

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 チェンバース ジェームズ 東京大学農学生命科学研究科 准教授

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3年目）は、高リン酸化 Tau の蓄積がみられたヤギおよびネコの脳から抽出したサルコシル不溶性分画を野生型マウスの脳に接種し解析した。その結果、ヤギの脳抽出物接種群および無接種群では脳に異常蛋白の蓄積は観察されなかったが、ネコの脳抽出物接種群では3頭のうち1頭で接種部と同側の大脳において高リン酸化 Tau が蓄積した神経細胞が散見された。本研究の結果から、高リン酸化 Tau が動物種間で伝達する可能性が考えられ、同蛋白がプリオン様の性質を有することが示唆された。また、同蛋白の伝達におけるリスク関連因子として動物種や接種する蛋白量などが考えられた。

研究分担者

内田和幸 東京大学農学生命
科学研究科 教授

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個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。

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

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（3年度目）は主にマウスを用いた伝達実験（課題③）に取り組んだ。また、昨年度から引き続き偶蹄目の動物の脳における異常蛋白の凝集を解析した（課題①）。

マウスを用いた伝達実験（課題③）

1. 材料と方法

昨年度までの研究において高リン酸化 Tau の蓄積が脳に認められた山羊およびネコの脳組織から蛋白質を抽出し、TBS 可溶性/不溶性、サルコシル可溶性/不溶性分画を分離した。サルコシル不溶性分画の抽出物を溶媒で混和し、混和物を4週齢の野生型マウス（C57BL/6）脳の線状体に接種した。対照として非接種群を設けた。接種から3ヶ月後に安楽死し、

解剖を行なった。脳を採取し10%中性緩衝ホルマリンで固定した後にパラフィン包埋した。HE 染色および免疫染色を実施した。免疫染色には抗高リン酸化 Tau 抗体（AT8）を用いた。

偶蹄目の動物の脳における異常蛋白の凝集（課題①）

1. 材料と方法

偶蹄目の動物（豚4頭、イノシシ1頭、牛5頭、山羊9頭、鹿1頭）の脳を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した後にパラフィン包埋した。HE 染色、Gallyas-Braak 染色および免疫染色を実施した。免疫染色には抗高リン酸化 Tau 抗体（AT8）、抗 Tau 抗体（tau5）、抗 3R-Tau 抗体（RD3）、抗 4R-Tau 抗体（RD4）および抗 A β 抗体を用いた。また、Proteinase K 処理による凝集蛋白の酵素抵抗性を確認した。

2. 研究内容の分担

マウスを用いた伝達実験をチェンバーズおよび研究協力者の中山（学生）が実施した。偶蹄目の動物の脳の採取および病理学的評価を内田が行なった。

得られた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

マウスを用いた伝達実験（課題③）

ヤギの脳の抽出物を接種した群および

無接種対照群では、脳に形態的な異常や異常蛋白の蓄積は観察されなかった。ネコの脳の抽出物を接種した群では3頭のうち1頭で接種部と同側の線状体周囲の島皮質において AT8 陽性の高リン酸化 Tau が蓄積した神経細胞が散見された (図 1)。高リン酸化 Tau は神経細胞の細胞体および同細胞の突起に顆粒状に観察された。

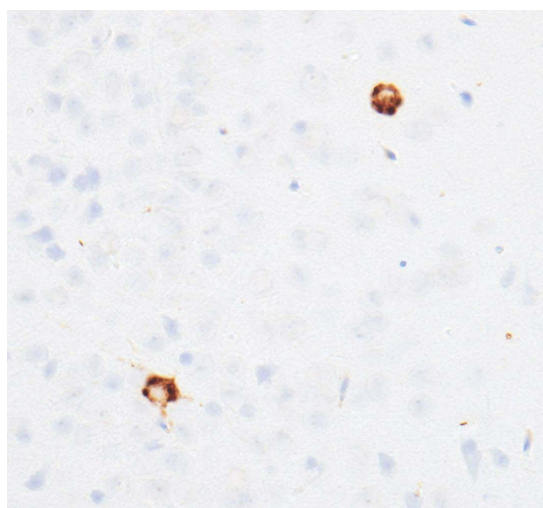


図 1 ネコの脳抽出物を接種した野生型マウスの脳組織。神経細胞に高リン酸化 Tau 抗体 (AT8) 陽性を示す凝集物を認める。

偶蹄目の動物の脳における異常蛋白の凝集 (課題①)

豚 2/4 頭 (10 歳以上)、イノシシ 1/1 頭 (19 歳)、牛 1/5 頭 (19 歳)、山羊 5/9 頭 (9 歳以上) の大腦において高リン酸化 Tau が神経細胞に蓄積する像を認めた (図 2)。同凝集物は各種 Tau 抗体 (AT8, tau5, RD3, RD4) に陽性を示し、Proteinase K 処理に抵抗性を示した

(図 3)。また、高リン酸化 Tau 凝集物の一部は Gallyas-Braak 染色に陽性を示した。これらの動物では Amyloid- β の蓄積は観察されなかった。

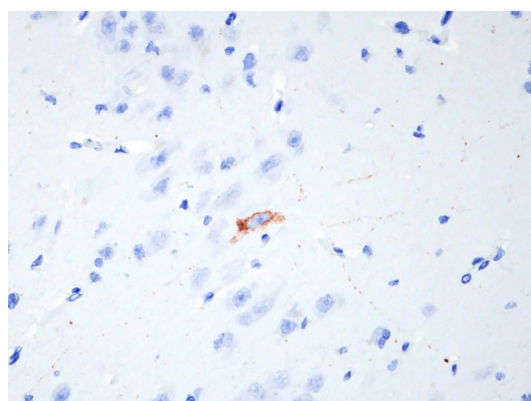


図 2 高リン酸化 Tau 抗体 (AT8) を用いた山羊の脳の免疫染色。神経細胞体および突起に凝集物を認める。

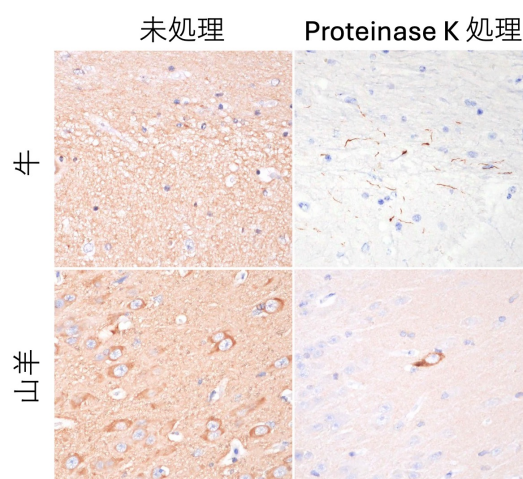


図 3 Tau 抗体 (tau5) を用いた牛および山羊の脳の免疫染色。未処理では生理的に発現する Tau 蛋白が検出され、異常 Tau 凝集物は Proteinase K 処理に抵抗性を示す。

D. 考察

マウスを用いた伝達実験（課題③）

本研究の結果から、高リン酸化 Tau が動物種間で伝達する可能性が考えられ、同蛋白がプリオン様の性質を有することが示唆された。本研究では観察期間および個体数が少ないため、再現実験および接種する蛋白の量や接種経路および観察期間などの条件を変えて追加実験を行い、研究結果の意義をさらに精査する必要がある。

偶蹄目の動物の脳における異常蛋白の凝集（課題①）

本研究の結果から、偶蹄目の動物では加齢性に脳に高リン酸化 Tau が蓄積することが明らかになった。また、これらの凝集物は酵素抵抗性を示す異常な蛋白凝集物であることが分かった。一方で、これらの動物種では A β の蓄積が観察されなかったことから、A β 非依存性に Tau のリン酸化および凝集が生じると考えられた。

E. 結論

本研究では、偶蹄目の動物の脳において高リン酸化 Tau が蓄積することを明らかにした。高リン酸化 Tau の蓄積は高齢個体の脳に観察されたことから、一般に市場に流通する個体や解剖学的部位に高リン酸化 Tau が蓄積する可能性は低いと考えられる。また、山羊の脳抽出物をマウスに接種した実験では高リン酸化 Tau

の蓄積が認められなかったことから、プリオン様蛋白の伝達には蛋白量や動物種などの要因が関与すると考えられた。本研究では統計学的な解析を実施するには調査個体数が少ないため、さらに個体数を増やして研究する必要がある。

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 topographic correlation with tau and α -synuclein accumulation in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2024; 83(10): 833-842.

2. 学会発表

中山雄太郎、チェンバーズジェームズ、内田和幸「タウオパチーモデルマウス（rTg4510 マウス）における細胞質内 TDP43 とタウおよび α -シヌクレイン凝集との相関」第 65 回日本神経病理学会総会学術研究会：2024 年 5 月 16-18 日（下関市）

チェンバーズジェームズ「動物の中枢神経系アミロイド」第 11 回日本アミロイドーシス学会学術集会：2024 年 10 月 18 日（松本市）

James Chambers 「Comparative pathology of protein aggregates in the central nervous system」 Asian Pacific Prion Symposium 2024 : 2024 年 12 月 1 日（北海道大学、ハイブリッド開催）

中山雄太郎、チェンバーズジェームズ、内田和幸「偶蹄目動物におけるリン酸化 tau 蓄積の病理学的解析」第 12 回 日本獣医病理学専門家協会学術集会： 2025 年 3 月 27-28 日（盛岡市）

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