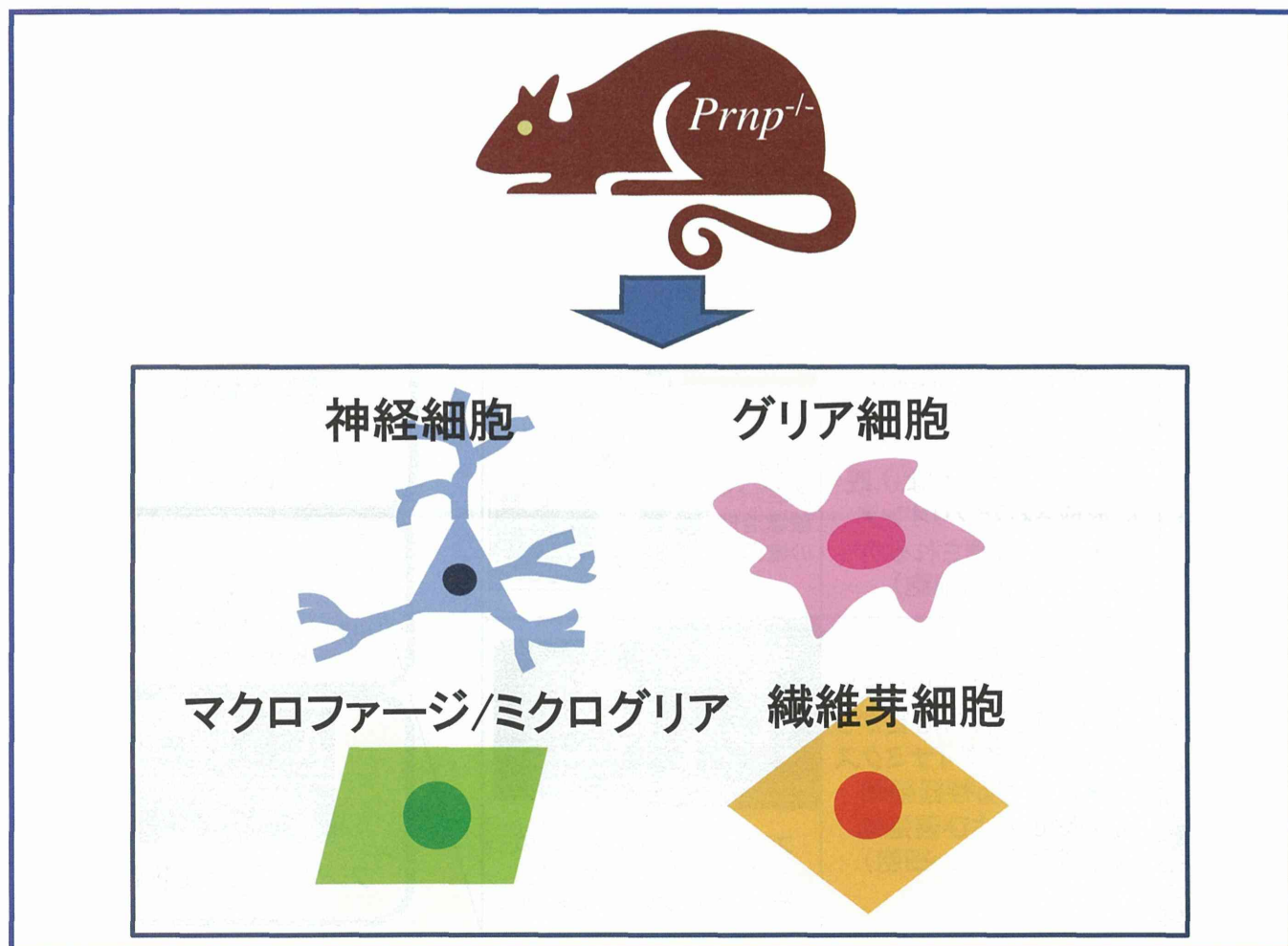


プリオン病治療戦略構築に向けてのプリオン蛋白質の性状解析

研究分担者: 琉球大学 作道章一



解 説

1. プリオン蛋白質遺伝子欠損マウスより作製された種々のプリオン蛋白質遺伝子欠損細胞株(神経細胞、グリア細胞、マクロファージ/ミクログリア、繊維芽細胞)について、プリオン蛋白質再発現細胞との性状比較から、プリオン蛋白質の機能を解析した。
2. プリオン蛋白質遺伝子に対するsiRNA等を用い、効率的にプリオン蛋白質を減少させることのできる条件を調べた。

新規プリオン結合因子Sortilinはプリオン分解を制御する

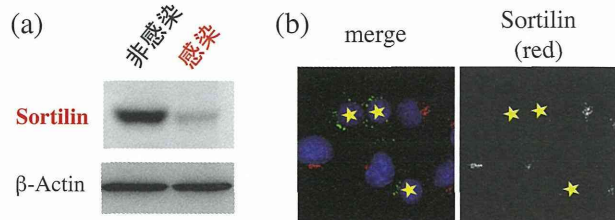
研究分担者: 徳島大学疾患酵素学研究センター 坂口末廣

1 Sortilinとは

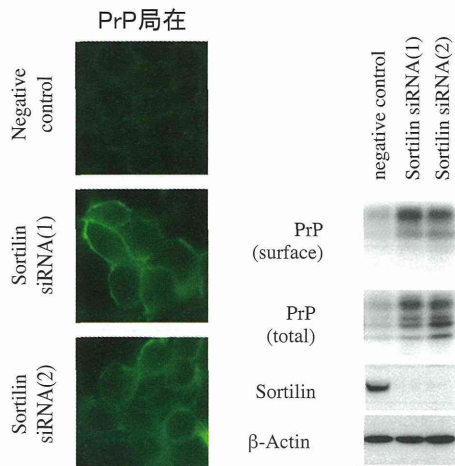


VPS10PDメインを介してPrPと結合する
新規プリオン結合因子である

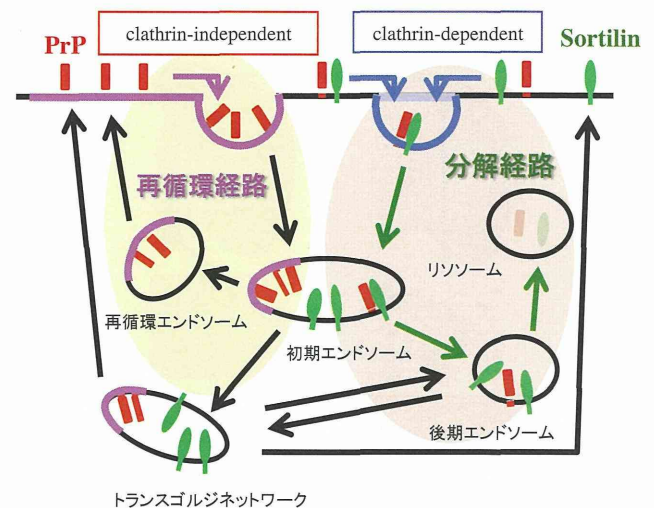
2 プリオン感染によりSortilinは減少する



3 Sortilinの機能抑制は細胞表面からのPrPの取り込みを抑制しPrP蓄積を引き起こす



4 Sortilinはクラスリン依存性のPrPの取り込みと分解経路への誘導を制御している



解説

- Sortilinは、小胞輸送における積荷タンパク質受容体としての機能を持ちこれまでPrPとの結合やPrP輸送に関与することが報告されていない新規PrP結合因子である。
- プリオン感染によりSortilin発現量が低下することを見出した。(a)プリオン感染細胞と非感染細胞でのSortilin発現量を比較したウエスタンブロットで確認したところ、プリオン感染細胞でのSortilin発現量は低下していた。(b)間接蛍光抗体法でも、異常プリオン(緑)が検出される細胞(黄色星印)ではSortilin(赤)が検出されない。
- SortilinをsiRNAでノックダウンするとPrPは細胞表面に蓄積し、Sortilinは細胞表面からのPrP取り込みに作用していることが明らかになった。
- Sortilinは、細胞表面からのPrPの取り込みと、後期エンドソームからリソソームへ向かう分解経路にPrPを誘導することが明らかになった。また、Sortilinの機能抑制は、分解経路が抑制されるため細胞表面に再循環するPrPが増加、細胞表面でPrPが蓄積する。

スクレイピー野外症例の体内におけるプリオンの多様性

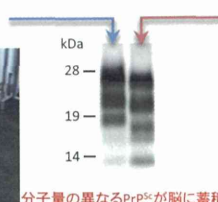
研究分担者：動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター 宮澤光太郎

I. 定型スクレイピー野外発症ヒツジ脳から分離された2つのスクレイピー

①定型スクレイピー



野外発症例のほとんどを占める。
野生型マウスに伝達可能



分子量の異なるPrP^{Sc}が脳に蓄積

②CH1641様スクレイピー



野外発症例は稀。
野生型マウスに伝達不可能

II. TgOvPrP59マウスに伝達した2つのスクレイピープリオンの生物学的性状

定型スクレイピー



定型スクレイピー

PrP^{Sc}沈着 広範囲にブラーク様の沈着

潜伏期間 約462日

CH1641様スクレイピー

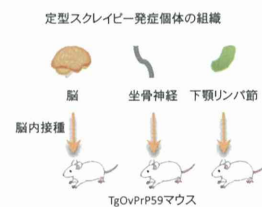


CH1641様スクレイピー

限局的な顆粒状の沈着

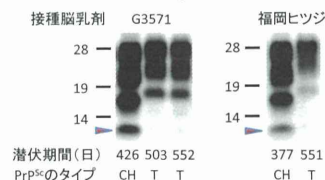
潜伏期間 約257日

III. 定型スクレイピー野外症例の各組織におけるスクレイピープリオンの多様性



各組織におけるスクレイピープリオンの分布を検討する。

野外症例の脳を接種したTgOvPrP59マウスでのPrP^{Sc}蓄積



CH: CH1641様スクレイピープリオン, T: 定型スクレイピープリオン
矢頭はCH1641様スクレイピープリオンの特徴である約14kDaの断片を示す。

組織	発症数/接種数	蓄積したPrP ^{Sc} のタイプ	
		定型	CH1641様
脳	11/12	5	6
坐骨神経	4/5	4	0
下顎リンパ節	1/5	0	1

定型スクレイピー野外症例の体内には2種類のスクレイピープリオンが混在する。

解説

1. 定型スクレイピー野外発症個体の体内には性状の異なる2種類のスクレイピープリオンが混在している。
2. 定型およびCH1641様スクレイピープリオンは、異なる組織向性を示す。

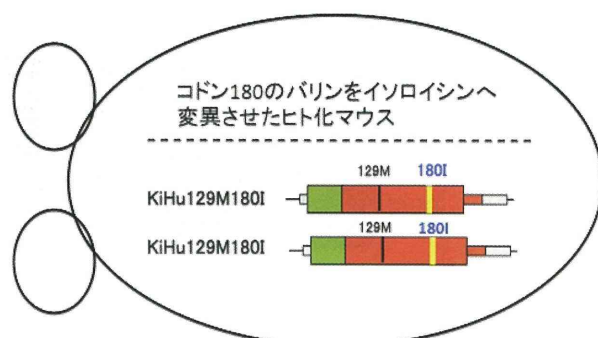
わが国最多の遺伝性プリオン病V180Iはヒト化マウスに伝達しない

研究分担者: 東北大学医学系研究科病態神経学分野 毛利資郎

1. 遺伝性プリオン病V180Iのヒト化マウスへの感染実験成績

ヒト化マウス	KiHu129MM		KiHu129VV		KiHu129MM・219K	
	感染頭数 /接種頭数	観察日数	感染頭数 /接種頭数	観察日数	感染頭数 /接種頭数	観察日数
Ak180I	0/5	746,769, 812.812, 812	0/6	563,612, 740,780, 812,812	0/5	546,614, 650,740, 812
Mi180I	0/4	447,725, 745,812	0/4	725,812, 812,812	0/4	504,539, 740,752

2. 遺伝性プリオン病V180Iモデルマウスの作成



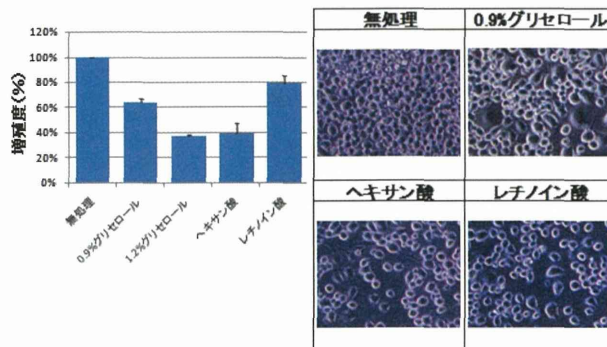
解 説

- わが国の遺伝性プリオン病で最も数多く報告されているV180Iの変異をもつプリオン病はヒト化マウス(KiHu129M, KiHu129V, KiHu129M・219K)に伝達(感染)しなかった。
- V180Iの変異をもつ遺伝性プリオン病ヒト化マウスを作成した。
- この遺伝性プリオン病ヒト化マウスに遺伝子変異による自発性の異常プリオンたんぱく質の産生は認められなかった。

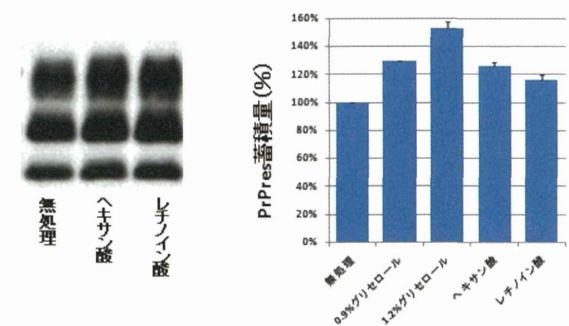
治療薬探索に適したプリオン感染細胞モデルの探索

研究分担者: 東北大学医学系研究科 堂浦克美

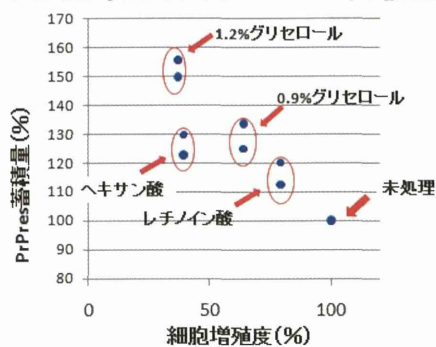
(1) 細胞増殖抑制作用



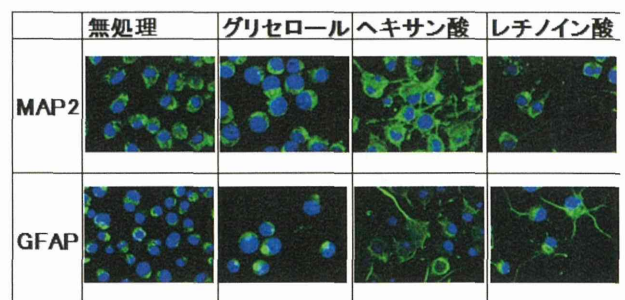
(2) 細胞内PrPres蓄積量



(3) 細胞増殖抑制とPrPres蓄積量



(4) 分化マーカーの発現

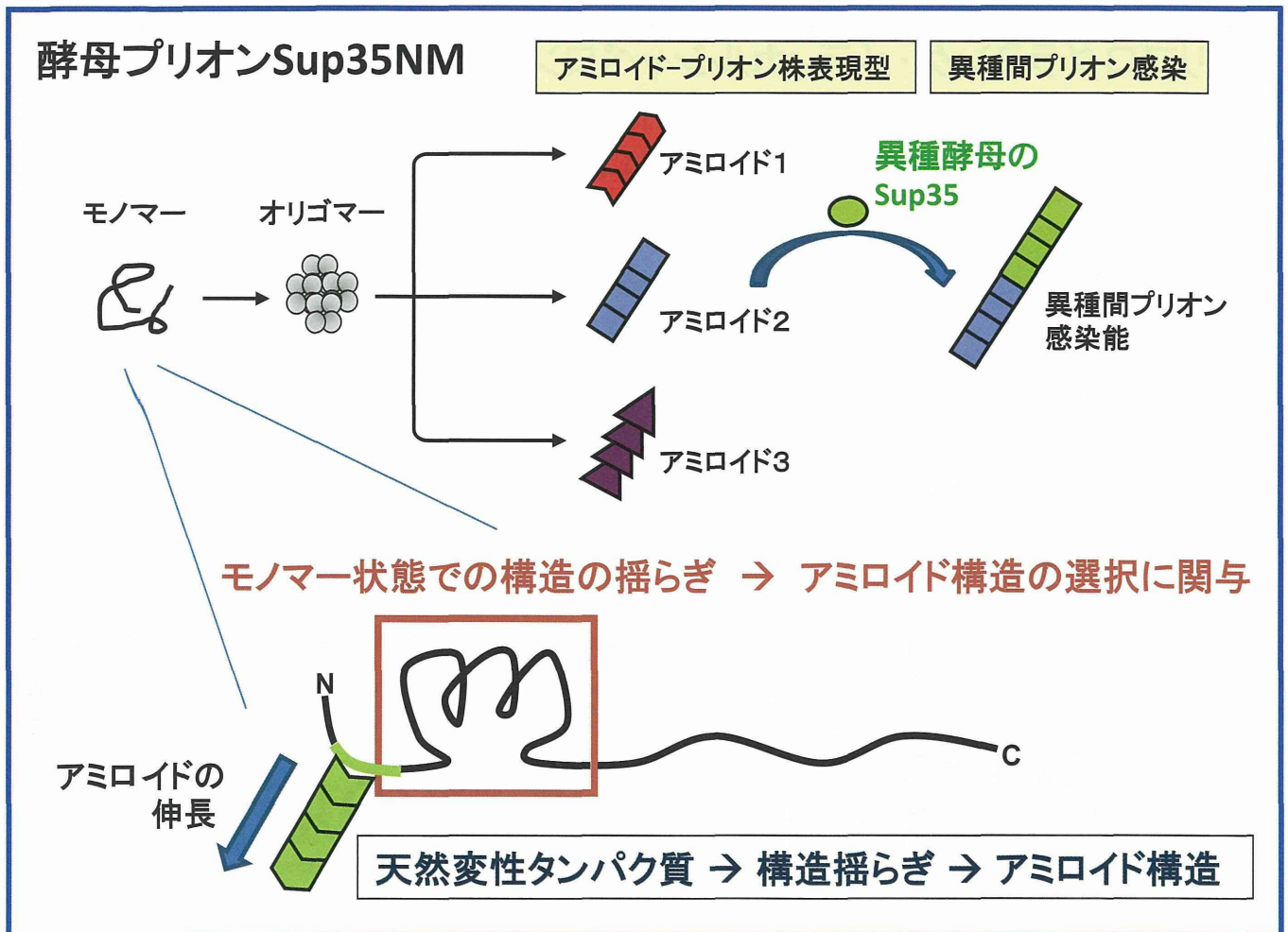


解説

1. ビボに近い状態の細胞モデル(分化した状態でプリオンが飽和状態)で治療薬を探索すれば、治療効果に優れた化合物を発見できる可能性がある。そこで、プリオン持続感染細胞を用いて、ポストマイトテックな感染細胞の作製を検討した。
2. ジブチリルcAMPやレチノイン酸を除いて、いずれの処理でも10日間程度は継代しない程度は細胞増殖を抑えた状態を維持できた。(1)
3. 特にグリセロールやブチル酸は細胞増殖抑制効果が高く、かつPrPresレベルも高い状態が観察された。(2)、(3)
4. 細胞増殖抑制効果やPrPresレベルと分化マーカー発現とは関連しなかった。(4)

酵母を用いたプリオン病異種間感染機構の解明

研究分担者: 独立行政法人理化学研究所 田中元雅



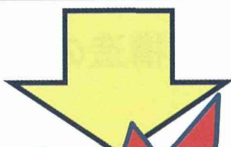
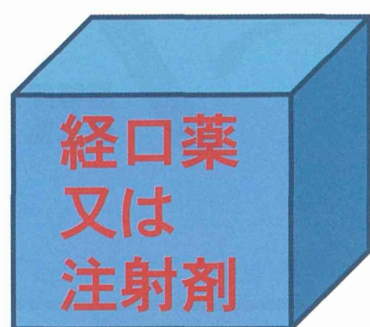
解説

1. 異種間プリオン感染機構を調べるための様々な実験系を構築した。
2. 天然変性モノマーの揺らぎや局所構造が、プリオン凝集体(アミロイド)の構造やプリオン株表現型の選択に関与。

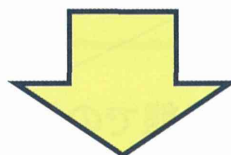
再生メディカルシャペロンの神経変性疾患への応用

研究分担者: 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 桑田一夫

1. リプログラミング・メディカルシャペロン(RMC)の実用化
2. ダイレクトリプログラミングメディカル・シャペロン(DMC)の実用化
3. 特異分化誘導・メディカルシャペロン(IMC)の実用化



プリオン病におけるカスケード的神経変性の停止



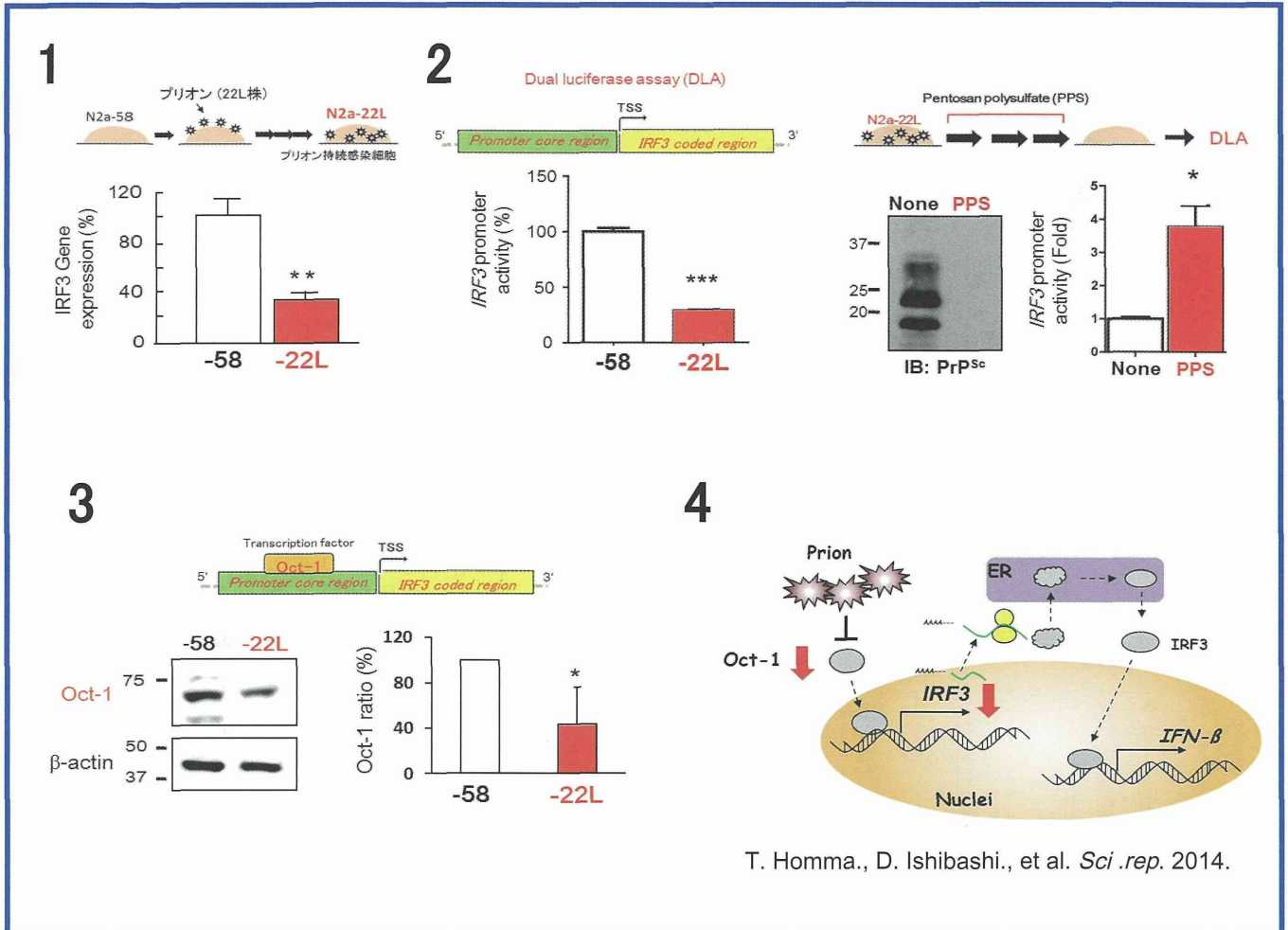
プリオン病に対する
再生医療の展開

解説

1. 再生医療につながるメディカルシャペロンの開発を目指す。
2. プリオン病に適用する。
3. 最終的には、変性した神経を元に戻す根本的治療法に繋げる。

転写因子IRF3に対するプリオンの抑制メカニズム

研究分担者: 長崎大学医歯薬学総合研究科感染分子解析学 石橋大輔

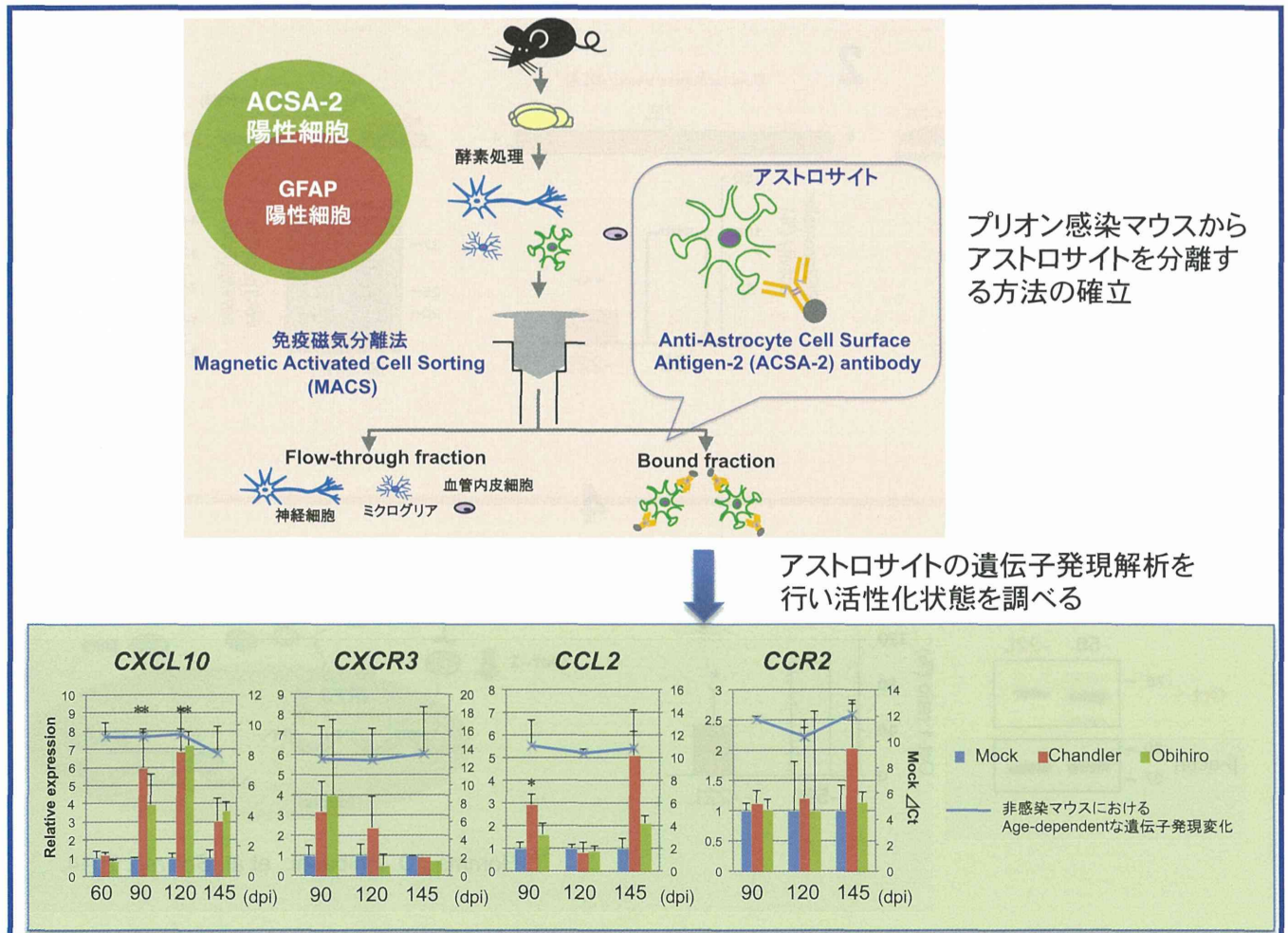


解説

1. プリオン持続感染細胞では転写因子IRF3の発現が減少していた。
2. IRF3のプロモーター活性はプリオン持続感染細胞では減少した。また抗プリオン薬 (PPS) によるPrP^{Sc}の発現減少と共に、その活性が増加した。
3. IRF3プロモーター活性に重要な転写因子Oct-1の発現が、プリオン持続感染細胞では減少していた。
4. プリオン感染後のIRF3発現低下は、Oct-1の発現減少に伴った結果と示唆された。

プリオン感染マウスのアストロサイト活性化状態の解明

研究分担者：北海道大学大学院獣医学研究科 堀内基広

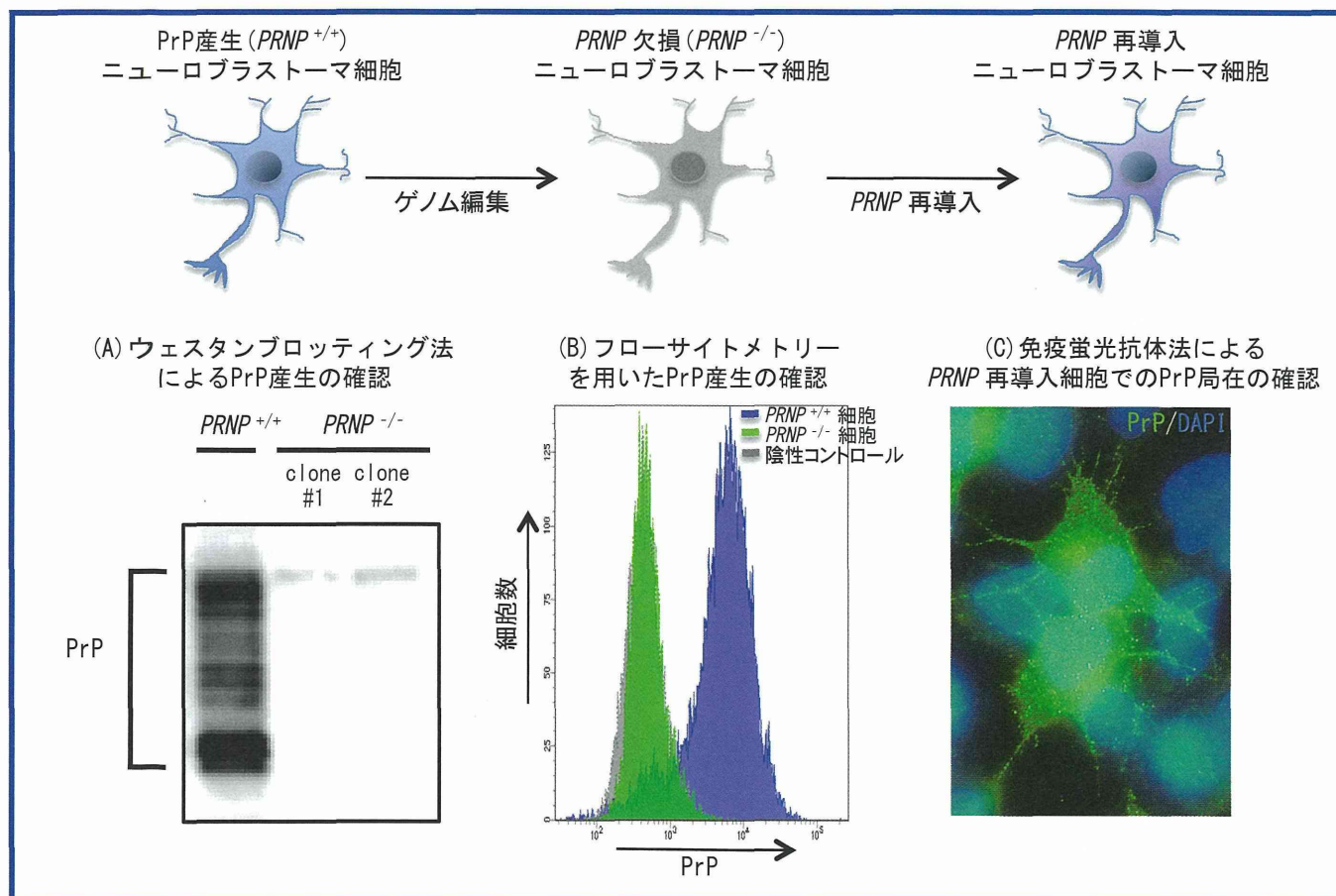


解説

1. 抗Astrocyte Cell Surface Antigen (ACSA-2)抗体を用いる免疫磁気分離法を用いて、プリオン感染マウスの脳からアストロサイトの簡便な分離方法を確立した。
2. 神経栄養因子、サイトカイン、およびケモカイン等11遺伝子の発現を調べたところ、CXCL10ケモカイン遺伝子の発現が、病態進行の過程で一過性に上昇することを発見した。

培養細胞を用いた新規のプリオン解析系確立の試み

研究分担者: 国立感染症研究所細胞化学部 桶本優子(中村優子)



解説

1. ヒトのプリオン遺伝子($PRNP$)には複数の多型や変異が存在することが知られている。これらの多型・変異の中には129番目のアミノ酸(メチオニンあるいはバリン)や219番目のアミノ酸(グルタミン酸あるいはリシン)のように、プリオン病の発症機構に深く関与すると考えられているものもある。これらの変異・多型を有する培養細胞株を構築し、新規のプリオン解析系として用いることが可能か検討を行った。
2. ニューロblastoma細胞を用い、ゲノム編集技術により $PRNP$ コード領域の欠損を試みた。プリオン蛋白質(PrP)の産生を抗PrP抗体を用いたウェスタンブロッティング法(A)およびフローサイトメトリー法(B)にて確認したところ、PrPを産生しない細胞クローンが確認され、 $PRNP^{-/-}$ 細胞株の樹立に成功したと考えられた。
3. さらに、 $PRNP^{-/-}$ 細胞株を用いて $PRNP$ 再導入実験を行った。免疫蛍光抗体法にて細胞表面、樹状突起などにPrPが局在していることが確認された(C)。以上より、 $PRNP^{-/-}$ 細胞株を用いた $PRNP$ 再導入により、PrP産生能を有する細胞の取得が可能であることが確認された。