

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 15 年度博士課程 入学

氏 名 谷内洋次郎

指導教員名 小野寺節

論文題目

Studies on suppressive effect of prion protein to apoptosis induced by encephalomyocarditis virus infection

(脳心筋炎ウイルス感染後に誘導されたアポトーシスに対する正常プリオン蛋白の抑制効果に関する研究)

プリオン病は、羊のスクレイピー、牛の海綿状脳症、ヒトのクールーやクロイツフェルト・ヤコブ病等が含まれる神経変性疾患で、本来生体に存在する正常プリオン蛋白 (PrP^c) が異常プリオン蛋白 (PrP^{sc}) に変換し、神経細胞に蓄積することによって起こると考えられている。プリオン病は潜伏期が長く、脳萎縮、神経細胞の脱落と皮質の海綿状変化が特徴的で、致死的な経過をたどる。PrP^c から PrP^{sc} への変化機構は未だ明らかにされていない。また、プリオン病の発症が PrP^{sc} の直接的もしくは間接的な作用によるものかも明らかになっていない。

PrP^c は細胞膜表面に存在する糖蛋白質で、種間において高度に主に保存されていることが明らかにされており、神経細胞や免疫系細胞に産生されることから神経系や免疫システムにおいて重要な役割を担っていることが予想される。PrP^c の機能については未だ十分には解明されていない。PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬より樹立された不死化神経細胞株を用いた研究が行われ、無血清培養下におけるアポトーシスが、PrP 欠損神経細胞に比べ PrP の再発現化により抑制されること、またコクサッキーウイルスの増殖や感染後に誘導されるアポトーシスが PrP 欠損神経細胞より PrP を再発現させた神経細胞で抑制されるという報告がある。無血清培養下を含め、PrP 発現細胞では PrP 欠損細胞に比べ、SOD 活性が高いことや、産生された ROS の低下が報告されている。これらのことより、プリオン蛋白に抗酸化作用やアポトーシス制御など神経細胞を保護する機能が示唆さ

れている。そこで本研究では、*in vitro* で感染細胞にアポトーシスを起こし、*in vivo* において脳炎を起こすことが知られているピコルナウイルス科に属する脳心筋炎ウイルス(EMCV)を用いた解析を試みた。

まず第1章にて PrP の有無による EMCV 感染後の細胞変性効果、細胞生存率、ウイルス力価およびアポトーシスの比較を *in vitro* で行った。これまでに PrP の研究のために異なるグループにより6系統の PrP 遺伝子欠損マウスが作成されているが、それらのマウスは PrP 遺伝子の下流にコードされ PrP と同性的のあるドッペル蛋白(Dpl)の本来発現が検出されない脳内での異所発現、および加齢に伴う運動障害の現れにより、1型と2型に分類されている。すなわち Dpl の異所発現が見られず運動障害が起こらない1型と Dpl の異所発現および運動障害が観察される2型に分類されている。2型 PrP 遺伝子欠損マウスを用いる場合 Dpl の影響が懸念されている。そのため、EMCV 感染には3つの組み合わせの細胞を用いた。1組目は、2型 PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬由来不死化神経細胞株である HpL3-4 に PrP を再発現させた HpL3-4-PrP と、再導入のコントロールとして空ベクターのみを導入し PrP を発現しない HpL3-4-EM の組み合わせ。2組目は、野生型マウスの脳海馬から樹立された不死化神経細胞株 NB3-2 と、1型 PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬由来不死化神経細胞株である NpL2 の組み合わせ。3組目は、NpL2 に PrP を再発現させた NpL2-PrP と、再導入のコントロールとして空ベクターのみを導入し PrP を発現しない NpL2-EM の組み合わせ。以上の組み合わせを用いて *in vitro* の解析を行った。EMCV 感染は5MOI で感染12時間後まで経時的に細胞変性効果、細胞生存率、ウイルス力価およびアポトーシスの比較を行った。その結果、EMCV 感染後時間経過に伴い細胞生存率の低下が観察された。HpL3-4-PrP と HpL3-4-EM の組み合わせおよび NpL2-PrP と NpL2-EM の組み合わせでは細胞生存率の低下に違いは見られなかった。NB3-2 と NpL2 の組み合わせでは PrP を発現しない NpL2 においてより細胞生存率の低下が見られたが、NpL2 およびそのトランスフェクタントは他の細胞より早く EMCV 感染による細胞生存率の低下が観察され、より細胞変性が起こりやすい細胞であったことから PrP の有無による差ではないと考えられる。そのため EMCV 感染による細胞死は PrP の発現の有無にかかわらず同様に起こると考えられる。EMCV 感染に伴う細胞変性効果は感染6時間後から観察され、円形化と剥離を主徴していたが、PrP を発現していない細胞でより顕著な傾向が観察された。EMCV 感染後の感染力を持つウイルスの増殖は、培養上清および細胞内共に感染後6時間で顕著に増加したが、PrP の有無による違いは見られなかった。DNA ラダーアッセイを行い EMCV 感染後のアポトーシスを比較したところ、すべての細胞の組み合わせで PrP を発現している細胞に比べ、発現していない細胞において明瞭な断片化 DNA が観察された。また NpL2-PrP と

NpL2-EM の組み合わせについて“ cell death detection ELISA^{PLUS} ”を用いて、定量的にアポトーシスによる DNA の断片化を測定した結果、NpL2-PrP と比較して NpL2-EM において有意に高く、アポトーシスにより DNA の断片化が強く起こっていることが示唆された。EMCV の感染性ウイルス増殖は感染後6時間から検出されるという報告があるが、本研究で用いた PrP を発現する細胞および発現しない細胞共に早期化や遅延は観察されず、PrP は EMCV の増殖には影響は与えないと考えられる。また EMCV 感染後のアポトーシスによる DNA の断片化に違いはあるが細胞生存率に顕著な違いが見られないのは、アポトーシスによる細胞変性の差が現れるよりも EMCV の複製、細胞外への放出による細胞死が早く起こっていることによると考えられる。これらのことより、*in vitro* において PrP は EMCV 感染による細胞変性やウイルス増殖を抑えることはないが、誘導されるアポトーシス抑制的に働いていると考えられる。

第2章では1型 PrP 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスの脳内に EMCV を接種し、EMCV 感染時における *in vivo* での PrP のアポトーシス抑制能を解析した。1型 PrP 遺伝子欠損マウス(雄、15週齢)および野生型マウス(雄、15週齢)の右大脳半球に EMCV を 600 pfu 接種し感染 4、7 日目に安楽死させ、脳を採材した。脳の右半分を用いてウイルス力価を測定した。左半分を用いて HE 染色および TUNEL 法による染色を行い、病理組織学的に解析した。ウイルス力価を測定した結果、EMCV 感染 4、7 日目共に 1 型 PrP 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに顕著な違いは見られなかった。病理組織学的解析において、EMCV 感染4日目では 1 型 PrP 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウス共に顕著な変化は見られなかった。また EMCV 感染 4 日目において DNA の断片化を受けた細胞を検出するために TUNEL 法による染色を行った結果、1 型 PrP 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウス共に TUNEL 法陽性細胞はほとんど検出されなかった。EMCV 感染 7 日目では、野生型マウスにおいて 1 型 PrP 遺伝子欠損マウスと比べ重度の細胞浸潤やグリアの増殖を伴う、より激しい炎症が観察された。1 型 PrP 遺伝子欠損マウスでは海馬錐体細胞の脱落が多数観察された。また TUNEL 法により、1 型 PrP 遺伝子欠損マウスの脳において、海馬の錐体細胞に多数の陽性細胞が検出され、アポトーシス細胞の増加が考えられた。1 型 PrP 遺伝子欠損マウスでは、炎症部位においても、野生型マウスに比べ炎症細胞が少ないのにも関わらず多数の TUNEL 陽性細胞が観察された。

ウイルスの増殖は第1章の *in vitro* での結果と同様に、*in vivo* でも PrP の有無による違いが見られなかったことから、PrP は EMCV の増殖には関与していないことが示唆された。*in vitro* において PrP がサイトカイン産生やグリアの増殖に関与しているという報告があるが、本研究の結果から *in vivo* でも PrP がウイルス感染後の

細胞浸潤やグリアの増殖を伴う炎症反応に関与していることが示唆された。また第1章の *in vitro* と第2章の *in vivo* において共にアポトーシスに対し PrP が抑制的に働いていることが示唆された。

PrP がアポトーシスの抑制にどのような機序で関わっているかは、今後更なる研究を進める必要があるが、EMCV の増殖には関与せずにアポトーシスの抑制が観察されたことから、本研究結果は今後の PrP の機能解析、特にアポトーシス抑制機序解析の一端を担うものと考えられる。また本研究の結果より、PrP 遺伝子欠損マウスはアポトーシスを伴う中枢神経系の疾患に陥りやすいことが示唆される。そのアポトーシスの起こしやすさからアポトーシスを起こす原因の特定や慢性的に進行する中枢神経系疾患の解析の早期化に寄与すると期待される。