

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻  
平成 16 年度博士課程入学

吳 惲英

指導教員： 小野寺節 教授

## 論文題目

The studies on the function of PrP from different species in neuronal survival and the species barrier to prion diseases

(神経細胞の生存における異種プリオン蛋白の機能、及びプリオン病種の壁に関する研究)

## 序論

プリオン病は中枢神経系疾患であり、牛における牛海綿状脳症(BSE), 羊でのスクレイピー、人のクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)などがある。プリオン病において、感染性因子プリオンによる正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)から異常プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)への構造変換と細胞内への蓄積、さらにそれに伴う神経細胞のアポトーシス誘起が病因とされている。PrP<sup>C</sup> は哺乳類の進化の過程の中で保存された膜タンパク質で、様々な組織、特に脳、脊髄の神経細胞、グリア細胞に高発現であり、脳内での銅の代謝、シグナル伝達、神経細胞保護に関わっていると考えられているが、その生理的機能は不明である。これらのことから、PrP<sup>C</sup> の機能解析は、神経細胞における生理機能、またプリオン病の感染、病態を考える上でも重要である。

プリオン病は同一種間での感染に比べ、異種の間での伝達は抑制されていることが知られている。この現象は「種の壁」と呼ばれ、近年、BSE が人に伝達したと考えられる変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)において報告されている。種の壁が存在する理由として、ドナーとレシピエントの PrP<sup>C</sup> の一

次構造が異なること、PrP<sup>Sc</sup> 株の性状差、また PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への変換を促す未知のタンパク質の存在の可能性などが考えられている。プリオンの異種間の伝達を解析するために、様々なトランスジェニックマウスが利用されているが、プリオン病発症までの潜伏期間は長期に及ぶため、細胞株を用いた研究が有用であると考えられる。しかし、現在までのところ PrP<sup>Sc</sup> の感染、複製を維持する細胞株は少数であり、多様なプリオン株に感染可能な細胞株の樹立が必要とされている。

そこで、本研究では、プリオン蛋白(PrP)遺伝子欠損マウスである Rikn 型マウスから単離された神経細胞株である HpL3-4 にハムスター、ウシ、およびマウスの PrP<sup>C</sup> を発現させた細胞株、マウスの PrP<sup>C</sup> を再発現させた細胞株を樹立し、マウス由来神経細胞における異種 PrP<sup>C</sup> のアポトーシス抑制作用に関する機能解析、また、異種プリオンの長期感染を維持できる神経細胞モデルの確立を目的として実験を行った。

## 第一章 異種 PrP<sup>C</sup> 発現不死化神経細胞株の樹立と、PrP<sup>C</sup> の細胞死抑制効果についての解析

ハムスター及びウシの PrP 遺伝子の Open Reading Frame (ORF)をレトロウイルス発現システムである pMSCVpuro ベクターに導入し、ウイルスを産生するためにパッケージング細胞として、PT67 細胞にトランスフェクションした。PT67 細胞から産生された組み換えウイルスベクターを HpL3-4 に感染させ、ハムスター及びウシの PrP 遺伝子導入細胞、HpL3-4-HaPrP 及び HpL3-4-BoPrP を得た。これらの細胞におけるハムスター及びウシ PrP<sup>C</sup> の発現をウエスタンブロットティング、フローサイトメトリーと蛍光抗体法により確認した。さらに、クローン化した HpL3-4-MoPrP, HpL3-4-HaPrP, HpL3-4-BoPrP 細胞を用い、異種 PrP<sup>C</sup> 発現による抗アポトーシス作用について検討した。

以前、我々の研究室は、PrP 遺伝子欠損細胞は野生型マウスから単離された細胞株と比較して血清除去による酸化ストレスに感受性で、アポトーシスが誘導されることから、PrP<sup>C</sup> が神経細胞の抗アポトーシス作用をもつことを明らかにした。そこで今回、HpL3-4-MoPrP、HpL3-4-HaPrP、HpL3-4-BoPrP、または空ベクターを導入した HpL3-4-EM 細胞を用いて、血清除去後、経時的に細胞を回収し、各細胞株の顕微鏡観察、さらに DNA fragmentation assay、トリパンプルー色素排除試験および ELISA によりアポトーシス検出を行った。形態学的解析からは、マウス PrP<sup>C</sup> を再発現した HpL3-4-MoPrP 細胞においては、血清除去による細胞死は確認されなかったが、HpL3-4-HaPrP、HpL3-4-BoPrP、HpL3-4-EM 細胞では円形になり浮遊してくる細胞が多数観察された。さらにこれらの細胞株においては、断片化 DNA が検出され、トリパンプルー色素排除試験、ELISA により死細胞の有意な増加がみられた。以上のことから、マウス由来神経細胞において、マウス PrP<sup>C</sup> はアポトーシス抑制機能を持つが、ハムスター、ウシ PrP<sup>C</sup> はアポトーシスを抑制しないことが示唆された。抗アポトーシス経路において、種特異的な PrP<sup>C</sup> 結合分子の存在が考えられている。ハムスターとウシの PrP<sup>C</sup> はそれら結合タンパクと会合できず、PrP<sup>C</sup> が細胞内で担うべき作用が行われない可能性が考えられる。

## 第二章 マウス、ハムスター、ウシ PrP<sup>C</sup> 発現神経細胞へのマウス、及びハムスターPrP<sup>Sc</sup>の感染実験

細胞に発現している PrP<sup>C</sup>と外界からの異なる種由来の PrP<sup>Sc</sup>の感染について検討することを目的とした。マウスプリオン Chandler 株に持続感染している ScN2a 細胞の乳剤を HpL3-4-EM, HpL3-4-MoPrP, HpL3-4-HaPrP または HpL3-4-BoPrP 細胞の培地中に加え、マウスプリオンのそれぞれの細胞に対する感染を試みた。また、ハムスタープリオン Sc237 株を感染させたハムスターの脳乳剤を HpL3-4-EM, HpL3-4-MoPrP または HpL3-4-HaPrP 細胞の培地中に加え、ハムスタープリオンのそれぞれの細胞に対する感染についても試みた。

感染後、パッセージを Chandler 株感染細胞については 8 回、Sc237 株感染細胞については 3 回繰り返す、それぞれについて細胞を回収後 Proteinase K (PK)を用いて細胞抽出液を処理し、それぞれのプリオンに由来する PK に抵抗性の PrP (PrP<sup>res</sup>)をウエスタンブロッティングと ELISA により検出した。Chandler 株感染において、PrP 遺伝子を発現していない HpL3-4-EM 細胞ではパッセージ 1 (P1)から PrP<sup>res</sup> は検出されなかったが、HpL3-4-MoPrP と HpL3-4-HaPrP 細胞では P1 から P8 に渡って PrP<sup>res</sup> が検出された。しかしながら、HpL3-4-BoPrP 細胞では PrP<sup>res</sup> は検出されなかった。発現している PrP<sup>C</sup>の構造(種による違い)に関らず、マウス、ハムスターの PrP<sup>C</sup> を発現している細胞において、マウスプリオン Chandler 株の持続感染を確認できたが、ウシの PrP<sup>C</sup> を発現している細胞では、感染を確認できなかった。一方、Sc237 株感染細胞については、P1 から P3 について検出を試みたが、すべての細胞について PrP<sup>res</sup> は検出されなかった。プリオン感染について、マウスプリオン Chandler 株およびハムスタープリオン Sc237 株の結果から、種特異的な PrP<sup>Sc</sup>とその感染に関与する細胞内因子の存在が考えられる。今回用いた HpL3-4 細胞はマウス由来であるため、ハムスタープリオンの感染は成立しなかった可能性がある。Chandler 株について、マウス、ハムスターPrP<sup>C</sup> 発現細胞では持続感染が確認されたが、ウシPrP<sup>C</sup> 発現細胞において感染が見られなかったことは、それぞれの PrP<sup>C</sup>の一次構造だけでなく、細胞内及び細胞表面において PrP<sup>C</sup>と種特異的に相互作用する分子が機能していることが考えられ、今後の研究が必要とされる。また、マウス、ハムスターPrP<sup>C</sup> 発現細胞については、持続感染が確認できたことから、細胞内における PrP<sup>Sc</sup>の複製の検討について有用な細胞株であると考えられる。

### まとめ

今回の研究において、異なる種由来の PrP<sup>C</sup> を恒常的に発現する細胞株 HpL3-4-MoPrP、HpL3-4-HaPrP 及び HpL3-4-BoPrP 細胞を得た。マウス由来細胞株において、マウス PrP<sup>C</sup>は、血清除去によるアポトーシスを抑制するが、ハムスター、ウシの PrP<sup>C</sup>はアポトーシス抑制に働かないことがわかった。それぞれの細胞での PrP<sup>C</sup>発現量の検証から、この効果は PrP<sup>C</sup>の種の違いによることが示唆された。これらの結果からアポトーシス抑制における PrP<sup>C</sup>の機能発現には、種特異的な PrP<sup>C</sup>結合

分子の関与が予想され、さらなる解析が必要である。また、今回、マウス PrP<sup>C</sup> 発現細胞、及びハムスター PrP<sup>C</sup> 発現細胞において、マウスプリオン Chandler 株の持続感染を確認した。さらにウシ PrP<sup>C</sup> 発現細胞では感染が見られなかった。このプリオン株においては、マウス、ハムスターの PrP<sup>C</sup> とは共通して働く細胞内因子が存在し、ウシの PrP<sup>C</sup> はその因子と協調することができず、感染が起こらなかったことが考えられる。これらの細胞は、異種の PrP<sup>C</sup> を発現しているマウス細胞株であるため、プリオン感染の種の壁の分子基礎について研究し、考察するための有効なツールであると言える。