

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 谷内 洋次郎

プリオン蛋白 (PrP) 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 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という報告がある。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。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。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った。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 の有無による顕著な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、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 “cell death detection ELISA^{PLUS}” を用いて、相対的にアポトーシスによる DNA の断片化を測定した結果、PrP を発現する細胞と比較して発現しない細胞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 の断片化は PrP を発現しない細胞で強く起こっていた。これらのことより、*in vitro* において PrP は EMCV の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。以上のことより、PrP は EMCV の増殖には関与せず、アポトーシスに対し抑制的に働いていることが示された。

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