

## ミクログリア細胞株を用いたプリオン持続感染モデル系の作出とその特性解析

### 1. はじめに

プリオン病は感染性タンパク質“プリオン”を病原体とする致死性・伝達性の神経変性疾患の総称であり、ヒツジ・ヤギのスクレイピー、ウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy, BSE), ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) などが知られている。BSEは多くの動物種に伝達可能であり、変異型CJDの原因であると考えられていることから、プリオン病は人獣共通の感染症としての側面を持っている。

プリオン感染個体の中枢神経系やリンパ細網系には、異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の蓄積が観察される。感染性の濃縮された画分から PrP<sup>Sc</sup> が回収されることから、PrP<sup>Sc</sup> はプリオンの主要な構成成分と考えられている。PrP<sup>Sc</sup> は宿主に発現する正常プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) を構造変換することにより複製・増幅する。PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> は同一のアミノ酸配列を有しているが、物理的・生化学的性質が異なり、その特徴の一つにタンパク質分解酵素処理に対する部分抵抗性がある。またプリオンには、生物学的性状 (臨床症状, 潜伏期, 病変分布) 及び生化学的性状 (PrP<sup>Sc</sup> の分子量ならびに糖鎖パターン) の異なる様々な「株」が存在することも報告されている。

プリオン病研究は主にマウスなど実験動物を用いて行われているが、近年様々な培養細胞を用いた *in vitro* プリオン感染系の確立が世界中で精力的に行われ、プリオン病研究の強力な解析ツールとなっている。*in vitro* 感染系はプリオン感染と細胞機能との関連性を詳細に検討する系として役立つだけでなく、治療薬開発のためのスクリーニング系としても極めて有用である。最近筆者らは、ミクログリア由来の不死化細胞株を樹立し、この細胞を用いたプリオン *in vitro* 感染系を確立した<sup>1)</sup>。さらにこの系を用いて、プリオン感染がイオンチャネル型 ATP 受容体ファミリーの一つである P2X7 受容体機能に影響を及ぼすことを報告した<sup>2)</sup>のでここに紹介する。

### 2. プリオン持続感染ミクログリア細胞株の樹立

ミクログリアは脳のグリア細胞の一種であり、神経細胞の傷害や病原体の侵入・感染を監視し、それらに対する生

体防御反応の中心的な役割を担う。一方で、ミクログリアが異常に活性化した場合、様々な細胞傷害性因子を過剰に放出し、それが神経変性の原因の一つになると考えられている。プリオン病の神経変性過程においてもミクログリアの関与が報告されている<sup>3)</sup>。ミクログリアにおける PrP<sup>C</sup> の発現量は低い、CJD 感染マウスの脳から分離したミクログリアにおいて高い感染性が確認されるなど、脳内でのプリオンの拡散に関与する可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。そこで、プリオン感染がミクログリア機能に与える影響を検討するためのモデル系として、プリオン持続感染ミクログリア細胞株の確立を試みた。

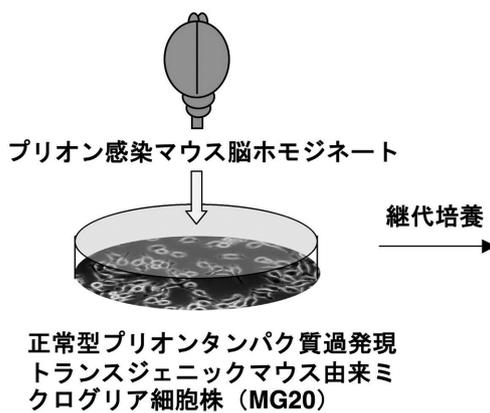
筆者らはまず、マウス PrP<sup>C</sup> を過剰に発現するトランスジェニックマウス (tga20 マウス) 及び PrP<sup>C</sup> ノックアウトマウスの脳からミクログリアを初代培養し、これらにレトロウイルスベクターを用いてヒト *c-myc* 遺伝子を導入して不死化ミクログリア細胞株 (それぞれ MG20 細胞及び MG0 細胞) を樹立した。MG20 細胞では野生型の C57BL/6 マウスから樹立されたミクログリア細胞株 (MG6 細胞) に比べて約 10 倍量の PrP<sup>C</sup> の発現が確認された。マウスに馴化したスクレイピーを発症したマウスの脳ホモジネートを MG20 細胞に暴露し、96 ウエルプレートを用いたサブクロニング後にそのマウス馴化スクレイピーへの感染を検討したところ、実験条件により異なるが 7-30% のサブクロンにおいて持続的な PrP<sup>Sc</sup> の増幅が確認された (図 1, 表 1)。一方、MG0 細胞や MG6 細胞ではマウス馴化スクレイピーの感染は確認されず、PrP<sup>C</sup> の高発現が持続感染において重要であることが示唆された。これまでに神経系細胞株、上皮系細胞株、繊維芽細胞株等においてマウス馴化スクレイピーの持続感染は報告されてきたが<sup>5)</sup>、免疫系細胞であるミクログリアでも同様にプリオン持続感染系を作出できることが初めて示された (表 1)。現在のところ、プリオン感染がミクログリアの免疫応答性に与える影響などについて直接的に解析できる唯一の *in vitro* モデルであると考えられる。しかしながら、プリオン高感度検出系にしばしば用いられる神経芽腫細胞株 N2a 細胞と MG20 細胞の感染効率を比較すると、プリオンに暴露された N2a 細胞ではほぼ 100% のサブクロンで感染が起きることから (清水ら, 未発表データ), MG20 細胞の感染効率は低いと考えられる。そのため、プリオン高感度検出系としての MG20 細胞の有用性は高くないと推察される。

またマウス馴化スクレイピーには、世界中で野外発生したヒツジスクレイピーをマウスに継代・馴化した多くの実験系が報告されており、それぞれを詳細に調べてみると、

表1 様々な種類の培養細胞でのプリオン感染モデル系

細胞タイプ	細胞株	動物種	感染するマウス馴化プリオン株	コメント
神経芽腫細胞	N2a	マウス	Chandler, Fukuoka-1	プリオン感染実験で最もよく使用される細胞株。培養中に形態や増殖性の異なるヘテロな細胞集団になりやすく、非常に感染しやすい細胞としにくい細胞が混在すると考えられている。
繊維芽細胞	L929, NIH/3T3	マウス	Chandler, 22L, ME7	感染脳ホモジネート暴露によりL929で47%、NIH/3T3で12%の細胞が感染する。
筋芽細胞	C2C12	マウス	22L	感染脳ホモジネート暴露では感染せず、感染N2a細胞との共培養で感染する。
上皮系細胞 (腎臓由来)	RK13	ウサギ	Chandler, 22L, ME7, Fukuoka-1	ヒツジPrP <sup>C</sup> の強制発現でヒツジスクレイピーに直接感染する。マウスPrP <sup>C</sup> の強制発現でマウス馴化プリオン株へも感染する。
免疫系細胞 (ミクログリア)	MG20	マウス	Chandler, Obihiro, ME7, BSE	感染脳ホモジネート暴露後のサブクローニングによりChandler株で20%、Obihiro株で30%、ME7株で7%、BSE株で15%のサブクローンが感染する。

文献5参照



各継代数でのプロテイナーゼK (PK) 抵抗性PrP<sup>Sc</sup>の検出

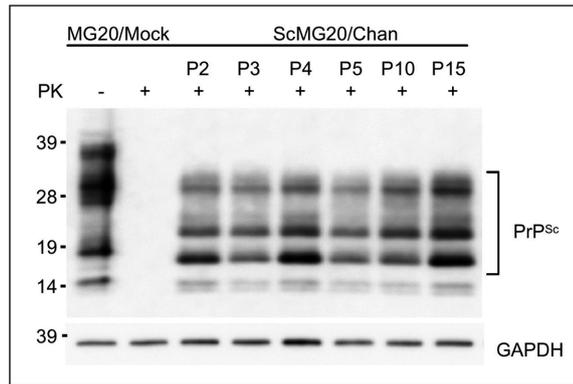


図1 プリオン持続感染ミクログリア細胞株の樹立方法

PrP<sup>C</sup> 過発現トランスジェニックマウス由来ミクログリア細胞株 (MG20 細胞) に正常脳及びマウス馴化スクレイピー (Chandler 株) 発症マウス脳ホモジネートを添加し、各継代数でプロテイナーゼ K 抵抗性の異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) をウエスタンブロット法により検出した。

やはり発症までの潜伏期間や病理所見、また増幅する PrP<sup>Sc</sup> の分子量や糖鎖パターンなどが異なる「株」が存在することが知られている。異なるマウス馴化スクレイピー株の特徴は細胞に感染させた場合にも維持される。ところが、各種マウス馴化スクレイピー株の細胞に対する感染性は細胞の種類や性質によって様々であり、多種類のプリオン株に感染できる細胞株はその有用性も高い。大変興味深いことに、MG20 細胞は少なくとも3種類の異なるマウス馴化スクレイピー株に加え、感染が難しいとされているマウス馴化 BSE 株にも感染感受性があることがわかった。これらプリオン株の感染性の違いに関する詳細は不明であるので、MG20 細胞は動物個体を使わずに多種類のプリオ

ン株を維持・継代できるだけでなく、それぞれの株の感染成立を規定する細胞側の要因を分子レベルで解析することにも有用であると考えている。

### 3. プリオン持続感染ミクログリア細胞株の特性解析

ミクログリアには G タンパク質共役型 (P2Y) 及びイオンチャンネル型 (P2X) の ATP 受容体が存在する。その中で P2X7 受容体は他の ATP 受容体ファミリーと異なり、その活性化に比較的高濃度の ATP (1mM 以上) を必要とし、また Na<sup>+</sup> や Ca<sup>2+</sup> などの流入を伴うイオンチャンネルとしての機能だけでなく、細胞膜上に 900Da 程度までの高分子物質を透過できるポアを形成し、さらに活性化が続けば

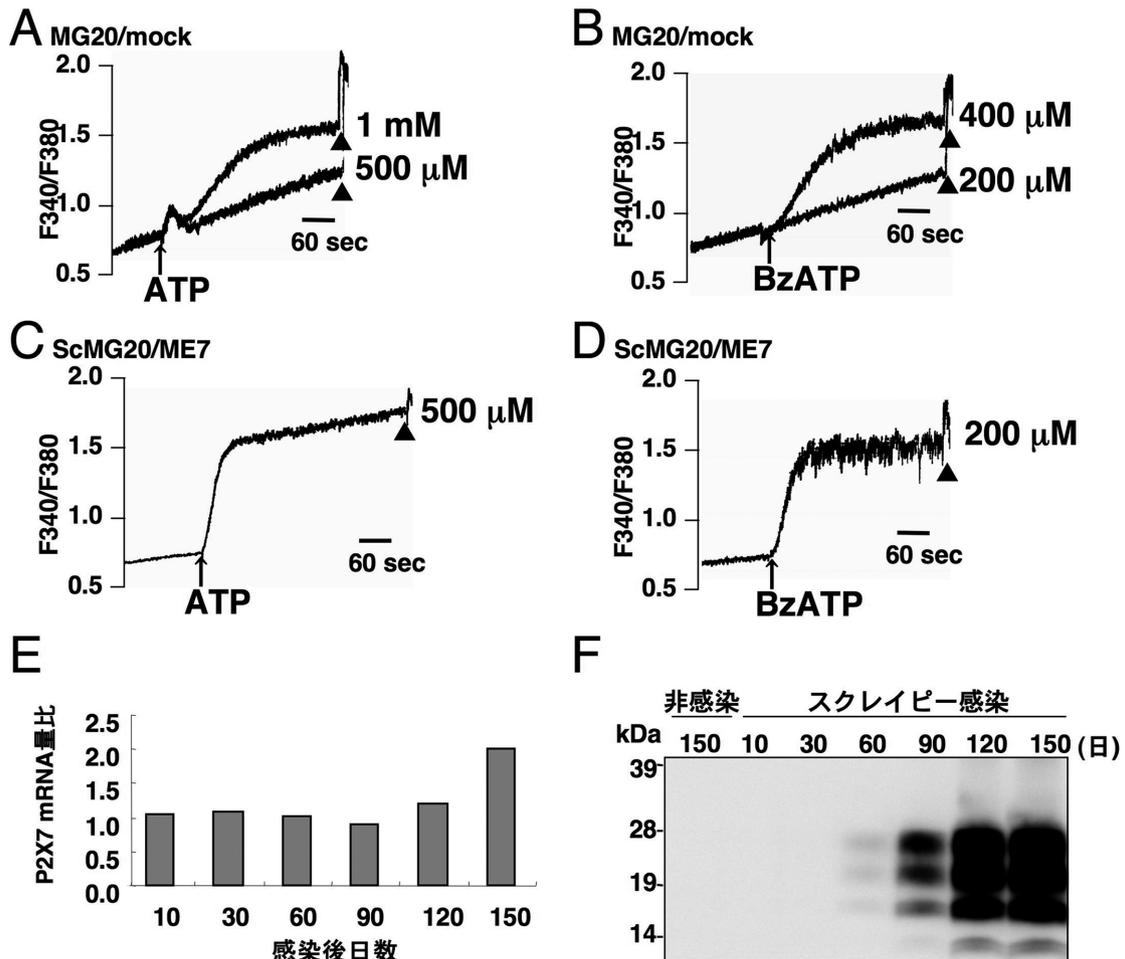


図2 Mock感染 (A, B) 及びマウス馴化スクレイピー (ME7株) 感染 (C, D) MG20細胞でのヌクレオチド刺激による細胞内カルシウム濃度の変動. 感染細胞では mock 感染細胞に較べて ATP 及び BzATP に対する感受性が高い. マウス馴化スクレイピー (Obihiro 株) 接種後のマウス脳での P2X7 受容体 mRNA 発現量の増加 (E) 及び PrP<sup>Sc</sup> の蓄積 (F). P2X7 受容体 mRNA は定量的 PCR で測定した.

細胞死を誘導するなどの特徴を持つ. また炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の前駆体から成熟型へのプロセッシング及び細胞外への分泌においても重要な役割を担う分子である<sup>6)</sup>. P2X7 受容体は脳内では主にミクログリアで多く発現しており, その活性化がミクログリアの生理学的あるいは病態生理学的役割に深く関与することも報告されている.

N2a 細胞や GT1 細胞などの神経系細胞株においては, プリオン持続感染がそれらの細胞における増殖因子受容体発現やイオンチャネル機能など様々な細胞機能に影響を及ぼすことが報告されている<sup>7,8)</sup>. そこで筆者らはマウス馴化スクレイピー ME7 株に持続感染した MG20 細胞 (ScMG20/ME7) を用いてプリオン感染が P2X7 受容体機能に与える影響について検討した. コントロールには非感

染マウスの脳ホモジネートに暴露した MG20 細胞 (MG20/mock) を用いた.

MG20/mock 細胞に Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光指示薬である Fura-2 を取込ませ ATP 刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 変化を測定したところ, 1 mM ATP 添加により早い一過性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇とそれに続く持続的な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が観察された (図 2A). これは野生型マウスから樹立された MG6 細胞で見られる反応と類似しており<sup>9)</sup>, 薬理的検討の結果から一過性の反応は主に P2Y 受容体, 持続的な反応は P2X7 受容体を介したのものであると考えられる. P2X7 受容体の選択的アゴニストである BzATP では持続的な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇のみが見られることからそれは支持される (図 2B). ScMG20/ME7 細胞では, MG20/mock 細胞で反応が見られない 500  $\mu$ M ATP や 200  $\mu$ M BzATP で顕著な持

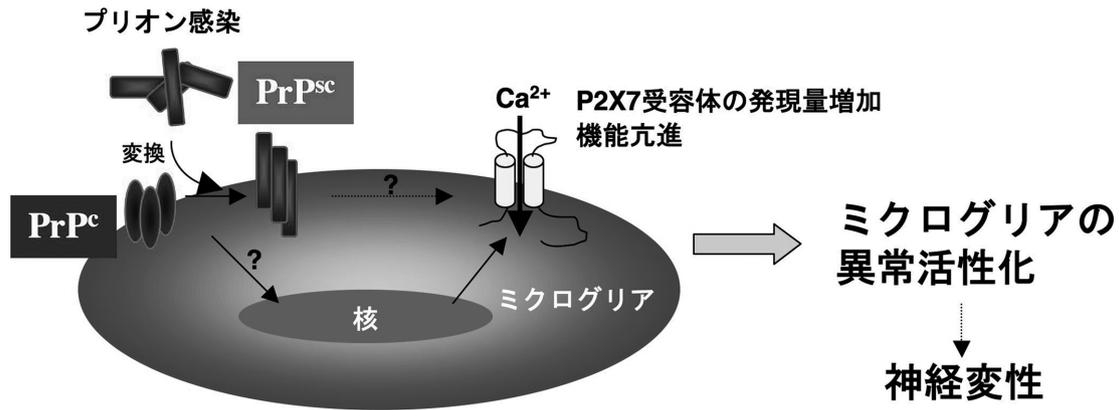


図3 プリオン感染時のミクログリアでのP2X7受容体機能亢進による神経変性メカニズムに関する仮説

統的  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を誘導することから (図2C, D), プリオン持続感染によってP2X7受容体の感受性が高くなっている可能性が示唆された。さらにポア形成に伴う蛍光物質YO-PRO-1の取込み, ミクログリア細胞死の誘導及びIL-1 $\beta$ の分泌が促進されることが確認され, ScMG20/ME7細胞においてP2X7受容体機能が亢進していることが示された。この受容体機能の亢進が受容体発現の増加によるものか否かを調べるため, 定量的PCRを用いた検討を行った。その結果プリオン感染細胞では非感染細胞と比較して, 約6倍のP2X7受容体mRNA発現の増加が起っていた。つまり, mRNA発現増加に伴う受容体タンパク質の増加が主にP2X7受容体機能亢進に関与する可能性が示唆された。さらに, スクレイピー感染マウス脳におけるP2X7受容体mRNA発現量を経時的に検討したところ, PrP<sup>Sc</sup>蓄積が著明になる感染後期にかけてそのmRNA発現量が増大することが示された (図2E, F)。この*in vivo*の結果からもプリオン感染とP2X7受容体亢進との間には関連性があることが示唆される。

プリオン感染とP2X7受容体亢進との関連性をさらに検証するため, ペントサンポリサルフェート (PPS) により, プリオンを除去したScMG20/ME7細胞において, P2X7受容体機能を調べた。PPS処理により, ScMG20/ME7細胞でPrP<sup>Sc</sup>ならびに感染性の消失が確認されたが, P2X7受容体の感受性は増大したままであった。PPS処理は数週間で速やかにプリオンを除去するが, その作用機序の詳細は不明である。プリオン持続感染によりP2X7受容体システムに対し, PPS処理によるプリオン除去のみでは修復できない影響が与えられた可能性を考えている。プリオン感染がP2X7受容体の発現や機能に影響を及ぼすメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

P2X7受容体はミクログリア活性化において重要な役割を持つ。プリオン感染が引き起こすこの受容体の発現量及び機能亢進はミクログリアの異常活性化につながり, 神経変性を誘導する引き金になると推測される (図3)。この仮説を検証するために今後は免疫組織化学等を用いて, スクレイピー感染マウス脳におけるP2X7受容体の発現解析を進める必要があると考えている。これまでにアルツハイマー病モデルマウスの脳<sup>10)</sup>や, 虚血により誘導された脳変性<sup>11)</sup>においても同様にP2X7受容体の発現増加が報告されている。また最近, アルツハイマー病患者の脳から分離したミクログリアではP2X7受容体のmRNA発現レベルが増加しており, さらにアミロイド $\beta$ タンパク質で処理したヒトミクログリアにおいてP2X7受容体のmRNA発現増加及びアゴニスト刺激による $Ca^{2+}$ 反応性の増強も報告された<sup>12)</sup>。加えてP2X7受容体アンタゴニストであるoxidized ATPは, ラット脳へのリボポリサッカリド投与による炎症反応で誘導された神経変性に対し, ミクログリア活性化の抑制を介して神経保護的な効果を持つことが報告された<sup>13)</sup>。プリオン感染あるいはアミロイド $\beta$ タンパク質処理がミクログリアのP2X7受容体の発現量を増加するメカニズムについてはまだ不明であるが, これらアミロイド性タンパク質が原因となるような神経変性疾患の発症過程にもP2X7受容体に関与し, その受容体機能を抑制することで神経変性の進行を遅らせられる可能性が推察される。

#### 4. おわりに

ここではプリオン持続感染ミクログリア細胞株を用いた解析の一例を示したが, プリオン感染とミクログリア機能の関係, さらに神経変性への関与については不明な点が多く残されている。今回樹立された細胞株はこれらを

解明していくための有用な *in vitro* の解析ツールとなり、プリオン病研究のさらなる発展に寄与することが期待される。

- 1) 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) *J. Virol.*, 81, 1524–1527.
- 2) Takenouchi, T., Iwamaru, Y., Imamura, M., Kato, N., Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Sato, M., Okada, H., Yokoyama, T., Mohri, S., & Kitani, H. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 3019–3026.
- 3) Heppner, F.L., Prinz, M., & Aguzzi, A. (2001) *Prog. Brain Res.*, 132, 737–750.
- 4) Baker, C.A., Martin, D., & Manuelidis, L. (2002) *J. Virol.*, 76, 10905–10913.
- 5) Vilette, D. (2007) *Vet. Res.*, 39, 10.
- 6) Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Di Virgilio, F. (2006) *J. Immunol.*, 176, 3877–3883.
- 7) Ostlund, P., Lindegren, H., Pettersson, C., & Bedecs, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 36110–36115.
- 8) Sandberg, M.K., Wallen, P., Wikstrom, M.A., & Kristensson, K. (2004) *Neurobiol. Dis.*, 15, 143–151.
- 9) Takenouchi, T., Ogihara, K., Sato, M., & Kitani, H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, 1726, 177–186.
- 10) Parvathenani, L.K., Tertysnikova, S., Greco, C.R., Roberts, S. B., Robertson, B., & Posmantur, R. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 13309–13317.
- 11) Franke, H., Gunther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., Faber-Zuschratter, H., Schneider, D., & Illes, P. (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63, 686–699.
- 12) McLarnon, J.G., Ryu, J.K., Walker, D.G., & Choi, H.B. (2006) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65, 1090–1097.
- 13) Choi, H.B., Ryu, J.K., Kim, S.U., & McLarnon, J.G. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 4957–4968.

竹之内 敬人<sup>1</sup>, 岩丸 祥史<sup>2</sup>, 横山 隆<sup>2</sup>, 木谷 裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 独立行政法人農業生物資源研究所  
遺伝子組換え家畜研究センター,

<sup>2</sup> 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構  
動物衛生研究所 プリオン病研究チーム)

Establishment and characterization of prion-infected microglial cells

Takato Takenouchi<sup>1</sup>, Yoshifumi Iwamaru<sup>2</sup>, Takashi Yokoyama<sup>2</sup>, and Hiroshi Kitani<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Transgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan, <sup>2</sup>Research Team for Prion Diseases, National Institute of Animal Health, Kannondai 3-1-5, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan)

投稿受付：平成 19 年 10 月 17 日

## X ファミリー DNA ポリメラーゼの進化と機能

### 1. 序 論

真核生物の DNA ポリメラーゼ (以下, 種類を示すときは Pol と略す) は, ゲノムプロジェクトの進行に伴って, 酵素種が多数存在することが急速に分かってきた。現在, 少なくとも 14 種類 (Pol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\pi$ ) あり, さらに鋳型 DNA を必要としないターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) やデオキシシチジルトランスフェラーゼである Rev1 も含めて数えると 16 種類になる。これら多数の酵素種はアミノ酸配列の類似性から, A (Pol  $\gamma$ ,  $\theta$ ,  $\nu$ ,  $\pi$ ), B (Pol  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ), X (Pol  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ , TdT), Y (Pol  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ , Rev1) の四つのファミリーに分類されている<sup>1)</sup>。DNA ポリメラーゼは, 5′から 3′の方向に鋳型鎖と相補的なポリヌクレオチドを合成していく酵素である。さらに, いくつかの酵素種は, 別の酵素活性も持ち合わせている。例えば, Pol  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  は 3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を持ち, ミスペアの塩基を除去する。また, Pol  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$  は dRP (5′-deoxyribose phosphate) 部位を切断する活性を持つ。

X ファミリー DNA ポリメラーゼ (以下 PolX と略す) は, DNA 修復系酵素としてよく知られ, その構造と機能が独特であるため, 多くの研究者に注目されている。Pol  $\beta$  と TdT は昔からよく知られる一方, Pol  $\lambda$  と Pol  $\mu$  は比較的最近同定された<sup>1)</sup>。PolX は, 極端に DNA 鎖伸張能が低い (一度の DNA 結合反応において 1~数塩基しか伸張できない)。その時, 必ずマグネシウムやマンガンイオンなどの二価陽イオンを要求する。さらに構造的な特徴を述べると, PolX のうち, Pol  $\beta$  以外はアミノ末端側に BRCT (BRCA1 C-terminal) ドメイン, 中央付近に DNA 結合ドメイン, カルボキシ末端側に DNA 合成活性を担うドメインを持っている。それに対して Pol  $\beta$  は, BRCT ドメインを含むアミノ末端側が欠けた構造をしている (図 1)。興味深いことに, 哺乳類組織におけるそれぞれの酵素の存在様式が大きく異なる。Pol  $\beta$  が脳及び生殖系組織, TdT は免疫系組織に存在する。また, Pol  $\lambda$  と Pol  $\mu$  は比較的普遍的に存在するが生殖系組織と免疫系組織にそれぞれ多く存在している<sup>2-5)</sup>。

このレビューでは, PolX の各生物種における分布に着