

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
（総合）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 准教授

研究要旨：Tau や α -synuclein などの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報告されている。本研究は食肉を介してこれらの蛋白を摂取するリスクを評価することを目的とした。その結果、家畜およびジビエに供される動物種では、高齢個体において脳に高リン酸化 Tau (p-Tau) が蓄積することが分かった。また、ヒト型 p-Tau を過剰発現するマウスにおいて、マウス型 TDP-43 蛋白が異常凝集することを実験的に示した。さらに、脳において p-Tau の蓄積みられた山羊およびネコの脳の抽出物を野生型マウスの脳接種したところ、ネコ由来の蛋白を接種したマウス 1/3 頭において脳の神経細胞に少数の p-Tau 凝集物が観察された。これらの結果から、一般に市場に流通する若齢動物の中樞神経を除く組織については、プリオン様蛋白が含まれるリスクが小さいと考えられる。また、動物に由来するプリオン様蛋白の伝達性については再現実験を行い精査が必要である。

研究分担者

内田和幸 東京大学農学生命
科学研究科 教授

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 β)、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

課題① (1～3 年目)

材料と方法

偶蹄目 (豚 4 個体、イノシシ 1 個体、牛 : 5 個体、山羊 : 9 個体、鹿 1 個体) 奇蹄目 (馬 : 10 個体)、鳥類 (鶏 5 個体)、その他 9 個体) の脳組織を収集し解析に用いた。脳組織は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した後パラフィン包埋した。

脳組織の切片を作成し、以下の抗体を使用して蛋白を免疫組織化学的に検出した : A β , Tau (Tau5), 3R-Tau (RD3), 4R-Tau (RD4), p-Tau (AT8), α syn, p- α syn。Tau, 3R-Tau, 4R-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 については異常蓄積物を評価した。

異常蓄積物がみられた組織について

は、組織切片に Proteinase K 処理を行い凝集蛋白の酵素抵抗性を確認した。また、Gallyas-Braak 染色により神経細胞内の線維性凝集物を確認した。

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ついても同様に解析した。

課題② (1～2 年目)

材料と方法

ヒト型 Tau 発現マウス (rTg4510) 3 ヶ月齢、6 ヶ月齢、8.5 ヶ月齢、10 ヶ月齢の脳組織をサンプリングした (10% 中性緩衝ホルマリン固定および凍結)。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。

それぞれの群について、脳の組織切片を作成し、Tau, p-Tau, α syn, p- α syn, TDP-43 抗体を用いて免疫組織化学的に蛋白を検出した。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、凍結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。

課題③（3 年目）

材料と方法

p-Tau の蓄積が認められた山羊およびネコの凍結脳組織から蛋白を抽出し、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。脳組織を採取し 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 pTau 抗体を用いた。

（倫理面への配慮）

人を対象とした研究は実施していない。動物実験については「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「文部科学省の研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および所属機関の規定を遵守し、所管する動物実験委員会の承認を得て実施した。また、遺伝子組み換え体の作成および取り扱いについては「カルタヘナ法」および東京大学の規定に準拠し、所管する遺伝子組み換え生物

等委員会の承認を得て実験を実施した。

C. 研究結果

課題①

脳における蛋白の生理的発現

解析を行なった偶蹄目、奇蹄目および鳥類の脳において Tau および α syn の生理的な発現を認めた（図 1-1）。

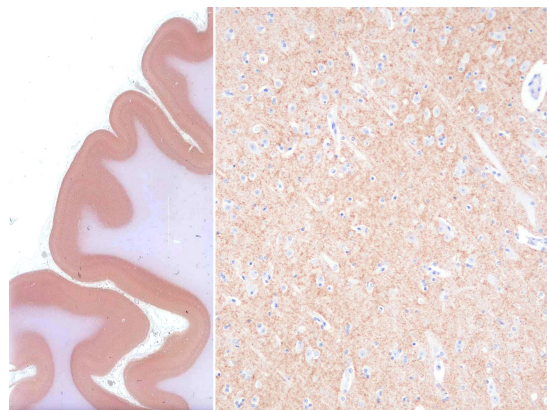


図 1-1 牛の脳。大脳皮質に α syn の発現を認める。左：弱拡大、右：強拡大。

脳における異常蛋白の蓄積

豚 2/4 個体（10 歳以上）、イノシシ 1/1 個体（19 歳）、牛 1/5 個体（19 歳）、山羊 5/9 個体（9 歳以上）、馬 2/10 個体（高齢）の脳において p-Tau が神経細胞に蓄積する像を認めた（図 1-2, 1-3, 1-4, 1-5）。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 1-6）。また、p-Tau 凝集物の一部は Gallyas-Braak 染色に陽性を示した。これらの動物の脳では A β および p- α syn の蓄積は観察されなかった。また、若齢個体では蓄積物は観察されなかった。

鳥類については、200 日齢の鶏の脳では異常蛋白（ $A\beta$ 、p-Tau および p- α syn）の蓄積は観察されなかった。その他の鳥類では、ペンギン 1 個体（32 歳）およびカモ 1 個体（高齢）の脳において $A\beta$ の蓄積を認めた（図 1-7）。p-Tau および p- α syn の蓄積は観察されなかった。

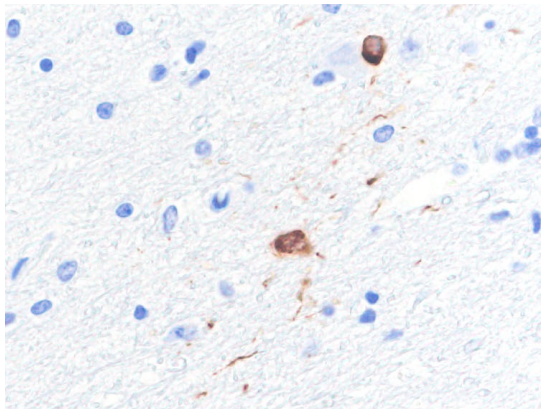


図 1-2 p-Tau 抗体（AT8）を用いた山羊の脳の免疫染色。神経細胞体および神経突起に p-Tau の蓄積を認める。

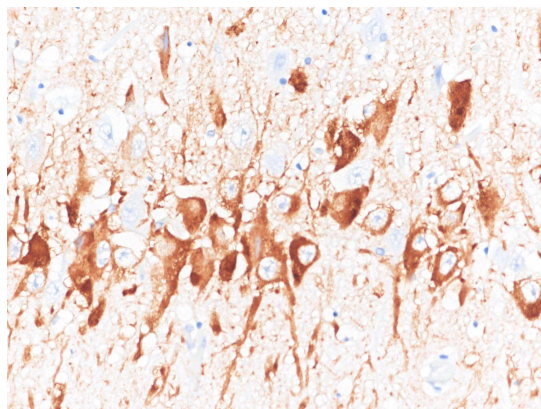


図 1-3 p-Tau 抗体（AT8）を用いたインシシの脳の免疫染色。神経細胞体および神経突起に p-Tau の蓄積を認める。

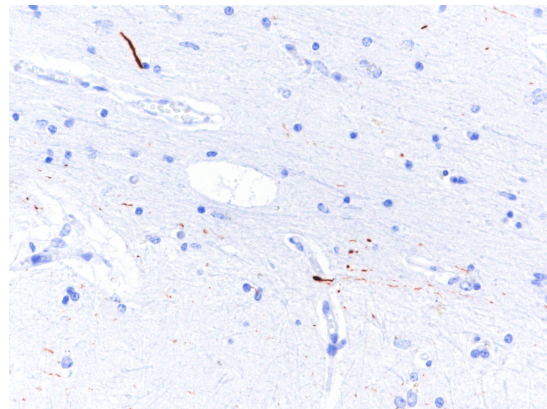


図 1-4 p-Tau 抗体（AT8）を用いた牛の脳の免疫染色。神経突起に p-Tau の蓄積を認める。

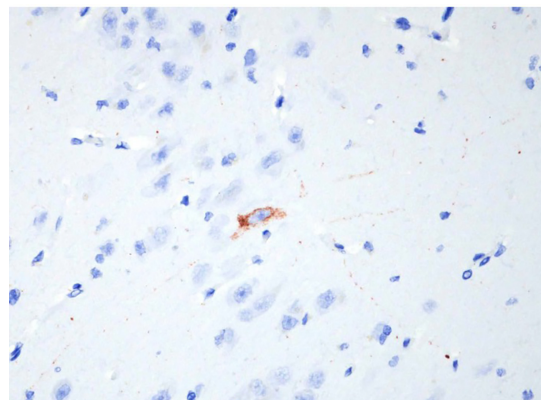


図 1-5 p-Tau 抗体（AT8）を用いた山羊の脳の免疫染色。神経細胞体および神経突起に p-Tau の蓄積を認める。

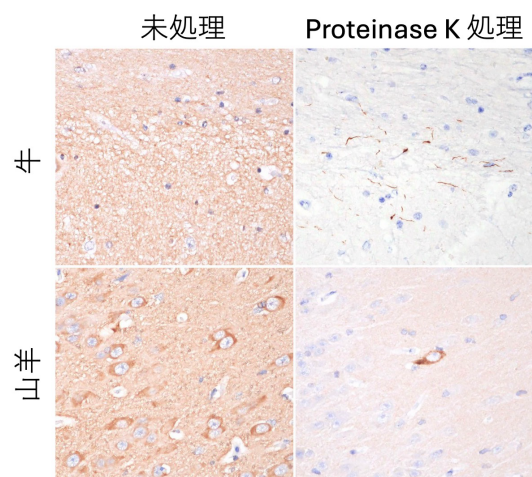


図 1-6 Tau 抗体（tau5）を用いた牛およ

び山羊の脳の免疫染色。未処理では生理的に発現する Tau 蛋白が検出される。異常 Tau 凝集物は Proteinase K 処理に抵抗性を示す。

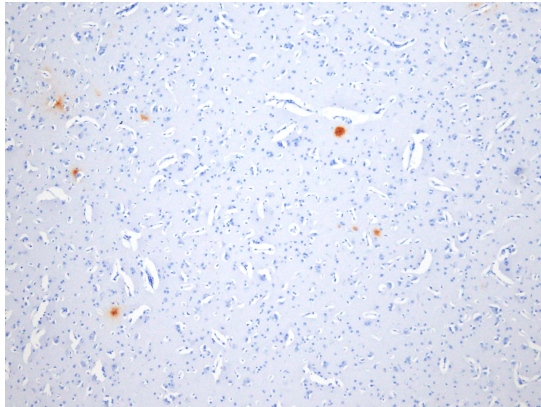


図 1-7 Aβ 抗体を用いたペンギンの脳の免疫染色。Aβ の蓄積を認める。

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 αsyn の生理的な発現を認めた。Aβ および p-tau、p-αsyn の蓄積は観察されなかった (図 1-8)。

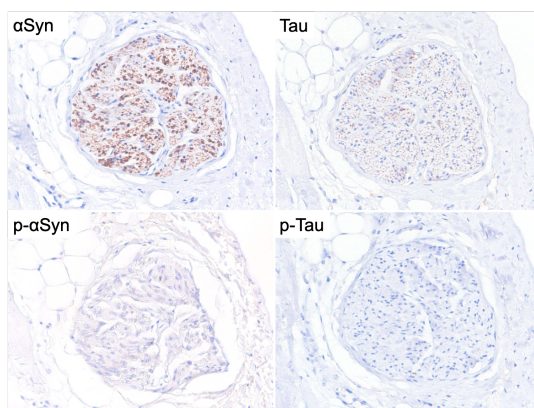


図 1-8 豚の末梢神経。tau および syn の発現を認める。p-tau および p-αsyn の蓄積は認めない。

課題②

rTg4510 マウス脳における TDP43 蓄積

3、6、8.5、10 ヶ月齢の rTg4510 マウスの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 2-1)。

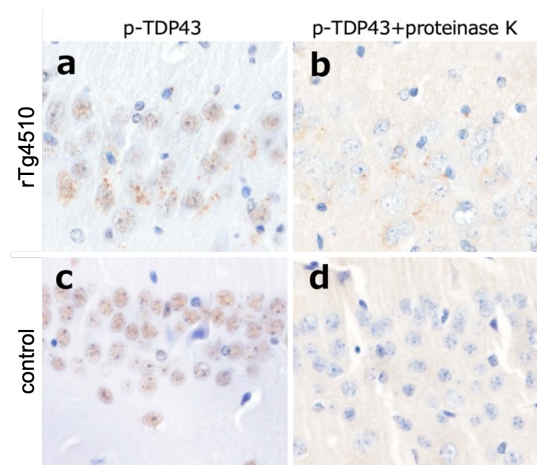


図 2-1 rTg4510 および野生型マウスの脳組織。(a)神経細胞の細胞質に p-TDP43 凝集物を認める。(b)細胞質の p-TDP43 凝集物は Proteinase K 抵抗性を示す。(c,d)p-TDP43 凝集物を認めない。

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 2-2)。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 2-3)。

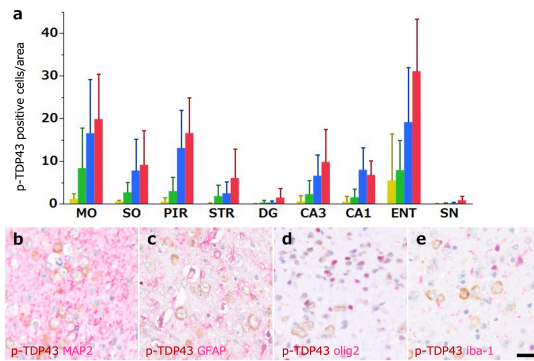


図 2-2 (a)脳の各領域において p-TDP43 凝集物を認め、その細胞数は加齢性に増加した。3 ヶ月 (黄)、6 ヶ月 (緑)、8.5 ヶ月 (青)、10 ヶ月 (赤)。運動野 (MO)、体性感覚野(SO)、嗅皮質(PIR)、線条体(STR)、歯状回(DG)、海馬 CA3(CA3)、海馬 CA1(CA1)、嗅内皮質 (ENT)、黒質(SN)。(b-e)二重免疫染色。P-TDP43 凝集物は MAP2 陽性細胞に認められ、GFAP および Olig2、Iba-1 陽性細胞には認められない。

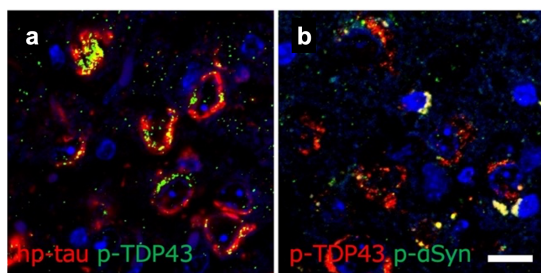


図 2-3 (a)p-TDP43 凝集物 (緑) および p-tau 凝集物 (赤) が同一の細胞に観察され、一部は共局在する (黄)。(b) p-TDP43 凝集物 (赤) および p- α syn 凝集物 (緑) が同一の細胞に観察され、一部は共局在する (黄)。

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 2-4)。

ドキシ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 2-5)。

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 2-6)。

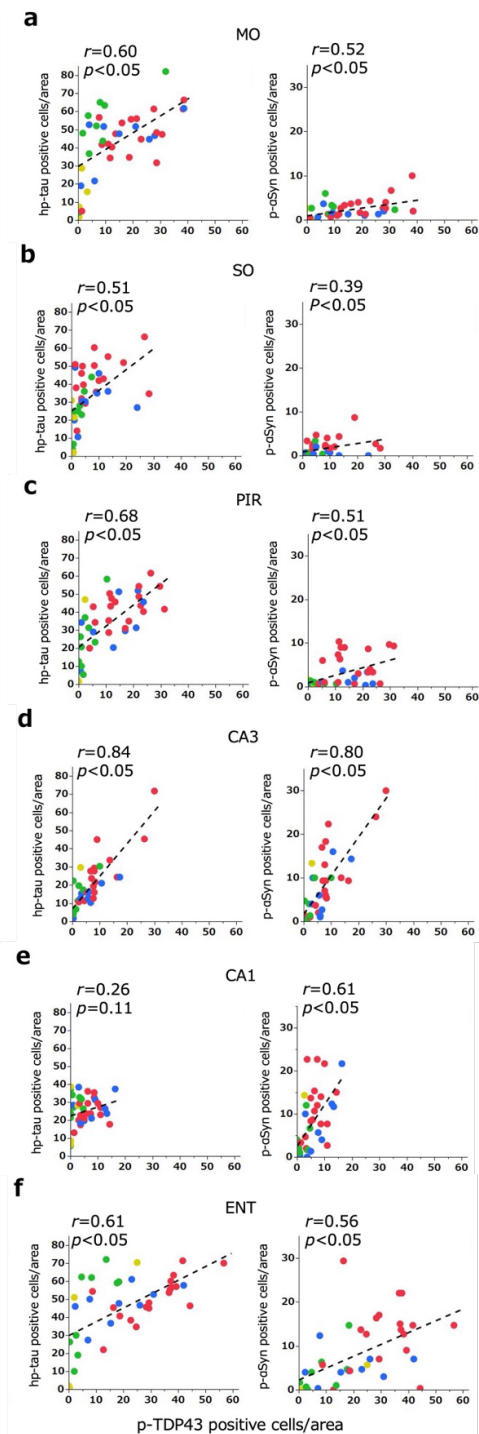


図 2-4 脳の各領域において p-TDP43 凝集物を有する細胞数と p-Tau および p-αsyn 凝集物を有する細胞数に相関を認めた。認め、(a)運動野、(b)体性感覚野、(c)嗅皮質、(d)海馬 CA3、(e)海馬 CA1、(f)嗅内皮質(ENT)。

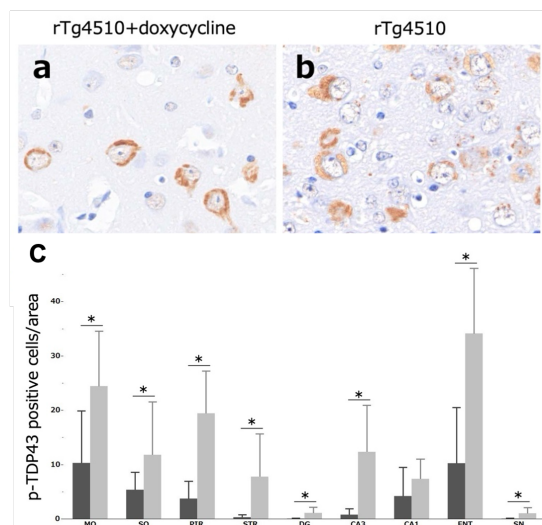


図 2-5 (a-c)ドキシサイクリン投与群 (黒) は非投与群 (灰) と比較して、p-TDP43 凝集物を有する細胞数が有意に少ない。

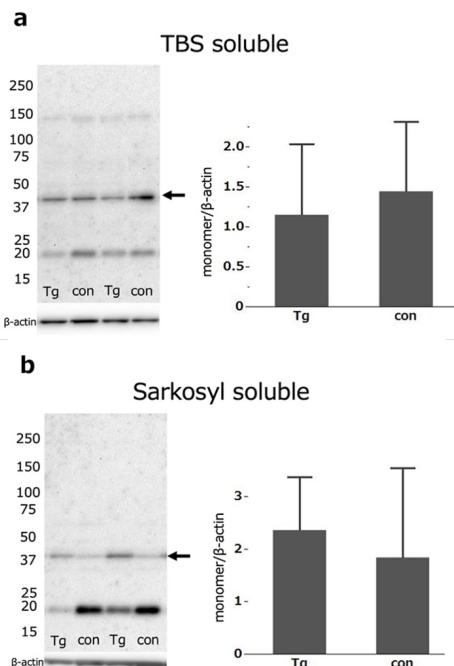


図 2-6 rTg4510 および野生型マウスの脳抽出物の p-TDP43 ウェスタンブロット。rTg4510 では野生型マウスと比較して TBS 可溶 p-TDP43 が少なく、TBS 不溶 (サルコシル可溶) p-TDP43 が多い。

課題③

動物の脳由来蛋白のマウス接種実験

ヤギの脳の抽物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 p-Tau が蓄積した神経細胞が散見された (図 3-1)。P-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。

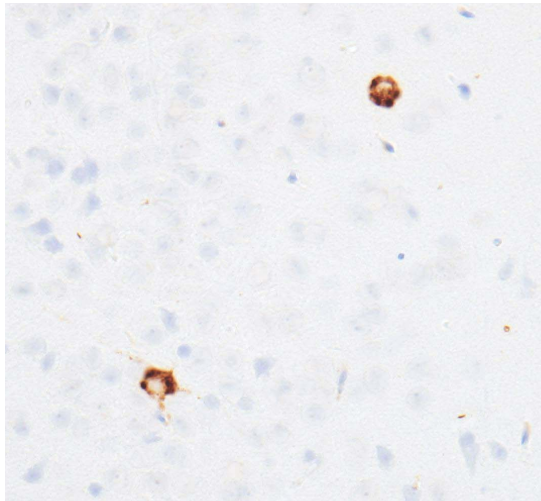


図 3-1 ネコの脳抽出物を接種した野生型マウス的大脑。p-Tau 抗体 (AT8) を用いた免疫染色。神経細胞の細胞体および神経突起に p-Tau が蓄積する。

D. 考察

課題①

本研究では、偶蹄目、奇蹄目および鳥類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することを確認した。また、豚 (10 歳以上)、イノシシ (19 歳)、牛 (19 歳)、山羊 (9 歳以

上)、馬の高齢個体では脳に p-Tau が異常蓄積することを明らかにした。また、これらの凝集物は酵素抵抗性を示す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。なお末梢神経には蛋白の異常蓄積は認められなかった。

本研究の結果から、一般的に市場に流通する若齢の家畜の中樞神経系を除く組織については、それを食べることによる動物由来 p-Tau を摂取するリスクは小さいと考えられた。一方でイノシシのようにジビエに供される動物については年齢が不明である場合が多いことから、特に中枢神経組織を食べることによる動物由来 p-Tau を摂取するリスクは相対的に高いと考えられる。

本研究ではサンプル数が少ないため、統計学的な解析を実施することができなかった。したがって、実際に食される組織に p-Tau が含まれる可能性を疫学的に検証するためには、さらに調査サンプル数を増やして p-Tau の蓄積が始まる年齢を精査する必要がある。

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。これらの結果から、異種蛋白の凝集物が他の蛋白の凝集を促進しうると考えられた。

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が、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。

課題③

本研究の結果から、動物由来の p-Tau が seed として他の動物種に実験的に伝達する可能性が考えられ、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観察した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、研究結果の意義を精査するとともに伝達リスクを高める要因を検討する必要がある。

E. 結論

課題①の研究により、高齢動物の脳に p-Tau の異常蓄積が生じるが、一般的に市場に流通する若齢の家畜の中樞神経系を除く組織については、それを食べることによる動物由来 p-Tau を摂取するリスクは小さいと考えられた。また、本研究で実施した p-Tau の検出方法は食肉検査施設で行われている検査技術を応用することで実施可能である。そのため、食肉検査を通じて高齢個体を選択的に調査することで p-Tau が蓄積しはじめる年齢に関する疫学的な解析に応用できる。

一方で、イノシシなどのジビエに供される動物については、年齢が不明である場合が多く、摂食部位についても多様であることから、動物由来の p-Tau を摂取するリスクが相対的に高い可能性が考えられる。しかしながら、本研究ではこれらの動物種のサンプル数が少ないため、十分な評価を行うことができなかった。そのため、ジビエに供される動物については引き続き調査することが望ましい。

課題②の研究により、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。本実験では脳においてヒト型 p-Tau を過剰発現マウスを使用したことから、次に課題③では野生型のマウスの脳に蛋白を接種する実験を行った。

課題③の結果により、動物（ネコ）の

脳から抽出した蛋白が野生型マウスに伝達する可能性が示唆された。一方で、山羊の脳から抽出した蛋白をマウスに接種した実験では蛋白の異常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。また、本実験では直接的に脳に蛋白を接種したが、実際には消化管を介した摂取が想定される。そのため、消化管からの摂取量および神経組織への移行についても考慮する必要がある、今後の研究課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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

- ① 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）

ームズ、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）

- ② 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）
- ③ チェンバーズジェームズ「動物の中樞神経系アミロイド」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）
- ④ James Chambers 「Comparative pathology of protein aggregates in the central nervous system」 Asian Pacific Prion Symposium 2024：2024 年 12 月 1 日（札幌、ハイブリッド開催）
- ⑤ 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）

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