

森 剛志, 内山圭司, 犬伏祥子. 異なるプリオン株の産生メカニズムについて. 第 26 回中国四国ウイルス研究会, 徳島, 6.18-19, 2011.

6) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. 細菌由来の蛋白 succinylarginine dihydrolase の免疫によるプリオン病の予防効果. (英語) Immunization with bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase induces antigenic mimicry-mediated anti-prion effects in mice. 第 40 回日本免疫学会, 千葉, 11.27-29, 2011.

7) 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.

8) 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.

9) 内山圭司, 臼井 健, 矢野雅司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送を抑制する. 第 28 回中国四国ウイルス研究会, 広島, 6.22-23, 2013.

10) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送障害を引き起こす. 第 86 回日本生化学会, 横浜, 9.11-13, 2013.

11) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送を抑制する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

G. 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 : PrP^C が過剰発現すると、Lrp11 と結合し、Src ファミリーである Fyn を介してオートファジーを誘導する。

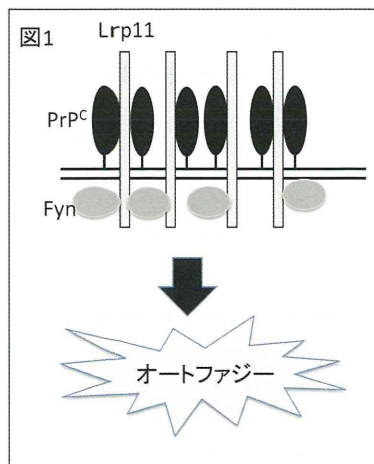
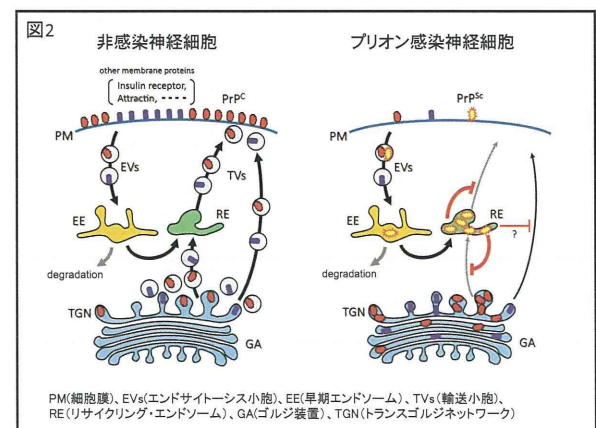


図 2: プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリングエンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、それによって神経障害をきたす。



異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

研究分担者：横山 隆	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：宮澤光太郎	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：舩甚賢太郎	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：多辺田奈保子	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：三輪律子	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：岡田洋之	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター

研究要旨 プリオン感染動物の脳乳剤を2種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した後の PrP のバンド型により、スクレイピー Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP が区別できた。しかし、PrP^{Sc} 断片の酵素処理による解析にはサンプル中の PrP^C の除去が必要となる。PrP^C の除去方法について検討したところ 10 mg/ml のサーモライシン処理が有効であり、その際 PrP^{Sc} は全長のまま保持された。この処理により PrP^{Sc} のみのフラグメント断片の解析が可能となった。一方、2頭のスクレイピー実験感染羊の脳および脾臓に存在するプリオンの性状を明らかにするために、野生型マウスおよび羊型プリオン蛋白質過発現マウスへの伝達試験と蓄積する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) のバンド型を解析した。脳に蓄積した PrP^{Sc} 型とプリオンの生物学的性状は一致していたが、脾臓からは複数のプリオン株が検出され、末梢組織の PrP^{Sc} 型別はプリオンの株、種類と一致しないことが示された。スクレイピーでは、末梢から中枢神経への伝播の際にプリオン株の選択が生じていると考えられた。

A. 研究目的

プリオンの主要構成成分である異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、プリオン株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例も知られている。牛海綿状脳症 (BSE) 由来 PrP^{Sc} とスクレイピー由来 PrP^{Sc} では、プロテイナーゼ K (PK) 消化後の分子量、糖鎖型に明瞭な差が認められるが、多くのスクレイピー株では、生物学的性状の異なる株でも PK 消化後のバンドに違いは認められない。一方、スクレイピー感染動物の脳内に蓄積する PrP^{Sc} が、不均一な集合体であることが示唆されており、プリオン株の性状解明には、PrP^{Sc} をさらに分類する手法が必要である。プリオン株の選択・変異の機構を明らかにすることを目指して、各種蛋白質分解酵素に対する抵抗性とその際に出現する断片を指標とした、PrP^{Sc} の性状解析ならびにプリオン株の分類を行う。

B. 研究方法

PrP^{Sc} の細分化を目的として、PK 以外の蛋白

質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc} 断片のバンド型別を行った。PrP^{Sc} のみの解析のため、サンプル中からの PrP^C の除去法を検討した。

PrP^{Sc} のバンド型とプリオンの生物学的性状を比較するため、スクレイピー実験感染羊の脳と脾臓からの PrP^{Sc} の検出ならびに野生型マウス、羊型 PrP 過発現マウスへの伝達試験を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

BSE プリオン株は PK 消化によるフラグメントの違いによる識別が可能であるが、多くのスクレイピー株ではこのフラグメントの大きさに差は認められない。しかし、感染動物の脳乳剤を2種類のエンドプロテイナーゼ(Lys-CまたはArg-C)で消化した後のPrPのバンド型により、スクレイピーChandler株、Obihiro株、およびマウス馴化BSE株由来PrPが区別できる可能性を示した。PrP^{Sc}の酵素処理による断片の解析にはPrP^Cの除去が必要となる。そこで、サーモライシンを使ったPrP^{Sc}の検出方法について検討した。プリオン非感染動物の脳乳剤を10 µg/mlのサーモライシンで処理すると、PrP^Cのバンドは消失したが、プリオン感染動物ではPrPのバンド型に変化は認められず、全長のPrP(PrP^{Sc})が保持される。サーモライシン処理した試料をPKで消化すると、PK処理のみと同じPrPcoreが出現するが、そのシグナル強度は大きく減弱する。このことから、調整した試料中にはPK抵抗性PrP^{Sc}(PrP^{Sc}-res)およびPK感受性PrP^{Sc}(PrP^{Sc}-sen)が含まれると考えられた。PK消化および未消化の試料のウエスタンブロットのシグナル強度を比較したところ、PrP^{Sc}-resはPrP^{Sc}の約20~40%を占めることが示唆され、その比率はプリオン株によって異なっていた。

2種類のスクレイピー実験感染羊の脾臓を羊型PrP過発現マウスおよび野生型マウスを用いて伝達試験を行った。野生型マウスに定型スクレイピーは伝達するが、CH1641様スクレイピーは伝達しない。また羊型PrP過発現マウスはCH1641様スクレイピーに高感受性を示す。この両マウスの選択性を利用して存在するプリオンを推定した。脳からは1種類のプリオンが検出されたが、脾臓には複数のプリオン株が混在していることが示された。脾臓では、主に存在するプリオンが組織でのPrP^{Sc}の型別に影響していた。しかし、伝達試験では、使用したマウスに感受性のプリオンが分離された。

D. 考察

PrP^{Sc}の酵素処理による断片の解析のため、PrP^Cの除去法を検討したところ、サーモライシン処理が有効であると考えられた。低濃度のサーモライシン処理はPrP^Cを除去し、全長のPrP^{Sc}

を保存すると考えられ、PK感受性PrP^{Sc}の検出への有用性も示唆された。

スクレイピーの末梢から中枢神経への伝播の際に株の選択が生じていると考えられた。株の選択または変異に伴う、新興プリオン病の出現の一端を示すものと考えられる。

E. 結論

脳に蓄積したPrP^{Sc}型とプリオンの生物学的性状は一致しており、PrP^{Sc}型別は、プリオン株の分類に有用であり、2種類の酵素処理を組み合わせ、新たなPrP^{Sc}分類の可能性が示された。しかし、脾臓からは複数のプリオンが混在し、そのPrP^{Sc}型別はプリオンの株、種類と一致しないことが示された。スクレイピーでは、末梢から中枢神経への伝播の際にプリオン株の選択が生じていると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Takata M, Fukuda S, Nikaido S, Fujii K, Onoe S, Mohri S, Yokoyama T. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in cases of bovine spongiform encephalopathy detected by fallen stock surveillance in Japan. *J Vet Med Sci* 73:1465-1471, 2011.
- 2) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T, Czub S. Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. *Vet Res* 42:79, 2011.
- 3) Kono J, Toyoshima R, Iseki T, Sato Y, Umematu A, Okano M, Tashiro A, Ano Y, Sata T, Yokoyama T, Onodera T, Yukawa M. Uptake dynamics of scrapie agent in the intestinal villous epithelium of suckling and weanling Syrian hamsters. *Microbiol Immunol* 55:661-665, 2011.
- 4) Imamura M, Kato N, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T. Strain-specific effects of reducing agents on the cell-free conversion of recombinant prion protein into a protease-resistant form. *Microbiol Immunol*

- 55:633-640, 2011.
- 5) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Yokoyama T. Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. *Prion* 5:103-108, 2011.
 - 6) Yoshioka M, Imamura M, Okada H, Shimozaki N, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S. Sc237 hamster PrPSc and Sc237-derived mouse PrPSc generated by interspecies in vitro amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice. *Microbiol Immunol* 55:331-340, 2011.
 - 7) Fukuda S, Okada H, Arai S, Yokoyama T, Mohri S. Neuropathological changes in auditory brainstem nuclei in cattle with experimentally induced bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 145:302-307, 2011.
 - 8) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T. Detection of disease-associated prion protein in the posterior portion of the small intestine involving the continuous Peyer's patch in cattle orally infected with bovine spongiform encephalopathy agent. *Transbound Emerg Dis* 58:333-343, 2011.
 - 9) Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y. Glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent stimulation pathway required for generation of baculovirus-derived recombinant scrapie prion protein. *J Virol* 85:2582-2588, 2011.
 - 10) Okada H, Sato Y, Sata T, Sakurai M, Endo J, Yokoyama T, Mohri S. Antigen retrieval using sodium hydroxide for prion immunohistochemistry in bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *J Comp Pathol* 144:251-256, 2011.
 - 11) Okada H, Murayama Y, Shimozaki N, Yoshioka M, Masujin K, Imamura M, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg Infect Dis* 18:2091-2092, 2012.
 - 12) Takenouchi T, Iwamaru Y, Imamura M, Fukuhara S, Sugama S, Sato M, Mochizuki N, Hashimoto M, Yokoyama T, Mohri S, Kitani H. Cytochalasin D enhances the accumulation of a protease-resistant form of prion protein in ScN2a cells: involvement of PI3 kinase/Akt signalling pathway. *Cell Biol Int* 36:1223-31, 2012.
 - 13) Iwamaru Y, Takenouchi T, Murayama Y, Okada H, Imamura M, Shimizu Y, Hashimoto M, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS One* 7:e37896, 2012.
 - 14) Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Kimura K, Mohri S, Yokoyama T. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *J Vet Med Sci* 74:1207-1210, 2012.
 - 15) Kim HJ, Tark DS, Lee YH, Kim MJ, Lee WY, Cho IS, Sohn HJ, Yokoyama T. Establishment of a cell line persistently infected with chronic wasting disease prions. *J Vet Med Sci* 74:1377-1380, 2012.
 - 16) Murayama Y, Imamura M, Masujin K, Shimozaki N, Yoshioka M, Mohri S, Yokoyama T. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein derived from ARQ and AHQ homozygote sheep by interspecies in vitro amplification. *Microbiol Immunol* 56:541-547, 2012.
 - 17) Tang Y, Gielbert A, Jacobs JG, Baron T, Andreoletti O, Yokoyama T, Langeveld JP, Sauer MJ. All major prion types recognised by a multiplex immunofluorometric assay for disease screening and confirmation in sheep. *J Immunol Methods* 380:30-39, 2012.
 - 18) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. *Prion* 6:89-93, 2012.
 - 19) 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. *FEBS Lett* 586:325-329, 2012.
 - 20) Fukuda S, Onoe S, Nikaido S, Fujii K, Kageyama S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Yoshioka M, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Neuroanatomical distribution of disease-associated

- prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn J Infect Dis* 65:37-44, 2012.
- 21) Okada H, Iwamaru Y, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Detection of disease-associated prion protein in the optic nerve and the adrenal gland of cattle with bovine spongiform encephalopathy by using highly sensitive immunolabeling procedures. *J Histochem Cytochem* 60:290-300, 2012.
- 22) Okada H, Iwamaru Y, Kakizaki M, Masujin K, Imamura M, Fukuda S, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T. Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraspecies passages. *Vet Pathol* 49:819-823, 2012.
- 23) Ushiki-Kaku Y, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Itohara S, Ogawa-Goto K, Hattori S, Yokoyama T. Different antigenicities of the N-terminal region of cellular and scrapie prion proteins. *Microbiol Immunol* 57: 792-796, 2013.
- 24) Okada H, Miyazawa K, Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Fujii T, Fujii K, Kageyama S, Yoshioka M, Murayama Y, Yokoyama T. The presence of disease-associated prion protein in skeletal muscle of cattle infected with classical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med Sci* 76:103-107, 2013.
- 25) Yoshioka M, Matsuura Y, Okada H, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, 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 Re* 9:134, 2013.
- 26) Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *J Virol* 87:8745-8755, 2013.
- 27) Yamamoto T, Ushiki-Kaku Y, Yokoyama T, Hattori S. Sensitivity and specificity of a commercial BSE kit for the detection of ovine scrapie. *Anim Sci J* 84:508-512, 2013.
- 28) Kasai K, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T. Heterogeneity of the abnormal prion protein (PrP^{Sc}) of the Chandler scrapie strain. *Pathogens* 2:92-104, 2013.
- 29) Masujin K, Kaku-Ushiki Y, Miwa R, Okada H, Shimizu Y, Kasai K, Matsuura Y, Yokoyama T. The N-terminal sequence of prion protein consists an epitope specific to the abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}). *PLoS One* 8:e58013, 2013.
- 30) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 432:86-91, 2013.
- 31) Matsuura Y, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Distribution of abnormal prion protein in a sheep affected with L-type bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 149:113-118, 2013.
- 32) Okada H, Iwamaru Y, Yokoyama T, Mohri S. Immunohistochemical detection of disease-associated prion protein in the peripheral nervous system in experimental H-type bovine spongiform encephalopathy. *Vet Pathol* 50:659-663, 2013.
- 33) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion* 7:185-191, 2013.
- 34) Yokoyama T. Bovine spongiform encephalopathy and scrapie. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Casiter Academic Press, Norfolk, pp93-110, 2013.
- 35) Ushiki-Kaku Y, Shimizu Y, Tabeta N, Iwamaru Y, Ogawa-Goto K, Hattori S, Yokoyama T. Heterogeneity of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in murine scrapie prions determined by PrP^{Sc}-specific monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci* 76:285-288, 2014.
- 36) 横山 隆, 辻 智香, 横山真弓. ニホンジカのプリオン病(CWD)サーベイランス. *JVM* 65:479-81, 2012.
- 37) 横山 隆. 動物のプリオン病 1.牛海綿状脳症(BSE). *Clinical Neuroscience* 31:1029-1031,

2013.

2. 学会発表

- 1) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the structural stability of various mammalian cellular prion proteins based on the fragment molecular orbital calculations. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 2) Yokoyama T, Kaku-Ushiki Y, Mohri S. PrP^{Sc} heterogeneity in inter- and intra-species transmission. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 3) Masujin K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 4) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mhori S, Yokoyama T. Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 5) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and other countries L-type BSE prions. Prion 2012, Amstrdam, May 10-12, 2012.
- 6) Jacobs J, Langeveld J, Yokoyama T, Andreoletti O, Hope J, Bossers A, van Keulen L, Baron T. Ovine field CH1641 like scrapie cases do differ from classical scrapie and BSE-Western blotting studies on PrPres. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 7) Yokoyama T, Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Mohri S. Western blotting detection of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues—Immunoreactivity of mab discriminate sheep scrapie types. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 8) Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y. Proteinase K- and heat-treated insect cell lysate effectively stimulates *in vitro* high-fidelity replication of baculovirus-derived recombinant scrapie and BSE prions. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Dorj G, 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Yokoyama T. Atypical bovine spongiform encephalopathies. The 16th Annual meeting of Japanese society for neurovirology, Tokyo, August 30-31, 2012.
- 16) Yokoyama T, Masujin K, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Fukuda S, Okada H, Murayama Y. Inter- and intra-species transmission of atypical BSEs. Animals TSEs

workshop, Banff, May 26, 2013.

17) Yokoyama T, Kasai K, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S. Heterogeneity of the abnormal prion protein (PrP^{Sc}) of the Chandler scrapie strain. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

18) An SS, Lim K, Youn YC, Bagyinszky E, Segarra C, Kang S, Yokoyama T, Coste J, Kim SY. Blood detection of scrapie sheep at pre-clinical stages: blinded study by using multimer detection system. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

19) Masujin K, Tabeta N, Miwa R, Miyazawa K, Okada H, Mohri ., Yokoyama T. The emergence of novel BSE prions by serial passages of H-type BSE in bovinized mice. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

20) Miyazawa K, Okada H, Masujin K, Yokoyama T. Characterization of Japanese field scrapie isolates by GT1-7 cells. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

21) Fukuda S, Fujii T, Kageyama S, Okada H, Yokoyama T, Murayama Y. Detection specificity of salivary BSE PrP^{Sc} by PMCA. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

22) Masujin K, Tabeta N, Miwa R, Miyazawa K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. The emergence of

novel BSE prions by the serial transmission of H-type BSE in bovinized mice. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

23) Miyazawa K, Okada H, Masujin K, Iwamaru Y, Yokoyama T. Transmissible properties of field scrapie isolates to GT1-7 cells. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

24) Yokoyama T, Sohn HJ. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and other transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): Current status and research topics. 1st International Interscience Conference on Infection and Chemotherapy, Seoul, November 7, 2013.

G. 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

ヒトプリオンの伝達性に関する研究

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 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 ヒトプリオン蛋白質遺伝子を発現した遺伝子改変マウス、いわゆるヒト化マウスやその他の感受性遺伝子導入マウスを用いて、プリオンの感染性を指標に CJD プリオンの分離、分類を行うのが目的である。感染性を指標とするためには、実験動物に伝達させることが重要である。われわれはこれまでにヒト型プリオン蛋白質遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製し、感受性の解析を行ってきたが、これらヒト化マウスに感染しないヒト CJD の存在がある。これを解決するために、CJD 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) マウスを作製した。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、KiBv マウスは、これまで伝達できなかった孤発性 CJD-MM2 cortical form の伝達を初めて成立させ、非定型 BSE を含めてすべての BSE にも感受性を示した。遺伝子改変モデル動物の作製、評価には長い期間を要するため、その間、これまでに開発してきたヒト化マウスを用いて CJD プリオンの除去方法を検討し、CJD 感染性に基づいたバイオアッセイにより、医療現場における現実的プリオン消毒法について評価した。

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。

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、この研究の目的である。

B. 研究方法

研究 1. プリオン消毒法の評価

1) 感染性材料とモデルマウス

孤発性 CJD プリオン (MM1 型) を材料 (H3) として、ヒトプリオンに対して最も感受性の高い、ヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質遺伝子導入の KiChM マウスを用いて処理後のステンレスワイヤーの CJD プリオンの感染性の減衰について半定量的に調べた。

2) ステンレスワイヤーへの材料接着

手術器具を模したステンレス製ワイヤーを 2% Triton-X-100 溶液中で超音波処理し、蒸留水で洗浄後、10% ヒト脳乳剤上清に浸漬後、一晚乾燥させた。

3) 滅菌処理

CJD ヒト脳乳剤を接着させたワイヤーに

ついて以下の滅菌処理を実施した。

- ① オートクレーブ
- ② 3%SDS 煮沸
- ③ 1M, 2M NaOH 水溶液処理
- ④ 市販のアルカリ性洗剤に浸漬
- 4) マウス脳内へのワイヤー埋め込み

マウスをネブタール麻酔の後、特注の押し出し式ルンバール針(0.7×13mm)を使用して、左脳に不活化処理後のワイヤーを埋め込み、発症の有無を観察した。

5) 感染性の有無の評価

マウスがプリオンに感染し、発病しているか否かの診断は、症状の観察、免疫組織化学染色による異常プリオン蛋白の検出、ウェスタンブロット法による脳組織からの異常プリオン蛋白の検出を併用することによりおこなった。

マウスがワイヤーを埋め込まれた後、発症するまでの日数を潜伏期間とした。ワイヤーに段階希釈した CJD プリオンを接着させ、潜伏期間を測定し、それを基に CJD プリオンの感染価を求めた(エンドポイントタイトレーションアッセイ)。滅菌処理後のワイヤーによるマウスの潜伏期間から感染価を求め、それぞれの感染性の減衰を算出した。

研究 2. 遺伝子導入マウスへのプリオン伝達試験

- (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、野生型マウスにそれぞれ継代接種し、感染性の有無を調べた。
- (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 µl)を行い、伝達性の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

これらの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

研究 1. プリオン消毒法の評価

オートクレーブ、3%SDS 煮沸、NaOH の単独処理では 1M、2M の浸漬ではヒトプリオンに対してそれぞれ 1.39 log, 1.53 log の減衰効果しか得られず、マウスの発病も防げなかった。しかし、3%SDS 煮沸+オートクレーブ、1M NaOH+オートクレーブなど処理を組み合わせることによって、3.34 log 以上の感染性減衰が認められ、遺伝子改変マウスによる感染性検出限界レベル以下となった。アルカリ性洗剤については、単独使用でも高温かつ高濃度(高いアルカリ領域)のもとで一定時間以上処理することで、感染性が検出限界以下になることが判明した。

研究 2. 遺伝子導入マウスへのプリオン伝達試験

- (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(PrP)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)飼育後に、安楽死の後、免疫組織染色、ウェスタンブロットともに異常な PrP の蓄積を認めなかった。
- (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、KiBv 遺伝子導入マウスにより初めて伝達可能となった(表 1)。
- (4) 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 いずれも伝達できた(表 1)。

D. 考察

医療現場で通常おこなわれている滅菌処理を組み合わせるにより、マウスへの感染は成立しなくなり、CJD プリオンの感染性は、二次感染防止可能と考えられるレベル以下に減衰することが明らかになった。アルカリ性洗剤では濃度、温度、処理時間を一定以上に保持すれば、単独の薬剤処理でも CJD プリオンの感染性が検出限界以下に減衰した。

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。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。KiBv マウスは、CJD のみならず、すべての型の BSE、CWD も伝達でき、プリオンに対する感受性の広さが示された。

E. 結論

CJD プリオンを用いて遺伝子改変マウスを用いた感染性を指標としたバイオアッセイの結果から、病院等医療の現場におけるプリオンによる二次感染を防ぐためには、不活化処理方法等により注意を払うことの重要性が示された。

KiBv マウスは、CJD はじめ BSE、CWD の動物由来プリオン病も広く伝達可能であり、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) Fichet G, Comoy E, Duval C, et al. Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364:521-526, 2004.
- 2) Lemmer K, Mielke M, Kratzel C, Joncic M, Oezel M, Pauli P, Beekes M. Decontamination of surgical instruments from prions. II. In vivo findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces. *J Gen Virol* 89:348-358, 2008.
- 3) 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.
- 4) Agrimi U, Nonno R, Dell'Omo G, Di Bari MA, Conte M, Chiappini B, Esposito E, Di Guardo G, Wind 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.
- 5) 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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada H, Iwamaru Y, Kakizaki M, Masujin K, Imamura M, Fukuda S, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T. Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraspecies passages. *Vet Pathol* 49:819-23, 2011.
- 2) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Takata M, Fukuda S, Nikaido S, Fujii K, Onoe S, Mohri S, Yokoyama T. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in cases of bovine spongiform encephalopathy detected by fallen stock surveillance in Japan. *J Vet Med Sci*

73:1465-1471, 2011.

3) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T, Czub S. Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. *Vet Res* 42:79, 2011.

4) Imamura M, Kato N, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T. Strain-specific effects of reducing agents on the cell-free conversion of recombinant prion protein into protease-resistant form. *Microbiol Immunol* 55:633-640, 2011.

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

6) Yoshioka M, Imamura M, Okada H, Shimozaki N, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S, Sc237 hamster PrP^{Sc} and Sc237-derived mouse PrP^{Sc} generated by interspecies in vitro amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice. *Microbiol Immunol* 55:331-340, 2011.

7) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T. Detection of disease-associated prion protein in the posterior portion of the small intestine involving the continuous peyer's patch in cattle orally infected with bovine spongiform encephalopathy agent. *Transbound Emerg Dis* 58:333-343, 2011.

8) Fukuda S, Okada H, Arai S, Yokoyama T, Mohri S. Neuropathological changes in auditory brainstem nuclei in cattle with experimentally induced bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Path* 145:302-307, 2011.

9) Okada H, Murayama Y, Shimozaki N, Yoshioka M, Masujin K, Imamura M, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg Infect Dis* 18:2091-2092, 2012.

10) Okada H, Iwamaru Y, Yokoyama T, Mohri S. Immunohistochemical detection of

disease-associated prion protein in the peripheral nervous system in experimental H-Type bovine spongiform encephalopathy. *Vet Pathol* 50:659-663, 2012.

11) Kasai K, Hitara A, Ohyama T, Nokihara K, Yokoyama T. and Mohri S. Novel assay with fluorescence-labelled PrP peptides for differentiating L-type atypical and classical BSEs, and scrapie. *FEBS Lett* 586:325-329, 2012.

12) Murayama Y, Imamura M, Masujin K, Shimozaki N, Yoshioka M, Mohri S, Yokoyama T. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein derived from ARQ and AHQ homozygote sheep by interspecies in vitro amplification. *Microbiol Immunol* 56:541-547, 2012.

13) Okada H, Iwamaru Y, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Detection of disease-associated prion protein in the optic nerve and the adrenal gland of cattle with bovine spongiform encephalopathy by using highly sensitive immunolabeling procedures. *J Histochem Cytochem* 60:290-300, 2012.

14) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. *Prion* 6:89-93, 2012.

15) Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Kimura K, Mohri S, Yokoyama T. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *J Vet Med Sci* 74:1207-1210, 2012.

16) Iwamaru Y, Takenouchi T, Murayama Y, Okada H, Imamura M, Shimizu Y, Hashimoto M, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS One* 7:e37896, 2012.

17) Fukuda S, Onoe S, Nikaido S, Fujii K, Kageyama S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Yoshioka M, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn J Infect Dis* 65:37-44, 2012.

18) 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.

19) 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.

20) Matsuura Y, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Distribution of abnormal prion protein in a sheep affected with L-type bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 149:113-118, 2013.

21) Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *J Virol* 87:8745-8755, 2013.

22) 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* 432:86-91, 2013.

23) 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.

24) Matsuura Y, Ishikawa Y, Somerville RA, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Yokoyama T, Kitamoto T, Mohri S. A rapid bioassay for classical and L-type bovine spongiform encephalopathies. *Open J Vet Med* 3:79-85, 2013.

25) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion* 7:1-7, 2013.

26) 毛利資郎. 伝達性海綿状脳症(プリオン病)の病原体. 吉田眞一, 柳 雄介, 吉開泰信・編

戸田新細菌学 改訂 34 版, 南山堂, 東京, pp713-720, 2013.

2. 学会発表

1) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the structural stability of various mammalian cellular prion proteins based on the fragment molecular orbital calculations. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.

2) Yokoyama T, Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Mohti S. Western blotting of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues – immunoreactivity of mab discriminate sheep scrapie types. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.

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

4) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Mutayama Y, Yokoyama T, Somerville R, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. Prion 2013, Banff, May 26-29 2013.

5) Yokoyama T, Kasai K, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S. Heterogeneity of the abnormal prion protein (PrP^{Sc}) of the Chandler scrapie strain. Prion 2013, Banff, May 26-29 2013.

G. 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 KiBvマウスの伝達試験

Inoculum (brain homogenate)	positive / sacrificed	Mean incubation periods (days)	Post inoculation days of positive mice	Post incubation days of negative mice
sCJD-MM1	3/3	296	287,287,315	-
sCJD-MM2C	3/5	524	376,580,617	386*, 581
sCJD-VV2	0/3	-	-	528,552,657
vCJD	4/4	489	420,507,507,522	-
F1/B6	6/6	334	307,307,319, 327,340,405	-
F1/TgBv (TgBv/0)	6/6	206	179,196,215, 216,216,216	-
BSE-C	1/7	564	564	487,523,712*,737, 804*,807*
BSE-L	8/10	596	549-646	509,518*
BSE-H	9/9	419	406-422	-
CWD	2/4	460	436,483	631,631
Not inoculated	0/16	895	805-971	-

*: Brain is negative but spleen is positive by IHC

Cell-PMCA 法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増幅

研究分担者：竹内敦子 東北大学医学系研究科病態神経分野
研究協力者：北本哲之 東北大学医学系研究科病態神経分野

研究要旨 Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法を用いて、ハムスタースクレイピー263株におけるプリオン不活化効果の評価を行った。また PMCA 法をヒトプリオンに応用し、高感度検出法として確立するための検討を行った。

A. 研究目的

プリオン病は現時点で有効な治療法のない感染性の致死性神経疾患である。CJD の二次感染を今後確実に防止するためには、輸血用血液や医薬品原料のスクリーニングが必須であり、一刻も早くヒトプリオンを高感度検出する技術を確立しなければならない。

異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) の *in vitro* 増幅系である PMCA 法は、ハムスタースクレイピー263K 株における PrP^{Sc} の高感度検出法として広く知られている。そこで H23 年度はこのハムスタースクレイピー263K 株について、簡便なプリオン不活化法を迅速かつ網羅的に検索するため、PMCA 法を用いて不活化処理後に残存するプリオンを検出し、不活化効率を評価することを目的とした。

H24-25 年度はヒトプリオンの PMCA 法による高効率な増幅を達成することを目的とした。ヒトプリオンにはいくつかのタイプが存在する。中でも日本人に最も多いタイプである 孤発性 CJD-MM1 (sCJD-MM1) プリオンの増幅は非常に困難であり、依然として増幅率は実用化レベルに達していない。一方、変異型 CJD (vCJD) プリオンについては、リコンビナント PrP^C を基質に用いる PMCA 法 (Cell-PMCA 法) により超高感度で検出が可能となった (1)。このように、CJD プリオンはタイプによって同じ条件では増え方に大きな違いがある。本研究では、いくつかのタイプの CJD プリオンに対して Cell-PMCA 法により高感度検出を試みた。

B. 研究方法

1. 感染材料にはハムスタースクレイピー263K 株感染脳ホモジネートを用い、最終濃度 1% (w/v) で種々異なる処理によってプリオンを不活化した。不活化処理後、Proteinase K (PK) 処理 (50 µg/ml, 37 °C, 30 min) により、残存する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) 量をウェスタンブロット法により確認し、PrP^{Sc} が検出されなかったサンプルを 10% (w/v) ハムスター正常脳で 100 倍希釈し PMCA に供した。48 サイクルの反応後、正常脳ホモジネートで 10 倍希釈し PrP^{Sc} の増幅を繰り返した (マルチラウンド PMCA)。PMCA 反応終了後、Proteinase K 処理 (50 µg/ml, 37 °C, 60 min) を行い、ウェスタンブロット法により残存 PrP^{Sc} 量を定量し、不活化効率を比較した。

2. ヒトプリオンの増幅に用いる基質として、293F 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞由来) にヒト PrP^C (129M または V) を一過性に発現させた細胞破砕液を基質として用い、各タイプの CJD プリオン (10% (w/v) 脳ホモジネート ; sCJD, vCJD, dCJD) から PMCA 法によって PrP^{Sc} を増幅させ、proteinase K 処理の後、ウェスタンブロット法により PrPres を検出した。PMCA 反応は 48 サイクルを 1 ラウンドとし、マルチラウンド PMCA では反応終了後に新たな 293F 細胞破砕液で 3 倍に希釈し PrP^{Sc} の増幅を繰り返した。

(倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた研究に関しては、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い

研究を行った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

1. PMCA 法によるプリオン不活化効果の評価

PMCA 法を用いて半定量的に評価する方法について検討した(図 1)(2)。動物実験では非常に時間と費用のかかる不活化効果の評価であるが、PMCA 法により迅速に(判定まで二週間以内)評価することができた。高水準、中水準、低水準、その他種々異なる消毒法の不活化効果について網羅的に比較したところ、①加熱なしの方法ではプリオンを不活化できない、③121°C のオートクレーブを併用すれば、フタラール(商品名; ディスオーパ®、ジョンソン&ジョンソン)が比較的簡便にプリオンを不活化できることが分かった(表 1)。

2. Cell-PMCA 法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増幅

Cell-PMCA 法によるヒトプリオンの増幅効率は、CJD のタイプによって大きく異なることが分かった。現時点では大きく分けて増幅効率の低いグループ(MM1, MM2, 家族性 CJD)と高いグループ(MV2, VV2, 医原性 CJD プラークタイプ(p-dCJD; MMi), vCJD)に分かれる結果を得た。また、CJD のタイプによって基質特異性があり、増幅効率の低いグループは 129 番目のコドンが M であるか V であるかにかかわらず増幅しないが、高いグループのなかで MV2, VV2, dCJD-PL は 129 番目が V のときのみ、一方 vCJD は 129 番目が M のときのみ高効率に増幅することが分かった。vCJD については、219 番目や 232 番目の変異導入により増幅効率が向上し、さらなる高感度検出が可能となる可能性が示唆された。

D. 考察

1. PMCA 法によるプリオン不活化効果の評価

PMCA 法により算出された不活化効果を、動物実験により算出された文献値と比較したところ、数値上に大きな離れはなく、PMCA 法による不活化効果の算出、比較は一次スクリーニングに十分利用できると考えられた。一方で

プリオン不活化法として活用するためには、最終的に動物実験での確認が必要となろう。

2. Cell-PMCA 法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増幅

増幅効率の高いグループに関しては、現時点で MV2, VV2, p-dCJD では 10^{-8} - 10^{-9} 希釈、vCJD については 10^{-10} 希釈した脳ホモジネートからのプリオン検出が可能となっている(図 2)。MV2 では患者の脳脊髄液からの検出も可能となる感度であることが示唆されており、今後の PMCA 条件の見直しや、基質遺伝子型の改変などにより、検出感度はさらに向上する可能性があると考えられた。また、基質特異性を利用した生前診断法の開発などにも応用できる可能性が示された(図 3)。

E. 結論

1. PMCA 法によるプリオン不活化効果の評価

PMCA 法により、種々異なる消毒法のプリオン不活化効果を算出した。その結果、加熱なしでの不活化は不可能なもの、フタラールと通常のオートクレーブ処理の組み合わせにより、従来よりも比較的簡便かつ確実にプリオンを不活化できる方法を検索することができた。

2. Cell-PMCA 法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増幅

MV2, VV2, p-dCJD は基質遺伝子型が 129V の時に高効率な増幅が可能であり、高感度検出、生前診断法への応用が現実的な段階となった。vCJD については超迅速かつ高感度検出系として、材料スクリーニングなどへの実用化に対して十分な感度を有していると考えられた。

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

Immunol 55:502-509, 2011.

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2) Takeuchi A, Komiya M, Kitamoto T, Morita M. Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve. *Microbiol Immunol* 55:502-509, 2011.

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 129 genotypes. *J Biol Chem* 288:21659-21666, 2013.

2. 学会発表

1) Takeuchi A., Kobayashi A., Shirou M., Kitamoto T. Accurate assessment for diagnosing vCJD patients with codon129Val/Val. Asian Pacific prion Symposium 2011, Karuizawa, July 7-9, 2011.

G. 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

1. PMCA 法によるプリオン不活化効果の評価

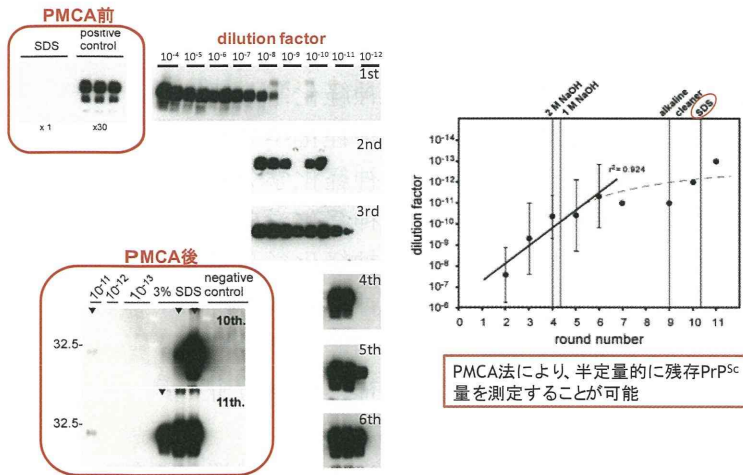


図 1 PMCA 法を用いたhamsterプリオンの不活化効果の算出

表 1 不活化効果一覧

	室温 不活化効果			加熱 不活化効果	
	10min	30min	60min	70°C, 30 min	A.C.121°C, 15 min
滅菌水	0	0	-	-	2.35
過酢酸	2.77 (±0)	-	-	-	1.33 (±0.35)
グルタール	1.76 (±0.58)	3.77 (±0.81)	-	-	2.63 (±0.35)
フタルール	-	2.36 (±0.81)	1.76 (±0.58)	1.48 (±0)	>6.50
クレゾール	0	0.19 (±0.06)	-	3.62, 4.33, >5.67	>6.50
塩化ベンザルコニウム	0	0.29 (±0.02)	-	-	3.93 (±2.31)
2000 ppm 次亜塩素酸	-	-	-	-	6.23 (±0)
液状フェノール	0	0.01 (±0.03)	-	-	3.50 (±0)
①アルカリ洗剤	-	>6.04	4.37 (±0)	-	6.57, >6.57, >6.57
②アルカリ洗剤 (0.125M NaOH)	-	4.22 (±0.81)	-	>7.30	-
③中性洗剤	-	0	0	-	5.38 (±0.47)
④中性洗剤(酵素配合)	-	0.13 (±0.21)	0	-	4.37 (±0)
0.1M NaOH	-	4.27 (±1.08)	-	4.33, >5.67, >5.67	8.09, >8.09, >8.09
0.2M NaOH	-	3.64 (±0)	-	-	5.67, >5.67, >5.67
0.5M NaOH	-	>7.39	-	-	2.19, >5.67, >5.67
0.8M NaOH	-	>7.39	-	-	>5.67

2. Cell-PMCA 法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増

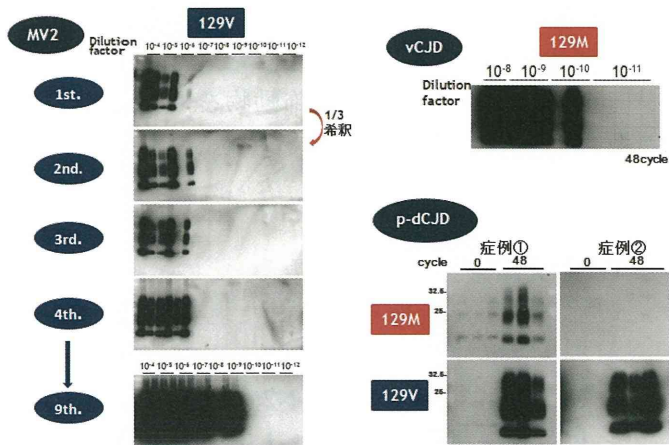


図 2 Cell-PMCA 法を用いた MV2 プリオン, vCJD, p-dCJD プリオンの *in vitro* 増幅

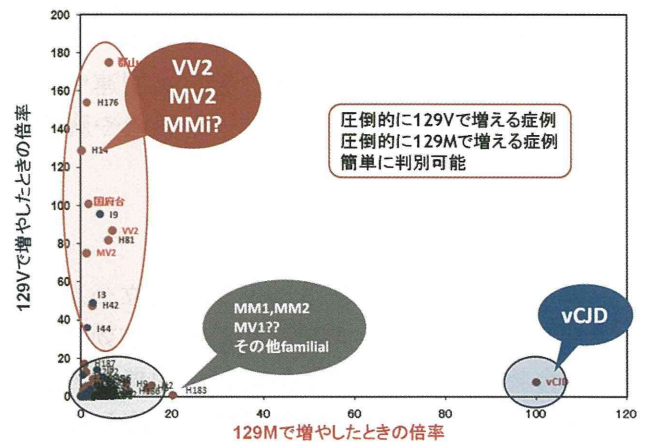


図 3 各 CJD タイプの Cell-PMCA 法における増幅特性の違い

プリオン病の治療予防に関する基礎研究

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

研究要旨 抗プリオン活性や治療予防効果をもつ化合物・生物因子について、作用機序の解明研究や実用化可能性の検討研究を実施した。抗プリオン活性を発揮する新たな化合物であるメラニン^①は、プリオン蛋白代謝やコレステロール代謝に影響せず、プリオン株に依存せずに抗プリオン活性を発揮した。一方、プリオン感染マウスにおいて感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインであるGM-CSFは、Tg7-263K疾患モデル動物では有効であったが、Tga20-22L疾患モデル動物では無効か、あるいは逆に生命予後を短縮する傾向が見られ、効果は疾患モデルに依存することが明らかとなった。また、発病予防に優れた糖誘導体は、その効果は動物の系統により明瞭な違いが見られ、低感受性マウスであるTga20ではTリンパ球の成熟分化に関する因子に異常があることから、Tリンパ球の機能が糖誘導体効果の発現に関連する可能性が考えられた。各種免疫修飾動物を用いた検討を行ったところ、マクロファージ機能や胸腺細胞が効果を左右する要因となっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、抗プリオン活性や治療予防効果をもつ化合物・生物因子について、作用機序の解明研究や実用化可能性の検討研究を実施した。

B. 研究方法

プリオン持続感染細胞やプリオン感染早発系マウスにおける各種の評価・解析は、すでに報告している方法（参考文献1、2）に基づき実施した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

抗プリオン活性を発見した色素性化合物であるメラニン^①は、いずれのプリオン持続感染細胞（RMLプリオン感染N2a細胞、22Lプリオン感染N2a細胞、Fukuoka-1プリオン感染N2a細胞）においても、濃度依存的に抗プリオン活性を発揮しプリオンの形成を抑制した。作用機序としては、①由来の異なる2種類のメラニン（一つは市販のチロシン・メラニン、もう一つはL-ドーパから自家合成したL-ドーパ・メラニン）において、同様に抗プリオン活性が観察された。②正常型プリオン蛋白については、細胞全体での発現量や細胞膜上での発現量や局在への影響はなかった。③細胞の脂質ラフトや脂質ラフト微小膜分画中の正常型プリオン蛋白の局在に影響はなかった。また、④メラニンを構成する基本骨格の化合物と類似構造を有する化合物には、抗プリオン活性

は観察されなかった。さらに、⑤細胞のコレステロール量に影響しなかった。

一方、プリオンを脳内感染させた早発系マウスを用いた研究で、感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインとして発見したGM-CSFに関して、実用化の可能性について検討した。早発系Tg7マウスに263Kプリオンを脳内感染させ、7.5週目よりマウス組換え型サイトカインを投与したものでは、効果の程度は低いものの、対照に比して有意な生命予後改善効果が見られたので、発症時期の特定が容易である疾患モデルで発症後の効果を調べた。具体的には、早発系Tga20マウスに22Lプリオンを脳内感染させると、10週目頃より頭部後屈や頭振などの異常行動が出現する。そこで、このマウスに10週目よりTg7マウスで投与した量と同量の週5日間、一回/日に500 ngを皮下に投与を行ったが、GM-CSF投与群では対照群より生命予後が短縮する傾向が出現した。そこで、投与量を週3日間に減量したところ、対照群との差はなくなったが、Tg7で観察されたような生命予後改善効果は見られなかった。さらに、22Lプリオン脳内感染Tga20マウスで投与時期を早め、感染後8.5週目より週3日間の投与を実施したが、生命予後改善とは逆に、生命予後を短縮させる結果となった。

一方、発病抑制に優れた糖誘導体については、感染ルート(脳内感染、腹腔内感染)や投与ルート(脳室内投与、皮下投与、腹腔内投与)に関係なくマウスの系統による違いが観察された。代表的には、早発系マウスではTg7マウスで長期にわたる効果が発現するのに対して、Tga20マウスでは効果の発現は極めて乏しかった。プリオン株による効果の違いは、マウス系統による効果の違いほどは、明らかではなかった。極めて低感受性であるTga20マウスの遺伝子異常を調べたところ、トランスジーンがpre-T cell receptor alpha遺伝子の第一イントロンに挿入されているため、同遺伝子の発現が胸腺で検出されないことが判明した。文献的に検討したところ、そのためTga20マウスでは $\alpha\beta$ TCR(T cell receptor)陽性T細胞が少なく、逆に $\gamma\delta$ TCR陽性T細胞が増加している免疫異常があることが報告されていた(参考文献3)。そこで、Tga20マウスで見られる何らかの免疫異常が糖誘導体の低感受性に関与

していると考え検討を行ったところ、マクロファージ機能を修飾するチオグリコレート投与やシリカ投与の処置では糖誘導体の効果に影響が見られた。また、新生児期に胸腺摘出を行った場合にも糖誘導体の効果に顕著な影響が見られた。

D. 考察

優れた抗プリオン活性を発揮したメラニン は、過去に報告のある抗プリオン活性を持つ化合物群と化学構造上ならびに物性としての共通点が乏しい。アミロイド親和性化合物とは一部に類似の共通構造があるものの、その部分だけの化学構造だけでは活性がなく、またアミロイド親和性化合物は特定のプリオン持続感染細胞でのみ有効である点などはメラニンとは異なり、メラニンがアミロイド親和性化合物と同様な作用機序で効いているとは考え難い。また、メラニンはその基質の由来(チロシン、L-ドーパ)に関わらず、抗プリオン活性を有しており、正常型プリオン蛋白代謝・脂質ラフト・コレステロール代謝への影響は観察されなかったことより、メラニンの作用機序解明は新たなプリオン産生・分解に関わる分子メカニズムの解明と創薬標的の発見につながる可能性がある。メラニンの活性を持つ化学構造の特定、作用機序の特定や生理学的意義について、今後さらに解明を進める必要がある。

また、Tg7-263K疾患モデルにおいて感染後期の末梢投与でも有効であったGM-CSFは、発症時期が観察しやすいTga20-22L疾患モデルでは無効かあるいは逆に生命予後を短縮させる結果となった。このことは、プリオン病のタイプによっては、GM-CSFの効果を期待できない、もしくは逆に症状を増悪させる可能性があることを示唆している。GM-CSFは海外では既製薬として臨床で使われていることより、早期に患者への実用化が可能であるが、プリオン病患者への応用には慎重であるべきことが示された。

一方、糖誘導体のプリオン病発病抑制効果については、効果にマウス系統差があり免疫系因子が効果の差異に関与していることを明らかにした。具体的には、マクロファージ機能が影響した。また、胸腺細胞の除去は、糖誘導体の効果を顕著に

増強したため、糖誘導体の作用機序に胸腺の機能が関与している。糖誘導体は日常的に摂取している可能性が高く、その作用機序解明は、プリオン病に対する疾患感受性機構の解明につながる可能性があり、引き続き解明研究を続ける必要がある。

E. 結論

抗プリオン活性を発揮する新たな色素性化合物であるメラニンについて、その作用機序について解明研究を進めた。また、Tg7-263K 疾患モデルにおいて感染後期の末梢投与で有効であったサイトカイン GM-CSF について、発症時期が観察しやすい他の疾患モデルでの検討を進め、実用化の可能性を評価した。さらに、優れた発病抑制効果を持つ糖誘導体について、その効果の発現機構の解明を進め、疾患感受性との関連を考察した。

[参考文献]

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 405:285-290, 2011.
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81:12889-12898, 2007.
- 3) Zabel M, Greenwood C, Thackray AM, Pulford B, Rens W, Bujdoso R. Perturbation of T-cell development by insertional mutation of a PrP transgene. *Immunology* 127:226-236, 2009.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and selectivity of the marine toxin neodysiherbaine A and its synthetic analogues to GluK1 and GluK2 kainate receptors. *J Mol Biol* 413:667-683, 2011.
- 2) Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML.

Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem* 46:2917-2929, 2011.

- 3) Teruya K, Doh-ura K. Amyloid-binding compounds and their anti-prion potency. *Curr Top Med Chem* 13:2522-2532, 2013.
- 4) 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.
- 5) Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K. Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *J Virol*, in press.
- 6) 逆瀬川裕二, 堂浦克美. 認知症学 (下): 弧発性プリオン病 Creutzfeldt-Jakob 病と治療薬開発. *日本臨床* 69:411-414, 2011.
- 7) 逆瀬川裕二, 木村朋寛, 堂浦克美. プリオン病の疫学から治療まで プリオン病の分子標的治療薬の開発. *Neuroinfection* 16:79-86, 2011.
- 8) 堂浦克美. 神経ウイルス感染症の最前線 プリオン病研究の最前線. *Neuroinfection* 17:136-141, 2012.
- 9) 倉橋洋史, 堂浦克美. プリオン病の診断と治療 プリオン病治療の現状と展望. *Clini Neurosci* 31:1093-1095, 2013.

2. 学会発表

- 1) Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. Acidic CC chemokines are upregulated in RML-prion-infected neuroblastoma N2a cells. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 2) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T, Doh-ura K, Ando T, Ohmoto A. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 3) Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion