

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成11年度博士課程進学
氏名 中村優子
指導教官 小野寺節

論文題目 : Functional Analysis of Prion Protein in the Cells Infected with Coxsackievirus B

(コクサッキーウイルス感染細胞のプリオン蛋白質機能に関する研究)

伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathies: TSE) は難治性神経変性疾患の一つであり、ヒトにおけるクロツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・スライスラー・シャインカー病など、脳萎縮、神経細胞の脱落と皮質の海綿状変化を特徴とする疾患である。また、ヤギやヒツジにおけるスクレイピー、ウシにおけるウシ海綿状脳症なども TSE に分類される獣医学領域の重要疾患である。TSE はその発症に深く関与すると考えられるプリオン蛋白質 (prion protein: PrP) にちなんでプリオン病とも呼ばれる。これら TSE の発症には遺伝的要因が考えられる場合と、感染性要因が疑われる場合とがある。特に後者においてはプリオン蛋白質が構造変化することにより病原性を獲得し (scrapie isoform of prion protein: PrP^{Sc})、さらには PrP^{Sc} そのものが正常型プリオン蛋白質 (cellular isoform of prion protein: PrP^C) の PrP^{Sc} への変換を引き起こすと考えられている。TSE はこれら感染メカニズムの特異性さらには人獣共通感染症としての可能性などから、非常に注目されている疾患の一つである。

TSE 発症に関与するとされる PrP^{Sc} については、免疫学的、組織学的解析が数多く試みられ、知見が得られてきた。しかし、PrP^{Sc} は凝集体を形成していると予想されており、その高次構造の解析は困難で、生化学的な性質は未同定のままとされている。また、PrP^{Sc} による PrP^C → PrP^{Sc} の変換機構も未だ解明されておらず、TSE 発症は PrP^{Sc} 蓄積によるもの（'gain of function' 仮説）かあるいは PrP^C の消失によるもの（'loss of function' 仮説）であるかも現在明らかとはなっていない。以上の理由から、PrP^C 研究は、TSE における PrP^{Sc} の機能解明への発展性の可能性からも重要であると考えられる。

これまでの研究より PrP^C は種間において高度に保存されていることが判明しており、重要な役割を担っていることが予想される。また、神経細胞や免疫系細胞などに産生が認められることから、神経系におけるシグナル伝達や免疫システムにおける機能が予想される。その正常機能についてはやはり十分な解明がなされていないが、本研究において、ウィルス感染時における PrP^C の機能関与を示唆する新たな知見を得た。

近年、PrP^C に RNA, DNA に対する結合能力があることが報告され、さらに、核酸存在下で PrP^C が凝集体を形成することが報告された。これらの知見は PrP^C が凝集体を形成し、PrP^{Sc} へと変換する過程を解明する手がかりになる可能性があり、注目される。また、murine leukemia virus によるスクレイピー病態の促進など、TSE における PrP とウィルスの関連を示唆する報告がある。しかし、ウィルス感染における PrP^C の機能解析に主眼をおいた研究は未だなされていない。そこで本研究では、ヒト乳児期、幼児期に顕性感染として症状を呈し、脳炎や心筋炎の原因ウィルスとして知られるエンテロウィルス科コクサッキーウィルス B 群(CVB) を用いた解析を試みた。

まず第一章にて、プリオン遺伝子(prion protein: *Prnp*)欠損細胞が CVB に対し高感受性を示すことが確認され、また CVB 検出系としての応用利用が可能であることが示された。さらに、CVB 感染における PrP^C の機能解析をより詳細にすすめることを試みた。まず、PrP^C の機能を検討できる *in vitro* の系を確立するため、第二章にて、*Prnp* 欠損不死化神経細胞株を用い、*Prnp* 再導入株の構築を行なった。最後に、第三章にてこれら細胞株を用いた PrP^C の CVB 感染時における機能解析を試みた。

まず、新生児 *Prnp* ノックアウトマウスおよび野生型マウスより脳初代培養を行い、CVB 感染実験を試みた結果、ノックアウトマウス由来、野生型マウス由来細胞双方において細胞の円形化および剥離を主徴とする細胞変性効果 (CPE) が観察された。しかし、*Prnp* ノックアウトマウス脳初代細胞におけ

る CPE は野生型マウス脳初代細胞のものに比べ、早期に、より顕著に観察される傾向が認められた。CVB は生後 1 週間以内の新生児マウス脳における増殖が非常に効率的とされるが、これは CVB の主要なレセプターの発現がこの時期に高いことが一因と考えられている。上記結果は、*Prnp* 欠損により幼児期マウス脳細胞における CVB 感受性がさらに高くなる可能性を示唆する。また、CVB の分離同定においては、サル腎細胞の初代培養や乳飲みマウスへの接種が最良とされるが、その効率、コストを考慮すれば、CVB 分離培養、同定に適した高感受性の細胞株の樹立が必須である。そこで、本章ではさらに、*PrP* 欠損細胞の CVB 高感度検出系への応用が可能か検討を行った。より安定したウィルス感染、および検出成績を比較検討するため、胎児 *Prnp* ノックアウトマウス海馬領域より樹立された細胞株、HpL3-4 を用い、CVB 分離、同定に使用されるヒト HEP-2, HeLa 細胞との CVB1-6 に対する感受性の比較を行った。その結果、HpL3-4 の TCID₅₀ 値は、CVB1, 3, 4, 5 感染において HEP-2, HeLa 細胞に比して有意に高く、また、その CPE は HEP-2, HeLa 細胞より早期に表れた。CVB 感染 HpL3-4 細胞および上清中のウィルスカ価は、HEP-2, HeLa 細胞の約 10 倍を示した。これらの結果より HpL3-4 では微量なウィルスサンプルの感染においてもより明瞭な CPE を得る事が可能であり、ウィルス分離の確立が高いことが示唆される。また、HpL3-4 は CVB 感染によりブラックを形成するため、より簡便なウィルスカ価測定が可能である。本章の結果より *Prnp* 欠損細胞株 HpL3-4 は、CVB 分離、増殖に非常に有用であることが示された。また、胎児期、新生児マウスにおける CVB 高感受性が、CVB レセプター発現量の高さだけでなく、*Prnp* の発現量の低さにも関与することも推察できる興味深い知見であると考えられた。(第一章)

しかし、さらにウィルス感染時における PrP 機能解析を *in vitro* で解析するためには詳細な検討が必要であり、HpL3-4 を用いた *Prnp* 欠損細胞株および *Prnp* 再導入株の樹立を試みた。これまでに報告された *in vitro* の PrP 研究においては、*Prnp* を有し、PrP を発現している細胞株へ一過性に PrP 過剰発現させた系であった。遺伝子導入による *Prnp* 再導入株の樹立は、これまで困難とされており、現在でも効率的な遺伝子導入法が模索されている段階である。本系ではサイトメガロウィルスプロモーターを有するベクター pIRES-Hyg を用い、*prnp* ORF 上流にコザックシーケンスを挿入したプラスミドを構築、さらに遺伝子導入後フローサイトメトリーによる迅速で効率的なクローニングを行なう等の工夫を試みた。結果、*Prnp* 再導入株の樹立に成功し、既に神経細胞で報告されたと同様の PrP の細胞表面に

おける産生局在および糖鎖付加パターンを示すことも確認した。また、*Prnp* 欠損、再導入株は共に神経細胞様の性質を保持していると考えられた。本章は *in vitro* における 'loss of function' の解析が可能なシステムの確立に関する最初の報告である。(第二章)

最後に第二章で得られた細胞株を用いることで、CVB3 感染時における *Prnp* 欠損、再導入両細胞株の比較検討を試みた。その結果、*Prnp* 欠損、再導入株双方において CVB3 感染が成立するものの、再導入株では *Prnp* 欠損株に比し、CVB3 増殖および CPE の抑制が認められた。さらに、CVB3 感染初期に再導入株で IFN- α , β mRNA の転写が認められたのに対し、*Prnp* 欠損株では検出限界以下であった。この結果は感染初期の IFN- α , β 産生の差異が両細胞株における CVB3 増殖効率を決定する一因となることを示唆する。さらに、*Prnp* 欠損株では CVB3 感染による DNA 断片化およびミトコンドリア膜電位の低下が強く誘導されることが明かとなった。これらより PrP 欠損細胞では CVB 感染がアポトーシスによる細胞死を強く誘導するのに対し、PrP 存在下ではミトコンドリア膜電位を伴うアポトーシスシグナル伝達が抑制されることが示唆された。(第三章)

PrP が Type I interferon 産生やミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナル伝達にどのようなカスケードを経て関与するかは今後さらなる研究を進める必要がある。しかし、PrP が細胞膜上のシグナル伝達の重要な場であると考えられる raft に存在するタンパク質であり、PrP 欠損によりウイルス感染による複数のシグナル伝達の抑制・阻害がおこる可能性が考えられる。また、PrP 欠損細胞株を利用したウイルス分離等、応用法としての報告は他になく、今後の研究の方向性がさらに拡大すると考えらる。したがって本研究結果は今後の PrP の機能解析の一端を担うものと考えられる。