論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成13年度 博士課程 入学
氏　名　　金 芝 璟
指導教員　　小野寺　節

論文題目　The analysis of ability of odor discrimination and histopathology in *Prnp*$^{-/-}$ mice
(プリオン遺伝子欠損マウスにおける嗅覚変動と病理組織学的研究)

序論

プリオン病は、宿主の正常型プリオン蛋白質（PrP^{C}）が、体内に侵入した異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）へと変換し発症する神経変性疾患である。ヒトのプリオン病ではクールー、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病（GSS）が知られており、家畜ではヒツジのスクレピー、ウシの牛海面状脳症（Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE）が、知られている。特にウシの場合、神経細胞体および突起内における空胞変性が病理組織学的特徴である。GPI アンカーで膜表面に付着している正常型プリオン蛋白質は感染型PrP^{Sc}が入ると結合し、連続的にPrP^{Sc}に変わるものと推定されているが、まだ、PrP^{C}がPrP^{Sc}に変わる過程は不明である。

正常型プリオン蛋白遺伝子の生体での機能を調べる研究のため、世界で何種類のプリオン蛋白遺伝子欠損マウス（*Prnp*$^{-/-}$）が作製された。これらはプリオン遺伝子の欠損

部位によって1型と2型に分かれている。1型であるZrch I 型とEdinburg型 *Prnp*$^{-/-}$マウスは正常に発達する一方、2型であるNgsk型、Rcm0型、ZrchⅡ 型 *Prnp*$^{-/-}$マウスではPrP遺伝子と25%の相同性を持つDoppel (Dpl) 遺伝子が脳に異所発現し、行動異常や小脳プルキンエ細胞の脱落を起こすと知られている。Dpl遺伝子はマウスの場合はPrP 遺伝子の16kb下流域にcodeされており、ヒトの場合は27kb下流域に存在している。Wild type マウスでのDpl 遺伝子は中枢神経系にはあまり存在していないが、心臓や精巣で発現する。しかし、Dplの機能についてはまで明らかになっていない。新たに作られたRikn型 *Prnp*$^{-/-}$マウスは *Prnp* ORF (open reading frame) と intron 2 の一部が欠損され、加齢と伴う運動失調が現れた。そこで、2型Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスにおけるDpl蛋白質と嗅覚の機能の関係および組織学的な解析を目的として研究を行った。

第1章　Type-2 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスの脳に発現するDplの検出

第1章では、Ataxia による行動異常を起こす 2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスと wild type(*Prnp*$^{+/+}$, C57/6BJ)、そして1型Zrch I *Prnp*$^{-/-}$マウスを用いてDplの検出について検討した。*Prnp/Prnd* chimeric mRNAs は週齢に関わらず2型Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスの脳で観察された。さらに大脳、小脳、嗅球に分けてRT-PCRを行った結果、大脳での発現が最も多かったが、918bp, 818bp, 717bp のバンドは三つの部分で差はみられなかった。RT-PCRの結果、野生型と1型Zrch I *Prnp*$^{-/-}$マウスは精巣ではDplmRNAが観察されたが、脳の *Prnp/Prnd* chimeric mRNAs は見られなかった。また、週齢別に発現したDpl蛋白質の検出の結果、5週から90週まで、25－30kDのDpl蛋白質が検出された。これらのことから、Dplは2型Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスの大脳、小脳、嗅球で週齢に関係なく発現していることが明らかにされた。

第2章　*Prnp*$^{-/-}$マウスの嗅覚識別能力の解析

第2章では、1型Zrch I *Prnp*$^{-/-}$と2型Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウス 及び *Prnp*$^{+/+}$マウスの週齢と伴う嗅覚識別能力について検査を行った。各groupのマウスは行動異常が開始する60週を基準として二つに分けてデータの分析を行った。 Simple olfactory test では、マウスを臭覚刺激剤 (0.1%vanilla extract) に露出時、マウスが刺激源を探すまでの時間を測定した。その結果、Prnp+/+と1型Zrch I *Prnp*$^{-/-}$マウスはいずれも週齢に対する変化が認められなかったが、2型Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスでは加齢と共に臭覚に対する反応が遅かった。特に70週齢以上の場合は臭覚に反応するまで約3倍の時間を必要とし

た。Food localization test に用いたマウスは実験の前に節食をさせ、マウスが food (チーズ) を探したり、食べたりするまでの時間を測定、分析した。この実験でも 2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスは他の group と比べて、反応時間が遅く、Simple olfactory test と同一な結果が得られた。さらに、老齢の 2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスにおける運動失調による誤差を排除するために新たな実験が必要となった。それで、ケージの中を仮象の線で二つの区域に分けて各区域にマウスが止まる時間を測定した。*Prnp*$^{+/+}$(野生型)と 1 型 Zrch I *Prnp*$^{-/-}$マウスは刺激剤 (2.5% Lemon extract) に反応して control (滅菌水) の区域に止まる時間が長かったが、2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスは両方に止まる時間で差が現れなかった。これらの結果から、2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスは加齢と伴う嗅覚機能の障害が起こると考えられた。

第3章　*Prnp*$^{-/-}$マウスにおける免疫組織学的分析

さらに第 3 章では、2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスに起こる嗅覚機能の障害による組織学変化を解析した。野生型と 1 型 Zrch I 及び 2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスの脳は週齢別に採取し、作った paraffin 組織切片を用いて組織学的および免疫組織学的検査を行った。2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスで Hematoxyline and eosin 染色を行った結果、大脳の海馬の場合、80 週齢でも組織の変性が見られなかったが、小脳は約 50 週を始め、80 週では強度のプルキンエ細胞の脱落が観察し、残存しているプルキンエ細胞の樹状突起は野生型と 1 型 Zrch I マウスに比べて突起の伸展が不良であるのが認められた。さらに、80 週の嗅球では存在する僧帽細胞の脱落が起こるのを分かった。しかし、フェロモン識別記憶に関与する副嗅球での細胞の脱落や変性は現れなかった。抗-GFAP 抗体を用いて免疫組織学的な観察の結果、2 型 Rikn *Prnp*$^{-/-}$マウスは嗅球の全般で陽性反応が現れたが、特に外叢状層と顆粒細胞層で強度の gliosis が観察された。また、抗-ssDNA(single stranded DNA) 抗体と様々な caspase 抗体を用いて染色したところ、嗅球の僧帽細胞で抗-ssDNA 抗体、caspase－3 抗体に対する反応性が検出された。これらの結果から、嗅球の僧帽細胞では caspase－3 の活性化から誘導されるアポトーシス細胞死が起こると推測された。

今まで Dpl の研究は精巣での機能や小脳のプルキンエ細胞に対して行われていた。

本研究により、脳に異所発現する Dpl 蛋白質は小脳のプルキンエ細胞の変性による運動失調以外に、嗅球の細胞で発現し、僧帽細胞における細胞死に関与しているのを新たに分かった。また、Dpl による嗅球の組織学的変性は嗅覚認識及び識別能力の低下に関与すると考えられる。