿等について解析を進めるとともに、脳波測定等の神経生理学的検索および高次脳機能検査として指迷路試験を行い、初期症状発現の有無について検討し、晩発性発症リスクについて評価する。

MRI を用いた拡散テンソル画像による神経線維の連絡について、画像解析を行ったところ、発症カニクイザルにおいて、神経線維経路が断裂している可能性が示唆された。今回は視覚的描出のみで検討したことから、今後、対象領域の設定や解析精度向上等の検討を行うことで、脳内の各部位についてそれぞれ解析を行い、発症病態と神経線維経路の連携との関連性について検証していく。

E. 結論

カニクイザルへの C-BSE および L-BSE 継代脳内接種により、再現性の高い早期発症系モデルが確立した。確立した発症モデル系を、臨床症状、高次脳機能解析、MRI 画像解析および病理学的解析等を用いて多角的に解析することによって、プリオン病の発症機序解明および治療研究への応用が考えられる。また、PMCA 法により、未発症の経口接種および輸血サル由来材料から、微量の PrP^{Sc} が検出されたことにより、食品および輸血によるリスク評価系モデルとしても期待される。今後経時的なサンプリング材料(血液、尿、唾液等)を用いた検出系の確立が重要と考えられた。また、感染が示唆された長期経過観察をしている未発

症の経口および輸血接種サルについては、今後発症までの経過について検索を進めることによって、受動的感染リスクによるプリオン病発症機序解明に貴重な資材になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

Ono F., Shibata H., Kurosawa A., Yamakawa Y., Tobiume M., Sato Y., Katano H., Hagiwara K., Saito N., Komatuzaki K., Nakamura K., Emoto Y., Hamano M., Yasutomi Y., and Sata T. Assessment of memory disorder by using retrieval task test in classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions transmitted cynomolgus macaques. Asian Pacific Prion Symposium (July, 29-30, 2012, Yokohama, Japan)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

6. プリオン形成に関わる体内因子の解析

分担研究者 堂浦 克美 東北大学大学院 医学系研究科 教授

研究協力者 西澤 桂子、逆瀬川 裕二、小熊 歩、濱中 大一、堺 英士、
倉橋 洋史、河田 真樹（東北大学大学院・医学系研究科）

研究要旨

昨年度の成果を踏まえ、細胞レベルやビボレベルでプリオン増殖の制御に働く因子群を明らかにするため、2つの研究を進めた。一つは、セクレチンシグナル伝達系とプリオンの増殖制御との関連をビボで検討するため、リガンドノックアウトマウスと受容体ノックアウトマウスでプリオンを感染させる実験を実施した。結果はまだ得られておらず、感染後の経過を観察中である。もう一つは、プリオン増殖制御を調べる研究ツールとして新たに発見した Glycoside-9 について、その作用機序を分子レベルで解析した。その結果、インターフェロンシグナル伝達系とプリオン増殖との関連を発見した。

A. 研究目的

昨年度の成果を踏まえ、細胞レベルやビボレベルでプリオン(異常型プリオン蛋白)増殖の制御に働く因子群を明らかにするため、セクレチンシグナル伝達系の関与をビボ実験で検討するとともに、プリオン増殖制御を調べる研究ツールとして新たに発見した Glycoside-9 について、その作用機序を分子レベルで解析した。

B. 研究方法

(1) セクレチン系の関与の検討

セクレチンリガンド遺伝子あるいは受容体遺伝子について、それ以外は遺伝的背景が同じであるノックアウトマウスのホモ(-/-)、ヘテロ(+/-)、対照マウス(+/+)を準備して、RML プリオンを脳内あるいは腹腔内に接種して、経過を観察した。

(2) Glycoside-9 の作用機序の解析

プリオン持続感染細胞において Glycoside-9 の作用について、プリオン蛋白代謝・局在への影響はウエスタンブロットやフローサイトメーターや定量的 RT-PCR で解析した。脂質ラフトへの影響はフローテーションアッセイやフローサイトメーターで解析した。また、mRNA 発現パターンの解析は DNA マイクロアレイを用いて実施し、定量的 RT-PCR で確認した。各種のプライマー、siRNA、リコンビナント蛋白、特異抗体は市販のものを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験ならびに遺伝子組換え実験は、所属機関の許可を受けた後に、法令等を遵守し実施した。

C. 研究結果

(1) セクレチン系の関与の検討

本年度は動物を準備し、プリオンを接種して経過を観察中であり、まだ結果は得られていない。接種ルートの違い(脳内感染 vs 腹腔内感染)も検討中である。

(2) Glycoside-9 の作用機序の解析

新たなツールとして昨年度発見した Glycoside-9 について、プリオン感染細胞と非感染細胞で解析を進めたところ、感染の有無にかかわらず、プリオン蛋白の mRNA 発現量には影響せず、Glycoside-9 は正常型プリオン蛋白量(細胞膜上プリオン蛋白量)や脂質ラフトの減少をもたらすことがわかった。また、DNA マイクロアレイ解析では、Isg15、Oasl2、Cxcl10、Ccl5、Ifit1 などのインターフェロン誘導遺伝子群の mRNA 発現が Glycoside-9 によりいずれも減少していることが明らかとなった。そこで、各種インターフェロン(IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)をプリオン感染細胞の培養上清に加えてプリオン(異常型プリオン蛋白)への影響を調べたところ、通常の培養では異常型プリオン蛋白量に変化はなかったが、

Glycoside-9 と共培養するといずれのインターフェロンでも濃度依存的に異常型プリオン蛋白量の回復が観察された。回復の程度は不完全で Glycoside-9 非存在下での異常型プリオン蛋白量のレベルまでは戻らなかった。次に、インターフェロンが、Glycoside-9 による正常型プリオン蛋白の変化や脂質ラフトの変化を回復するかどうかを解析したところ、インターフェロンは正常型プリオン蛋白量や脂質ラフトを回復させず、影響が無いことがわかった。むしろ、低用量のインターフェロンでは、プリオン蛋白の mRNA 発現量の低下が観察された。なお、インターフェロンの作用が解析に用いた細胞でも STAT 系を介しているかどうかを調べたところ、インターフェロンの培養上清への添加で STAT のリン酸化や核内への移行が確認された。

D. 考察

今回の研究では、セクレチンシグナル伝達経路とプリオン増殖制御との関係について、ビボで何らかの手がかりを得るところまでは到達できなかった。プリオンを動物の脳内あるいは腹腔内に接種するところまで終了しており、来年度には結果が得られる。

一方、新たなツールとして発見した Glycoside-9 については、プリオン感染細胞および非感染細胞を用いた解析から、プリオン（異常型プリオン蛋白）増殖におけるインターフェロンシグナル伝達系の関与が明らかとなった。インターフェロンは、Glycoside-9 によるプリオン蛋白代謝への影響や脂質ラフトへの影響を全く回復できないにも関わらず、異常型プリオン蛋白量を不十分ながらも回復させた。Glycoside-9 の非存在下ではインターフェロンの効果が見られず、Glycoside-9 により修飾された細胞でのみプリオン増殖におけるインターフェロンの働きを観察できた。今後さらに詳しく Glycoside-9 により修飾される細胞内分子群の動態とプリオン増殖制御との関連を詰めるとともに、インターフェロンシグナル伝達系のどの因子群がプリオン増殖制御と関連しているのか特定作業を進めていく必要がある。

ビボにおいてプリオン（異常型プリオン蛋白）が神経変性をどのように惹起するかは、いまだに謎であるが、神経変性過程では神経細胞やグリア細胞から様々な液性因子が放出され、神経保護的

あるいは神経障害的に作用している。インターフェロンやセクレチンは、それらの液性因子の一つとして本来は生体防衛的に働くことを目的に放出されるかもしれないが、プリオン（異常型プリオン蛋白）の増殖を助けるという負のプレイヤーを演じている可能性も考えられる。引き続き、セクレチンシグナル伝達系とインターフェロンシグナル伝達系という2つの異なる経路から切り込み、プリオン制御にかかわる細胞環境を明らかにしたい。

E. 結論

プリオン感染細胞において、プリオン（異常型プリオン蛋白）増殖の制御に関わる分子群に連なる手掛かりとして、これまでに報告したセクレチンシグナル伝達系とは異なる経路（インターフェロンシグナル伝達系）の存在を明らかにした。

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* 32:124-132, 2012.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sakasegawa Y, Doh-ura K. Extracellular heat shock protein 90 enhances PrPres production in prion-infected neuroblastoma N2a cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012
- 2) Kurahashi H, Doh-ura K. Application research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnq1 Δ 100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012
- 3) Hamanaka T, Doh-ura K. Melanin-like substances extracted from insect cuticle reduce the PrPres levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012
- 4) Sakai E, Doh-ura K. Glycerol enhances the protease-resistance prion protein production in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30,

2012

5) Sakasegawa Y, Goto Y, Hachiya N, Kaneko K, Doh-ura K. Dominant negative inhibition by GPI anchor-less recombinant prion proteins is observed in persistently prion infected N2a cells in a culture medium-dependent manner. Prion2012, Amsterdam, May09-12, 2012

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

国内学会

- 1) 堂浦 克美. ヤコブ病治療研究の現状と課題. 第6回 食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座, 東京, 2012年12月2日
- 2) 坪井 義夫, 堂浦 克美. プリオン病に対する治療法の開発. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, 2012年5月25日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)