

2)。

D. 考察

今回導入した C 末端側の変異は、ハムスター PRNP のみならずウシ PRNP にも共通しているサイトであるが、HuPrP<sup>C</sup>を用いた場合よりも C 末端のハムスター型(またはウシ型)変異は vCJD プリオンをより効率よく増幅させた。MV2, VV2 とほぼ同様の増幅の特徴(129M では極めて増幅効率が低い)を示す p-dCJD は、129V の時のみ顕著な増幅を示すが、129M であっても変異の導入箇所によっては増幅効率が著しく向上する変異箇所が見つかった。MV2, VV2 においても C 末端側の変異により増幅効率は変化するものの、p-dCJD における変化ほどではなかった。PMCA 法における p-dCJD プリオンの *in vitro* 増幅の基質選択性は MV2, VV2 プリオンと比較して若干の違いがあるかもしれない。

E. 結論

vCJD プリオンでは、C 末端側への変異導入は増幅効率に大きく影響を及ぼした。中でもコドン 219 および 232 への変異導入は、増幅効率を大きく変化させ、検出限界の向上が期待できる結果を得た。

[参考文献]

1) Yokoyama T, Takeuchi A, Yamamoto M, Kitamoto T, Ironside JW, Morita M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 498:119-123, 2011.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon 129 genotypes. *J Biol Chem* 288:21659-21666, 2013.

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

図 1 129M219Q は p-dCJD プリオンをより増幅させる

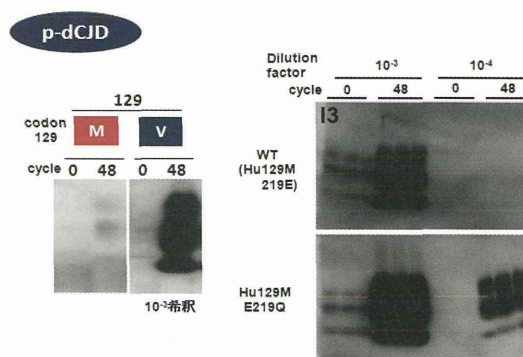
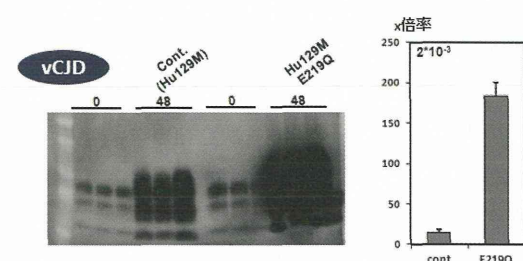


表 1 変異導入によるプリオン増幅効率の変化

	129M	129V
MM1	-	Y145W,M166V,E168Q,E219Q,R220K
MV2	E219Q	E168Q
VV2	Y145W, S170N,E219Q,M232R	-
p-dCJD (MMi)	Y145W,E168Q,S170N,E219Q,M232R	E168Q,231A,
vCJD	E219Q,M232R	-

増幅効率の向上度 ■ > ■ > ■

図 2 219Q は vCJD プリオンをより増幅させる



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

## 認知症患者の血清 H-FABP の有用性について

研究分担者：堀内浩幸 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学  
研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子解析学  
研究分担者：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子解析学

**研究要旨** 本研究では、CJD の髄液診断に活用できるバイオマーカーとして H-FABP (心臓型脂肪酸結合タンパク質) に焦点を当てて、新規な免疫学的 H-FABP 検出系の開発を進めている。平成 25 年度は、これまでに開発した高感度 H-FABP 検出系のさらなる高度化と sCJD (孤発性) を含む各種認知症疾患における血清 H-FABP 濃度の検出を試みた。H-FABP 検出系の高度化では、サンドイッチ ELISA に利用する発色系を o-フェニレンジアミン 2 塩酸塩 (OPD) の系からテトラメチルベンジジン (TMB) の系へ変更することで、従来法よりも高い反応活性が得られ、検出感度の増強が見込まれた。各種認知症疾患における血清 H-FABP 濃度の検出では、sCJD 9 例と健常人 6 例を含む PDD (認知症を伴うパーキンソン病)/DLB (レビー小体型認知症)、LCCA (脊髄小脳変性症)、AD (アルツハイマー病)、CBD (大脳皮質基底核変性症) の患者 (31 例) について血清 H-FABP 量の測定を試みた。健常人 6 例の平均血清 H-FABP 量は、1047 pg/ml であった。また sCJD の 9 例の平均 H-FABP 量は 2934.7 pg/ml であり、健常人よりも高値であった。一方、DLB/PDD、LCCA、AD では、特に DLB/PDD (8 例) において平均 H-FABP 量が 6084 pg/ml と高値を示したが、AD (4 例)、LCCA (2 例) および CBD (2 例) では、それぞれ 2270.8 pg/ml、1702 pg/ml および 1319 pg/ml であり sCJD より低値を示した。DLB/PDD に関して、血清 H-FABP 量と  $^{123}\text{I}$ -MIBG 心筋シンチ検査結果と比較したところ、H/M 比 1.9 以下の異常症例において、初期像と後期像において高い相関が認められ、血清 H-FABP が DLB/PDD のマーカーのひとつの候補となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我国における CJD、なかでも医原性 CJD の発生頻度は世界で最も高く、その治療法の確立と CJD 診断法の充実が医療現場並びに医療行政から強く求められている。

CJD の髄液中のマーカーとして診断に利用されているものには、t-tau と 14-3-3 タンパク質があるが、CJD に経過に伴い t-tau は変動が大きいことや両タンパク質共に陰性である患者も存在する。

近年、CJD の髄液中の新たなマーカータンパク質として H-FABP (心臓型脂肪酸結合タンパク質) が注目されている。

そこで本研究では、この H-FABP の高感度検出系を構築するとともに、CJD や他の認知症患者の髄液並びに血清中における H-FABP の動態を解析することで CJD 診断法における H-FABP 検査の有効性を検証する。また医療現場で簡易

かつ高感度に H-FABP を検出できる系を確立することが目的である。

### B. 研究方法

#### 1. H-FABP 検出系

H-FABP の検出系には、本研究で構築した H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体 (3E9) をキャプチャー抗体に、HRP 標識ニワトリモノクローナル抗体 (HUFa26) を検出抗体としたサンドイッチ ELISA を用いた。さらに検出系の高度化を目的に、HRP の発色系を OPD 系と TMB 系で比較検討した。

#### 2. 各種脳疾患患者における血清 H-FABP

各種認知症疾患における血清 H-FABP 濃度の検出では、sCJD 9 例と健常人 6 例を含む PDD (認知症を伴うパーキンソン病)/DLB (レビー小体型認知症) 8 例、LCCA (脊髄小脳変性症) 2 例、

AD(アルツハイマー病) 4例、CBD(大脳皮質基底核変性症)の患者2例の計33例について血清H-FABP濃度を測定した。

### 3. PDD/DLBにおける<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチと血清H-FABP濃度の比較

PDD/DLBにおいて実施された<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチのデータと測定した血清H-FABP濃度をYahr分類、発症から期間、<sup>123</sup>I-MIBGの初期像と後期像で相関比較を行なった。

#### (倫理面への配慮)

ヒトプリオン病他の脳脊髄液並びに血清を用いたバイオマーカー測定は、研究協力が所属する長崎大学で実施し、実験に当たっては、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

## C. 研究結果

### 1. H-FABP検出系の高度化

H-FABP検出系の高度化では、サンドイッチELISAに利用する発色系をOPDの系からTMBの系へ変更することで、従来法よりも高い反応活性が得られた。また相関係数の上昇も認められるとともに、検出時間の短縮も見込まれた(図1)。

### 2. 各種脳疾患患者における血清H-FABP

各種認知症疾患における血清H-FABP濃度を測定し、その平均値で比較した(表1)。その結果、sCJD患者の平均H-FABP濃度は、2934.7 pg/mlであり、健常人の平均値(1047 pg/ml)の約3倍の高値を示した。同様に、AD(2270.8 pg/ml)では約2倍、PDD/DLB(6084 pg/ml)では約6倍という極めて高い値を示した。またCBDとLCCAの血清H-FABP濃度は、健常人とほぼ変わらない値を示した。血清H-FABP濃度が高値を示したsCJD、AD、PDD/DLBを平均値とともに患者毎にグラフ(図2)にまとめたところ、PDD/DLBの患者の血清H-FABP濃度は、全て健常人の値を上回っていた。

### 3. PDD/DLBにおける<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチと血清H-FABP濃度の比較

PDD/DLB患者のプロファイル並びに<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチ、測定した血清H-FABP濃

度を表2にまとめた。<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチの検査では、DLB及びPDDのいずれも初期像、後期像においてH/M比が1.9以下の異常症例であった。次にPDD/DLB患者のYahr分類並びに罹病期間と血清H-FABP濃度の比較を行なったが高い相関は認められなかった。これに対して<sup>123</sup>I-MIBGの初期像と後期像の値と血清H-FABP濃度の比較では、いずれも高い相関が認められた(図3)。

## D. 考察

平成25年度の研究では、高感度H-FABP検出系のさらなる高度化を目指し、またsCJD(孤発性)を含む各種認知症疾患における血清H-FABP濃度の検出を行なった。H-FABP検出系の高度化では、発色系の改良により、より高感度にまた短時間にH-FABPを検出できることが示唆された。今後は、CJDの髄液検査におけるH-FABP検出系を臨床応用可能にするために、CJDのタイプ別のH-FABP濃度動態の特徴、検出感度と特異度を明らかにする必要があるものと考えられる。

本研究では、さらにCJDの検査における血清H-FABP濃度の活用を考え、各種認知症疾患における血清H-FABP濃度を測定したが、sCJDにおいて血清H-FABP濃度は健常人に比べ高値を示したものの、それ以上にPDD/DLBで高値を示すという予想外の結果を得た。またこの値は、PDD/DLBの検査に活用される<sup>123</sup>I-MIBG心筋シンチと良く相関していることがわかり、PDD/DLBの血液検査のひとつのマーカーになることが示唆された。しかし、なぜPDD/DLB患者において血清H-FABP濃度が異常高値になるのか、そのソースなど不明な点も多く、今後の解析が必要である。

PDD/DLBと血清H-FABP濃度の関係は、非常に興味深いのが、本研究班はプリオン病に焦点を当てているため、本年度の成果として記述するものの、今後の展開は別途考慮する必要があるものである。

## E. 結論

H-FABP検出系の高度化では、検出系を見直すことで、従来よりも高感度かつ短時間にH-FABPを検出できることがわかった。また相

関係数の上昇も認められるとともに、検出時間の短縮も見込まれた。各種脳疾患患者における血清 H-FABP 濃度の動態では、sCJD 患者で健常人の約 3 倍という高値を示したが、PDD/DLB 患者では、さらに健常人の約 6 倍という異常高値を示すことがわかった。

[参考文献]

- 1) Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23:372-381, 2007.
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewczuk P, Poser S, Kretschmar H a, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neuro- degenerative diseases. *Neurosci Lett* 370:36-39, 2004.
- 3) Wada-Isobe K, Imamura K, Kitamaya M Kowa H, Nakashima K. Serum heart-fatty acid binding protein levels inpatients with Lewy body disease. *J Neurol Sci* 266:20-24, 2008.
- 4) Mollenhauer B, Sterinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, Locascio JJ, Wiltfang J, Kretschmar H A, Poser S,

Trenkwalder C, Otto M. Serum heart-type fatty acid-binding protein and cerebrospinal fluid tau: marker candidates for dementia with Lewy bodies. *Neurodegenerative Dis* 4:366-375, 2007.

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

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

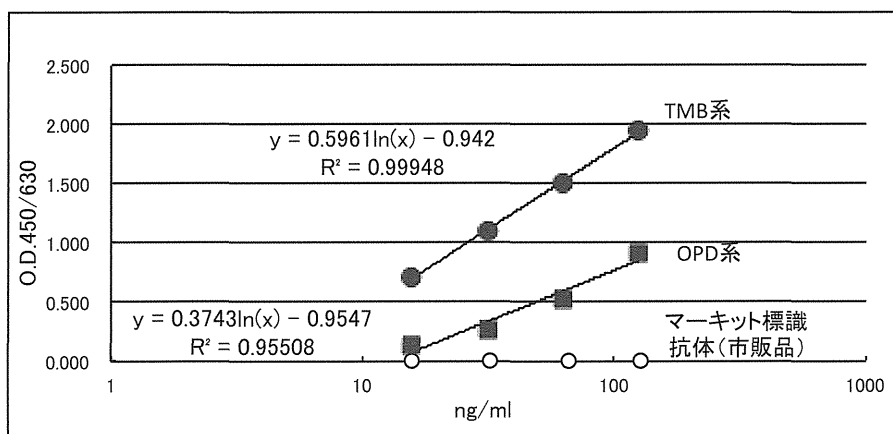


図1 H-FABP検出における発色系の比較

表1 各疾患別の血清中のH-FABP濃度

疾患名	平均値 ± 標準偏差 (pg/ml)
sCJD	2934.7 ± 1173
AD	2270.8 ± 761
PDD/DLB	6084 ± 2034
CBD	1319
LCCA	1702
heathy subjects	1047 ± 627

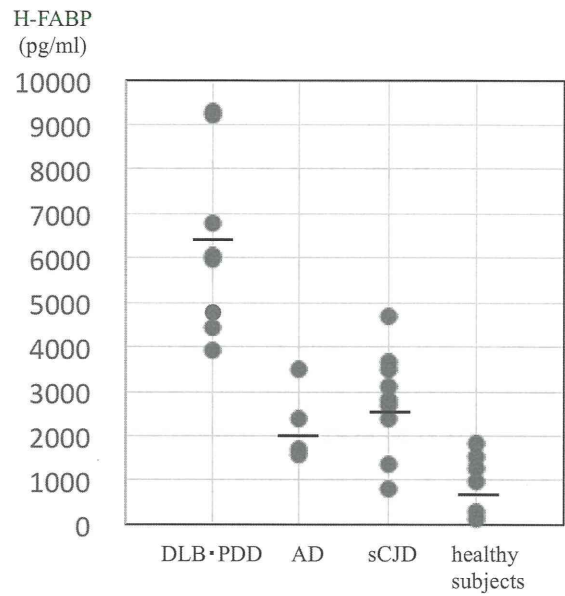


図2 各認知症患者の血清中のH-FABP濃度

表2 DLB/PDD患者のプロファイルと検査結果

臨床診断名	発症年齢	性別	Yahr分類	発症から期間	<sup>123</sup> I-MIBG			H-FABP (pg/ml)
					初期像	後期像	wash out率	
DLB	59	male	I	2年	1.82	1.65	55.20%	6073
DLB	68	female	III	6年	1.45	1.2	63.30%	9215
PDD	64	female	II	2年	1.92	1.84	23.20%	4794
PDD	76	male	III	7年	1.67	1.47	32.21%	5959
PDD	78	male	III	2年	1.79	1.63	43.10%	4416
PDD	82	male	III	4年	1.29	1.25	47.35%	6773
PDD	65	male	II	6年	1.86	1.55	53.94%	3912
PDD	77	male	IV	10年	1.39	1.22	45%	9315

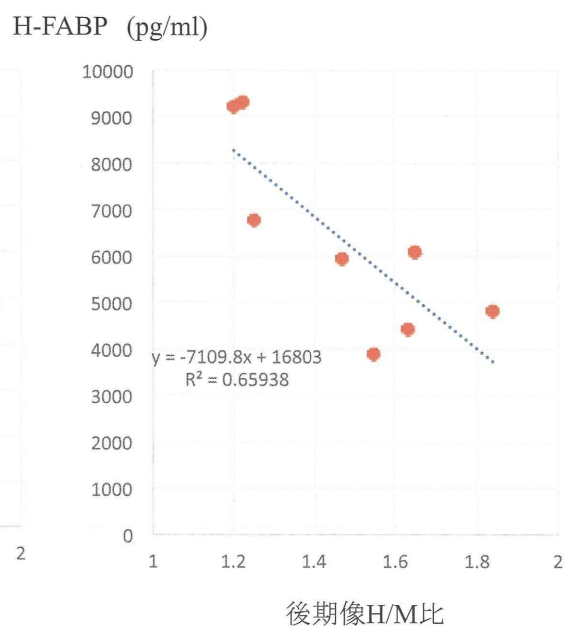
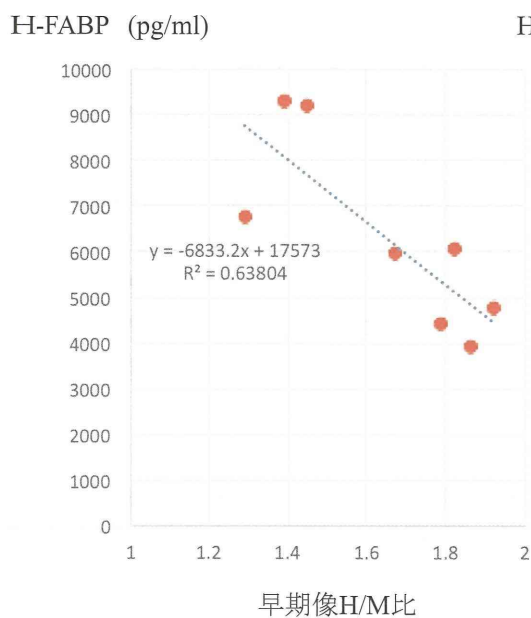


図3 H-FABPと<sup>123</sup>I-MIBGとの関係

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

## 正常プリオンタンパク質依存性神経細胞死機構の解析

研究分担者：八谷如美 東京医科大学神経生理学講座

**研究要旨** プリオン病における神経細胞死を防ぐ手段を検討することは、病気の進行を遅らせる手法の開発につながるものである。本研究では、老化による細胞内プロテアソーム活性の低下により、本来の輸送経路を逸脱した PrP<sup>C</sup> がミトコンドリアに局在したのち、膜電位を低下させ、ミトコンドリアを凝集させ、神経細胞死を引き起こす経路において、(1)ミトコンドリア移行に必須のアミノ酸最小領域、(2)ミトコンドリア移行に必須の細胞質因子、(3)ミトコンドリア外膜上の受容体因子、(4)ミトコンドリア内への輸入には新規のチャンネルが関与していること、を明らかにした。

### A. 研究目的

PrP<sup>C</sup> のミトコンドリア移行は神経細胞死に直結する[1,2]。本経路を薬剤等で阻害し、神経細胞死を防ぐ手段を開発することは、病気の進行を遅らせる手立てとなりうる。我々は、将来的にそのような薬剤を開発・同定するため、まず、培養細胞において、PrP<sup>C</sup> 依存性神経細胞死の分子メカニズムを詳細に検討し、関与する因子群を同定することを目的とした。

### B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞を用い、プロテアソーム活性低下には、ラクタシスチン使用した。細胞の形態観察にはデルタビジョンセクションング蛍光顕微鏡を使用した。一過性のトランスフェクションおよび siRNA にはリポフェクタミン 2000 を使用した。

#### (倫理面への配慮)

培養細胞での研究のため、本研究は該当しない。

### C. 研究結果

①ミトコンドリア移行に必要な最少領域の決定：我々はすでに大まかに PrP (122-139) の領域が移行に必要なことを見いだしていた。そこで、まず、トランケート PrP 変異体である PrP (1-139) を鋳型として PCR を行い、139 から 122 番目までのアミノ酸を 1 残基ずつ欠損させた、合計 18 の欠損変異体を作成した。次に、

これらの変異体を用いて PrP<sup>C</sup> の局在を観察したところ、ミトコンドリア移行に必要な最少領域は 132 から 135 番目にある 4 アミノ酸であることを同定した。

②ミトコンドリア移行に必須の細胞質因子：14-3-3 蛋白質はミトコンドリア蛋白質の輸送に関与することを以前に見いだした[3]。この背景から、PrP のミトコンドリア移行にも 14-3-3 蛋白質が関与すると考え、すでに昨年度までに 14-3-3 $\eta$  の関与を見いだしていた。本年度では、7 種の 14-3-3 アイソフォームすべてにおいて、SiRNA 法を行い、ミトコンドリア移行への関与を検討した。その結果、14-3-3 $\eta$  に加えて、14-3-3 $\gamma$  が、PrP<sup>C</sup> のミトコンドリア移行の細胞質因子であることを明らかにした。

③ミトコンドリア外膜上の受容体因子の同定：ミトコンドリア外膜上で、ミトコンドリア蛋白質前駆体の受容体として機能している 3 種類の既知の蛋白質群 (Tom20, Tom22, Tom 70) [4] のノックダウンを行い、PrP のミトコンドリア移行への影響を調べたところ、Tom70 が PrP<sup>C</sup> 特異的なミトコンドリア外膜上受容体であることがわかった。

④ミトコンドリア内への輸入には新規のチャンネルが関与していること：ミトコンドリア蛋白質の輸入には、唯一、膜透過装置である Tom40 が存在することが知られている。しかし近年、Tom40 非依存性のミトコンドリア輸入機構の存在が示唆されてきている。PrP のミトコンドリアへの輸入において、Tom40 依存性を検討す

るため、Tom40 のノックダウンを行い検討したところ、PrP<sup>C</sup> は Tom40 を経由せずにミトコンドリア内へ輸入されていることを明らかにした。

#### D. 考察

PrP<sup>C</sup> 依存性のミトコンドリア移行には、PrP(132-135)、14-3-3 蛋白質、Tom70 が関与している。これらのいずれか、もしくは複数の因子を阻害することで、細胞死が遅延あるいは抑制されれば、プリオン病治療の新たな手段となりうることが示唆される。

#### E. 結論

本年度の研究により、PrP<sup>C</sup> 依存性神経細胞死に関与する因子群として、PrP(132-135)、14-3-3 $\gamma$ 、14-3-3 $\eta$ 、Tom70 を同定した。

#### [参考文献]

- 1) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, et al. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett* 374:98-103, 2005.
- 2) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, et al. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 327:894-899, 2005.
- 3) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, et al. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* 376:705-709, 1995.
- 4) Rehling P, Brandner K, Pfanner N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 519-530, 2004.

#### F. 健康危険情報

培養細胞での研究のため、本研究は該当しない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 八谷如美. プリオン病の基礎. *東京医科大学雑誌*, in press.
- 2) 加藤大樹, 八谷如美. 正常プリオン蛋白の構造と機能. *Clin Neurosci* 31:1012-1014, 2013.
- 3) 八谷如美. クールー. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:412-422, 2013.
- 4) Leszek J, Trypka E, Kato H, Hachiya N. Break down of insulin system in brain; Link from Alzheimer's disease to type 3 diabetes. *J Alzheimer Dis*, in press.
- 5) Ichimura T, Taoka M, Shoji I, Kato H, Hatakeyama S, Isobe T, Hachiya N. 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM 32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation. *J Cell Sci* 126:2014-2026, 2013.
- 6) Kato H, Nishijima K, Hachiya N. Motor switch from KIF4 to KIF5 induces a selective reduction in anterograde velocity of fluorescence cellular prion protein in neurites. *J Neurol Neurophysiol* S11:005, 2013.
- 7) Kato H, Hachiya N. Mitochondrial physiology and cerebro-spinal protection. In: Uchino H, Ushijima I, Ikeda Y eds. *Neuroanesthesia and Cerebro-Spinal Protection*, Springer, Tokyo, in press.

##### 2. 学会発表

- 1) Hachiya N. A novel methodology for the analysis of protein inclusions. The 1<sup>st</sup> Conference of Neurodegenerative Disorders-Present and past-Wroclaw, Poland, November 6-7, 2013.
- 2) Miyashita K, Fukushima M, Kato H, Hachiya N. Possible involvement of a novel mitochondrial quality control system for the PrPC-dependent neuronal cell death. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 3) Kato H, Hachiya N. Identification of the cyptic mitochondrial targeting sequence for PrPC/mitochondria-dependent neuronal cell death. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 4) Hachiya N. More than a thousand-fold increase

in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p. 12<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, June 23-27, 2013.

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

## 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<sup>Sc</sup>) の増加と正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) の減少が生じていることが示されつつあり、PrP<sup>C</sup> 欠乏による抗酸化能低下と PrP<sup>Sc</sup> 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 酸化損傷が起きていることを示してきた。本年度は、これらの研究を進展させ、PrP<sup>C</sup> 欠乏状態で酸化ストレスが発生すると DNA 損傷が起こるのかについて解析するため、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) を用いて、PrP 遺伝子発現が DNA 損傷マーカーである Checkpoint kinase1 に与える影響について解析を行った。

### A. 研究目的

これまでに我々は DNA 酸化損傷マーカー (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG) がプリオン感染により脳内で増加していることを報告してきた。また、正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) は抗酸化ストレス制御に関与することを様々なプリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損細胞株を使用して示してきた (参考文献 1、2)。プリオン感染時の脳内では異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) の増加と PrP<sup>C</sup> の減少が起きていることが知られており、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積による酸化ストレス発生と PrP<sup>C</sup> 減少に伴う抗酸化ストレス活性低下が DNA 酸化損傷を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、これを進展させ、PrP<sup>C</sup> 欠乏状態で酸化ストレスが発生すると DNA 損傷が起こるのかについて解析するため、本年度の研究では、PrP<sup>C</sup> 欠乏状態である PrP 遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞 (HpL) を血清除去することにより DNA 損傷が起きるのかと PrP 再導入によりそれが抑制されるのかについて、代表的な DNA 損傷マーカーである Checkpoint kinase1 (chk1) のリン酸化を指標に解析を行った。

### B. 研究方法

空ベクター導入 HpL 細胞 (HpL-EM) および PrP 遺伝子を再導入した HpL 細胞 (HpL-PrP) について、血清除去を行った。回収した細胞ライゼートを Sodium dodecyl sulfate (SDS)-ポリアク

リルアミドゲル電気泳動後、抗リン酸化 chk1 (Ser345) 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析を行った。

### (倫理面への配慮)

DNA 実験は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 (カルタヘナ法) および琉球大学遺伝子組換え生物等使用安全管理規則に従い行った。

### C. 研究結果

DNA 損傷の指標である chk1 のリン酸化について、Ser345 がリン酸化した chk1 を認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析したところ、血清存在下において HpL-EM のリン酸化 chk1 は検出限界以下であったが血清除去 18 時間より検出され、血清除去 24 時間でピークとなった。一方、HpL-PrP では血清存在下と非存在下のいずれにおいても検出限界以下であった。これらことから、血清除去が DNA 損傷を誘導するとともに、PrP<sup>C</sup> 発現は DNA 損傷抑制に関連しているものと考えられた。

### D. 考察

血清除去は酸化ストレス誘導の他に、細胞周期を同調させる方法としても用いられ、細胞を G0 期に留め、G1、S 期に同時に移行させる目

的でも使用される。また、chk1 は DNA 損傷とともに、細胞周期の制御にも関わることが知られている。PrP 発現により chk1 のリン酸化が抑制されたことから、PrP 発現が細胞周期へも影響を与える可能性が考えられる。現在、HpL-EM と HpL-PrP を用いて、細胞周期とその関連遺伝子発現について解析を進めている。

本研究より、PrP<sup>C</sup> 発現が間接的に DNA 損傷を抑制する可能性が示されたため、プリオン病発症時にみられるマウス脳内の DNA 損傷が PrP<sup>C</sup> 減少によるものかについて、さらなる解析が必要である。

## E. 結論

PrP<sup>C</sup> 発現は間接的に DNA 損傷を抑制する可能性がある。

## [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.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biot*, in press.
- 2) Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Kono J, Yukawa M, Onodera T. Intestinal transmission of prion proteins and role of exosomes in enterocytes. *Food Safety* 1:43-48, 2013.
- 3) Hirata A, Hori Y, Koga Y, Okada J, Sakudo A, Ikuta K, Kanaya S, Takano K. Enzymatic activity

of a subtilisin homolog, TK-SP, from *Thermococcus kodakarensis* in detergents and its ability to degrade the abnormal prion protein. *BMC biotechnol* 13:19, 2013.

4) Onodera T, Sakudo A. Introduction. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Current Progress in Advanced Research*, Caister Academic Press, Norfolk, pp1-3, 2013.

5) Sakudo A. Prion protein and the family members, Doppel and Shadoo. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Prion: Current Progress in Advanced Research*, Caister Academic Press, Norfolk, pp5-10, 2013.

6) Onodera T, Sugiura K, Matsuda S, Sakudo A. Function of cellular prion protein. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Prion: Current Progress in Advanced Research*, Caister Academic Press, Norfolk, pp11-29, 2013.

7) Ano Y, Sakudo A, Onodera T. Effect of microglial inflammation in prion disease. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Prion: Current Progress in Advanced Research*, Caister Academic Press, Norfolk, pp31-40, 2013.

8) Sakudo A. CWD and other prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. *Prion: Current Progress in Advanced Research*, Caister Academic Press, Norfolk, pp111-118, 2013.

9) Sakudo A, Onodera T. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). In: Liu D Ed. *Manual of security sensitive microbes and toxins*, CRC Press, New York, pp611-624, 2013.

10) 作道章一. プリオン. 小林典裕, 上田 宏, 三宅司郎, 荒川秀俊・編 免疫測定法の基礎と応用, 講談社サイエンティフィック, 東京, in press.

### 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.

## 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

## プリオン蛋白質が形成するアミロイド線維のダイナミクス

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学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** プリオン蛋白質が形成する複数の異なるアミロイド線維間における構造転移に関し、構造生物学的及び速度論的解析を行った。その結果、pH 2.9 fibrils と pH 7.5-like fibrils の間の障壁は低く、可逆的に交換することが可能であるが、pH 7.5-like fibrils と pH 7.5 fibrils の間の障壁は著しく高く、容易に移行できないことが分かった。これらの遷移障壁は、プリオンにおける株の安定化に寄与する、と考えられる。

### A. 研究目的

プリオン蛋白質が形成するアミロイド線維の形状の溶媒環境による変化を、時間分解で観測することにより、異種構造間の遷移障壁を計測し、プリオン株安定化のメカニズムを解明する。

### B. 研究方法

プリオン凝集体構造の溶媒環境依存性を解析するため、新たに凝集体専用のストップト・フロー装置を開発する。同時に NMR、FT-IR 及び CD を用いて、これらの構造変化を解析する。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、プリオン蛋白質を用いた物理化学実験であるため、特に倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

プリオン蛋白質のH2ペプチドのアミロイド線維を用いてpHジャンプ実験を行った。その結果、CDとFT-IRスペクトル測定によりpH 2.9で作製した線維(pH 2.9 fibrils)をpH 7.5にジャンプさせると、分子間のβシートとターン構造が大きく変化すること(pH 7.5-like fibrils)が分かった。しかし、pH 7.5-like fibrilsはpH 7.5で作製した線維(pH 7.5 fibrils)とは構造が異なっていた。よって、pHジャンプ後も線維構造は部分的に保持されていると考えられる。次に、pHを

7.5→2.9に戻すと、pH 7.5-like fibrilsは再びpH 2.9 fibrilsに戻った。このようにH2線維構造は分子間の水素結合による制限によって、ほぼ可逆的に変化すると考えられる。しかしながらpH 7.5で作成した線維に完全に変換することは、観測時間の範囲内ではなかった(不可逆)。従って、pH 7.5-like fibrilsとpH 7.5 fibrilsの間には、大きな障壁があると考えられる。

### D. 考察

鋳型依存性複製過程により形成された線維性凝集体の形態は、超音波のパワーや pH などの溶媒環境に大きく依存する。プリオンが形成する凝集体の立体構造は、このように溶媒環境に大きく依存するため、これが異常型(PrP<sup>Sc</sup>)の多様性(株)の原因となる、と考えられる。このようにプリオン感染において、株は保存されるが、これは鋳型依存性複製過程において、株に特異的な凝集体構造間に、上に述べたような大きな遷移障壁が形成されるためであろうと考えられる。一方、遷移障壁の低い構造間では容易に構造変化が可能である。これらは、継代に伴う同種株内部での性状変化に相当する、と考えられる。異常型(PrP<sup>Sc</sup>)の多様性(株)を考えると、一種類の異常型(株)に特異的に結合する低分子化合物は、他の株に変化すれば、効果がなくなる恐れもあり、治療薬開発に当たっては、PrP<sup>C</sup>の安定化などのメカニズムを考慮する必

要があるだろう。

## E. 結論

プリオン蛋白質の複数の異なる線維構造間で、構造転移障壁の低いものと高いものが存在することが分かった。これらは、プリオンにおける株の安定化に寄与する、と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Yoshifumi, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. *Autophagy* 9:1386-1394, 2013.
- 2) Kimura T, Sako T, Siqin, Hosokawa-Muto J, Cui YL, Wada Y, Kataoka Y, Doi H, Sakaguchi S, Suzuki M, Watanabe Y, Kuwata K. Synthesis of an <sup>11</sup>C-Labeled antiprion GN8 derivative and evaluation of its brain uptake by positron emission tomography. *Chem Med Chem* 8:1035-1039, 2013.
- 3) Endo S, Dawei HU, Suyama M, Matsunaga T, Sugimoto K, Matsuya Y, El-Kabbani O, Kuwata K, Hara A, Kitade Y, Toyooka N. Synthesis and structure-activity relationship of 2-phenyliminochromene derivatives as inhibitors for AKR1B10. *Bioorg Med Chem* 21:6378-6384, 2013.
- 4) Yamaguchi K, Kamatari YO, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly reversible conformational change of amyloid fibrils as revealed by pH-Jump experiments. *Biochemistry* 52:6797-6806, 2013.
- 5) Kuwata K. Logical design of medical chaperone for prion diseases. *Curr Top Med Chem* 13:2432-40, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) Kuwata K. Medical chaperone - A novel strategy for the logical drug design. Drug Discovery & Therapy World Congress 2013, Boston, June 2-8, 2013.
- 2) Fukuoka M. Structure-based drug discovery of anti-influenza a virus compounds among medicines. Drug Discovery & Therapy World Congress 2013, Boston, June 2-8, 2013.
- 3) Kuwata K. Logical design of a medical chaperone for prion diseases. 韓国蛋白質学会, Daejeon, June 17-19, 2013.
- 4) Kuwata K. Medical chaperone- a novel strategy for the logical drug design for prion diseases. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 5) 山口圭一, 鎌足雄司, 福岡万佑子, 宮地礼司, 桑田一夫. ダブル pH ジャンプによる H2 アミロイド線維のほぼ可逆的な構造変化. 第 13 回蛋白質科学会年会, 鳥取, 6.12-14, 2013.
- 6) Yamaguchi K, Kamatari YO, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly reversible conformational change of H2 amyloid fibrils as revealed by pH-jump experiments. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 7.21-22, 2013.
- 7) 桑田一夫. Application アミロイド 2. X-FEL 第 2 回会合, 和光, 8.8-9, 2013.

## 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

## 酵母を用いたプリオン病伝播機構の解明

研究分担者：鈴木元治郎 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** プリオンは凝集性のタンパク質からなる遺伝因子であり、原因となるタンパク質の凝集体の個体間・細胞間の感染によって伝播すると考えられている。本分担者はこれまでに、出芽酵母を用いて新規プリオンの同定やその機能解析を行ってきた。そこで、プリオン病原体の細胞間の伝播について明らかにするために、酵母を用いてプリオンの伝播に欠損が生じる変異株を用いて、どのような宿主細胞の因子がプリオンの伝播に関与しているかについて解析を行った。酵母プリオンタンパク質の凝集体と結合するタンパク質として Mlp タンパク質を単離した。Mlp タンパク質がプリオンタンパク質凝集体と結合していることや、mlp1mlp2 二重変異株ではプリオンタンパク質凝集体が母細胞から娘細胞へと流入しやすくなっていることなどから、Mlp タンパク質はプリオンタンパク質などのタンパク質凝集体を母細胞に保持する役割を担っていることが示唆された。

### A. 研究目的

プリオンは他のウイルスなどと異なり、タンパク質の凝集体によって感染・伝播すると考えられている。プリオン病の予防の観点から、プリオンの感染・伝播機構の解明は急務であるものの、国内外でこれまでにほとんど理解が進んでいない。タンパク質によって感染・伝播するプリオンという現象は、哺乳類以外にも出芽酵母で知られており、プリオンの基本的な性質を理解するうえで重要なモデルとして利用されてきた。そこで、プリオン病原体の細胞間の伝播について明らかにするために、酵母を用いてプリオンの伝播に欠損が生じる変異株を同定・単離し、そのような変異株を用いて、どのような宿主細胞の因子がプリオンの伝播を制御しているかを明らかにし、プリオンの伝播・感染機構を解明することを目的とし、プリオン病の感染予防および治療法開発の基礎となることを目的とする。

### B. 研究方法

まず、出芽酵母において酵母プリオンである Sup35、Rnq1、New1 の凝集体と結合するタンパク質を網羅的に調べ、凝集体と結合するタンパク質として Mlp タンパク質を同定した。Mlp タンパク質がプリオンタンパク質などの凝集体

と結合するか、また Mlp タンパク質の機能を失った変異株を作成し、その表現型を解析することによって、Mlp タンパク質がプリオン凝集体の細胞間の伝播に果たす役割を明らかにし、プリオンの伝播・感染機構の解明を目指した。

### （倫理面への配慮）

酵母を用いた研究であり、倫理面の問題は無い。遺伝子組み換え実験等は理化学研究所の指示に従い適切に行った。

### C. 研究結果

出芽酵母において酵母プリオンである Sup35、Rnq1、New1 の凝集体と結合するタンパク質を網羅的に調べたところ、核膜孔複合体を構成する Mlp1 と Mlp2 が同定された。出芽酵母においてタンパク質凝集体は、核の近傍に局在することが知られており、またそのような凝集体は出芽酵母における不均等細胞分裂の際に、主に母細胞に留まることが知られている。そこで、Mlp タンパク質がプリオンタンパク質などのタンパク質凝集体の分配に必要であるかを調べたところ、野生型酵母ではタンパク質凝集体は主に母細胞に局在するが、mlp1mlp2 二重変異株においては母細胞への局在が失われることを見出した。また、Mlp タンパク質とタンパク質凝

集合のマーカとなる Hsp104 が共局在することもわかった。次に酵母プリオンである[PSI+]の系を利用して、プリオン化の原因となる Sup35 タンパク質凝集体の娘細胞への流れ込みを解析したところ、mlp1mlp2 二重変異株では Sup35 凝集体の流れ込みが起りやすくなっていることがわかった。さらに mlp1mlp2 二重変異株の細胞寿命を調べたところ、野生型と比べて寿命が低下していること、また Hsp104 の過剰発現によって、その寿命の低下が回復することがわかった。

#### D. 考察

本研究では核膜孔複合体の構成因子である Mlp タンパク質がタンパク質凝集体と結合している可能性が示されたが、Mlp タンパク質は Nuclear Basket と呼ばれ、核膜孔の核側に存在している。このことから、凝集体などのダメージを受けたタンパク質が核内へと輸送されている可能性が考えられる。酵母では核内でプロテアソームの活性が高いことがわかっており、プリオン凝集体などがユビキチン化された後、核内へと輸送されプロテアソームによって分解されている可能性が高いと考えられる。mlp1mlp2 二重変異株の解析から、mlp1mlp2 二重変異株ではプリオンタンパク質などのタンパク質凝集体を母細胞に留めることができずに娘細胞へ流れ込みやすくなり、その結果、細胞寿命が低下すると考えられる。以上より、Mlp タンパク質はタンパク質凝集体を母細胞の核膜孔内部に保持するためのアンカーとなっていると考えられる。核膜孔複合体は非常に安定なタンパク質であり、母細胞と娘細胞に不均等に分配すると考えられている。そのため、プリオンタンパク質凝集体が Mlp タンパク質によって母細胞の核内部に集積されることによって、プリオンタンパク質などの凝集したタンパク質の娘細胞への流入を阻害していると考えられる。

#### E. 結論

本研究において、酵母プリオンタンパク質凝集体がどのように不均等に分配されるかについて興味深い知見が得られた。今後は、さらに詳細な解析を行い酵母プリオンタンパク質の

伝播機構について明らかにしていきたい。また、哺乳類においても、プリオンタンパク質などのタンパク質凝集体の伝播や分解機構に Mlp タンパク質が関わっているか検討し、プリオン病の予防につなげていきたいと考えている。

#### [参考文献]

- 1) Suzuki G, Tanaka M. Active prion conversion as a molecular switch for cellular adaptation to environmental stress. *Bioessays* 35:12-16, 2013.
- 2) Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science* 336:355-359, 2012.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki G, Tanaka M. Expanding the yeast prion world: Active prion conversion of non-glutamine/asparagine-rich Mod5 for cell survival. *Prion* 7:109-113, 2013.
- 2) 鈴木元治郎, 田中元雅. 新規な酵母プリオンタンパク質 Mod5 の凝集が生存に有利に働くことを発見. *化学と生物* 51:228-233, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) Suzuki G, Tanaka M. The mechanism of asymmetric distribution of prion protein in the yeast cell. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 7. 21-22, 2013.
- 2) 鈴木元治郎, 田中元雅. 酵母における老化タンパク質凝集体の不均等分配のメカニズム. 日本細胞生物学会年会, 名古屋, 6.21, 2013.

#### 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

## 非定型 BSE に関する解析-定型および非定型 BSE 解析系の樹立の試み-

研究分担者：桶本優子（中村優子） 国立感染症研究所細胞化学部

**研究要旨** ウシ海綿状脳症(BSE)において報告されている定型 BSE(C-BSE)、非定型 BSE(H-BSE および L-BSE)において、株間の性状解析等が可能である、培養細胞を用いた解析系の樹立を目指した。日本において摘発された C-BSE および L-BSE に由来するプリオンを用いた感染実験により、双方に感受性を有する細胞株が確認され、プリオン蛋白質の産生量を上げることでより安定した解析が可能となった。これらの感染細胞において、プロテアーゼ抵抗性のプリオン蛋白質は C-、L-BSE 由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すことが明らかとなった。しかし、いずれの細胞株においても L-BSE 由来プリオンの感染効率および持続感染性は依然として低く、さらなる改良の余地があると思われる。

### A. 研究目的

ウシ海綿状脳症(BSE)には(1)従来型 BSE である定型 BSE(C-BSE)、そして近年新たに発見された非定型 BSE である(2)H-BSE と(3)L-BSE の報告があり、少なくとも3種類の BSE 株が存在することが明らかとなっている。我が国においても C-BSE とともに L-BSE が摘発されている。今日までに 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<sup>1-4)</sup>、また、L-BSE が変異型 CJD 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。しかし、L-BSE の発生報告数は C-BSE に比べ頻度が低く、その性状についてはまだ明らかになっていない点が多い。そこで、C-BSE および L-BSE の感染性および性状を比較・評価することを目的とし、それぞれを神経細胞株に感染させた BSE プリオン解析系の確立を目指している。

### B. 研究方法

これまでに L-BSE および C-BSE をカニクイザルに初代伝播して得られた L-、C-BSE 由来プリオンを感染材料とし、複数のヒトニューロblastoma細胞株を用いて感染実験を試みてきた。結果、SK-N-SH、SK-N-BE2 および BE(2)-M17 において感染が成立すると考えられたが、これらの感染細胞は継代を重ねるにつれ

検出されるプロテアーゼ抵抗性のプリオン蛋白質(PrP<sup>res</sup>)が減少する、つまり持続感染の安定性に欠け、詳細な比較・解析を行うのが難しいという問題点があった。そこで今年度は、感染効率の向上および持続感染性の向上を期待し、プリオン蛋白質(PrP)過剰発現細胞株を樹立した。また、マウスニューロblastoma N2a 細胞やマウス不死化神経細胞株 GT1-7 細胞など、プリオンに対し高感受性であることが報告されているマウス神経細胞株を用いての検討も同様に行った。感染成立の有無は、感染後複数回の継代を重ねた後に細胞を回収し、total lysate において PrP<sup>res</sup> が検出されるかをウェスタンブロッティング法にて確認することにより行った。

### (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、PrP 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

昨年度までの検討により、BSE由来プリオンの感染が成立すると考えられた SK-N-SH、SK-N-BE2 および BE(2)-M17 のうち、SK-N-SH はコドン 129 が Met/Met、BE(2)-M17 および SK-N-BE(2)では Met/Val であることが明らかと



なっている(図1-A)。そこで、PrP過剰発現細胞株を樹立するにあたり、SK-N-SHを用い検討を行った。結果、親株であるSK-N-SHに比しPrP過剰発現細胞株では、感染効率および持続感染性の向上が確認された(図1-B)。また、感染SK-N-SH細胞とネオマイシン耐性を付与した非感染細胞とを共培養し、G418選択を行った結果、薬剤耐性細胞においてもPrP<sup>res</sup>が検出された。このことより、Cell to Cellの感染がおきていることが示唆された。さらに、これらの感染細胞に一過性にPrPを過剰発現させるとPrP<sup>res</sup>のシグナルが増強された。これにより、細胞由来のPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>res</sup>への変換がおきていることが示唆され、感染材料として用いた脳乳剤中のPrP<sup>res</sup>シグナルのみを検出しているという可能性を否定した。これら感染細胞におけるPrP<sup>res</sup>の糖鎖パターンを比較したところ、C-/L-BSE由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示した(図1-B)。

一方、C-BSEはC57BL/6Jマウスへの感染が成立するため、C-BSEプリオンに感染させたマウス脳乳剤を用いたマウス神経細胞株(N2a細胞およびGT1-7細胞)への感染実験を行った。結果、GT1-7細胞においてC-BSE由来プリオンの持続感染が成立することもあわせて明らかとなった。

#### D. 考察

PrP過剰発現細胞を用いることでより安定に糖鎖プロファイルの比較検討が可能となった。昨年度の解析結果からも示唆されていたが、本年度の解析においてもヒト神経細胞株(SK-N-SH由来)においてC-/L-BSE由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すことが明らかとなった。C-/L-BSEプリオンをウシに伝播させた場合には糖鎖パターンの差異は保存されることが報告されており<sup>5)</sup>、種をこえて感染が成立する場合には異なった現象が起きる可能性が示唆された。また、L-BSE由来プリオンの感染については依然、感染効率および持続感染性ともにC-BSE由来プリオンに比べ低い傾向にあった。PMCA法を用いたC-/L-BSEプリオンによるヒトPrPの異常化においては、L-BSEプリオンによる異常化がおきなかったという報告<sup>6)</sup>もあることから、今後、さ

らなる検討が必要と思われる。

#### E. 結論

ヒト神経細胞株を用いたBSE由来プリオン感染実験において、PrPの産生量を増加させることにより感染効率および持続感染性が向上することが明らかとなった。また、これらの感染細胞においてBSE由来プリオンによる細胞内在性PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>res</sup>への変換、およびCell to Cellの感染が起きていることも確認された。しかしながらL-BSE由来プリオンの感染については効率が非常に悪く、さらなる検討が必要である。また、C-BSEについても長期の継代(継代回数20回以上)をへても持続感染が成立しているかなど、その安定性においては経過観察中である。また、C-BSE由来プリオンについてはマウス神経細胞株GT1-7細胞において持続感染が成立し、C-BSE由来プリオンの性状解析に用いることが可能な解析が樹立された。

#### [参考文献]

- 1) 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.
- 2) 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 Infect Dis* 60:305-308, 2007.
- 3) 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* 64:81-84, 2011.
- 4) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K,

Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. *Microbiol Immunol* 53:704-707, 2009.

5) Barria MA, Balachandran A, Morita M, Kitamoto T, Barron R, Manson J, Knight R, Ironside JW, Head MW. Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg Infect Dis* 20:88-97, 2014.

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) Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hanada K, Hagiwara K. Identification of novel PrP epitope modulating conformational change from PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup>. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Sasebo, July 21-22, 2013.

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

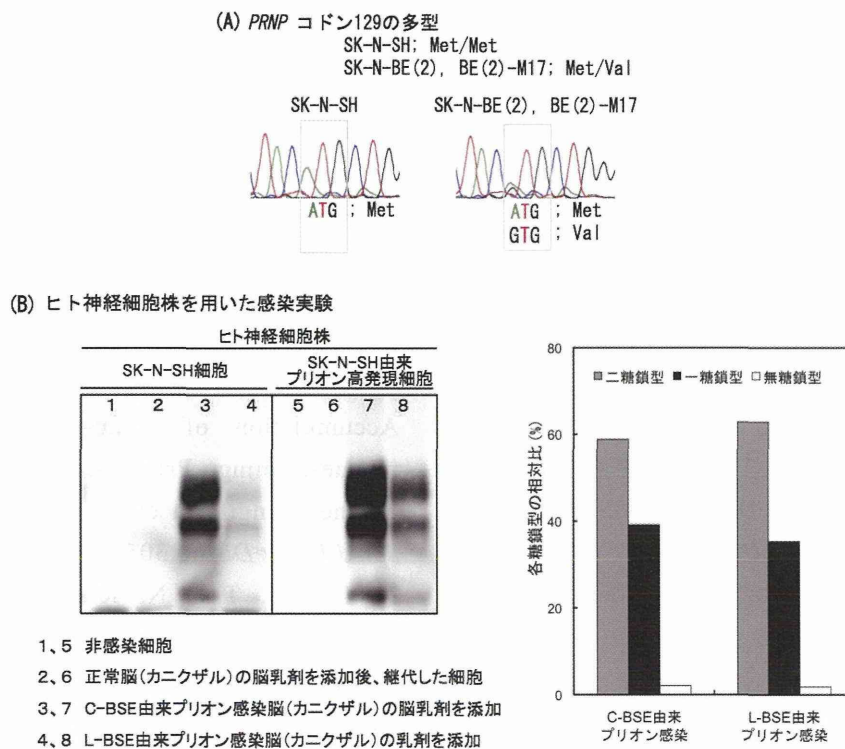


図 1.

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

## Bank vole (*Myodes glareolus*) 遺伝子導入マウスへのプリオン伝達試験

研究分担者：毛利資郎 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野  
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  
研究分担者：横山 隆 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分野

**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*) のプリオン蛋白質 (BvPrP) 遺伝子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、感染性について解析した。TgBv マウスは自発性にプリオン病様症状を呈し、脳内に異常なプリオン蛋白質の蓄積を認めたが、感染性は証明されなかった。KiBv マウスを終生飼育したが、異常なプリオン蛋白質の沈着を認めなかった。また、KiBv マウスは、CJD のみならず定型 BSE、非定型 BSE (H 型、L 型) も伝達され、広い感受性を示した。BvPrP 遺伝子導入マウスは、種々のプリオン感染モデルとして有用であることが明らかとなった。

### A. 研究目的

ひとりのクロイツフェルト・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、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について、過剰発現マウスの自然発症プリオン病の本態を調べ、ノックインマウスの終生飼育により異常のないことを確認し、BSE プリオンの伝達性を調べた。

### B. 研究方法

(1) 昨年度、作製報告した 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) うちマウスの自然発症した脳乳剤を KiBv マウス、野生型マウスにそれぞれ継代接種した最終結果をまとめた。

(2) 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 BSE プリオン 3 種類、定型 BSE (BSE-C)、非定型 BSE (BSE-L, BSE-H)、CWD の脳内接種 (20  $\mu$ l) を行い、伝達の有無を調べた。

### (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 364 日から 463 日 (平均 415 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。蓄積された

プリオン蛋白質 BvPrP はプロテナーゼ K (PK) 感受性であり、KiBv, C57BL/6J, NZW マウスへの継代伝播試験の結果、伝達は成立しなかった。

- (2) KiBv マウスを終生飼育した結果、805-971 日 (平均 895 日) 飼育し、安楽死の後、免疫組織染色、ウェスタンブロックにより精査したが、異常な PrP の蓄積を認めなかった。
- (3) KiBv マウスに対する BSE の伝達試験を行った結果、ウシの定型 BSE (BSE-C)、非定型 BSE (BSE-L, BSE-H)、シカの CWD いずれも伝達が成立した。

#### D. 考察

BvPrP 遺伝子を過剰発現する TgBv マウスは同じ導入遺伝子構成を相同組換えで導入された KiBv マウスのプリオン蛋白質発現量の 4～5 倍の過剰発現である。TgBv マウスは自然発症し、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 2 系統の野生型マウス (C57BL/6, NZW) 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 マウスの終生飼育の結果、異常な PrP の蓄積を認めなかったことは、TgBv マウスが同じ導入遺伝子で作製されていることを考えると、導入遺伝子そのものが異常化に関わっていないと考えられた。これらのことから KiBv マウスは伝達性を評価するモデルとして適していると考えられる。

これまで、すべての型の BSE、CWD が伝達できたことは、Bank vole の PrP 遺伝子導入マウスのプリオンに対する感受性の広さを示すものであった。

#### 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<sup>Res</sup>) 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 のみならず BSE、CWD のプリオン病が広く伝達可能であることから伝達性を評価する感染モデルとして適していることが明らかとなった。

#### [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) Agrimi U, Nonno R, Dell'Omo G, Di Bari MA, Conte M, Chiappini B, Esposito E, Di Guardo G, Windl O, Vaccari G, Lipp HP. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog* 4:e1000113, 2008.
- 3) 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

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, Iwasaki Y, Otsuka H, Yamada M, Yoshida M, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M/V and type 2 abnormal prion protein. *Acta Neuropathol Commun* 1:74, 2013.
- 2) Yoshioka M, Matsuura Y, Okada H, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama Y, Mohri S. Rapid assessment of bovine spongiform encephalopathy prion inactivation by heat treatment in yellow grease produced in the industrial manufacturing process of meat and bone meals. *BMC Vet Res* 9:134, 2013.
- 3) Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon