

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20380166

研究課題名(和文)

プリオン遺伝子欠損細胞の株化と種々のプリオン遺伝子再導入による感受性細胞株の樹立

研究課題名(英文)

Immortalization of prion protein deficient cell lines and establishment of prion-susceptible cell lines by introduction of prion protein genes.

研究代表者

小野寺 節 (ONODERA TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：90012781

研究成果の概要(和文)：

我々はすでに、2種類のプリオン遺伝子欠損マウス(I型、Zur Iマウス、II型Riknマウス)の骨髄細胞を用いてマクロファージの株化に成功し、数クローンを維持した。したがって株化されたマクロファージ細胞を用いて、マクロファージの機能を検索するとともに、病原体の増殖能を検討した。

Iwamaru, Y.: Journal of Virology 81:1524-1527, 2007の論文によると、Rikn型プリオン遺伝子欠損マウス由来ミクログリア株にChandler株や様々なスクレイピー株を感染させても何ら病原体の増殖が見られないという。

ハムスターPrP遺伝子をプリオン遺伝子欠損マクロファージに導入して、再導入細胞株を得る。この細胞に263Kプリオン病原体を感染させ、プリオン増殖のシグナルが得られるかを検討する。陽性対照としては263K株を接種したハムスター脳乳剤を用いた。

病原体増殖のシグナルが、ウエスタンブロッティングにより見られたものにおいて、細胞乳剤のハムスター脳内接種を行った。この際、培養細胞で12回継代したものをを用いた。さらに、通常のハムスター継代263K株との差異を観察した。その結果一部の動物において発症が見られた。

研究成果の概要(英文)：

After prion infection, an abnormal isoform of prion protein (PrP(Sc)) converts the cellular isoform of prion protein (PrP(C)) into PrP(Sc). PrP(C)-to-PrP(Sc) conversion leads to PrP(Sc) accumulation and PrP(C) deficiency, contributing etiologically to induction of prion diseases. Presently, most of the diagnostic methods for prion diseases are dependent on PrP(Sc) detection. Highly sensitive/accurate specific detection of PrP(Sc) in many different samples is a prerequisite for attempts to develop reliable detection methods. Towards this goal, several methods have recently been developed to facilitate sensitive and precise detection of PrP(Sc), namely, protein misfolding cyclic amplification, conformation-dependent immunoassay, dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay, capillary gel electrophoresis, fluorescence correlation spectroscopy, flow microbead immunoassay, etc. Additionally, functionally relevant prion-susceptible cell culture models that recognize the complexity of the mechanisms of prion infection have also been pursued, not only in relation to diagnosis, but also in relation to prion biology. Prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell lines that can clearly elucidate PrP(C) functions would contribute to understanding of the prion infection mechanism. In this review, we describe the trend in

recent development of diagnostic methods and cell culture models for prion diseases and their potential applications in prion biology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：免疫、ウイルス、プリオン、感染症、マクロファージ、細胞不死化、BSE、スクレイピー

1. 研究開始当初の背景

プリオン感染神経細胞には、様々なアポトーシスの見られる事が明らかにされている。そのアポトーシスの機構について、in vitroにおいて、①Gain of functionと②Loss of functionの両面について、その機構を検討する。マウス・スクレイピー株持続感染細胞と、PrP^{Δ132-135}細胞を共培養し、感染が成立するとするならば、以前、Dr. Prusinerのtransgenic mouseに見られるミニプリオンの形成が成立するはずである。

②Loss of functionは、プリオン蛋白及び異常プリオン蛋白をモノクローナル抗体で区別する事は容易ではない。しかし我々の協力研究者である横山は、正常プリオン蛋白には反応するが、異常プリオン蛋白とは反応しないモノクローナル抗体を樹立した(Yokoyama, et al. J. Biol. Chem. 276: 11265-11271, 2001)。このモノクローナル抗体を、プリオン感染マウス細胞株(N2a-sc)に反応する事により、正常プリオン蛋白の増減の測定が可能と考えられる。

2. 研究の目的

近年、日本においてはBSEが発生し、すでに36頭になっている。しかし、BSEの原因については、プリオン蛋白質と呼ばれる正常な生体にも存在するタンパク質の変性であることが、これまで知られているものの、プリオン病の発病機構ならびに正常プリオン蛋白質(PrP^c)の機能は未だ明らかにされていない部分がほとんどである。したがって、1) 異種プリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製。2) 1) で解析したマウスに由来する細胞株の樹立。3) 新たなトランスジェニックマウスの作製。4) PrP^c または、PrP^c 類似タンパク質 Doppel と相互作用する分子の探索

の手法によって、プリオン病の発病機構ならび、PrP^c の機能に関する新たな知見を提示する。また、肉骨粉消毒における条件設定マウスの材料を1) より得る。

3. 研究の方法

- ①□我々が樹立したプリオン蛋白欠損、不死化神経細胞に対して、プリオン遺伝子、変異型プリオン遺伝子、ハムスター型プリオン遺伝子を導入し、新たに形成された細胞株にマウス型プリオン22Lを感染させる。この方法により、他種、あるいは変異型プリオン遺伝子存在下で、病原体増殖を観察する。
- ②□新生マウスに、Tsukuba-1株プリオンを経口感染させ、gut closure以前の時期のマウスにおいて、病原体の腸管感染経路を確認する。

4. 研究成果

- 1) HpL3-4細胞株に、モノクローナル抗体3F4のエピトープで標識したマウスプリオン遺伝子を導入した。これはマウス・アミノ酸(ss)の108をL→M、111をV→Mに変化させたものである。この方法により、外部から感染させたマウスプリオン株22Lは、3F4と反応せず、denovoで合成されたプリオン増殖のみが、モノクローナル抗体3F4と反応する。この様に、合成されたHpL3-4M、3F4PrP株を、14回継代したところ、96.3%が、PrP^c陽性であり、69回継代したところ、97.6%がPrP^c陽性反応を示し、次の22L感染実験には充分に使用できる事が明らかとなった。
- 2) 次にこれらの細胞株に、マウス順化スクレイピー-22L株マウス脳を用いて、感染させた。その結

果、1週間後には、PrP^{sc}の業績が見られた。陰性対照として、Mo3F4PrPを導入しないHpL3-4にマウス脳を感染させても病原体の増殖は見られない。さらに、HpL3-4、Mo3F4PrP株に、22Lを感染させなければ、PrP^cは検出されるが、PrP^{sc}は検出されない。

- 3) このHpL3-4Mo3F4PrP株は、病原体の持続感染を行い、14回持続感染継代細胞株は、14%がPrP^{sc}陽性であるが、69回持続感染継代細胞株は、60%がPrP^{sc}陽性である。C. Weissmannのグループが用いているN2a細胞株ではその必要が無く、今の所、世界で最も感受性の高い細胞株といえる。
- 4) 11回継代した22L株を、高感受性マウスtga20に脳内接種して、その病原性を確認した。その結果、脳継代原株では、803日の潜伏期を示し、HpL3-4Mo3F4PrP株は、116日の潜伏期を示した。マウス脳ほどではないが、細胞継代株充分に毒力を示す事が明らかとされた。
- 5) 次に、病原体は、神経細胞体でなくて、培養上清にも放出されるか否かを検討した。もし、上清に病原体が放出されれば、生化学的解析が容易となるからである。その結果、上清を移されない細胞株では、PrP^cのみが検出されたが、上清を移された細胞株では、PrP^c、PrP^{sc}両方が検出された。
- 6) HpL3-4株に変異を導入する事によって見られる病原体感受性の変化を観察した。その結果、A132V変異により感受性は消失したが、V201Iの変異により感受性の増殖されるのが明らかとされた。次に144のアミノ酸がトリプトファンからチロジンに変化したL42PrP遺伝子を導入して、3F4エピトープ標識したものをを用いた際は、病原体の増殖は全く見られなかった。
- 7) これらの変異と感受性については、一定の法則性が見られた。つまり、132、150、167、189、204、144に変異が入ると感受性は低下する。しかし、183、202に変異が入っても感受性の低下は見られない。
- 8) これは、PrP^cの立体構造において、アミノ酸の側鎖が分子の内側を向いている時は、PrP^{sc}または、介在分子との接触が影響されないため、増殖に変化を示さないと考えられる。
- 9) 次に、マウス実験として、脳内接種より、経口感染の方がより自然に近いとの観点から、様々の週齢のマウスに、Tsukuba-1株を経口感染して、腸管粘膜上皮の吸収像を免疫組織化学的に観察した。
- 10) 2週齢マウスでは、十二指腸、空腸全体にわたって、円柱上皮より吸収像が見られた。しかし、3週齢マウスでは、一部の細胞にのみ吸収像が見られ、25日齢は全く吸収像が見られなかった。これは、PrP^{sc}吸収のgut closure像を示すものと考えられた。これらの吸収像は、乳清の添加により増強された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Ano Y and Onodera T et al. Enhanced enteric invasion of scrapie into villous columnar epithelium via immunoglobulin. *Int. J. Mol. Med.* 26:845-851, 2010. 査読有り
2. Uraki R, and Onodera T et al. Enhancement of phagocytic activity by prion protein (PrP) in PrP-deficient macrophage cells. *Int. J. Mol. Med.* 26:527-532, 2010. 査読有り
3. Ano Y, and Onodera T et al. Neuronal oxidative stress from NADPH oxidase among microglial cells infected with encephalomyocarditis virus. *Neurosci. Lett.* 469:39-43, 2010. 査読有り
4. Nitta, K., Sakudo, A., Masuyama, J., Xue, G., Sugiura, K., and Onodera, T.: Role of cellular isoform of prion protein in the function of macrophages and dendritic cells. *Protein Pept. Lett.* 16:239-244, 2009. 査読有り
5. Sakudo, A., Wu, G.Y., Onodera, T., and Ikuta, K.: Transient production of abnormal prion protein requires the octapeptide repeat region of prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365:164-169, 2008. 査読有り
6. Wu, G.Y., Nakajima, K., Ano, Y., Takeyama, N., Yukawa, M., Taniuchi, Y., Sakudo, A., and Onodera, T.: Species-specific anti-apoptotic activity of cellular prion protein in a mouse PrP-deficient neuronal cell line transfected with mouse, hamster and bovine *Prnp*. *Neurosci. Lett.* 466:11-15, 2008. 査読有り
7. Nishimura, T., Sakudo, A., Xue, G., Ikuta, K., Yukawa, M., Sugiura, K., and Onodera, T.: Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377:1047-1050, 2008. 査読有り

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

小野寺節、杉浦勝明食品におけるプリオン汚染リスク (食の安全科学の展開) シーエムシー、2011、総ページ数22.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
東京大学食の安全研究センター
http://www.frc.a.u-tokyo.ac.jp/list/list_bse.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺節 (ONODERA TAKASHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：90012781