

論文の内容の要旨

Uptake of amyloid- β protein and scrapie agents in the intestines during the suckling-weaning transition: a model for enteric invasion of prions

(離乳移行期における β アミロイドタンパク質およびスクレーピー病原体の腸管における取り込み—プリオンの消化管の侵入機序モデルとして)

阿野 泰久

プリオン病は、異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})を伝達因子として経口的に伝達が成立する致死性の中樞神経変性疾患で、ヒトでのクロイツフェルトヤコブ病(CJD)、ウシでの牛海綿状脳症(BSE)、ヒツジでのスクレーピー等がある。PrP^{Sc}により汚染された牛肉等の食品を介して伝播し、食の安心・安全において国内に留まらず世界的に非常に重要な問題となっている。PrP^{Sc}の感染経路の一つとして、経口的に摂取された本因子が消化管内のパイエル板内で増殖し、末梢神経へと伝達された後、最終的に脳や脊髄に蓄積することによって神経変性性の疾患を発症する。しかしながら、消化管より取り込まれた PrP^{Sc}の初期体内動態については不明な点が多い。疫学的な調査より、BSEは6か月齢以内のウシで最も伝達が成立した事が報告されている。この時期はウシでの離乳期に相当する。近年 PrP^{Sc}以外の Apolipoprotein AII 等のアミロイドタンパク質も経口的に伝達される事が報告され、タンパク質分解酵素に抵抗性を持つアミロイドタンパク質の消化管からの共通の侵入機序が考えられている。本研究では、アミロイドタンパク質の一つである β アミロイドタンパク質(A β)と蛍光タンパク質(EGFP)との融合タンパク質(A β -EGFP)を作製し、各週齢時のマウスおよびウシに経口投与して、消化管における初期の体内動態を解析した。またスクレーピー病原体をマウスに経口投与したモデルについても解析した。さらにそれらの結果を踏まえ、PrP^{Sc}の消化管における取り込み機構について考察した。

初めに A β -EGFP をマウスに経口投与し、消化管での取り込みを解析した。まず消化管での微量な物質の取り込みの検出系の確立を行うため、カーボンブラック微粒子を含む墨汁および蛍光標識ラテックスビーズを乳飲み期のマウスに投与し、消化管をパラフィン切片、凍結切片、テクノビ

ット包埋による切片を作製し、顕微鏡により解析した。その結果、パラフィン包埋では熱処理が加わり蛍光が失活しており、凍結切片では微量な蛍光物質が分散してしまい形態的に検出が困難であった。一方、テクノビット包埋による解析では投与後3時間程度から乳飲み期マウスの回腸においてカーボンブラック微粒子およびラテックスビーズの取り込みの検出に成功した。消化管からの微量な蛍光物質の取り込みを検出するには、テクノビット包埋による解析が最も適していた。続いて、マウスを用いて A β -EGFP の取り込みの解析を実施した。N 末端側もしくは C 末端側にマウス型 A β を含む EGFP との融合遺伝子を組み込んだ大腸菌の液体培養により、A β -EGFP および EGFP-A β を大量に調整した。精製された A β -EGFP は赤外分光解析、EGFP-A β は CD スペクトル解析により β シート構造が豊富である事を確認した。10、15、20、25 日齢の CD-1 マウス(18 日齢で離乳)に A β -EGFP および EGFP-A β を経口投与した。経時的に安楽殺後、腸および脾臓を採取し、4 %パラホルムアルデヒドで固定、テクノビット包埋後、薄切切片を作製した。A β -EGFP および EGFP-A β は乳飲み期の生後 10-15 日では WGA+UAE-1- の吸収円柱上皮細胞から投与後 3 時間程度で盛んに取り込まれ、その後減少していった。その取り込みは、20 日齢では有意に減少し、完全に離乳した 25 日齢ではほとんど確認されなかった。同様に経口投与した蛍光アルブミンは瀰漫性に絨毛に吸着しているだけであったが、A β -EGFP は凝集した状態のまま細胞内に取り込まれた。A β -EGFP は微量ではあるが、パイエル板ドーム上の WGA-UAE-1+の M 細胞からも取り込まれ、樹状細胞が多く存在するパイエル板ドーム下領域に蓄積していた。加えて、末梢神経組織に隣接する腸陰窩にも蓄積が確認された。また、連続投与した個体では脾臓の赤脾髄領域にも A β -EGFP が確認された。取り込まれた A β -EGFP は貪食細胞に取り込まれたかもしくは血流に乗って脾臓に蓄積したと考えられた。さらに、A β -EGFP を PBS ではなく初乳由来の乳清で希釈することにより、その取り込みは増加した。初乳に豊富に含まれる免疫グロブリンの取り込みのメカニズムへの寄与が考えられた。

この結果を踏まえて、実際のプリオン病原体の腸上皮からの侵入について解析を行った。10、15、20、25 日齢の BALB/c、C57BL/6J、CD-1 および SCID マウスに PBS で 10 %(w/v)に希釈したスクレーピー病原体(Tsukuba1 株)感染マウス脳乳剤を経口投与した。CD-1 および SCID マウスには免疫グロブリン(Ig)G を含有する脳乳剤も投与した。PrP^{Sc} の検出には免疫組織化学的に検出できることを確認した抗 PrP モノクローナル抗体(T2)およびポリクローナル抗体(P8)を用い、免疫組織化学法により行った。PrP^{Sc} は絨毛の吸収円柱上皮に認められ、10 および 15 日齢の乳飲み期で顕著であったが、離乳に伴い減少し、離乳後の 25 日齢ではほとんど確認されなかった。この PrP^{Sc} の取り込みにマウスの系統差は認められなかった。さらに、母乳中に IgG が含まれない SCID マウスでは乳飲みマウスにおける吸収円柱上皮細胞からの PrP^{Sc} の取り込みは有意に減少したが、PrP^{Sc} 乳剤に IgG を加えることにより PrP^{Sc} の吸収上皮円柱細胞からの取り込みは増加した。乳飲み期マウスの吸収円柱上皮細胞には neonatal FcR が発現して母乳中に含まれる Ig を積極的に取り込む特異性の低い機構が存在している。SCID 乳飲みマウスでの取り込みが IgG の存在により非添加と比べて増大したため、投与された PrP^{Sc} は恐らく IgG と結合して取り込まれていると考えられた。

マウスでの結果を踏まえて、ウシにおける A β -EGFP の消化管からの取り込みを検討した。まずマウスの際と同様に墨汁をウシへ経口投与し、消化管での取り込みの検出系を立ち上げた。その結果、投与後 12 時間後には回腸より取り込まれる事が判明した。続いて、ウシ型の A β -EGFP を大量調整し、構造解析により β シート構造を豊富に含むことを確認した。10mg/ml の A β -EGFP 300 ml を 2 週齢および 6 か月齢のホルスタイン牛に計 3 回、胃内に投与した。各消化管を採取し、A β -EGFP の分布を調べた。2 週齢の牛では A β -EGFP 取り込みは回腸の villin 陽性の吸収円柱上皮細胞に認められた。これに対して、6 ヶ月齢の牛では取り込みはほとんど認められなかった。この結果は乳飲みマウスでの結果と一致した。

本研究の結果から、A β -EGFP の経口投与は、BSE の消化管からの取り込みなど初期動態を解析するのに有用であると考えられた。また、離乳期における PrP^{Sc} の取り込みには消化管の発達に関連していることも示唆された。これまで消化管において PrP^{Sc} 等のアミロイドタンパク質の取り込みには M 細胞が重要な役割を担っていると考えられていたが、乳飲み期や離乳移行期には絨毛の吸収円柱上皮細胞からの取り込み機構が存在し、その取り込みには母乳中に含まれる Ig が関与している事が示唆された。