

図 3. 細胞活性の経時的変化

WST 試験による細胞活性の測定。各時点ごとに、非感染 (Mock) 細胞の 450 nm における吸光度の平均値を 1.0 としたときの、感染細胞の吸光度の相対値を算出した。その平均値と標準偏差をグラフに示した。

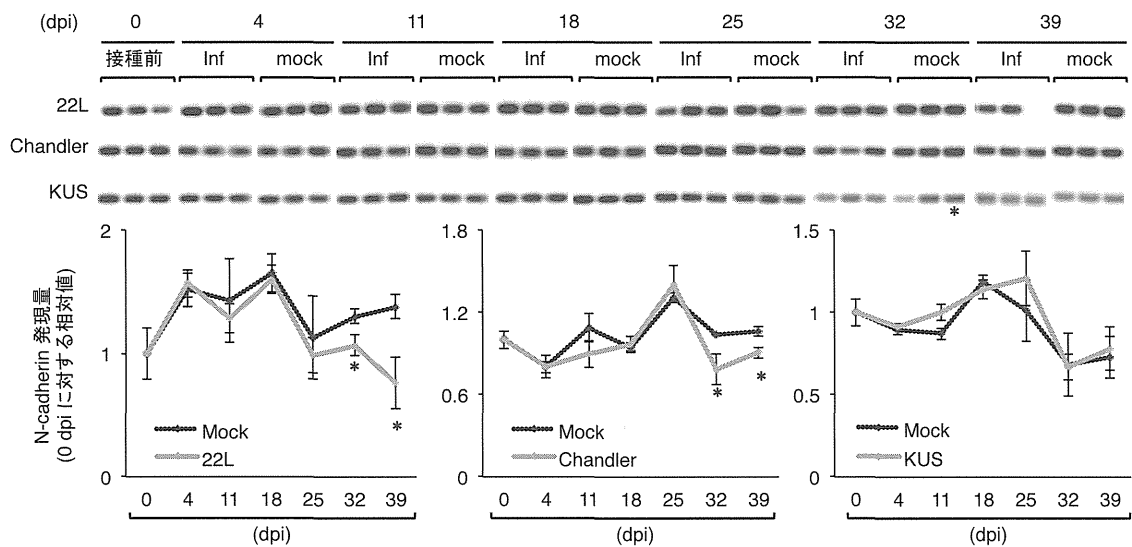


図 4. プリオン感染による N-cadherin 発現量の変化

WB による定量。非感染 (Mock) 細胞とプリオン感染細胞を用いて WB により N-cadherin の発現量を定量した。0 dpi (接種前) のシグナルの平均値を 1 としたときの相対値を、各時点ごとに算出した。この相対値の平均値と標準偏差をグラフに示した。

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 新 竜一郎 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

本研究では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（RT-QUIC 法：real-time quaking-induced conversion）により典型 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。今回の研究では C-BSE/L-BSE プリオンを高感度で RT-QUIC 法により検出できることを明らかにした。さらにハムスター配列 rPrP（rHaPrP）は L-BSE にはマウス配列 rPrP（rMoPrP）と遜色ないレベルで反応するのに対して C-BSE に対して全く反応しなかったという今回の結果から RT-QUIC 法を応用した C-BSE と L-BSE の鑑別が可能となった。

A. 研究目的

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（RT-QUIC 法：real-time quaking-induced conversion）を用いて、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 RT-QUIC 法と end-point dilution による異常型 PrP の定量法（シード量の測定）、RT-QUIC 法の応用による C-BSE と L-BSE 鑑別検査法を確立することも目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP（rPrP）の精製

ウシ、マウス、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 は、N 末側を中心とした領域に銅イオンなどの金属イオンに結合するため、ヒスチジンタグを導入し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℃ で保存する。

2) C-BSE、L-BSE に対する RT-QUIC 法の最適化

RT-QUIC 法の最適化を図るため、リコンビナント PrP（rPrP）の種類や反応溶液の条件を変え、最も感度・特異度の高くなる条件を見出すまで検討を行う。最適条件検討の際には、反応のシードとして C-BSE あるいは L-BSE 感染牛脳乳剤を用い、陰性コントロールとしてシードなし、あるいは非感染牛脳乳剤を添加したものをを用いる。また RT-QUIC 法と end-point dilution の組合せによる C-BSE、L-BSE 脳乳剤中のシード活性の半定量を行う。

3) RT-QUIC 法を応用した C-BSE と L-BSE 鑑別検査法の開発

マウス配列 rPrP（rMoPrP）とハムスター配列 rPrP（rHaPrP）に対する C-BSE と L-BSE の RT-QUIC 法における反応の顕著な違いを利用して両者の鑑別法を確立する。

（倫理面への配慮）

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) rMoPrP、rHaPrP を基質とした RT-QUIC 法
rMoPrP、rHaPrP を反応基質として用い、C-BSE、L-BSE それにハムスタープリオン 263K、マウスプリオン mBSE 脳乳剤をそれぞれシードとして RT-QUIC 法を行なった。さらにそれらの希釈系列に対する反応からシード活性の指標である SD_{50} (半数のウェルが陽性となる希釈値を Spearman-Kärber 法による計算により求める) を決定した (図 1)。その結果、rMoPrP はそれらすべてのプリオンに対して高い $\log SD_{50}/\text{mg brain}$ 値を示したのに対して、rHaPrP は L-BSE、263K、mBSE に対しては rMoPrP とほぼ同等の値であったのに対して C-BSE には全く反応を示さなかった。

2) C-BSE、L-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代反応

C-BSE、L-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代を継続 (最初の反応を First round とし、その反応液の希釈液の一部を次の反応 (second round) のシードとして RT-QUIC 法を実施) したところ、second round においても rHaPrP は C-BSE 由来の rMoPrP フィブリル ($2^{\text{nd}}\text{-rMoPrP-fib}^{\text{C-BSE}}$ と表す) に対して反応を示さなかった (図 2A)。それに対して L-BSE 由来の rMoPrP フィブリル ($2^{\text{nd}}\text{-rMoPrP-fib}^{\text{L-BSE}}$) や rHaPrP フィブリル ($2^{\text{nd}}\text{-rHaPrP-fib}^{\text{L-BSE}}$) では rMoPrP、rHaPrP の両者に高い反応を示した。その後も rMoPrP を基質として RT-QUIC 法で継代反応を続けると、fourth round で 0.5%シード量で 1/4、fifth round では 0.5%シード量で 4/4、0.05%でも 3/4 の rHaPrP を添加したウェルが反応を示した (図 2B)。いったん陽性となった反応液をシードとした場合は rMoPrP、rHaPrP の両者に対して反応性を示した。

D. 考察

本研究により RT-QUIC 法を C-BSE、L-BSE プリオンの高感度な検出アッセイとして確立できたと考えている。図 2A で示したように second round まで含

めた rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用すれば C-BSE と L-BSE の鑑別が RT-QUIC 法によって可能である。すなわち、仮に L-BSE が first round においてたまたま rMoPrP にのみ反応したとしても second round を行うことにより、L-BSE を C-BSE と間違えて判定することを除外できる。

また興味深いことに fourth round 以降は rMoPrP、rHaPrP の両者に反応するフィブリルが生成された。RT-QUIC 法では非特異的な rPrP フィブリルが生成しやすいことを我々は観察しており (非公開データ) 今回も round 数を重ねることにより非特異的な rPrP フィブリルが多数派となり、rMoPrP と rHaPrP の両方に反応するようになったのではないかと考えている。一方、もう一つ別の非定型 BSE である H-BSE が rMoPrP と rHaPrP に対して RT-QUIC 法でどのような反応を示すか興味を持たれる。

E. 結論

RT-QUIC 法は定型 BSE である C-BSE、非定型 BSE である L-BSE の高感度検出アッセイとなりうることが示された。また rHaPrP は L-BSE には rMoPrP と遜色ないレベルで反応するのにに対して C-BSE に対して全く反応しなかった。この性質は rMoPrP を基質とした RT-QUIC 法で継代することにより third round まで維持された。この性質を応用した RT-QUIC 法により C-BSE と L-BSE が鑑別可能である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. *PLoS One.*, 8(4): e60627, 2013
- 2) Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, 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(9): 1386-1394, 2013

2. 学会発表

- 1) Nakagaki T., Nishida N., Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autophagolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. Prion2013 (May, 26-29, 2013, Banff, Canada)
- 2) Ishibashi D., Honma T., Nakagaki T., Sano K., Honda K., Atarashi R., Nishida N. Type I IFN signal pathway of host innate immune response regulates prion infection. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)
- 3) Nakagaki T., Satoh K., Ishibashi D., Fuse T., Sano K., Kamatari YO., Kuwata K., Shigematsu K., Iwamaru Y., 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. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)
- 4) Takatsuki H., Atarashi R., Sano K., Satoh K., Nishida N. Quantitative analysis of seeding activity in human prion disease materials using end-point RT-QUIC. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)
- 5) Honma T., Ishibashi D., Atarashi R., Nishida N. Analysis of interferon regulatory factor-3 (IRF-3) promoter: Implications for prion infection. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)
- 6) Honma T., Ishibashi D., Nakagaki T., Atarashi R., Nishida N. p62/SQSTM1 promotes the sequestration and clearance of pathogenic prion protein. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)
- 7) Ubagai K., Atarashi R., Nishida N. The effect of metal ions on the structural stability of prion protein. APPS2013 (July, 21-22, 2013, Nagasaki, Japan)

Ⅷ. 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

以下に図表を入れて下さい。

図 1

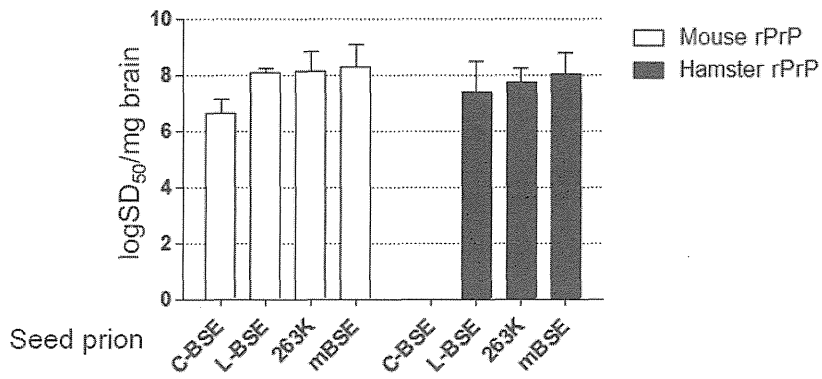


図 2 A

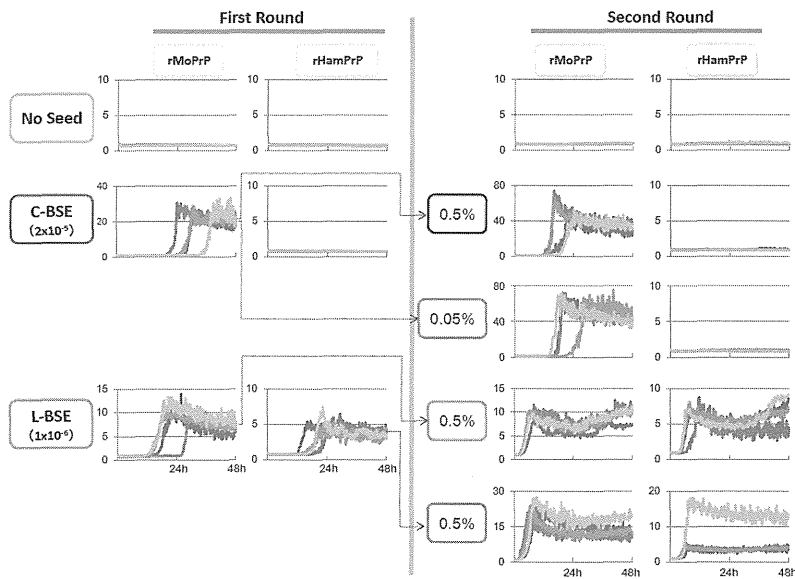
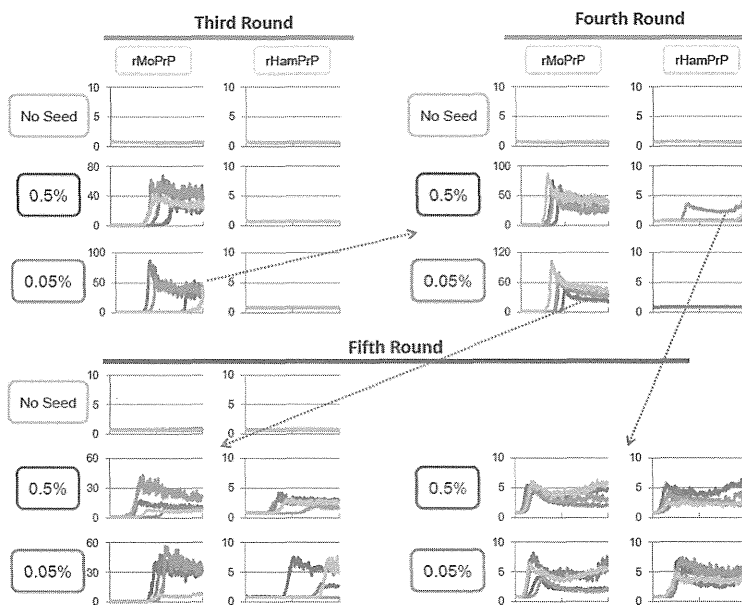


図 3 B



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た。BSE 由来の、vCJD 感染に関してヒト型ノックインマウスを用いて感受性を検討したところ、日本人で多く見られる多型である 219Lys PrP が最も感染しやすいことが明確となった。さらに、脳内投与という感染しやすいルートで実験すると、129Val PrP も感染することを明らかとした。今年度は、非典型 BSE のうち、L-BSE を感染させたサルモデルを用いてヒト型ノックインマウスへ腹腔内投与を行ったが、感染は成立しなかった。ヒトへの感染性を調べる検討として、将来的には脳内投与の感染実験が必要となろう。

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複製して、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

●ヒト vCJD (C-BSE 由来) プリオンを用いた感染実験

接種動物	感染成立
Ki-Hu129M/M	○
Ki-Hu129M/V	○
Ki-Hu129V/V	×
Ki-Hu219E/K	○
Ki-Hu219K/K	○

●サル L-BSE プリオンを用いた感染実験

接種動物	感染成立
Ki-Hu129M/M	×
Ki-Hu129V/V	×
Ki-Hu219K/K	×

頭蓋内投与による感染実験

●ヒト vCJD (C-BSE 由来) プリオンを用いた感染実験

接種動物	感染成立
Ki-Hu129M/M	○
Ki-Hu129M/V	○
Ki-Hu129V/V	○
Ki-Hu219K/K	○

頭蓋内投与では、全ての遺伝子型のヒト型ノックインマウスへの感染が成立した。これは、脳内投与実験の感受性の高さを示しており、腹腔内投与の限界を示すものである。

D. 考察

C-BSE由来のvCJDプリオンをヒト型ノックインマウスへ感染させることによって、数多くの結果が明らかになった。その1つは、219KがvCJDに感染しやすいということである。これは、残念ながら英国で219K/Eのヒトが2名もvCJDを発病したことで、ヒト型マウスを使用した感染実験の結果が重要な意味を持つことが示された。また、2つ目として、感受性は低いものの、129ValもvCJDプリオンに感染するということである。この結果も、最近の虫垂切除後の切片で、異常プリオン蛋白がFDCに証明された症例の中にも129Val/Val遺伝子型のヒトがいることから、今後Val/Valも発病する可能性があることが示唆された。本件急では、特にVal/ValのヒトがvCJDプリオンに感染した場合、確実なsCJDとの鑑別が可能な方法として、Ki-Bovマウスが有効であることを本年度論文として報告した(文献5)。

さらに、未だ腹腔内投与のみにであるが、L-BSEプリオン由来のサル・プリオンがヒト型マウスに対して感染力が低いことを今年度の結果から示唆されたが、これはまだ脳内投与の感染実験による検証が必要であろう。

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) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between Clinicopathological Features and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Japanese Patients with Genetic Prion Diseases. *PLoS One*. 2013;8(3):e60003
- 2) Xiao X, Yuan J, Haik S, Cali I, Zhan Y, Moudjou M, Li B, Laplanche JL, Laude H, Langeveld J, Gambetti P, Kitamoto T, Kong Q, Brandel JP, Cobb BA, Petersen RB, Zou WQ. Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease. *PLoS One*. 2013;8(3):e58786
- 3) 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*. 2013 Mar 1;432(1):86-91
- 4) 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 Jan 16;33(5):568-75
- 5) 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*. 2013 Jul 26;288(30):21659-66.
- 6) 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*. 2013 Nov 13;1(1):74.
- 7) Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP Structure (in press)
- 8) 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*. 2014 Jan;20(1):88-97.

9) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, Mori K, Ito M, Kitamoto T, Yoshida M. Panencephalopathic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with circumscribed spongy foci. Clin Neuropathol. 2013 Oct 16.

10) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. BMJ Open. 2013 Aug 23;3(8):e003400.

11) Taguchi Y, Mistica AM, Kitamoto T, Schätzl HM. Critical significance of the region between Helix 1 and 2 for efficient dominant-negative inhibition by conversion-incompetent prion protein. PLoS Pathog. 2013;9(6):e1003466.

12) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 Oct;84(10):1171-5.

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. Sortilin はプリオン蛋白の分解に関与する

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

正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) はリソソームで分解される。しかし、そのメカニズムは不明である。我々は、正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の分解における Cargo receptor である Sortilin の役割りを解析した。その結果、PrP^C 及び PrP^{Sc} とも Sortilin と結合し分解される可能性が考えられた。また、この分解には Sortilin のモノユビキチン化が関与する可能性も考えられた。

A. 研究目的

我々は、昨年度、VPS10P domain receptor family に属する Cargo receptor である Sortilin が正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と結合することを報告した。今年度は、PrP の分解における Sortilin の役割りについて解析した。

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)及び非感染細胞(N2aC24)を用いた。

2) ウェスタンブロッティング(WB)

細胞を溶解後、SDS-ポリアクリルアミドゲルにて総蛋白を泳動し、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体として、PrP、Sortilin、 β -actin に対する抗体を用いた。二次抗体には、西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)標識抗体を用いた。シグナルは ECL にて検出した。

3) 免疫沈降法

細胞を溶解後、Sortilin 及び PrP に対する抗体で反応させ、Protein G-sepharose ビーズにて沈降させ、WB に供した。

5) Sortilin コンストラクト

Sortilin cDNA は、Mouse brain QUICK-clone cDNA (Clontech)から Phusion high-Fidelity DNA

Polymerase を用い PCR により増幅後、pcDNA3.1(-) または pcDNA3.1(+)-hygro にクローニングした。Sortilin 非ユビキチン化変異体は、845 番目のリジンを phosion Phusion high-Fidelity DNA Polymerase を用いた部位特異的変異導入によりアルギニンに置換することにより作製し、pcDNA3.1(+)-hygro にクローニングした。

6) Sortilin siRNA

Sortilin siRNA は、siRNA1(Sort1MSS209261, Invitrogen) および siRNA2(Sort1 MSS209263, Insitrogen)を使用した。

7) トランスフェクション

cDNA は Lipofectamin 2000 (Invitrogen)によりまた、siRNA は Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen)により使用説明書に従い導入した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は、徳島大学の遺伝子組み換え安全委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1) Sortilin は PrP^C の分解に関与する

昨年度、PrP^C が Sortilin と結合することを見出した。今年度は、この結合の意義を検討するために、Sortilin を siRNA でノックダウンし PrP^C の量を WB で解析した。その結果、Sortilin をノックダウンすると PrP^C の量が増加した (図 1)。次に、

細胞内領域を欠損するミュータント Sortilin を発現させ、PrP^Cの量を解析した。すると、Sortilin をノックダウンした時と同様に、PrP^Cの量が増加した(図 2A)。Sortilin の細胞内領域のモノユビキチン化は Cargo 蛋白質をリソソームに運搬し分解するのに重要だと報告されている。そこで、モノユビキチンされないミュータント Sortilin(K845R)を発現させ、PrP^Cの量を解析した。その結果、Sortilin をノックダウンした時と同様に、PrP^Cの量が増加した(図 2B)。

2) Sortilin は PrP^{Sc} の分解にも関与する

PrP^{Sc}の分解にも Sortilin が関与するのか検討した。まず、PrP^{Sc}が Sortilin と結合するのか免疫沈降法で解析した。その結果、Sortilin で免疫沈降した複合体の中には、proteinase K (PK)抵抗性の PrP が検出できた(図 3)。この結果は、PrP^{Sc}が Sortilin と結合することを示した。次に、Sortilin の量と PrP^{Sc}の量との関係を解析した。Sortilin を siRNA でノックダウンすると、PrP^{Sc}の量が増加し(図 4)、Sortilin を過剰発現させると PrP^{Sc}の量が低下した(図 5)。以上の結果は、PrP^Cと同様に、PrP^{Sc}が Sortilin と結合し分解される可能性を示した。

D. 考察

Sortilin をノックダウンすると、PrP^C及び PrP^{Sc}の量が増加した。また、PrP^C及び PrP^{Sc}は Sortilin と結合した。以上の結果は、PrP^C及び PrP^{Sc}とも Sortilin と結合し分解される可能性を示した。また、この分解には Sortilin のモノユビキチン化に関与する可能性も示唆された。

E. 結論

今回我々は、PrP^C及び PrP^{Sc}とも Sortilin と結合し分解される可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

- 論文発表
- 4) Uchiyama K, Miyata H, Sakaguchi S. Disturbed vesicular trafficking of membrane proteins in prion disease. *Prion* Dec 11;7(6), 2013.
- 5) 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 (11) C-labeled antiprion GN8 derivative and evaluation of its brain uptake by positron emission tomography. *ChemMedChem* 8(7):1035-9, 2013.

- 6) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nature Commun* 4:1846 doi:10.1038/ncomms2873, 2013.
- 7) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. *PLoS ONE* 8(4):e60627, 2013.
- 8) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン病における神経変性のメカニズム. *Clinical Neuroscience* 31(9):1022-1024, 2013.
- 9) Uchiyama K, Sakaguchi S. Immunological Strategies for the Prevention and Treatment of Prion Diseases. In: Sakudo A and Onodera T. Edited Prions: Current Progress in Advanced Research. UK, Caister Academic Press, pp75-92, 2013.

2.学会発表

- 5) 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, 広仁会館(広島大学霞キャンパス), 6/22-23, 2013.
- 6) Sakaguchi S, Uchiyama K. Prions impair post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Asian Pacific Prion Symposium 2013, Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki, 7/21-22, 2013.*
- 7) 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, 神戸国際会議場(神戸), 11/10-12, 2013.
- 8) 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. 日本生化学会, パシフィコ横浜(横浜), 9/11-13, 2013.

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。

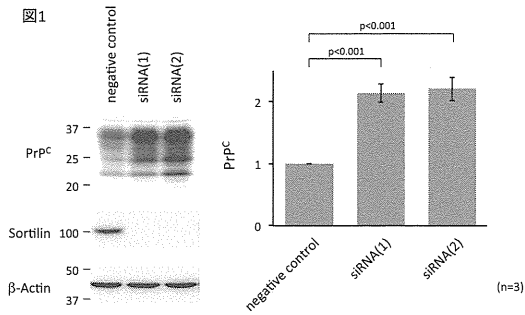


図 1 : Sortilin ノックダウンは PrP^C の量を増加する。プリオン非感染 N2aC24 細胞に Sortilin の異なる領域をターゲットにした siRNA を導入し、WB を行なった。Sortilin ノックダウンすることで、コントロール siRNA を導入した細胞と比べて、Sortilin siRNA を導入した細胞で、PrP^C の量が有意に増加した。

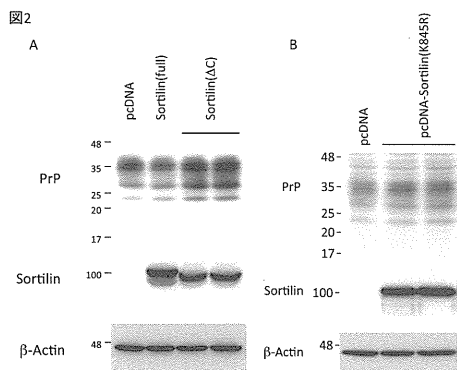


図 2 : Sortilin による PrP^C の分解には細胞内領域のモノユビキチン化が重要である。(A)細胞内領域を欠損するミュータント Sortilin を発現させ、PrP^C の量を解析した。ミュータント Sortilin は野生型 Sortilin に対し dominant-negative に作用し、PrP^C の量を増加した。(B)モノユビキチン化されないミュータント Sortilin(K845R)を発現させ、PrP^C の量を解析した。その結果、細胞内領域を欠損するミュータント Sortilin を発現させた時と同様に、PrP^C の量が増加した。

図3

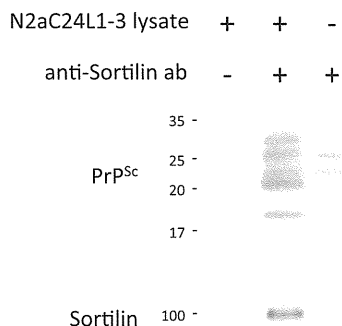


図 3 : Sortilin は PrP^{Sc} と結合する。プリオン感染 N2aC24L1-3 細胞を溶解し、抗 Sortilin 抗体で免疫沈降した複合体を PK 処理し、抗 PrP 抗体で WB を行なった。

図4

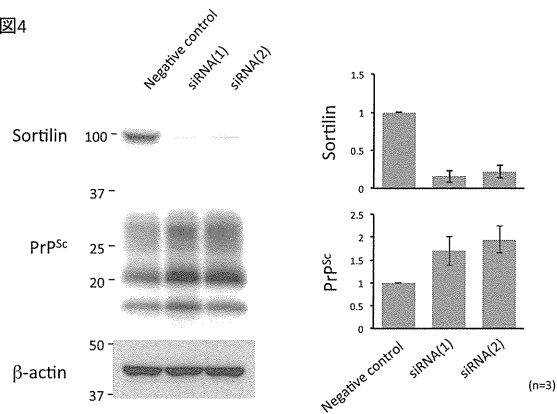


図 4 : Sortilin ノックダウンは PrP^{Sc} の量を増加する。プリオン感染 N2aC24L1-3 細胞に Sortilin の異なる領域をターゲットにした siRNA を導入し、WB を行なった。PrP^{Sc} は PK 処理後に WB を行ない検出した。

図5

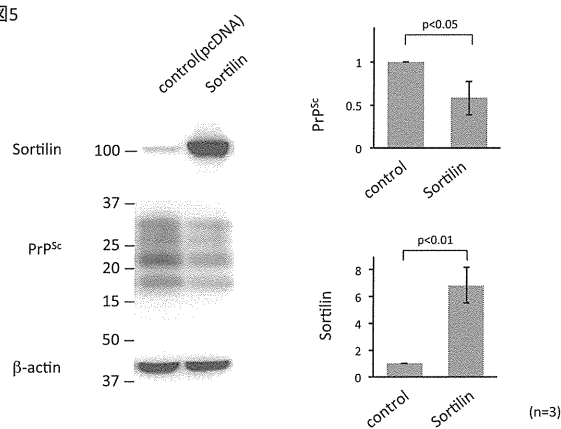


図 5 : Sortilin の過剰発現は PrP^{Sc} の量を減じる。プリオン感染 N2aC24L1-3 細胞に Sortilin を過剰発現し、WB を行なった。PrP^{Sc} は PK 処理後に WB を行ない検出した。

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 (千葉科学大学)

岡林佐知 (一般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の評価を目的として、カニクイザルへの感染実験を行った。ウシからサルへの種の壁を越えた C-BSE (定型 BSE JP/8 和歌山株) 脳内接種サル脳乳剤を用いた継代接種では、潜伏期間の短縮が観察された。L-BSE (非定型 BSE JP/24 佐世保株) では初代接種より、短い潜伏期間で発症が認められ、各プリオンにおける脳内継代接種及び L-BSE の経口接種実験を行った。L-BSE 由来プリオンの経口接種では接種後 2 年 5 か月を経過し、発症は認められていない。一方脳内接種においてはいずれの実験群においても、発症が認められた。C-BSE 3 代目継代接種を行った 2 頭で進行性の振戦、ミオクローヌス等の神経症状が認められたが、行動実験による高次脳機能は末期まで維持されていた。発症末期では麻痺が進行し、起立不能となったが、食欲、排尿、排便は維持していた。L-BSE 2 代目継代の脳内接種を実施した 2 頭は、発症までの潜伏期は初代接種より短縮したが、その後、神経症状の進行は緩徐であったが、行動実験により、認知能の低下が示唆された。C-BSE、L-BSE それぞれ異なった病態を示すプリオン感染モデル系として、今後発症機序の解明及び治療研究に非常に有用と考えられる。

A. 研究目的

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及び定型と非定型 BSE 感染による病態比較を行う目的に、カニクイザル 21 頭を用いて、定型及び非定型 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及び組織病理学的解析を行った。併せて、BSE プリオン接種後定期的に採取したサルの血液、脳脊髄液、尿、唾液及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°C、相対湿度 50-60%、12 時間照明 (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。飼料は固型飼料 (CMK-2; CLEA Japan, Inc.) 70g とリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

2) 実験群及び接種材料

実験群について下記に記載する。

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 和歌山株) 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 頭ずつ各々接種後 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 和歌山株) 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 x 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。2 頭は経過観察中。

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、輸血群 2 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。1 頭は経過観察中。

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)

脳内接種群 2 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

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/24 佐世保株) 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 x 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。経口投与群は経過観察中。

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)

脳内接種群 1 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。1 頭は発症が認められており、経過観察中。

3) 接種及び材料採取方法

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、頭皮膚切開、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

接種後、定期的に血液及び脳脊髄液 (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。

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

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った。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. 皮質脳波測定

脳波測定は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下で頭部を除毛し、電極用皿電極を用いて皮質脳波の測定を行った。誘導は左右それぞれ 4 極とし、測定は日本光電 EEG1000 を用いて実施した。

4. MRI 撮像及び画像解析

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 撮像室への移動した。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。

(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収容した。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、材料採取及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

C-BSE 3 代目継代接種を行った 2 頭については、再現性は非常に高く、いずれも、接種後 1 年 2 か月で発症し約 5 か月で振戦、ミオクローヌス等神経症状の進行をともない経過した。発症末期では麻痺が進行し、起立不能となったが、食欲、排尿、排便は維持していた。L-BSE 2 代目継代の脳内接種を実施した 2 頭は、発症までの潜伏期

は初代接種の 1.7 年から 1.2 年に短縮したが、その後、神経症状の進行は緩徐であった。表 1、図 1 に脳内接種を行った各実験群の発症経過を示す。L-BSE 牛脳乳剤を経口摂取した 2 頭については接種後、2.4 年を経過し未発症で経過している。

2) 高次脳機能解析

C-BSE 3 代目接種群、L-BSE 2 代目接種群について食物回収試験を実施した。食物回収試験により、隠れた 9 つの報酬を撮り終わるまでの短期記憶とともに、試験を行う手続きに対する記憶、試験に取り組む集中力等についても評価が可能と考えられた。C-BSE 3 代目接種群においては、発症後、運動機能障害の影響で、報酬のリンゴをうまく回収することができなくなるまで、試験系に対する手続き記憶、モチベーションを維持し、短期記憶についても解剖前までほぼ維持していた。一方 L-BSE 2 代目接種群においては、# 23 では神経症状の振戦がわずかに認められはじめた時期より、手続き記憶について明確な異常所見が認められるようになった。通常の手順で試験を開始した時に報酬であるリンゴが隠れていることについて認識ができず、すべての目隠しを開けた状態で試験に取り組んだ直後において、正式な手続きでの試験を開始することができた。また、その場合の集中力も約 60% 程度に低下していた。その後は試験課題を目の前にしても全く認識しない状況が現在まで、7 か月続いている。# 22 においては発症初期よりやや短期記憶の低下が認められたが、手続きに記憶について発症後 1 か月頃までは維持していた。その後は、徐々にモチベーションは低下し、発症後 3 か月目にはたまたま興味を示すものの試験には参加しなくなった。

3) 皮質脳波測定

C-BSE 3 代目継代接種サル、L-BSE 経口接種サル (未発症) 及び L-BSE 2 代目継代接種サルにおいて、接種後 2 年目の皮質脳波測定を行った。脳波は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下における睡眠脳波の測定を実施している。#20 (C-BSE 3 代目継代脳内接種サル) では低振幅徐波傾向が認められた。#22 (L-BSE 2 代目継代脳内接種サル) では、周期性放電様波形 periodic synchronous discharge(PSD)が観察された(図 3)。

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、全頭脳室拡張を伴う萎縮の所見が認められた。安楽死時の神経症状は C-BSE 接種サルの方が重度であるにもかかわらず、L-BSE 接種群の方が顕著な脳室拡張所見が観察され、脳委縮が進行している可能性が示唆された(図 4)。

5) 病理組織解析

空胞変性のレベルを評価するために、従来、各動物の灰白質、白質から無作為に抽出し撮影した組織像から空胞変性領域の面積率を計測していた(図 5)。しかし、抽出部位による差が個体差の誤差範囲を超えると考えられることから、切片全体を抽出し、高い客観性を持った抽出解析システムの構築について検討をおこなった。HE 染色スライドを Nanozoomer Digital Pathology (浜松ホトニクス) で取り込み、画像解析システム (DefiniensXD with Tissue Studio Library) を用いて空胞変性部位を抽出した。MRI 画像で脳室拡張が顕著な L-BSE を接種した # 1 4 で高い空胞率が認められた(表 2)。今回は髄質と皮質を分離することなく抽出 1 切片のみでの解析を試みたが、今後、脳各部位における客観的解析指標策定の検討行っていく

D. 考察

脳内接種サルについては、C-BSE、L-BSE とも非常に高い再現性をもって発症が認められたことから、CJD 等人プリオン病の治療研究モデルとして非常に有用と考えられる。治療研究において、

その治療効果を判定する指標が必須となるが、本研究で行った、経時的サンプリングによる、末梢サンプルからの PrP^{Sc} の検出系とともに、高次脳機能検査、脳波測定、MRI 画像診断、病理組織画像診断等を用いた評価系を確立することが可能となると思われる。

E. 結論

カニクイザルへの C-BSE 及び 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、脳波、MRI 画像解析及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及び治療研究に非常に有用な実験系である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表
なし

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

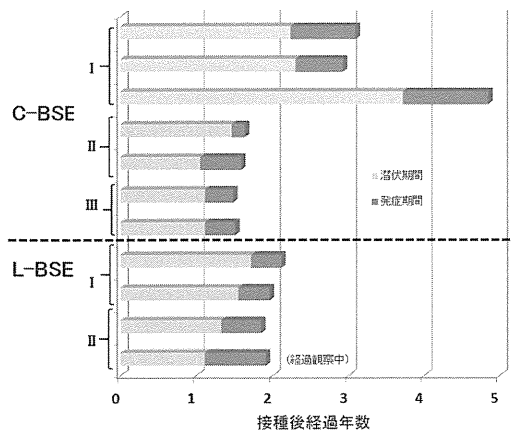


図1 脳内接種群発症経過

継代数		I			II		III	
BSE (BSE JP/8 和歌山)	実験番号	#007	#010	#011	#016	#017	#020	#021
	家系	フィリピン	フィリピン	マレーシア	マレーシア	混血	混血	インドネシア
	潜伏期間	2.2	2.3	3.7	1.5	1.1	1.1	1.1
	発症期間	0.8	0.6	1.1	0.2	0.5	0.4	0.4
	神経症状	振戦・ミオクローヌス・麻痺			振戦・ミオクローヌス・麻痺		振戦・ミオクローヌス・麻痺	
	行動異常	驚愕反応	驚愕反応	振痺感・多動	驚愕反応		軽度驚愕反応	
	認知機能	維持	維持	低下	NT	NT	維持	維持
非定型BSE (BSE JP/24 佐世保)	実験番号	X#014	X#015		M#022	M#023		
	家系	混血	混血		マレーシア	マレーシア		
	潜伏期間	1.7	1.6		1.3	1.1		
	発症期間	0.4	0.4		0.5	>0.8		
	神経症状	振戦・ミオクローヌス・麻痺			振戦・軽度麻痺			
	行動異常	軽度驚愕反応			反応性やや低下			
	認知機能	NT	NT		低下	低下		

表1 脳内接種群発症経過

FRT:食物回収試験
 右:試験パネル模式
 中段:試験開始を待っているサル
 下段:試験実施中
 ★トレーニング後はほとんどのサルで、試験に対して高い嗜好性を持って臨む

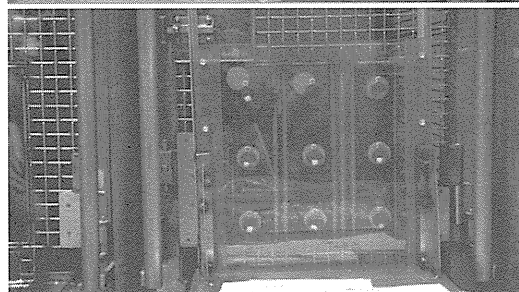
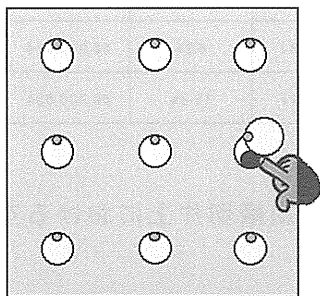
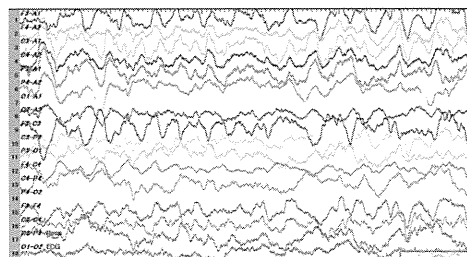
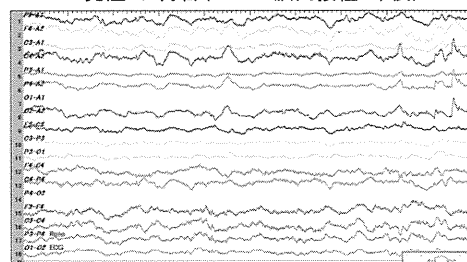


図2 食物回収試験



#20: 発症4カ月目 (C-BSE脳内接種2年後)



#22: 発症6カ月目 (L-BSE脳内接種2年後)

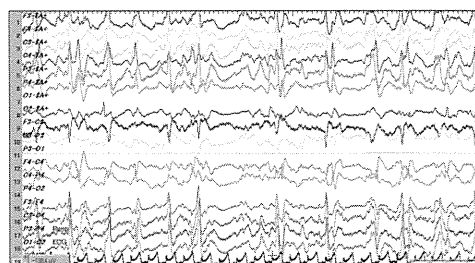


図3 麻酔下による皮質脳波
 #19: 未発症 (L-BSE 経口接種2年後)

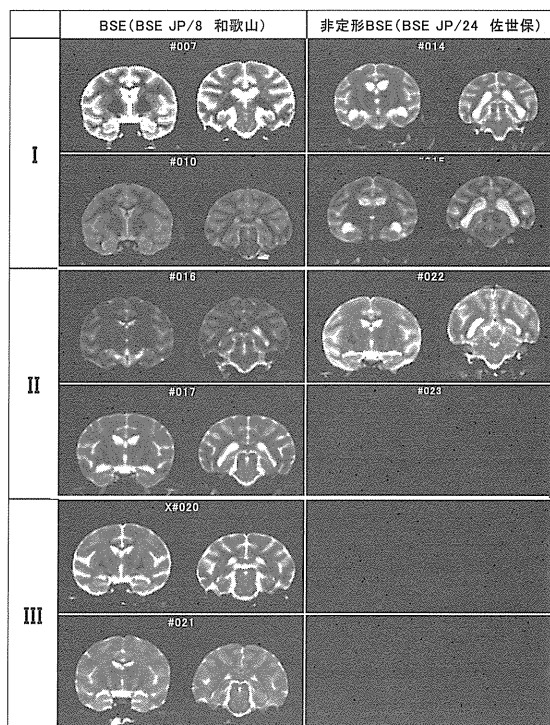


図4 脳内接種カニクイザル脳のMRI画像 (P2強調画像)

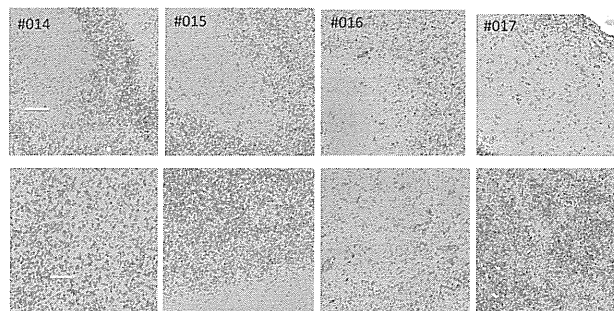


図5 空胞検出部位 (青色で抽出)

サンプル名	空胞率 (%)	組織の面積 (Px1)	空胞の面積 (Px1)	空胞数 (個)
L-I (14)	21.8%	56,899,268	12,394,588	274,440
L-I (15)	12.8%	54,736,792	7,019,104	194,654
C-II (16)	8.2%	56,942,814	4,641,054	128,049
C-II (17)	16.6%	60,700,654	10,062,620	189,693

表2 組織切片上における空胞変性率

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

研究要旨

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した。セクレチン受容体ノックアウトマウスの雌で有意な生存期間延長が観察され、プリオン病における性差の原因の一つと考えられた。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、Glycoside-9 が phosphodiesterase 4 D interacting protein の発現を増加させることでプリオン増殖を抑制していることを新たに明らかにした。

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、プリオン増殖抑制の時間的プロファイルを検討し、mRNA 発現パターンの解析を DNA マイクロアレイを用いて実施した。mRNA 発現パターンの違いは、定量的 RT-PCR で確認した。Glycoside-9 の効果をレスキューするため、遺伝子ノックダウン実験を行った。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。Glycoside-9 のプリオン感染マウスへの投与実験は、アルゼの浸透圧ポンプを利用

して脳内感染 6 週目より第 3 脳室に化合物を持続投与し、発症末期までマウスの状態を観察した。

(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、関連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

セクレチン・リガンドノックアウトマウスでは、脳内感染でも腹腔内感染でも、雌雄に関わらずホモ(-/-)、ヘテロ(+/-)、対照マウス(+/+)で生存期間に差は認められなかった。一方、受容体ノックアウトマウスでは、脳内感染でも腹腔内感染でも、雌においてホモ(-/-)でヘテロ(+/-)や対照マウス(+/+)に比して有意な生存期間の延長が認められた。

(2) Glycoside-9 の作用機序の解析

新たなツールとして発見した Glycoside-9 について、プリオン感染細胞で解析を進めたところ、プリオン増殖を抑えるのに 1 日以上を要することがわかった。また、細胞内の正常型プリオン蛋白量を減少させ、局在も変化し核周囲に集簇させる傾向が観察された。Glycoside-9 の作用には複雑なメカニズムが予想され、DNA マイクロアレイ解析をおこなったところ、昨年報告したように 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 処理細胞で減少する一方で、遺伝子発現が有意に増加する遺伝子が複数認められた。それらの中で、遺伝子情報が確かな 5 つの遺伝子について Glycoside-9 存在下で遺伝子ノックダウン実験を実施し、Glycoside-9 の効果をレスキュー出来るかどうかを検討した。その結果、唯一 phosphodiesterase 4 D interacting protein (Pde4dip) だけが、遺伝子ノックダウンにより Glycoside-9 の効果である細胞内正常型プリオン蛋白ならびに異常型プリオン蛋白の量的減少を回復した。昨年報告したインターフェロンによる Glycoside-9 効果のレスキュー効果と Pde4dip のレスキュー効果の間に関連性があるかどうか検討したが、双方に関連は見られなかった。なお、Glycoside-9 については、早発系マウスである Tg7-263K プリオン病モデルで、脳内感染 6 週目から脳室内に 300 µg/日の量を持続投与を行い、治療効果があるか検討したところ、効果の程度は極めて限られていたが有意な生存期間延長が観察された。

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、セクレチン受容体ノックアウトマウスの雌で有意な生存期間の延長が観察され、細胞で観察されたセクレチン受容体ノックダウンでのプリオン形成の抑制と矛盾しない結果となった。なお、プリオン持続感染細胞は雌由来であり、セクレチン受容体とプリオンとの関連が観察されるのは雌でのみ起こる性特異的な現象であり、プリオン病における性差の原因の一つと考えられる。セクレチン受容体は常染色体上に存在しているが、Y 染色体との関連性が高い自閉症の原因遺伝子の一つともされており、雄で受容体ノックアウトの影響が観察されなかったのは Y 染色体上の遺伝子によるリダンダントな影響かもしれない。

一方、新たなツールとして発見した Glycoside-9 の作用機序については、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）や正常型プリオン蛋白の制御に Pde4dip が関与していることが新たに明らかとなった。昨年、インターフェロンが 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ることを報告したが、インターフェロンの作用と Pde4dip の作用は関連が無く、それぞれが独立に Glycoside-9 作用に関わっているものと考えられた。インターフェロンの効果は Jak-Stat シグナル伝達経路を介しておらず、インターフェロンのシグナル伝達が緻密で緻細に制御されていることより、さらなる解析は困難であった。一方、Pde4dip は microtubule nucleation activator としての働きが報告されており、Pde4dip 遺伝子のノックダウン実験で正常型プリオン蛋白ならびに異常型プリオン蛋白の局在に変化が見られたことから、Pde4dip はこれらの蛋白を含有する小胞や構造物のトラフィッキングや他の細胞オルガネラとのフュージョンを制御している可能性が考えられる。より詳細な形態的解析により、細胞内での Pde4dip による異常型プリオン蛋白(プリオン)の制御メカニズムの詳細がわかる可能性があり、それは今後の課題である。

E. 結論

ピボレベルや細胞レベルでプリオン(異常型プリオン蛋白)増殖の制御に働く因子群として、セクレチン受容体と phosphodiesterase 4 D interacting protein 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)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)
- 2)Teruya K, Doh-ura K. Amyloid-Binding Compounds and their Anti-Prion Potency. *Curr Top Med Chem.* 13(19)2522-2532, 2013
- 3)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. *Clinical*