

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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発立する致死性の神経変性疾患で、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病(CJD)、ウシの牛海綿状脳症(BSE)、ヒツジのスクレーピー等がある。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で疾患を発症する。しかしながら、PrP^{Sc}の消化管からの取り込みについては不明な点が多い。疫学的な調査より、BSEは離乳期に相当する6か月齢のウシで最も伝達が発立しやすいことが報告されている。また、近年 Apolipoprotein AII 等の PrP^{Sc} 以外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、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、 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、幼若マウスおよびウシに経口投与し、消化管からの取り込みを解析した。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。

まず、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。N末端側マウス型 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 を大量に調整した。精製された A β -EGFP は赤外分光解析により 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 経口投与した。経時的に安楽殺後、腸および脾臓を採取し、テクニット包埋後、組織切片を作製し観察した。A β -EGFP は、乳飲み期の生後 10-15 日では WGA+UAE-1 陰性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。A β -EGFP は微量ではあるが、パイエル板ドーム上の WGA-UAE-1 陽性の 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。さらに、A β -EGFP を初乳由来の乳清で希釈するとその取り込みは増加したことから、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。

次いで、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} 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、母乳中に含まれる Ig を積極的に取り組

む非特異的取り込み機構があることから、SCID 乳飲みマウスでは PrP^{Sc} は IgG と結合した状態で取り込まれていると考えられた。

さらに、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。10mg/ml のウシ型 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 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。

本研究の結果は、A β -EGFP の経口投与は、BSE における消化管からの PrP^{Sc} 取り込み動態を解析する実験系として有用であることを示している。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した。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関してはパイエル板を覆う 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も存在し、その取り込みには母乳中に含まれる IgG が関与している事が明確に示された。このような成果は、ヒトおよび動物のプリオン病研究において、プリオンの体内動態を調べるための実験モデル系を提案するものであり、今後のプリオン研究に貢献することが大いに期待される。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。