

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吳 惲英

---

プリオン病では、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>は様々な組織、特に脳、脊髄の神経細胞に高発現であり、脳内でのシグナル伝達、神経細胞保護に関わっていると考えられている。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。

また、プリオン病は同一種間での感染に比べ、異種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」と呼ばれる。解析には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。しかし、現在まで 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 を pMSCVpuro ベクターを用い、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。

次に、HpL3-4-MoPrP、HpL3-4-HaPrP、HpL3-4-BoPrP、空ベクターを導入した HpL3-4-EM 細胞を用い、血清除去後、経時的に顕微鏡観察、さらに DNA fragmentation assay、トリパンブ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。HpL3-4-HaPrP、HpL3-4-BoPrP、HpL3-4-EM 細胞において円形細胞、浮遊細胞が多数観察された。さらに断片化 DNA が検出され、トリパンブルー色素排除試験、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。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。

## 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

マウスプリオン Chandler 株に持続感染している ScN2a 細胞の乳剤を用い、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用い、ハムスタープリオンの感染についても試みた。

感染後、Proteinase K(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、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。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。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、内因性の PrP<sup>C</sup> を持たないマウス細胞株である。内因性の PrP<sup>C</sup> の存在がなく、持続感染を確認した細胞はこれが初めてであり、これらの細胞は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。

したがって、審査委員一同は、本人が博士(農学)の資格の内容を十分に有するとの結論に達した。