

ウシ脊髄における正常型細胞性プリオンタンパク質 (PrPc) の局在

中村富美男・田中 誠一・小林 謙・關 巖・李 昇遠・福永 重治
北海道大学大学院農学研究科畜産資源開発学講座, 札幌市北区 060-8589

Immunohistochemical localization of cellular prion protein (PrPc)
in the bovine spinal cord

Fumio NAKAMURA, Masakazu TANAKA, Ken KOBAYASHI,
Iwao SEKI, Seung-Won LEE and Shigeharu FUKUNAGA

Research Group of Animal Product Science, Graduate School of
Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo-shi 060-8589

キーワード: ウシ, 脊髄, プリオンタンパク質, 免疫組織化学

Key words: bovine, spinal cord, cellular prion protein, immunohistochemistry

Abstract

In contrast with the interest shown in and recent accumulation on scrapie prion protein (PrPsc), little interest has been shown in the cellular prion protein (PrPc) and there is a lack of basic physiological knowledge of PrPc. In this study, we therefore investigated the immunolocalization of PrPc in the bovine spinal cord. Blood vessel of various size, cell bodies, axons and dendrites of neuronal cells in the cervical portion of spinal cord were immunostained with anti-PrPc antibody. In tissues originating from glial cells, PrPc was found in the myelin sheath of myelinated nerve fibers, ependymal cells of central canal, geratinous support of neurons, membrane limitans gliae perivascularis, membrane limitans gliae superficialis and its branches lining beneath the connective tissue support of nervous tissue. These findings suggest that PrPc is a protein that exists in various components of the central nervous system but is localized characteristically in the boundary of nervous tissue.

要 約

異常型プリオンタンパク質 (PrPsc) とは対照的に、正常型の細胞性プリオンタンパク質 (PrPc) に対する注目度は低く生理学的な基礎知識も十分には蓄積されていないので、中枢神経系の一つとしてのウシ脊髄における PrPc の局在を免疫組織学的に調べた。ウシ頸髄においては、様々な大きさの血管、神経細胞の細胞体、軸索および突起が抗 PrPc 抗体によって免疫染色された。グリア細胞に由来する組織においては、軸索を囲んでいる髄鞘、中心管の上皮細胞、神経の膠質性支柱、神経膠性血管周囲膜、神経膠性表層限界膜と結合組織性支柱に沿って走行する神経膠性表層限界膜の分枝に PrPc は存在していた。これらの結果から、

PrPc は中枢神経系の様々な構成要素に普遍的に存在するタンパク質であるが、神経組織の境界部における局在が特徴的なタンパク質であることが示唆された。

緒 言

プリオンタンパク質は、元来その生理学的な機能に基づいて同定されたタンパク質ではなく、伝達性海綿状脳症 (TSE) に深く係わる物質として発見された (PRUSINER, 1998)。従って、異常型プリオンタンパク質 (PrPsc) に対する関心は高く、病状に伴う免疫組織化学的な局在変化や感染機序に関する研究も多数報告されている (BURTHEM *et al.*, 2001; DEBEER *et al.*, 2001; MA and LINDQUIST, 2001; VOIGTLANDER *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2002)。しかし、正常型の細胞性プリオンタンパク質 (PrPc) への注目度は低く生理学的な基礎知識が不足しており、生体における役割の全容も

解明されていない (MARTINS *et al.*, 2002). 加えて, PrPc の免疫組織化学的検出方法が確立されていないために, 中枢神経系においてさえ PrPc の局在に関する矛盾した結果が報告されている (VERGHESE-NIKOLAKAKI *et al.*, 1999; LAINE *et al.*, 2001; FORD *et al.*, 2002)そこで本研究では, 凍結切片を冷メタノールで固定した後に間接蛍光抗体染色 (NAKAMURA *et al.*, 2002) を行うことにより, ウシ脊髄における PrPc の局在を検索した. また, 神経細胞の指標としてニューロフィラメント (NF) を, 神経膠細胞 (グリア細胞) の指標としてグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) を, 結合組織の指標としてコラーゲンを抗体染色により検出し, これらの局在との比較により PrPc の局在を特徴づけ, その役割を検討した. このことは, PrPc の生理機能を解明するための畜産学的基础知見としてだけでなく, 社会的関心の高い狂牛病 (BSE) 問題に対する学術情報としての意義も大きいと考えられる.

材料および方法

供試材料

日本で BSE 発症牛が確認される以前に屠場より入手し, -80°C に保存していた約 18 ヶ月齢のホルスタイン種去勢牛 3 頭の第四頸髄付近を試料として用いた.

組織切片の調製

正中面に沿って半切した頸髄を OCT コンパウンド (Tissue Tek; SAKURA, Tokyo) に包埋後凍結した. クリオスタット (CM3000; Leica, Germany) を用いて厚さ $14\ \mu\text{m}$ の凍結横断切片を作成し, -20°C に冷却した 100%メタノール内で 20 分間固定した後, リン酸緩衝塩溶液 (PBS) 中で再含水化した (NAKAMURA *et al.*, 2002).

免疫染色

固定後の切片は, ヘマトキシリン・エオシン (H・E) 染色を行うと共に, 間接蛍光抗体法により免疫染色を行った. 非特異的反応を抑制するために, 5%正常ヤギ血清 (SIGMA, USA), 3%カゼイン (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto), 1%ウシ血清アルブミン (BSA; SIGMA), 0.05%NaN₃ を含む T-PBS (0.05% Tween-20 を含む PBS) をブロッキング溶液として用いて 37°C で 30 分間処理した切片は, 下記の濃度にブロッキング溶液で希釈した各第一抗体と 37°C で 90 分間反応させた. T-PBS で洗浄した切片は, 150 倍にブロッキング溶液で希釈した FITC 標識抗ウサギ IgG (ICN Pharmaceuticals Inc., USA) を第二抗体として 37°C で 30 分間蛍光染色した. 染色標本は, T-PBS で洗浄後, Perma Flour (Thermo Shandon, USA) で封入し, 蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo) で観察した. なお, 第一抗体には, ブロッキング溶液で 100 倍に

希釈した anti-bovine PrPc (NAKAMURA *et al.*, 2002), 200 倍に希釈した anti-bovine NF (P-033; InRo Biomedtec Ab, Sweden), anti-bovine GFAP (RP041; Diagnostic Bio Systems, USA), anti-bovine type III (LB-1387; LSL, Tokyo) および V collagen (LB-1597; LSL, Tokyo) ウサギ抗血清を使用した.

結 果

脊髄における結合組織の局在

ウシ頸髄横断面の HE 染色像において観察される脊髄の結合組織は, 辺縁のクモ膜, 前脊髄動脈, 軟膜, 後中隔等であって (Fig. 1A), 実質表層部の白質や内部で H 字形を呈した灰白質に存在する結合組織の確認は困難であった. しかし, 結合組織に存在する間質コラーゲンである III 型あるいは V 型コラーゲンに対する抗体染色によっては上記に加え, 軟膜外部に存在する後根の神経内膜と周膜, 軟膜から枝分れして白質に陥入した後中間中隔や後中間溝の結合組織性支柱とその分枝およびそれらに伴って陥入した微細な血管の切断片が多数染色されていた (Fig. 1B, C, D).

脊髄における神経組織の局在

神経細胞に特異的な中間径フィラメントである NF に対する抗体染色では, 灰白質に存在する神経細胞体は染色されず, 細胞から伸長した様々な太さの軸索と突起の断片が染色されていた (Fig. 2A). 一方, 白質においては, 横断された有髄神経の大小の軸索と前根や後根の並走した軸索が束状に染色されていたが, 血管等の結合組織存在部位における陽性反応は観察されなかった (Fig. 2B).

グリア細胞に特異的な中間径フィラメントである GFAP に対する抗体染色では, 軟膜下白質表面の神経膠性表層限界膜とそれから分枝する様に白質に陥入した中間溝や中隔も線状に染色されていた (Fig. 2C). 前正中裂の拡大像においては, 正中裂に陥入した軟膜と血管は染色されておらず, 密集した微細な膠線維が線状あるいは網目状に染色された神経膠性表層限界膜とその分枝や白質の髄鞘が陽性反応を示していた (Fig. 2D). 髄鞘の染色像は, 白質の拡大像でより明確であり (Fig. 2E), 様々な大きさの円形もしくは多角形に染色された有髄神経の髄鞘が連続して膠網を形成し, この膠網は, 膠線維が線状に密集した膠質性支柱と神経膠性血管周囲限界膜によって大きく区画されていた.

脊髄における PrPc の局在

正中裂において抗 PrPc 抗体によって染色されていたのは, 軟膜内外の血管, 軟膜下の神経膠性表層限界膜とその分枝であり, 軟膜自体は染色されていなかった (Fig. 3A). 脊髄の中央部に位置し脳脊髄液が存在

する中心管では、上衣細胞の核以外の細胞質が細い突起状の膠線維も含めて染色されていた (Fig. 3B)。後中隔周辺では、脊髄軟膜から分枝した後中間中隔と中間溝に加えそれらの分枝がGFAPの場合と同様に鮮明な線状に染色されていた (Fig. 3C)。一方、灰白質は、全体として白質より強く染色されており (Fig. 3D)、挿入図に示した前柱の巨大な運動神経細胞の拡大像においては細胞質全体と二方向の突起が、中間帯の比較的小さな神経細胞では核周辺の強い陽性反応に加え三方向に伸長した軸索と突起が染色されていた。白質の拡大像においては、横断された有髄神経の軸索とそれらを同心円状に取り囲んでいる髄鞘が共に染色されているのに加え、毛細血管とその神経膠性血管周囲限界膜が染色されていた (Fig. 3E)。

脊髄神経の出入り口であり白質と灰白質が交錯する後外側溝においては、PrPcとNFやGFAPの局在との関連性が観察された (Fig. 3F, G, H)。すなわち、抗PrPc抗体染色像では、異なる網目の膠網が線状に染色された結合組織性支柱と膠質性支柱によって区画されており (Fig. 3F)、抗GFAP抗体によっては、膠網はより明確に染色され、線状の区画は幾分弱く染色されていたがPrPcに類似した染色像が観察された (Fig. 3G)。一方、抗NF抗体染色によっては、上記の異なる網目や区画毎に軸索が集団化した根糸が集合して後根を形成している様子が観察された (Fig. 3H)。

考 察

本研究では、ウシ中枢神経系におけるPrPcの存在

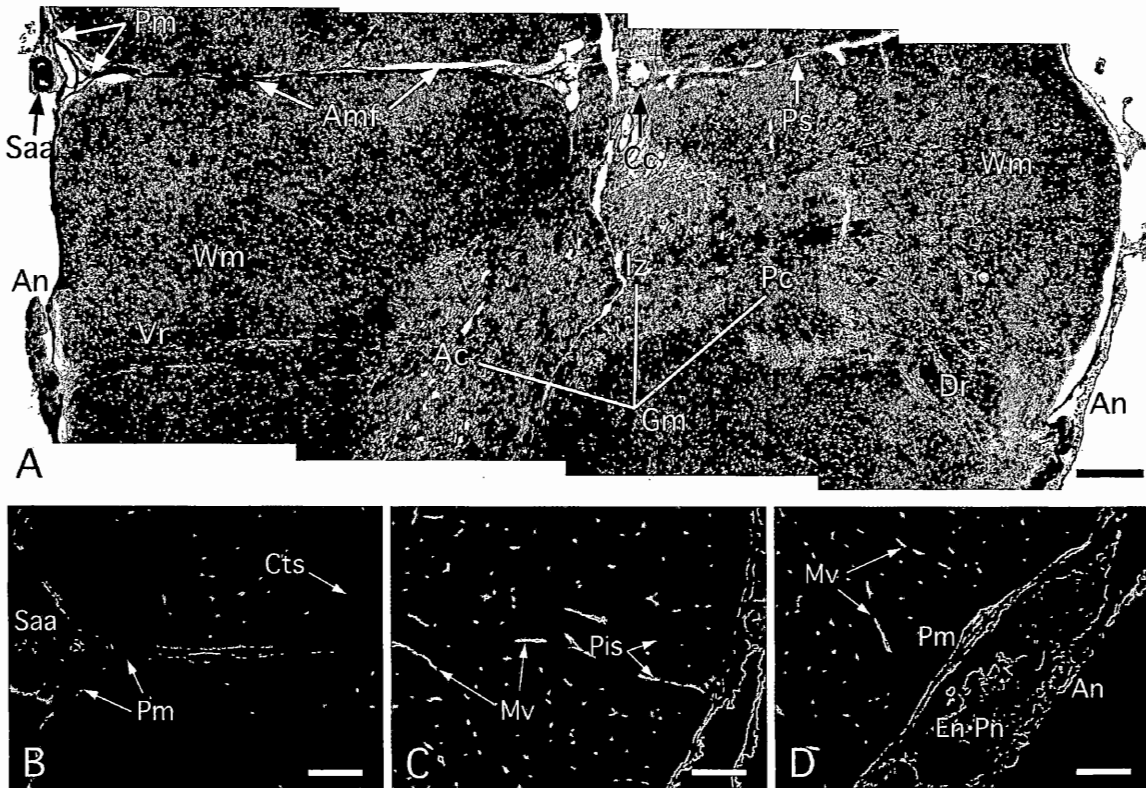


Fig. 1. Localization of connective tissues in the bovine spinal cord.

In a transverse section of cervical portion of the bovine spinal cord stained with HE (A), the spinal cord is divided from side to side by the spinal anterior artery (Saa), anterior median fissure (Amf), central canal (Cc) and posterior septum (Ps). The gray matter (Gm), which consists of the anterior column (Ac), intermediate zone (Iz) and posterior column (Pc), exists inside the white matter (Wm) covered by the pia mater (Pm). The ventral root (Vr) and dorsal root (Dr) extend from the Gm to the peripheral region surrounded by the arachnoid (An). The boxed areas B, C and D in A are shown in B, C and D respectively. In B, Saa, Pm and its branches, called connective tissue support (Cts), are immunostained with anti-type III collagen antibody. In the posterior region of the spinal cord (C, D), the posterior intermediate septum and sulcus (Pis), microvessels (Mv), endneurium (En) and perineurium (Pn) between the Pm and An are all stained with anti-type V collagen antibody. Scale bars, 1.0 mm (A), 0.5 mm (B, C, D).

The abbreviations used here are also used in Fig. 2 and 3.

部位の概要を把握するために、大脳や小脳に比べて構造が単純で比較的小さな横断面で全体像が検索可能な脊髄を間接蛍光抗体染色法により観察した。その結果、神経細胞の細胞体、軸索、突起のいづれにも PrPc は存在しており、グリア細胞に由来するものにおいては、有髄神経の髄鞘、中心管上衣細胞の細胞質と突起、膠質性支柱、神経膠性表層限界膜と神経膠性血管周囲限界膜に存在していた。さらに、結合組織性支柱である中間中隔および中間溝とそれらの分枝にも存在しており、加えて、脈管系では大小を問わず血管にも PrPc は存在していた。従って、PrPc は中枢神経系を構成する多くの要素に広範囲に、換言すれば、中枢神経系全体に普遍的に存在するタンパク質であると考えられた。

しかし、PrPc は中枢神経系全体において均一に存在しているのではなく、その局在には幾つかの特徴が観察された。まず第一は、脊髄軟膜下における線状の

陽性反応として観察された基底膜と接している神経膠性表層限界膜における局在あり、表層限界膜全体に存在することにより、脊髄の実質である神経組織全体を被っていたことである。第二は、コラーゲンに対する抗体染色で確認された結合組織性支柱における局在である。これは PrPc が、グリア細胞の指標タンパク質として用いた GFAP と類似した局在を示し、PrPc は神経系細胞の細胞膜リン脂質に繫留された状態で細胞外に存在し (MADORE *et al.*, 1999)、基底膜構成成分との結合性を有することから (GRANER *et al.*, 2000)、PrPc は中隔やその分枝である結合組織性支柱の実質である細胞外マトリックス自体に存在しているのではないと判断された。すなわち、これらと白質の境界部である神経膠性表層限界膜が中隔に沿って枝分れた分枝に局在していると判断され、結合性および膠質性支柱と共に白質の膠網をより大きく区画するという構

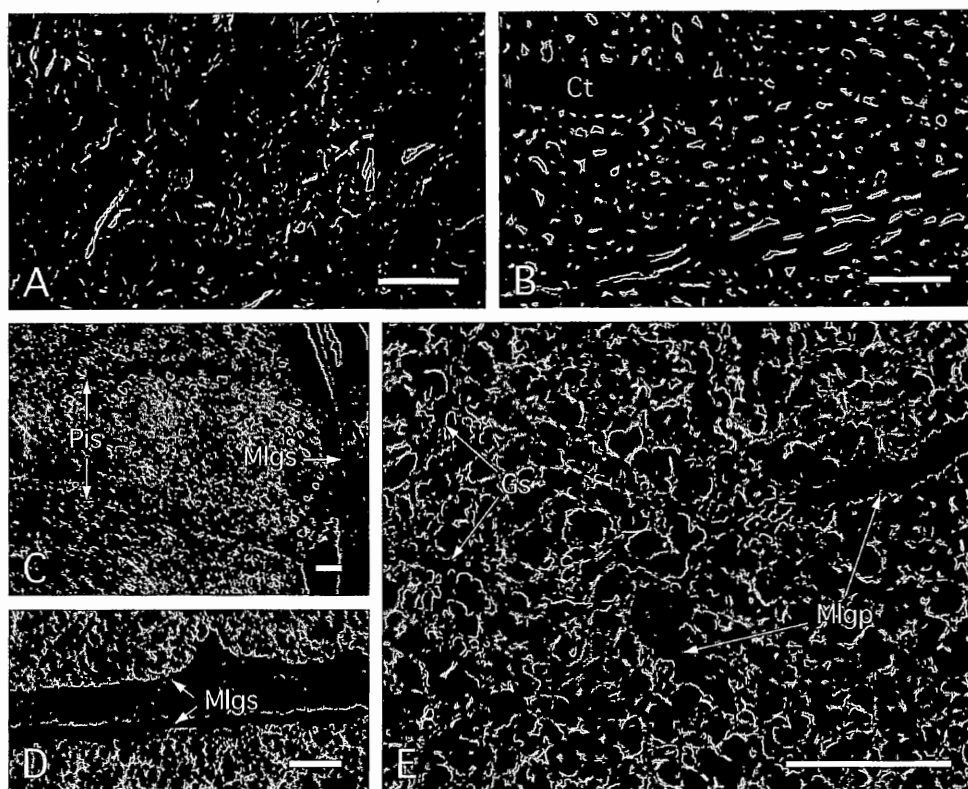


Fig. 2. Localization of neurofilament (NF) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the bovine spinal cord.

Transverse sections of the cervical portion of bovine spinal cord are immunostained with anti-NF (A, B) or GFAP (C, D, E) antibody. In the Gm (A), NFs were detected in various-sized fragments of axons and/or dendrites, but the cytoplasm around the nuclei (yellow) of neural cells was not stained. In the Wm (B), cross-sectioned thin and thick axons of myelinated nerve fibers and bundles of axons are immunostained, but the connective tissue (Ct) is not stained. GFAP was detected in the superficial layer of the Wm, called membrane limitans gliae superficialis (Mlgs), and in the Pis (C). In the Amf (D), the immunostained Mlgs shows a mass of fine fibers and that branch into the Wm. In the Wm (E), the stained myelin sheaths form a glial net that is sectioned by the stained gelatinous support (Gs) and membrane limitans gliae perivascularis (Mlgp). Scale bars, 100 μ m.

造的な役割を果たしていると考えられた。第三は、神経膠性血管周囲限界膜と中心管上皮細胞における局在である。中心管には脳脊髄液が存在しており、中心管上皮細胞は髄液脳関門の、血管周囲限界膜は血液脳関

門の各々重要な機能構成要素であり（藤田と藤田，1983），加えて，PrPcは血球細胞にも髄液にも存在していることから（BARCLAY *et al.*, 2002），PrPcは関門機能と密接に係わっていると考えられる。

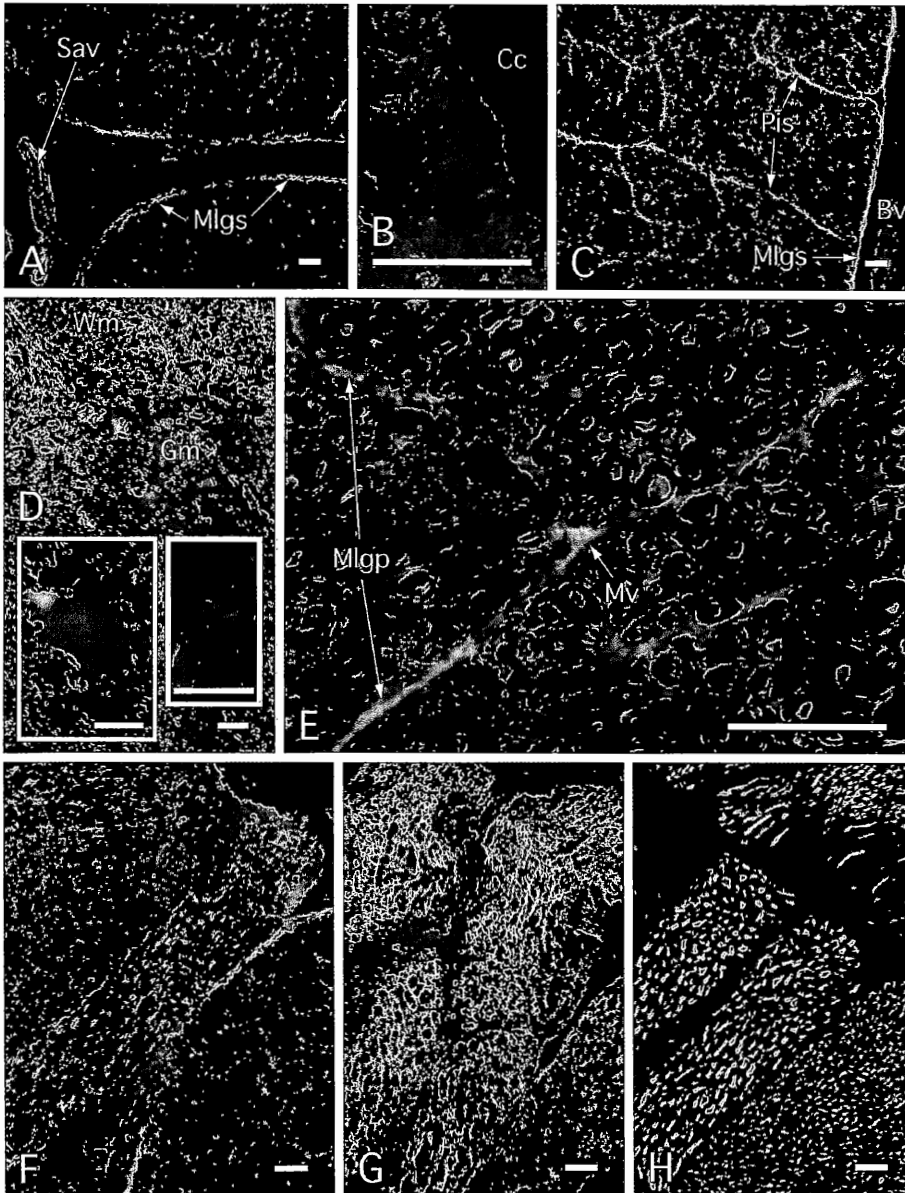


Fig. 3. Localization of cellular prion protein (PrPc) in the bovine spinal cord.

Transverse sections of the cervical portion of the bovine spinal cord are stained with anti-PrPc (A, B, C, D, E, F), GFAP (G) or NF (H) antibody. PrPc was detected in the spinal anterior vein (Sav), Mlgs and its branch near the Amf (A). In B, the cytoplasm and glial fibers of ependymal cells of the Cc are immunostained. In the posterior region of the spinal cord (C), a blood vessel (Bv), Mlgs, Pis and its branches are stained. In the Gm (D), cell bodies, axons and dendrites of neural cells are stained (insets). In a magnified image of the Wm (E), cross-sectioned axons and myelin sheaths of myelinated nerve fibers, microvessels and Mlgp are immunostained with anti-PrPc antibody. Near the sulcus lateralis posterior (F, G, H), the immunostained PrPc shows various types of glial net sectioned by linearly stained gelatinous and/or connective tissue support (F). The immunostaining pattern of GFAP resembles that of PrPc (G), but the immunostained NFs of axons are grouped in the sections described above (H). Scale bars, 100 μm (A-H), 50 μm (insets of D).

上述した PrPc の局在に関する三つの特徴は共通点を有している。神経膠性表層限界膜と血管周囲限界膜および中心管上衣は神経組織と他組織との境界を成しており、結合組織性および膠質性支柱は上記境界内部を区画しており、いずれも神経組織を分界している構造物である。一方今日、PrPc の生理機能に関しては、抗オキシダント作用を中心とした神経細胞の生存性への寄与が提案されている (BROWN *et al.*, 1999)。このことと局在の特徴を考え合わせると、中枢神経系における PrPc は神経組織、特に神経細胞の生存に適した環境の構築要素と推察される。この推論は、近年、ニューロンネットワークの発達を導く環境要素として神経細胞周囲の細胞外マトリックス網の存在が明らかにされ (MATTHEWS *et al.*, 2002)、PrPc の関与も提起されている (GRANER *et al.*, 2000) ことから示唆される。また、本研究では、光学顕微鏡下における PrPc の特徴的局在を検討したが、今後、軸索と髄鞘あるいはこれらと周囲の細胞外マトリックス網間におけるより詳細な PrPc の局在が検証されれば、神経細胞の生存環境に果たす PrPc の役割が解明されると思われる (MATTEI *et al.*, 2002)。

文 献

- BARCLAY, G. R., E. F. HOUSTON, S. I. HOLLIDAY, C. F. FAUCHAR and M. L. TURNER (2002) Comparative analysis of normal prion protein expression on human, rodent, and ruminant blood cells by using a panel of prion antibodies. *Transfusion*, **42**: 517-526.
- BROWN, D. R., B. S. WONG, F. HAFIZ, C. CLIVE, S. J. HASWELL and I. M. JONES (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.*, **344**: 1-5.
- BURTHEM, J., B. URBAN, A. PAIN and D. J. ROBERTS (2001) The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood*, **98**: 3733-3738.
- DEBEER, S. O. S., T. G. M. BARON and A. A. BENCSIK (2001) Immunohistochemistry of PrPsc within bovine spongiform encephalopathy brain sample with graded autolysis. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**: 1519-1524.
- FORD, M. J., L. J. BURTON, R. J. MORRIS and S. M. HALL (2002) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neurosci.*, **113**: 177-192.
- 藤田尚男, 藤田恒夫 (1983) 標準組織学総論. 第2版. 257-259. 医学書院. 東京.
- GRANER, E., A. F. MERCADANTE, S. M. ZONTA, V. R. MARTINS, D. G. JAY and R. R. BRENTANI (2000) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Letters*, **482**: 257-260.
- GU, Y., H. FUJIOKA, R. S. MISHRA, R. LI and N. SINGH (2002) Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J. Biol. Chem.*, **277**: 2275-2286.
- LAINE, J., M. E. MARC, M. M. SY and H. AXELRAD (2001) Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *E. J. Neurosci.*, **14**: 47-56.
- MA, J. and S. LINDQUIST (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**: 14955-14960.
- MADORE, N., K. L. SMITH, C. H. GRAHAM, A. JEN, K. BRADY, S. HALL and R. MORRIS (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.*, **18**: 6917-6926.
- MARTINS, V. R., R. LINDEN, M. A. M. PRADO, R. WALZ, A. C. SAKAMOTO, I. IZQUIERDO and R. R. BRENTANI (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Letters*, **512**: 25-28.
- MATTEI, V., T. GAROFALO, R. MISASI, C. GIZZI, M. T. MASCELLINO, V. DOLO, G. M. PONTIERI, M. SORICE and A. PAVAN (2002) Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem. Res.*, **27**: 743-749.
- MATTHEWS, R. T., G. M. KELLY, C. A. ZERILLO, G. GRAY, M. TIEMEYER and S. HOCKFIELD (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J. Neurosci.*, **22**: 7536-7547.
- NAKAMURA, F., I. SEKI, K. KOBAYASHI, M. TANAKA and S. FUKUNAGA (2002) Immunohistochemical detection of cellular prion protein (PrPc) in the rat central nervous system. *Anim. Sci. J.*, **73**: 553-556.
- PRUSINER, S. B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**: 13363-13383.
- VERGHESE -NIKOLAKAKI, S., H. MICHALOUDI, M. POLYMERIDOU, M. H. GROSCHEP, G. C. PAPADOPOULOS and T. SKLAVIADIS (1999) Expression of the prion protein in the rat forebrain - an immunohistochemical study. *Neurosci. Letters*, **272**: 9-12.
- VOIGTLANDER, T., S. KLOPPPEL, P. BIRNER, C. JARIUS,

H. FLICKER, S. VERGHESE -NIKOLAKAKI, T.
SKLAVIADIS, M. GUENTCHEV and H. BUDKA (2001)
Marked increase of neuronal prion protein in

immunoreactivity in Alzheimer's disease and
human prion disease. *Acta Neuropathol.*, **101**: 417-
423.

