

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 優子

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が、PrP^{Sc} による PrP^C → PrP^{Sc} の変換機構は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。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、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重要な機能が予想される。本博士論文は、ウイルス感染時、特にエンテロウイルス科コクサッキーウイルス B 群 (CVB) 感染時の神経細胞における PrP^C の機能関与を示唆した新たな知見である。

まず第一章にて、プリオン遺伝子 (prion protein gene: *Prnp*) 欠損細胞 HpL3-4 が CVB に対し高感受性を示すことが確認され、また CVB 検出系として応用利用が可能であることが示

された。しかし、さらにウイ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、まず、PrP^cの機能を検討できる *in vitro* の系を確立するため、*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（第二章）。得られた細胞株は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。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。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 増殖および細胞変性効果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。PrP が Type I interferon 産生やミトコンドリアを經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。以上より、審査員一同は本人が博士（農学）の資格を十分に有すると認定した。