

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22249034

研究課題名（和文） プリオン蛋白異常化分子機構の解明

研究課題名（英文） To study the molecular mechanism of prion protein conversion

研究代表者

北本 哲之（KITAMOTO TETSUYUKI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20192560

研究成果の概要（和文）：

バンクボール PrP を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、神経症状を呈し、病理では海綿状変化と異常型プリオン蛋白の沈着を認める。つまり、自然発病するプリオン病のモデル動物としての可能性を秘めていた。発病した脳をもちいて、野生型マウスやバンクボール PrP を遺伝子導入したノックインマウスを作製し感染実験を行った。しかし、いずれの動物に対しても感染性を示さないことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression model for Bank vole prion protein (PrP) showed clinical signs of prion disease, spongiform changes and abnormal PrP accumulations in the brain. Therefore, this transgenic mice have a possibility as an animal model for spontaneous prion diseases. We examined the transmission studies with the wild mice and the knock-in mice having bank vole PrP (Ki-Bank) There were no successful transmissions from the transgenic mouse brains. Therefore, it is clear that the PrP conversion is imperfect in this transgenic model. However, it is coming out that this Ki-Bank is a useful animal model for the experimental transmission.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	16,300,000	4,890,000	21,190,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2012年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、神経疾患の中では早くから感染モデルが存在し研究に役立ってきた。また、ヒト型プリオン蛋白遺伝子を導入したモデルマウスなど、申請者を含めて世界的にも多くのモデルマウスが作製され、ヒト・プリオン病の感染に対する病態解明、とりわけ硬膜移植後 CJD の感染源追求や vCJD 感染の感受性検定などに役立ってきた。しかし、感染因子プリオンが体外から入った感染モデルとは異なり、現実のヒトでは、孤発性 CJD も遺伝性 CJD もプリオン蛋白の spontaneous conversion (自発的異常化) によって引き起こされる病態である。そして、残念ながら自発的異常化を示すモデル動物は未だ誰も作成に成功していないのが現状であった。

我々は、自発的異常化のモデルを目指して、Hsiao らの GSS の過剰発現トランスジェニック・マウス (以下 Tg マウスと略す) を作成したが、すでに報告されているようにアミロイド斑のみ陽性であったが、プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白も海綿状脳症も作成することが出来なかった。しかしながらこの際、確立した Tg マウスの作成法を利用し、スクレピーンに対して感受性が高い齧歯類と言われる Bank vole (西洋ヤチネズミ、以下 Bv と略す) から PrP 遺伝子をクローニングし、Tg-Bv を作成したところ驚くべきことに、10 倍程度高い発現量の Tg-Bv#920 系統では 250 日以内に、4 倍程度の発現量の Tg-Bv#495 系統では 500 日以内にプリオン病の症状を示し、脳では異常型プリオン蛋白の沈着と海綿状脳症を認め、ウエスタンではプロテアーゼ抵抗性のプリオン蛋白も陽性であるという結果を得た。

現在まで、我々も含め世界中で野生型動物のプリオン蛋白遺伝子を用いて Tg マウスは

作成されているが、それぞれ導入した遺伝子と同じ動物種のプリオン感染に対する高い感受性を示すのみで、いかなる Tg マウスも自発的異常化を示すことはなかった。つまり、Tg-Bv は世界で初めてプリオン蛋白の自発的異常化を解析できるモデルマウスであることが我々の手で証明されつつある。このマウスを用いて、プリオン蛋白の異常化の分子機構を解明することが本研究の目的である。

## 2. 研究の目的

我々は、プリオン蛋白が自然に異常化を起こし (プリオンの投与なしに)、プリオン病を自然発症するトランスジェニック・マウスの作成に世界で初めて成功した。導入遺伝子は、Bank vole という齧歯類のプリオン蛋白遺伝子で、野生型の遺伝子を過剰発現させたものである。従来から、マウス・プリオン蛋白やハムスター・プリオン蛋白のトランスジェニック・マウスは我々も含め多くの施設で作成されてきたが、プリオン病を自然発症するモデルの報告はない。我々の作成した Bank vole 遺伝子とマウスおよびハムスターの遺伝子を比較検討しプリオンの自発的な異常化のメカニズムを解明することが本研究の主な目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 過剰発現系モデルの経時的観察

過剰発現モデルである、Tg-Bank vole PrP の 2 系統に関して、異常プリオン蛋白の検出時期、海綿状脳症の出現時期など時間経過とともに観察する。

### (2) 発病モデルの感染実験

最も重要な実験であるが、発病した Tg-Bank vole PrP の脳を野生型マウスやバンクボールに直接感染実験を行う。バンクボールは輸入規制などの制限が存在したので、

Bank vole PrP を homologous recombination で導入したノック印マウス (Ki-Bank) を作成して感染実験を行った。

### (3)新しいモデル動物の作成

Bank vole とマウス、そしてハムスターPrP のシーケンスを検討した結果、C 末端のシーケンスが bank vole にユニークであることが明らかになった。今回の研究では、この C 末端のシーケンスに注目して新しいトランスジェニックマウスを作成するとともに、先に述べたように Ki-Bank というノック印マウスを作成した。

## 4. 研究成果

### (1)経時的観察

この研究は、プリオン病感受性動物である Bank vole の PrP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスモデルを作成中に、過剰発現のモデルにおいて 10 倍発現量では 250 日前後で、4 倍発現量では 500 日前後で自然に神経症状を示し、組織学的に典型的な spongiform changes, gliosis, abnormal PrP 沈着を呈するマウスを見出したことに端を発する。

今年度は、まず 250 日前後で発病する Tg-Bv#495 を用いて、どの時期から病理所見が認められるのかを、生後から 30 日、60 日、90 日、120 日、150 日、180 日、210 日、240 日と経過を追って観察した。この観察によって、120 日ころから最初に異常プリオン蛋白の沈着が出始め、徐々にその沈着量が増えるにつれて、spongiform changes や gliosis が認められることを明らかとした。神経症状がでて死亡する期間の約半分で異常化を検出できることが明らかとなった。さらに、Tg-Bv#495 を用いて、各種のプリオンで感染実験を始めた。もちいたプリオンは、マウスに純化した F1 株、ヒト MM1 プリオン、BSE プリオン、vCJD プ

リオンなどである。これらの感染実験では、予想通り、Tg-Bv#495 は高い感受性を示し、100 日前後の潜伏期間で発病することが明らかになった。しかしながら、Tg-Bv#495 では 250 日後に自然に発病する系であるので、正常の発現量モデルであるノックインマウスを作製することにした。平成 22 年度中には、Ki-Bank vole の作製に関しては、ES 細胞を用いた homologous recombination、germ-line 化に成功している。

### (2)発病モデルの感染実験

平成 23 年度にノックインマウスである Ki-Bank vole の樹立に成功し、感染実験を始めた。このノックインマウスの発現量は、マウス PrP の発現量と全く同じで、8 個のアミノ酸だけがことなる Bank vole PrP である。発病した脳を、野生型マウスや bank vole PrP を遺伝子導入したノックインマウス (Ki-Bank) を作製して、感染実験を行った。Tg-BvPrP の脳はいずれの動物に対しても感染性を示さないことが明らかとなった。つまり、Tg-BvPrP はプリオン病のモデルとしては不完全で、海綿状態と部分的な異常化を示したのみで異常型プリオン蛋白と呼べるものでないことが明らかとなった。

### (3)新しいモデル動物の作成に関して

Ki-Bank の感染実験は、平成 23 年度から開始したが、非常に感受性が高いため短い潜伏期間で結果が出つつあり、非常によい動物モデルの樹立に成功しそうである。感染実験の中でも、驚いたのがヒトプリオンに対する感受性の高さである。Ki-Bank にマウスプリオンである F1 株を接種したところ、310 日程度の潜伏期間が必要であったが、ヒトの MM1 を接種したところ 280 日前後で発病が認められた。これは、げっ歯類 PrP のモデルマウスでは信じられない感受性である。ちなみに、野生型マウスではヒトプリオ

ンのMM1の潜伏期間は、600日以上必要であり、感染効率は20%に満たないという感受性の低さなのである。また、動物プリオンの感染でもBSEなどに高い感受性をしめしているが、一番のハイライトはヒトのMM2C(コドン129Met/Metでタイプ2の異常プリオン蛋白をもつ皮質型CJD)の感染実験に成功したことである。MM2Cは、あらゆるヒト型の遺伝子導入マウスでも感染実験に成功せず、バイオアッセイが不可能なヒト・プリオンであった。しかし、Ki-BvPrPを用いることで今後MM2Cプリオンに対する滅菌法の開発などが飛躍的に進むことが可能となった。

このように高い感受性を示すBank voleのPrP分子を解析するため、N末端とC末端のみBank voleに変更したトランスジェニックマウスを作製も行い、本研究は予想外の展開を見せている。

#### 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22件)

- (1) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 査読あり 2013 (in press). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595947>.
- (2) Iwasaki Y, Yokoi F, Tatsumi S, Mimuro M, Iwai K, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene codon 232 and type 1+2 prion protein. *Neuropathology*. 査読あり 2013 (in press) doi:10.1111/neup.12013.
- (3) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between Clinicopathological Features and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Japanese Patients with Genetic Prion Diseases. *PLoS One*. 査読あり 8(3): 2013;e60003. doi:10.1371/journal.pone.0060003.
- (4) Xiao X, Yuan J, Haik S, Cali I, Zhan Y, Moudjou M, Li B, Laplanche JL, Laude H, Langeveld J, Gambetti P, Kitamoto T, Kong Q, Brandel JP, Cobb BA, Petersen RB, Zou WQ. Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease. *PLoS One*. 査読あり 8(3): 2013;e58786. doi:10.1371/journal.pone.0058786.
- (5) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読あり 432(1): 2013 Mar 1, 86-91. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.081.
- (6) Takeda N, Yokota O, Terada S, Haraguchi T, Nobukuni K, Mizuki R, Honda H, Yoshida H, Kishimoto Y, Oshima E, Ishizu H, Satoh K, Kitamoto T, Ihara Y. Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different

- disease courses: Aclinicopathological study. *J Neurol Sci.* 査読あり 312: 2012 , 108-116.  
doi:10.1016/j.jns.2011.08.008.
- (7) Kobayashi A, Mizukoshi K, Iwasaki Y, Miyata H, Yoshida Y, **Kitamoto T** . Co-occurrence of types 1 and 2 PrPres in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1. 査読あり *Am J Pathol* 178: 2011, 1309-1315.  
doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.069
- (8) Takeuchi A, Komiya M, **Kitamoto T**, Morita M. Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve. *Microbiol Immunol.* 査読あり 55(7); 2011, 502-509. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00340.x.
- (9) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, **Kitamoto T**, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med.* 査読あり 17: 2011, 175-178.  
doi:10.1038/nm.2294.
- (10) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, **Kitamoto T**, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. *Neuropathology.* 査読あり 31: 2011, 540-548.  
doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01192x.
- (11) Yokoyama T, Takeuchi A, Yamamoto M, **Kitamoto T**, Ironside JW, Morita M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 査読あり 498: 2011 , 119-123.  
doi:10.1016/j.neulet.2011.04.072.
- (12) Nishimoto Y, Ito D, Suzuki S, Shimizu T, **Kitamoto T**, Suzuki N. Slow-progressive ataxia with a methionine-to-arginine point mutation in codon 232 in the prion protein gene (PRNP). *Clin Neurol Neurosurg.* 査読あり 113: 2011 , 696-698.  
doi:10.1016/j.clineuro.2011.04.009.
- (13) Kono S, Manabe Y, Fujii D, Sakai Y, Narai H, Omori N, **Kitamoto T**, Abe K. Serial diffusion-weighted MRI and SPECT findings in a Creutzfeldt-Jakob disease patient with V180I mutation. *J Neurol Sci.* 査読あり 301:2011, 100-103. doi:10.1016/j.jns.2010.10.032.
- (14) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, **Kitamoto T**, Hashizume Y. Survival to akinetic mutism state in Japanese cases of MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease is similar to Caucasians. *Eur J Neurol.* 査読あり 18: 2011 , 999-1002.  
doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03185.x
- (15) Saito Y, Iwasaki Y, Aiba I, **Kitamoto T**, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsy case of MM2-cortical+thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology.* 査読あり 31:

- 2011, 523-530. doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01181.x.
- (16) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, **Kitamoto T**, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand.* 査読あり 121: 2010, 127-130. doi:10.1111/j.1600-0404.2009.01272.x.
- (17) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, **Kitamoto T**. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J. Virol.* 査読あり 84: 2010, 3230-3238. doi:10.1128/JVI.02387-09.
- (18) Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, **Kitamoto T**. Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読あり 391(4): 2010, 1681-1686. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.128.
- (19) Saitoh Y, Ogawa M, Naito Y, Komatsuzaki Y, Tagaya H, Arima K, Tamaoka A, **Kitamoto T**, Murata M. Discordant clinicopathologic phenotypes in a Japanese kindred of fatal familial insomnia. *Neurology.* 査読あり 74: 2010, 86-89. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c7da09.
- (20) Hashimoto T, Ogino K, Shin RW, **Kitamoto T**, Kikuchi T, Shimizu N. Age-dependent increase in lysosome-associated membrane protein 1 and early-onset behavioral deficits in APPSL transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 査読あり 469: 2010, 273-277. doi:10.1016/j.neulet.2009.12.015.
- (21) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, **Kitamoto T**, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol.* 査読あり 54: 2010, 112-121. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00190.x.
- (22) Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nakamura Y, Sato T, **Kitamoto T**, Mizusawa H, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Kuzuhara S, Inuzuka T, Takeda M, Kuroda S, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S, Harada M, Sadakane A, Yamada M. Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain.* 査読あり 133: 2010, 3043-3057. doi:10.1093/brain/awq216.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北本 哲之 (KITAMOTO TETSUYUKI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：20192560

### (2) 研究分担者

( )  
 研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
 研究者番号：