

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）

（総括）研究報告書

神経変性疾患の原因となるプリオン様蛋白質の家畜における発現分布
および生物種間伝達の調査研究

研究代表者 チェンバーズ ジェームズ 東京大学農学生命科学研究科 助教

研究要旨：神経変性疾患の原因蛋白がプリオン様の性質を有することが近年報告されている。そこで本研究は食肉を介して神経変性疾患の原因蛋白を摂取するリスクを評価することを目的とした。本年度（3年計画2年目）は、昨年度の研究において中枢神経組織に蛋白の異常蓄積が認められた動物の末梢神経を解析した。その結果、末梢神経には蛋白の異常蓄積は認められなかった。したがって、中枢神経以外の組織を摂取することによるプリオン様蛋白の伝達リスクは小さいと考えられた。次に、ヒト型 Tau 蛋白を過剰発現するモデルマウスにおけるマウス蛋白の蓄積を調べたところ、ヒト型 Tau の蓄積に相関してマウス型 α -synuclein および TDP43 が脳に異常蓄積することが分かった。すなわち、異種間において異なるプリオン様蛋白が凝集を促進させることを実験的に示した。次年度は、異種間における伝達の可能性を接種実験により検証する。

研究分担者

内田和幸 東京大学農学生命
科学研究科 教授

A. 研究目的

神経変性疾患では特定の蛋白が神経組織に蓄積し、進行性に神経細胞が脱落する。これまでにアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症の患者の神経組織において β -amyloid ($A\beta$)、Tau、 α -synuclein (α syn)、TDP-43 等の蓄積蛋白が同定されている。

これらの蛋白はプリオンのように神経

組織内で伝播することが示されており、患者の組織から抽出した蛋白を腸（マウス）または脳（マウス、サル）に接種することにより、それぞれ疾患特異的な蛋白が固体間で伝達することが近年確認された。また、申請者はヒト型 Tau を過剰発現するマウスの脳を解析し、リン酸化 Tau (p-Tau) の蓄積とともにリン酸化 α syn (p- α syn) が蓄積することを明らかにした。すなわち、ヒト型 Tau が seed となり、マウス型 α syn が蓄積する可能性が示唆された。

これらのことから、動物に由来する蛋白を seed としてヒトの蛋白が蓄積する可能性が考えられるため、食肉を介して神経変性疾患の原因蛋白を摂取するリスクを評価する必要がある。そこで本研究は、食の安全性をふまえて以下の課題を明らかにすることを目的とした。

- ① 神経変性疾患の原因となるプリオン様蛋白が食肉となる家畜の組織に存在するのか
- ② 異なる種類のプリオン様蛋白が神経組織において伝播するのか
- ③ 動物種間でプリオン様蛋白が伝達するのか

B. 研究方法

本研究は3年計画であり、本年度（2年度目）は主に課題②に取り組んだ。また、昨年度実施していなかった課題①の末梢神経組織の解析を実施した。

課題①

1. 材料

昨年度の研究結果から、脳に p-Tau の蓄積を認めた豚2頭および山羊1頭の末梢神経組織を解析に用いた。

（倫理面への配慮）

病性鑑定のために剖検された動物組織サンプルを使用しており、倫理的な問題はない。

2. 方法

末梢神経組織の切片を作成し、免疫組織化学により蛋白を検出した。蛋白検出

には、以下の一次抗体を使用した：A β , Tau, p-Tau, α syn, p- α syn, Ubiquitin。Tau, α syn については生理的な蛋白発現を評価し、A β , p-Tau, p- α syn, Ubiquitin については異常蓄積物を評価した。

課題②

1. 材料

ヒト型 Tau 発現マウス (rTg4510) を繁殖維持し、3ヶ月齢 (5個体)、6ヶ月齢 (9個体)、8.5ヶ月齢 (9個体)、10ヶ月齢 (18個体) の組織をサンプリングした。また、ドキシサイクリン投与によりヒト型 Tau の発現を抑制した個体群についても同様にサンプリングした。

（倫理面への配慮）

動物実験および遺伝子改変動物の使用については実施機関の承認のもと、適切に実施した。

2. 方法

それぞれの群について、脳の組織切片を作成し、課題1と同様に Tau, p-Tau, α syn, p- α syn, TDP-43, Ubiquitin 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。蛋白凝集物については、ギ酸処理および酵素処理による抵抗性を評価するとともに、二重免疫染色により蛋白が凝集する細胞の種類の同定および異なる蛋白 (p-Tau, p-TDP43, p- α syn) の細胞内共凝集を確認した。脳の各領域 (運動野 (MO)、体性感覚野 (SO)、嗅皮質 (PIR)、線条体 (STR)、歯状回 (DG)、海馬

CA3 (CA3)、海馬 CA1 (CA1)、嗅内皮質 (ENT)、黒質 (SN)) における p-Tau、p-TDP43、p- α syn 凝集物を認めた細胞数の相関性を統計学的に解析した ($p < 0.05$ 有意)。また、脳組織から抽出した TBS 可溶分画および TBS 不溶分画 (サルコシル可溶分画) における TDP-43 の量をウェスタンブロットで比較した。

3. 研究内容の分担

課題①

材料の収集および病理組織の評価は、チェンバーズおよび内田が行った。研究協力者の中山 (学生) が免疫組織化学を実施した。

課題②

材料の収集および解析は、チェンバーズおよび研究協力者の中山 (学生) が行い、内田が病理組織の評価を行なった。

これらの結果についてチェンバーズと内田が総合的に検討し、本報告書をまとめた。

C. 研究結果

課題①

家畜の末梢神経組織の解析

脳に p-Tau の蓄積を認めた豚 2 頭および山羊 1 頭の末梢神経組織において tau および α syn の生理的な発現を認めた。A β および p-tau、p- α syn の蓄積は観察されなかった (図 1)。

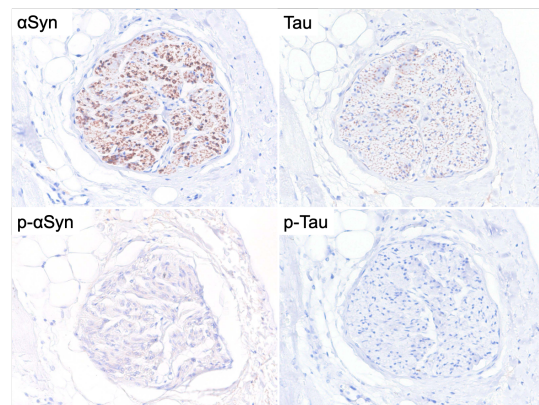


図 1 豚の末梢神経。tau および α syn の発現を認める。p-tau および p- α syn の蓄積は認めない。

課題②

rTg4510 マウス大脳における TDP43 蓄積

3、6、8.5、10 ヶ月齢の rTg4510 マウスの大脳において神経細胞の細胞質に p-TDP43 凝集物の蓄積を認めた。これらの凝集物はギ酸処理および proteinase K 処理に抵抗性を示した。野生型マウスでは p-TDP43 凝集物は観察されなかった (図 2)。

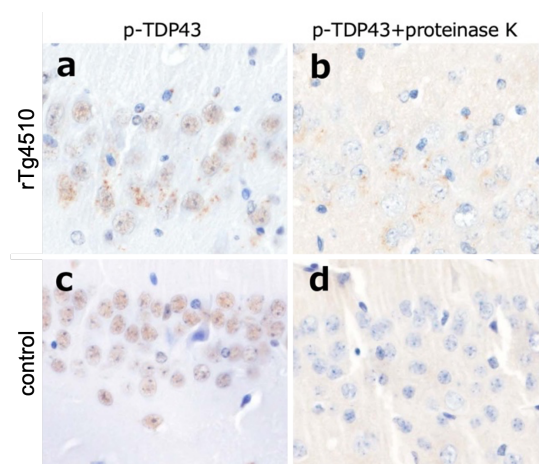


図 2 rTg4510 および野生型マウスの脳組織。(a) 神経細胞の細胞質に p-TDP43 凝集物を認める。(b) 細胞質の p-TDP43

凝集物は proteinase K 抵抗性を示す。
(c, d) p-TDP43 凝集物を認めない。

p-TDP43 蓄積の分布および程度

rTg4510 マウスの脳における p-TDP43 凝集物の蓄積は脳の各領域に観察され、蓄積細胞数が加齢性に増加した。また、二重免疫染色において p-TDP43 凝集物は MAP2 陽性の神経細胞に観察され、GFAP 陽性の星状膠細胞、Olig2 陽性の稀突起膠細胞、Iba-1 陽性の小膠細胞には認められなかった (図 3)。p-TDP43 凝集物は p-tau および p- α syn 凝集物と同じ細胞に観察され、細胞内において一部は共局在した (図 4)。

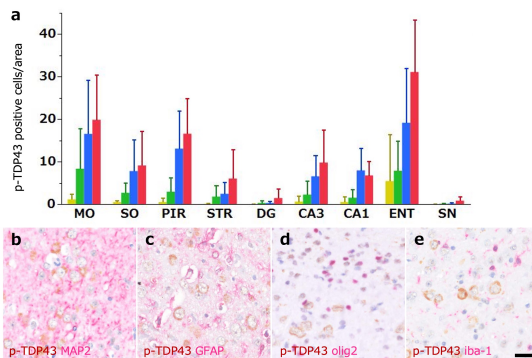


図 3 (a) 脳の各領域において p-TDP43 凝集物を認め、その細胞数は加齢性に増加した。3 ヶ月 (黄)、6 ヶ月 (緑)、8.5 ヶ月 (青)、10 ヶ月 (赤)。運動野 (MO)、体性感覚野 (SO)、嗅皮質 (PIR)、線条体 (STR)、歯状回 (DG)、海馬 CA3 (CA3)、海馬 CA1 (CA1)、嗅内皮質 (ENT)、黒質 (SN)。(b-e) 二重免疫染色。p-TDP43 凝集物は MAP2 陽性細胞に認められ、GFAP および Olig2、Iba-1 陽性細胞には認められない。

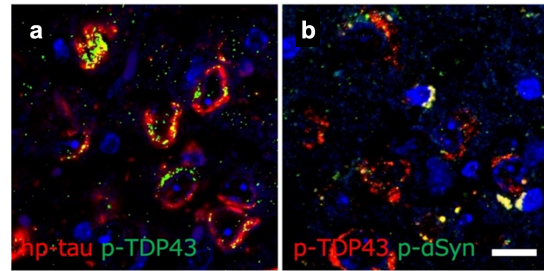


図 4 (c) p-TDP43 凝集物 (緑) および p-tau 凝集物 (赤) が同一の細胞に観察され、一部は共局在する (黄)。(d) p-TDP43 凝集物 (赤) および p- α syn 凝集物 (緑) が同一の細胞に観察され、一部は共局在する (黄)。

p-Tau、p-TDP43、p-syn 凝集物の関連性

脳の各領域における凝集物を認めた細胞数は p-Tau が最も多く、また p-Tau の蓄積が先行し、続いて p-TDP43 および p-syn の凝集物が観察された。これらの蛋白凝集物を認めた細胞数は加齢性に増加し、p-TDP43 および p-Tau、p- α syn の間に相関を認めた (図 5)。

ドキササイクリン投与によりヒト型 p-Tau の発現を抑制したところ、脳の各領域において p-TDP43 凝集物を有する細胞数が有意に減少した (図 6)。

TBS 可溶および不溶分画の p-TDP43 量

rTg4510 と野生型マウスの脳 TBS 可溶および TBS 不溶 (サルコシル可溶) 分画に含まれる p-TDP43 量をウェスタンブロットにより比較したところ、rTg4510 マウスでは TBS 可溶性 p-TDP43 が少なく、TBS 不溶性 p-TDP43 が多かった。

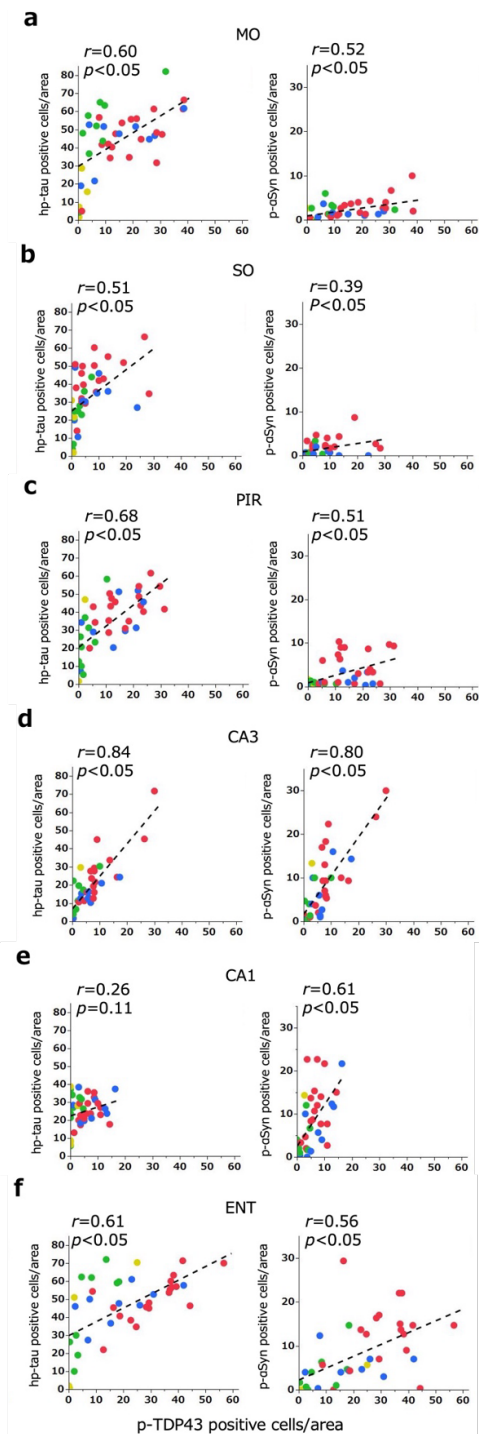


図5 脳の各領域において p-TDP43 凝集物を有する細胞数と p-Tau および p-αSyn 凝集物を有する細胞数に相関を認めた。認め、(a)運動野、(b)体性感覚野、(c)嗅皮質、(d)海馬 CA3、(e)海馬 CA1、(f)嗅内皮質(ENT)。

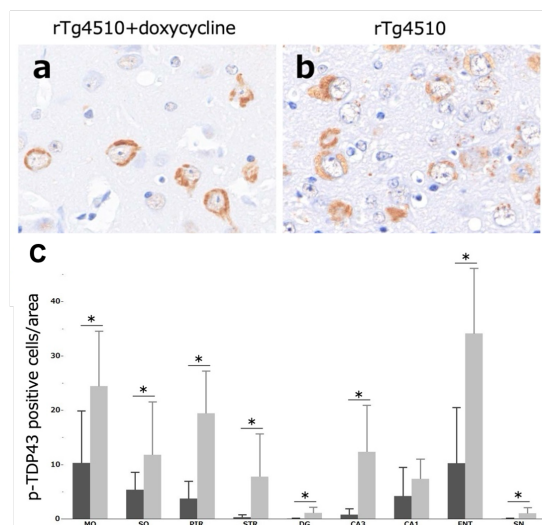


図6 (a-c) ドキシサイクリン投与群 (黒) は非投与群 (灰) と比較して、p-TDP43 凝集物を有する細胞数が有意に少ない。

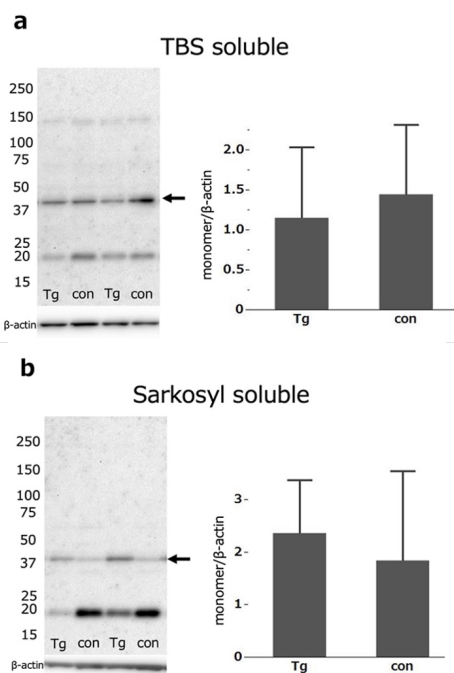


図7 rTg4510 および野生型マウスの脳抽出物の p-TDP43 ウェスタンブロット。rTg4510 では野生型マウスと比較して TBS 可溶 p-TDP43 が少なく、TBS 不溶 (サルコシル可溶) p-TDP43 が多い。

D. 考察

課題 1

昨年度の研究結果から家畜の脳において神経変性疾患に関連する蛋白が生理的に発現しており、牛、山羊、豚の脳では加齢性に p-Tau が蓄積することが明らかになった。本年度は、脳に p-Tau 蓄積が認められた山羊および豚の末梢神経組織を解析したところ、p-Tau および p- α syn 凝集物が観察されなかった。すなわち、中枢神経系を除く組織については食肉を摂食することによるリスクは小さいと考えられる。

課題 2

ヒト型 p-Tau の蓄積にともないマウス型 p-TDP43 が蓄積することを示すデータが得られた。マウス型 TDP43 凝集物はリン酸化された状態で神経細胞内に凝集物を形成していた。脳の各領域においてヒト型 p-Tau の凝集が先行し、p-Tau が凝集した細胞においてのみマウス型 p-TDP43 の凝集を認めた。ヒト型 p-Tau とマウス型 p-TDP43 が細胞内で共局在する像が観察された。また、ヒト型 p-Tau 蓄積の程度と相関してマウス型 p-TDP43 の蓄積が促進されることが分かった。さらに、ヒト型 p-Tau の発現を抑制することにより、マウス型 p-TDP43 の凝集が抑制された。本研究の結果から、異種蛋白の凝集物が他の蛋白の凝集を促進すると考えられた。

異種蛋白の凝集物が他の蛋白の凝集を

促進するメカニズムについては不明である。仮説として、異種蛋白の凝集物が seed として他の蛋白と共凝集する (cross-seeding)、あるいは異種蛋白が共通したリン酸化酵素を介してリン酸化され相互作用的に凝集が促進される可能性が考えられた。そこで、次年度はこのメカニズムを解析し、異種に由来する蛋白による cross-seeding のリスクを評価する。

E. 結論

本年度の研究結果から中枢神経系を除く組織については家畜肉を摂食することによるプリオン様蛋白の伝達リスクは小さいと考えられる。一方で、マウスを用いた実験の結果から、ヒト型 p-Tau の蓄積にともないマウス型 p-TDP43 が蓄積することが示された。すなわち、異種蛋白の凝集物が他の蛋白の凝集を促進することが実験的に明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakayama Y, Chambers JK, Takaichi Y, Uchida K. Cytoplasmic aggregation of TDP43 and topotrophic correlation with tau and α -synuclein accumulation in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Journal of*

*Neuropathology and Experimental
Neurology.* (投稿論文審査中)

2. 学会発表

中山雄太郎、チェンバーズジェームズ、滝本明佳、内田和幸「高齢のニホンイノシシの脳における異常蛋白質の蓄積」第 29 回日本野生動物医学会大会：2023 年 9 月 22-24 日（鹿児島大学）

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
3. その他 なし