

ヒツジプリオン蛋白質発現細胞を用いたスクレイピープリオン株の性状解析

宮澤光太郎¹⁾

Scrapie prion strain analysis based on the ovine prion protein expressing cell lines

Kohtaro MIYAZAWA¹⁾

背景と目的

スクレイピーはヒツジおよびヤギの伝達性海綿状脳症 (Transmissible spongiform encephalopathy; TSE) であり、我が国では法定伝染病に指定されている。その病原体は、ウイルス・細菌等とは異なり、宿主が発現する正常な蛋白質 (プリオン蛋白質; PrP^C) の構造異性体である異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) と考えられている¹⁾。このため、TSE はプリオン病とも呼ばれる。感染因子である PrP^{Sc} は易凝集性であり、蛋白質分解酵素に部分抵抗性を示す。このため、プロテイナーゼ K 抵抗性の PrP^{Sc} の検出はプリオン病診断の指標となっている。スクレイピーはウェスタンブロット (WB) 法で検出される PrP^{Sc} 断片の分子量に基づいて、従来型、非定型および CH1641 型の3つの型に大別される。加えて、従来型スクレイピーには、ヒツジやマウスへ伝達した際の生物学的性状が異なる多くの株が報告されている²⁴⁾。これまでのところ、ヒツジ・ヤギからスクレイピーがヒトへ伝達する直接的な証拠は示されていないが、ヒト PrP^C を過剰発現させたマウスやマカクザルへの伝達が近年報告されている^{5,6)}。従って農場で摘発されたスクレイピーに由来するプリオン株の性状を把握し、ヒトを含む他動物種への伝達リスクを評価することは公衆衛生上極めて重要である。しかしながら、スクレイピープリオン株は遺伝的背景が均一なマウスへ伝達した際の生物学的性状の違いに基づいて分類するため、多数のマウスを数年に渡って病原体の封じ込めが可能な施設で飼育する必要が生じ、発症までの潜伏期間が非常に長いスクレイピーのリスク評価には多額の費用と人的労力が必要となる。また、近年ではアニマルウェルフェア (動物福祉) に対する意識の向上から、動物試験

における「使用動物数の削減」が社会的に強く求められている。以上の2つの問題点を克服するために、動物へのプリオン接種試験の代替案として培養細胞を利用することを着想した。マウス馴化スクレイピープリオンでは、細胞株によってプリオン株に対する感受性が異なることが知られている^{7,8)}。また、上皮系の細胞は高密度になって互いに接触すると増殖が抑制され、継代することなしに比較的長期間の培養が可能である。以上の理由から材料と方法に示した4つの細胞株を使用することにした。

ヒツジではスクレイピーへの感受性に影響を与える PrP^C の多型が知られている⁹⁾。コドン 136, 154 および 171 がコードするアミノ酸がそれぞれバリン (V), アルギニン (R), グルタミン (Q) である PrP_{VRQ} を持つ個体は従来型スクレイピーに対して最も高い感受性を示す。一方、これらのアミノ酸がアラニン (A), アルギニン (R), アルギニン (R) である PrP_{ARR} を持つ個体は従来型スクレイピーに対して比較的高い抵抗性を示す。ヒツジで頻出する多型はアラニン, アルギニン, グルタミンを持つ PrP_{ARQ} である。本研究では PrP_{VRQ}, PrP_{ARQ} および PrP_{ARR} を標的細胞株に発現させ、PrP_{VRQ} と PrP_{ARQ} を発現させた細胞株についてヒツジスクレイピープリオンへの感受性を調べた。

材料と方法

1. PrP_{VRQ}, PrP_{ARQ} および PrP_{ARR} をコードするヒツジプリオン蛋白質遺伝子をサフォーク種からクローニングし、レンチウイルスベクターを製作する。(遺伝子組換え実験承認番号 A-11-040)
2. 内因性の PrP^C を発現しない標的細胞株に上記のレンチウイルスベクターを感染させ、ピューロマイシン耐性を指標にレンチウイルス感染細胞を選抜し、

1) 農研機構 動物衛生部門 越境性感染症領域 プリオン病ユニット

ヒツジプリオン蛋白質遺伝子が安定的に組み込まれた細胞株を得る。以下に標的細胞株を記載する。

- A) プリオン蛋白質ノックアウト (PrP-KO) マウス由来のグリア細胞株 (Gpl1)¹⁰⁾
- B) PrP-KO マウス由来の小腸上皮細胞株 (NIEC)
- C) ヒツジ腎上皮細胞株 (FLK-N3)¹¹⁾
- D) ウサギ腎上皮細胞株 (RK13)¹²⁾

3. 各細胞株での PrP^C 発現を WB 法と免疫染色法により確認する¹³⁾。
4. 作出したヒツジ PrP^C 発現細胞株に従来型スクレイピープリオン感染ヒツジ脳乳剤 (#79 および #52) または CH1641 型スクレイピープリオン感染ヒツジ脳乳剤 (#56) を暴露し、細胞での PrP^{Sc} 蓄積を WB 法により確認し、各細胞株のスクレイピープリオンへの感受性を評価する。なお、実験に用いたヒツジの PrP^C 多型は #52 と #79 は PrP^{ARQ/ARQ}、#56 は PrP^{VRQ/ARQ} であった。以下に細胞への感染試験の手順を記す。
 - ① 1 日目: 6 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で細胞を播種する。
 - ② 2 日目: 培地を吸引除去後に 20 μ L の 20% 脳乳剤を含む 1 mL の培地を加え、37 $^{\circ}$ C で一晩培養する。
 - ③ 3 日目: 培地を 1 mL 追加し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養する。
 - ④ 5 日目: 脳乳剤を含む培地を吸引除去し、1 mL の培地でウェルを 3 回洗浄する。以降、7 日に一度培地を交換し、脳乳剤添加後 18 日間細胞を維持する。
 - ⑤ 23 日目: 細胞から蛋白質を抽出し、PrP^{Sc} の蓄積を WB 法により確認する。

結果

1. ヒツジ PrP^C 持続発現細胞株の樹立

3つのアミノ酸多型と4種類の細胞株の組み合わせから、合計12種類のヒツジ PrP^C 発現細胞株を得た。各細胞株での PrP^C 発現を WB 法により確認した結果、脳と同様に全ての細胞株において二糖鎖型、一糖鎖型および無糖鎖型の PrP^C の発現が認められた (図1)。また、二糖鎖型および一糖鎖型の分子量はヒツジ PrP^{ARQ} 過発現マウス (TgOvPrP59) の脳に発現する PrP^C に比べて大きく、細胞株が発現する PrP^C には長い糖鎖が付加されていた。免疫染色の結果、ヒツジプリオン蛋白質遺伝子を導入した細胞株では細胞膜上に PrP^C の発現が観察された (図2)。他の細胞株に比べ、NIEC 細胞では細胞質の核周辺に強いシグナルが観察された。

2. ヒツジ PrP^C 持続発現細胞株のスクレイピー感染ヒツジ脳乳剤に対する感受性

図3Aに感染実験に使用した3頭のスクレイピー感染ヒツジの脳に蓄積する PrP^{Sc} のバンドパターンを示す。#52と#79では従来型スクレイピーのバンドパターンが確認されたのに対して、#56では従来型スクレイピープリオンの PrP^{Sc} よりも分子量が低い CH1641 型のバンドパターンが確認された。

PrP^{VRQ} を発現する RK13 細胞 (RK13-PrP^{VRQ}) は、従来型スクレイピーの PrP^{Sc} バンドパターンを示すヒツジ #79 (従来型 #79) の脳乳剤に対して感受性を示し、PrP^{Sc} を蓄積した (図3B, レーン6)。しかしながら、同じく従来型スクレイピーの PrP^{Sc} バンドパターンを示すヒツジ #52 (従来型 #52) の脳乳剤に対しては感受性を示さず、PrP^{Sc} を蓄積しなかった (図3B, レーン4)。PrP^{ARQ} を発現する RK13 細胞 (RK13-PrP^{ARQ}) は従来

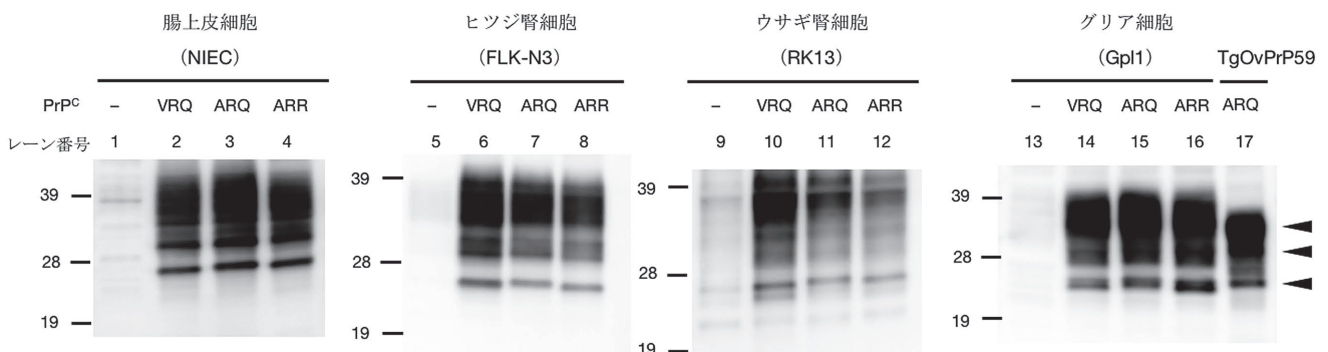


図1. 各細胞株における PrP^C 発現。PrP^C の N 末端側を認識する SAF32 抗体を用いて NIEC, FLK-N3, RK13 および Gpl1 の PrP^C 発現を WB 法により確認した。レンチウイルス非感染細胞では PrP^C は検出されない (レーン 1, 5, 9 および 13)。レーン 17 は、PrP^{ARQ} 過発現マウス (TgOvPrP59) の脳組織を示す。図中の矢頭は二糖鎖型、一糖鎖型および無糖鎖型の PrP^C を示す。各写真の左側のバーは分子量マーカー (kDa) を示す。

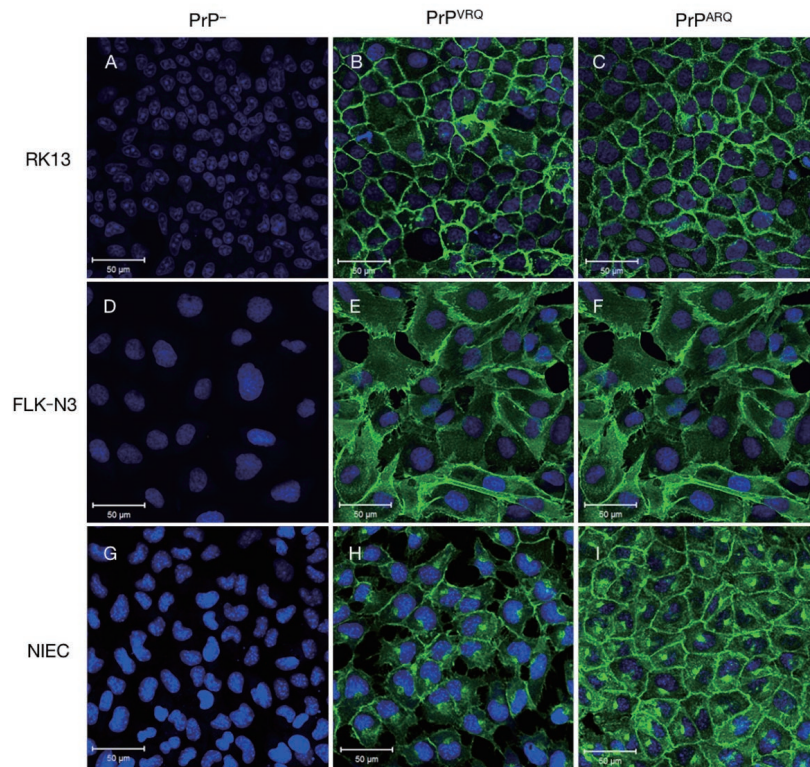


図2. 各細胞株における PrP^C 局在。ヒツジ PrP^C の N 末端側を認識する P4 抗体を用いて RK13, FLK-N3 および NIEC の PrP^C の細胞内局在を免疫染色法により観察した。細胞は 4%PFA で固定した。A, D および G はレンチウイルス非感染細胞を示す。B, C, E, F, H および I は、レンチウイルスによりヒツジプリオン蛋白質遺伝子を導入した細胞を示す。写真の緑色は PrP^C, 青色は核を表す。

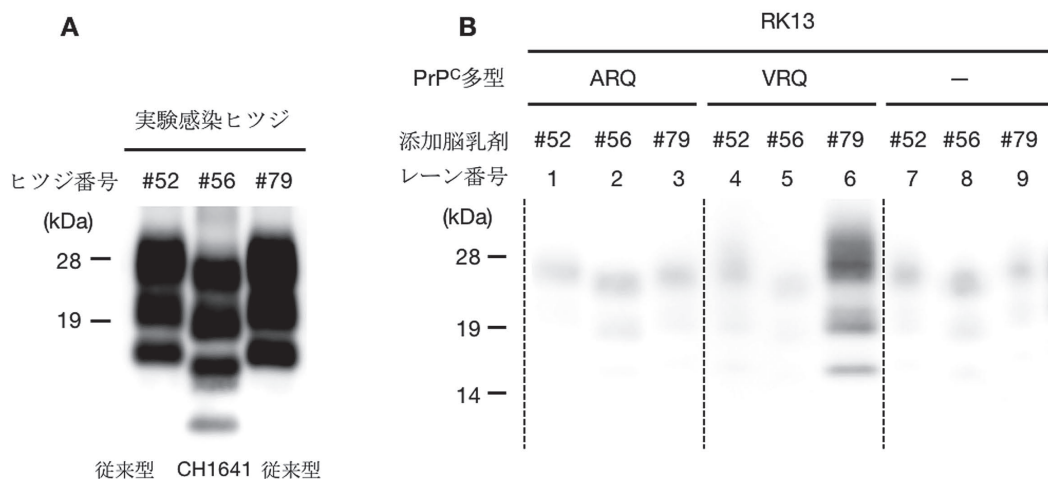


図3. ヒツジ PrP^C 発現 RK13 細胞を用いたスクレイピー感染試験の結果。感染試験に使用したスクレイピー感染ヒツジ脳乳剤の PrP^{Sc} 蓄積 (A)。#79 と #52 は従来型スクレイピー, #56 は CH1641 型スクレイピーを示す。脳乳剤添加 18 日後の RK13 細胞に蓄積する PrP^{Sc} (B)。図中の PrP 多型は PrP^C のコドン 136, 154, 171 のアミノ酸を表す。図中の「-」は PrP^C 非導入細胞を表す。

型 #79 および #52 のいずれに対しても感受性を示さず、PrP^{Sc} を蓄積しなかった (図 3B, レーン 1, 3)。RK13-PrP_{VRQ} と RK13-PrP_{ARQ} の両細胞株ともに CH1641 型の PrP^{Sc} バンドパターンを示すヒツジ #56 (CH 型 #56) の脳乳剤に対しては感受性を示さず、PrP^{Sc} を蓄積しなかった (図 3B, レーン 2, 5)。ヒツジ PrP_{VRQ} または PrP_{ARQ} を発現させた FLK-N3, Gpl1 および NIEC 細胞は従来型 #79, 従来型 #52 および CH 型 #56 のいずれに対しても感受性を示さなかった (表 1)。

考 察

これまでに、マウスに馴化させたスクレイピープリオン株に感受性を示す細胞株は複数報告されている^{8, 14)}。本試験を開始した時点ではヒツジ・ヤギのスクレイピープリオンに感受性を示す細胞株はヒツジ PrP_{VRQ} を発現させた RK13 細胞 (Rov 細胞), ヒツジ PrP_{VRQ} 過発現マウス由来のグリア細胞 (MovS6 細胞) の 2 細胞株のみであったが、2015 年に新たにヒツジ (PrP_{VRQ/VRQ}) 由来の不死化ミクログリア細胞 (hTERT-microglia) およびウシ腎上皮細胞株 (MDBK) のサブクローンである PES 細胞が一部のスクレイピー野外分離株に感受性を示すことが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。過去の報告と同様に、本試験でも RK13-PrP_{VRQ} は従来型 #79 に感受性を示し、PrP^{Sc} を蓄積した。今回用いた従来型スクレイピー発症ヒツジの PrP^C アミノ酸多型は全て PrP_{ARQ/ARQ} であったが、PrP_{ARQ} を発現する RK13-PrP_{ARQ} には感受性を示さず、PrP^{Sc} の蓄積は認められなかった。このことから、従来型スクレイピーにおける PrP^C から PrP^{Sc} への変換では、標的細胞の PrP^C アミノ酸多型と鋳型となる感染脳乳剤の PrP^{Sc} アミノ酸多型の一致は必ずしも重要ではないと考えられる。

また、RK13 細胞では PrP_{VRQ} は PrP_{ARQ} に比べて PrP^{Sc} に変換されやすいことが示唆された。今回の試験では、ヒツジ PrP^C を発現させていない RK13 細胞 (RK13-PrP-null) でも非常に弱い PrP^{Sc} シグナルが検出された (図 3B, レーン 7-9)。RK13 細胞は内因性の PrP^C を発現していないので、PrP^C から PrP^{Sc} への変換は起こり得ず、細胞に付着し除去しきれなかった添加脳乳剤由来の PrP^{Sc} が検出されたと考えられる。今回用いた方法では、脳乳剤添加後、PrP^{Sc} 検出まで 1 度も細胞を継代しないため、脳乳剤由来の残存 PrP^{Sc} 量を評価するために RK13-PrP-null に感染脳乳剤を添加した実験区が RK13-PrP_{VRQ} や RK13-PrP_{VRQ} での PrP^{Sc} の蓄積を評価する上で重要であった。

本試験で用いた PrP_{VRQ} または PrP_{ARQ} を発現するヒツジ腎上皮細胞株 (FLK-N3), マウスグリア細胞 (Gpl1) およびマウス小腸上皮細胞株 (NIEC) は従来型 #79 および #52 のいずれにも感受性を示さなかった。WB の結果からは PrP_{VRQ} を発現する RK13, FLKN3, Gpl1 および NIEC の間で発現量に大きな差は見られないため、従来型スクレイピープリオンに対する細胞の感受性と PrP_{VRQ} 発現量は必ずしも相関しないことが示唆された。これはこれまでの報告とも一致する¹⁶⁾。本試験では RK13-PrP_{VRQ} のみで PrP^{Sc} の蓄積が起こったことから、細胞株に依存的な因子が PrP^C から PrP^{Sc} への変換に重要な役割を果たしていると考えられる。RK13-PrP_{VRQ} を含め、CH1641 型スクレイピープリオンに感受性を示す細胞株は得られなかった。

ヒトを含む動物への感染性の有無を調べるためには動物への接種試験は必須である。一方、培養細胞の利点は、プリオン株の生物学的性状の違いを短期間で識別できる点にある。本試験では、PrP^{Sc} バンドパターンからは

表 1. 作出したヒツジ PrP^C 持続発現細胞株のスクレイピーに対する感受性

細胞株	PrP ^C 多型 (細胞株)	使用したヒツジスクレイピープリオン分離株		
		#52 (従来型)	#56 (CH1641 型)	#79 (従来型)
ウサギ腎上皮細胞 (RK13)	VRQ	×	×	○
	ARQ	×	×	×
ヒツジ腎上皮細胞 (FLK-N3)	VRQ	×	×	×
	ARQ	×	×	×
マウスグリア細胞 (Gpl1)	VRQ	×	×	×
	ARQ	×	×	×
マウス小腸上皮細胞 (NIEC)	VRQ	×	×	×
	ARQ	×	×	×

○ : 細胞での PrP^{Sc} 蓄積あり, × : PrP^{Sc} 蓄積なし

識別できない従来型 #79 と #52 の生物学的性状の違いを RK13-PrP_{VRQ} への感受性の違いにより約 1 ヶ月で明らかにすることができた。ただし、より詳細なスクレイプープリオン株の識別を可能にするためには、スクレイプープリオン株に対する感受性が異なる複数の細胞株を樹立する必要がある。また、細胞株に感受性を示すスクレイプープリオン株については TCID₅₀ を算出できるため、動物試験に比べて少ない労力と資金で短期間に様々な組織の感染性を評価できる。今後、多様なスクレイプープリオン株に対して感受性を示す細胞株を作出できれば、動物試験に代わる簡便な *in vitro* 感染価測定系を実現できる。

謝 辞

本試験は平成 26～27 年度の農研機構における先行的・試行的研究として実施した。

参考文献

- 1) Colby DW, Prusiner SB. 2011. Prions. Cold Spring Harb Perspect Biol 3: a006833.
- 2) Bruce ME. 2003. TSE strain variation. Br Med Bull 66: 99-108.
- 3) Horiuchi M, Nemoto T, Ishiguro N, Furuoka H, Mohri S, Shinagawa M. 2002. Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. J Clin Microbiol 40: 3421-3426.
- 4) Miyazawa K, Okada H, Iwamaru Y, Masujin K, Yokoyama T. 2014. Susceptibility of GT1-7 cells to mouse-passaged field scrapie isolates with a long incubation. Prion 8: 306-313.
- 5) Comoy EE, Mikol J, Luccantoni-Freire S, Correia E, Lescoutra-Etcheagaray N, Durand V, Dehen C, Andreoletti O, Casalone C, Richt JA, Greenlee JJ, Baron T, Benestad SL, Brown P, Deslys JP. 2015. Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. Sci Rep 5: 11573.
- 6) Cassard H, Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I, Costes P, Aron N, Reine F, Herzog L, Espinosa JC, Beringue V, Andreoletti O. 2014. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. Nat Commun 5: 5821.
- 7) Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C. 2007. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 20908-20913.
- 8) Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I. 2013. Cellular aspects of prion replication *in vitro*. Viruses 5: 374-405.
- 9) Goldmann W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. Vet Res 39: 30.
- 10) Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. 2008. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 377: 1047-1050.
- 11) Matsuura K, Inoshima Y, Kameyama K, Murakami K. 2011. Establishment of a novel ovine kidney cell line for isolation and propagation of viruses infecting domestic cloven-hoofed animal species. In Vitro Cell Dev Biol Anim 47: 459-463.
- 12) Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H. 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4055-4059.
- 13) Iwamaru Y, Takenouchi T, Ogihara K, Hoshino M, Takata M, Imamura M, Tagawa Y, Hayashi-Kato H, Ushiki-Kaku Y, Shimizu Y, Okada H, Shinagawa M, Kitani H, Yokoyama T. 2007. Microglial cell line established from prion protein-overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains. J Virol 81: 1524-1527.
- 14) Nuvolone M, Aguzzi A, Heikenwalder M. 2009. Cells and prions: a license to replicate. FEBS Lett 583: 2674-2684.
- 15) Neale MH, Mountjoy SJ, Edwards JC, Vilette D, Laude H, Windl O, Saunders GC. 2010. Infection of cell lines with experimental and natural ovine scrapie agents. J Virol 84: 2444-2452.
- 16) Munoz-Gutierrez JF, Schneider DA, Baszler TV, Greenlee JJ, Nicholson EM, Stanton JB. 2015. hTERT-immortalized ovine microglia propagate natural scrapie isolates. Virus Res 198: 35-43.
- 17) Oelschlegel AM, Geissen M, Lenk M, Riebe R, Angermann M, Schaetzel H, Groschup MH. 2015. A bovine cell line that can be infected by natural sheep scrapie prions. PLoS One 10: e0117154.