

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成12年度博士課程 進学

氏 名 徐 聖 旭

指導教官名 小野寺 節

論文題目 **Studies on transgenic mice expressing oryx (*Oryx dammah*) prion protein**
(シロオリックスプリオン蛋白遺伝子を有するトランスジェニックマウスに関する研究)

伝達性海綿状脳症はヒトや、ヒツジ、ウシなど多くの哺乳動物に見られる神経変性疾患であり、プリオン蛋白の異常によって起こるプリオン病である。その中でも、ヒトにおいてはクールー、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、家畜反芻獣であるヒツジ、ウシではそれぞれスクレイピー、牛海面状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy、BSE) であることが知られている。BSE 汚染肉骨粉がウシに与えられたことにより BSE が拡大したとされ、また BSE に感染した牛の肉をヒトが食べることでより変異型 CJD を引き起こした可能性が報告されている。このことから、本疾患は種を越えて伝達する可能性があり、プリオン病の病原因子を迅速に検出できる系の確立が求められている。

現在興味深いことに、イギリスの動物園でシロオリックスでのスクレイピー発症が報告された。それは家畜反芻獣に比べて、スクレイピー発症までの期間が短く、発症後の経過も急激である。ヒツジが 36-48 ヶ月、ウシが 30-72 ヶ月の潜伏期間なのに対して、飼育状況から潜伏期間が 21 ヶ月程度であろうと考えられている。一方、ヒツジプリオン蛋白遺伝子(ShePrP)を発現したマウスにおいて、壊死性筋炎が見られ、同時に、ヒツジスクレイピー-病原体においては、野生型マウスより潜伏期の短いことは良く知られている事である。そこで本研究では、シロオリックスプリオン蛋白遺伝子(OrPrP)

を有するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、外部から導入した正常プリオン蛋白をコードする OrPrP の発現を調べることと、その発現が認められた組織について病理組織学的に検討した。さらに、スクレイピー病原体の接種により本マウスの感受性について検討し、高感度診断技術を開発することを目指した。

第 1 章 本章では、他動物と OrPrP の塩基配列を比較することと、作成された 4 系統の Tg(OrPrP)マウスにおいて導入遺伝子の発現とその影響について解析を行った。まず OrPrP の全塩基配列を決定するため、国立科学博物館より供与されたシロオリックスの筋組織より DNA を抽出し、PCR 法により得られた DNA 断片をクローニングし、塩基配列を決定した。塩基及びアミノ酸配列の結果、シロオリックスのプリオン蛋白遺伝子 ORF は、771bp であり 256 アミノ酸をコードしていた。文献的に調べたアラビアオリックス *Arabian oryx (Oryx leucoryx)* とは同じ配列を示した。これはヒツジの塩基配列とは 10 塩基異なり、アミノ酸配列は 1ヶ所異なっていた。以上の結果を参考に、OrPrP を全身で過剰発現するトランスジェニックマウス作製のため、ベクター-pCAGGS のアクチンプロモーターの下流に OrPrP cDNA を組み込んだ。得られた構築ベクターをマイクロインジェクション法にて受精卵に導入し、OrPrP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これより 4 系統、Tg(OrPrP)34, Tg(OrPrP)36, Tg(OrPrP)42, Tg(OrPrP)50 で OrPrP の遺伝子導入が確認された。しかしこの 4 系統中、Tg(OrPrP)34 と Tg(OrPrP)42 が 107 日目に突然死を起こした。死亡した Tg(OrPrP)42 マウスの脳、肝臓、肺、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉において病理組織学的に調べた結果、海馬錐体細胞の変性萎縮が観察された。しかしながら、グリア細胞の反応は見られなかった。Tg(OrPrP)34 マウスでは、骨格横紋筋の一部硝子様変化が観察されたが、他の組織では異常が見られなかった。以上のことより、突然死の Tg(OrPrP)34 マウスと Tg(OrPrP)42 マウスは脳、骨格筋で過剰発現が起こり、その原因により死に至った可能性が示唆された。脳、骨格筋における Tg マウス病変については、以前に Tg(ShePrP)マウスについて報告されている。今回作製した Tg(OrPrP)マウスにおいても、脳、骨格筋において病変が観察された。

第 2 章 突然死を示さなかった Tg(OrPrP)マウスにおける OrPrP 発現の検討と、その発現量が及ぼす組織への影響について解析を行った。オリックス Tg マウスでは、 β -アクチンプロモーターの作用により筋組織での過剰発現が生じたと考えられた。脳、肝臓、肺、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉における RNA レベルでは、脳、心臓、筋肉においてのみ発現が認められた。蛋白レベルでは、Tg マウスの脳以外に、心臓、骨格筋に過剰に産生していることが明らかにされた。脳でも免疫沈降法及び免疫染色により OrPrP の産生が確認された。心臓での OrPrP の過剰発現が及ぼす影響について、Tg(OrPrP)マウスを週齢別に心電図の測定を行った結果、30 から 70 週齢オリックス Tg マウスにおいて心電図の QRS の R 波形の異常波形が確認された。対照である C57BL/6 マウスにおいては同週齢でこの様な波形は観察されなかった。一方、心電図の測定により異常

が見られた Tg(OrPrP)マウスの心臓における病理組織学的検討によると、30 週齢以上から心室部心筋全体に散在する心筋細胞の空胞変性が多数観察された。この結果から、OrPrP の心臓での過剰発現は、空胞変性及び心筋異常を伴うものであることが示唆された。原因として予想されるのは、Tg マウス作製の際、筋組織特異的アクチンプロモータの作用から心筋細胞に過発現が発生し、空胞変性が生じたことにより正常な心筋細胞が減るため、心臓全体としての起電力が小さくなり、心電図の異常な波形が測定される可能性が考えられた。この様な心筋病変は、以前に報告された Tg(ShePrP)マウスでは観察されていない。したがって、Tg(OrPrP)マウスを用いて我々の研究において初めて観察された事実である。このマウスは、今後の拡張性心筋症研究の疾患モデルを提供したと考えられる。

第 3 章 プリオン病は種を越えて伝達する可能性があり、その病原因子を迅速に検出できる系の確立が求められている。免疫検査法 (ELISA 等) によるプリオン病原体の検出は迅速であるが検出感度が低く、バイオアッセイによる検出法では感度は高いが長時間を必要とする。そこで他動物種よりも潜伏期間の短い Tg(OrPrP)マウスを用い、プリオン病原体の接種により異常プリオン蛋白を産生させ、高感度診断技術の開発を目指した。プリオン潜伏期の比較のため、マウス型スクレイピー株 (Tsukuba-1) 20 μ l を 9 週齢 Tg(OrPrP)および野性型マウスに対し脳内接種を行った。スクレイピー感染マウスの病理組織学的検討では、大脳において多数の空胞変性が観察される野生型マウスに比べ、Tg マウスではマウス異常プリオン蛋白により生じる空胞変性、アストロサイトの増殖が OrPrP によって抑制される像が観察された。一方、Tg マウスには明瞭なアミロイド斑が観察された。脾臓では、両マウスとも脾臓中心部に巨大食細胞が観察され、特に Tg マウスにおいて樹状細胞内に明瞭な異常プリオン蛋白の蓄積が見られた。さらに Tg(OrPrP)マウスでは発症と瀕死期がそれぞれ 150-169 日と 158-177 日を示すのに対し、non-Tg マウスは 165-169 日と 169-182 日を示して Tg(OrPrP)マウスが潜伏期間が短いという結果が得られた。Tg(OrPrP)マウスは、脳全体に病原体増殖を示すことから、スクレイピー病原体に対する感受性を有していると考えられ、高感度な検出系に利用できることが期待された。現在、Tg(OrPrP)マウスを用いて、BSE 病原体及びヒツジスクレイピー材料臓器を用いた感染実験を計画中である。これらの感染実験が修了してはじめて、我々の Tg(OrPrP)マウスの有用性が確認されると考えている。

本研究により、OrPrP は 256 個のアミノ酸から成り、プリオン遺伝子に特徴的な配列や、部位はいずれもよく保存されていた。一方、異常型プリオン蛋白の神経細胞内の蓄積が神経細胞空胞変性、神経細胞脱落、海綿状脳症の進行に深く関与していると考えられている。しかし、今回作製された Tg(OrPrP)マウスが心臓において導入遺伝子の過発現により空胞変性を引き起こしていることから、正常型、異常型を問わずプリオン蛋白の過剰蓄積、あるいは過剰発現が細胞の空胞化形成に関与していると考えられた。さらに病理組織学的検討より、海馬錐体細胞の変性、横紋筋の硝子様変化に

より突然死が起った Tg マウスにおいては、それぞれ脳と骨格筋に過剰に OrPrP が発現していた可能性が考えられる。また、神経細胞空胞変性を起こすなど、スクレイピー病原体に対する感受性を有した感染実験の結果より、プリオン病の早期・生前診断法及び畜産物等からの異常プリオン蛋白質の検出法の病態モデルとして Tg(OrPrP)マウスは有用であると期待された。