

氏名	田中 美咲
所属	獣医衛生学教室
学年	D3
活動先名	コロラド州立大学プリオン研究センター
期間	① 2018年10月18日-11月19日
① (出発日-帰札日)	
② (インターンシップ 実施開始日-終了日)	② 2018年10月19日-11月16日

## 活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

コロラド州立大学 (CSU) が位置するコロラド州北部では、1967 年以降飼養施設内のシカ群において進行性の消瘦を経て斃死する慢性消耗病 (Chronic Wasting Disease, CWD) が相次いで認められてきました。1982 年に CSU の Dr. Williams らにより、CWD がスクレイピーなどに類似した海綿状脳症を伴うことが初めて報告され、現在では CWD はシカ科動物内で伝播するプリオン病として認知されています。これまでに CWD プリオン陽性のシカ科動物はカナダ、韓国、ノルウェー、フィンランドでも見つかっていますが、現在もなおコロラド州北部と近隣地域を中心とする北アメリカ地域が CWD の“endemic area”といえる状況にあります。このような歴史的経緯と状況を踏まえ、CWD の伝播や病態解明に向けた研究活動のさらなる発展と国内外への啓蒙のためコロラド州立大学獣医学生命科学研究科は 2010 年にプリオン病研究センター (Prion Research Center, PRC) を設立しました。このプリオン研究センターは大学院生やポスドクといった若手を含め 70 名以上の研究者を抱える、世界的に見ても大規模な研究グループのひとつであります。感染実験棟での完全屋内飼育によるオジロジカへのプリオン曝露実験は世界でも唯一このプリオン研究センターでのみ実施されている研究であり、他にも様々なアプローチでプリオン病の伝播、発症機序など未解明問題の解明に取り組む PRC の研究グループは、特に CWD 関連研究において世界を牽引するポジションを担ってきました。加えて PRC には現在、私の学位研究と密接に関連したテーマでの研究成果を報告した Dr. Moreno が在籍しており、直接に技術指導と討論の機会を得ることは自身の研究を進める上で非常に有意義にはたらくことが期待されました。以上の理由により、私は今回コロラド州立大学プリオン研究センターの Dr. Zabel, Dr. Moreno, Dr. Denkers の三氏に海外インターンシップの受け入れを要請し、快諾していただきました。このプリオン研究センターでインターンシップを行う目的は次の 4 点になります。まず欧米諸国でのプリオン病研究の動向と若手研究者の研究環境を知り自身のキャリアプランを考えること、次に当研究室に経験のない解析手法を習得すること、互いの研究について討論し自身の研究を発展させるヒントを得ること、そして PRC の特色であるシカを用いた感染実験の現場を経験しバイオセーフティーを考慮した大動物の取り扱い技術を学ぶことです。コロラド州立大学のプリオン研究センターは経歴の多様な研究者が在籍し、分子生物学的手法から大動物を用いた感染実験まで研究が多面的に展開されていることから訪問によって得られるものが多く、インターンシップに非常に適した機関であると考えました。

## 活動内容・成果

### 1. 新しい解析手法の習得

今回のインターンシップでは研究テーマの異なる 3 名の先生方の研究に携わる機会を頂き、PMCA (protein misfolding cyclic amplification), RT-Quic (real-time quaking induced conversion), CPCA (cervid prion cell assay) という 3 つの実験手法について Hands-on training を受けました。これら 3 つはいずれも In vitro で試料に含まれる微量のプリオンを検出する、または試料中のプリオンの増殖伝播能を評価する技術であり、かつ現在私が在籍する研究室でも既存の設備で導入可能な技術であります。私は大学院での研究において、主に初代培養神経細胞を用いており、プリオン感染マウス脳乳剤由来の膜画分に曝露することでプリオン感染が成立し異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) が産生されることを確認しました。しかしながら、この新しく産生された PrP<sup>Sc</sup> の Conversion activity (PrP の構造転換を引き起こすシードとしての能力) と細胞集団のプリオン感染率の 2 点については、実験結果の解釈に大きな影響を与えうるにも関わらず、これまで十分に評価できていませんでした。これらの点を改めて評価するにあたり、今回のインターンシップで学んだ技術が有効に使えようと考えています。各技術の概要とトレーニング内容については次の通りです。

### 1-1. PMCA (protein misfolding cyclic amplification)

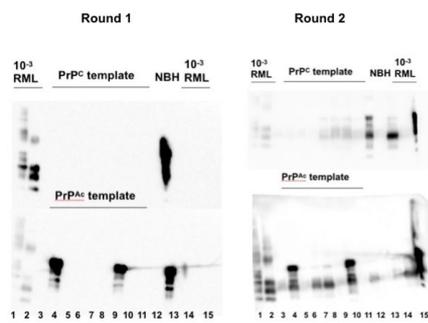


図 1. Multi-round PMCA で増幅された PrP<sup>Sc</sup>

PMCA では、非感染マウス脳乳剤中の PrP を基質として、少量のサンプルを加えた溶液に断続的な超音波破碎処理を加えることにより、サンプルに含まれる微量の PrP<sup>Sc</sup> をシードとして PrP の構造転換を人為的に引き起こす。このようにして増幅された PrP<sup>Sc</sup> はウエスタンブロットによりプロテアーゼ抵抗性画分として検出できる。反応物の一部を次の反応のサンプルとして用いてこの一連のサイクルを繰り返すことにより、元のサンプルにごく微量含まれるプリオンを検出することができる技術である。トレーニングでは Dr. Zabel の指導の下、推定上の PrP の構造転換中間体について、マウスの脾臓乳剤をサンプルとした PMCA を実施しその構造転換誘導能を検証しました。

### 1-2. RT-Quic (real-time quaking induced conversion)

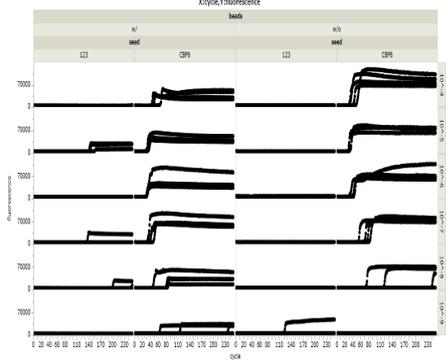
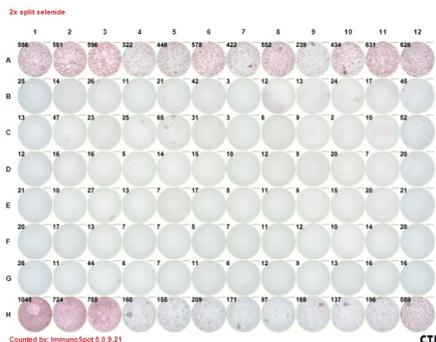


図 2. RT-Quic 法によるプリオンの検出

RT-Quic は PMCA に類似した技術ですが、リコンビナント PrP を基質に利用し、振動 (quaking) によってサンプル中の PrP<sup>Sc</sup> をシードとした構造転換を誘発します。生成するアミロイド様構造物の検出にはチオフラビン T の蛍光を利用するため、リアルタイム測定が可能であること、PMCA の検出ステップにあるプロテアーゼ処理やイムノブロットの手順が必要でないことからより簡便に実施できる手法です。また蛍光シグナルが得られるまでの時間 (ラグタイム) の長さから、サンプルに含まれる PrP<sup>Sc</sup> 量を推定し定量的に解析することも RT-Quic の長所となります。トレーニングでは Dr. Denkers の指導の下、CWD 感染オジロジカの唾液サンプルからのプリオン検出を試みました。

### 1-3. CPCA (cervid prion cell assay)



CPCA は上記 2 つの手法と異なり、Enzyme-linked Immuno-spot (ELISpot) の原理を応用して培養細胞でのプリオン増殖と細胞間伝播を定量的に解析する手法です。細胞をプリオン接種原に曝露して一定期間培養した後、剥離した細胞を PVDF 膜に吸着させ、PrP 特異的抗体を用いて感染細胞のスポットを検出します。感染細胞数は自動画像解析により計測され、簡便かつ High-throughput に感染率を算出することが可能です。トレーニングでは、Dr. Moreno の指導の下プリオン感染に感受性/抵抗性の細胞で発現量に差が認められた遺伝子の機能解析の一環として、その代謝物がプリオンの伝播に与える影響を調べました。

図 3. CPCA による High-throughput な感染細胞数の計測

なお、今回のインターンシップの目的の一つとして酸化ストレス応答の解析手法の習得を挙げていましたが、あいにく予定していた実験期間に指導予定だった Dr. Moreno が病欠となり、以降の日程で他のトレーニングとの調整がつかなかったことから、酸化ストレス応答解析については Hands-on-training を受けるに至りませんでした。しかしながら複数の酸化ストレス検出試薬とそれぞれの特徴、酸化ストレス誘導法、酸化ストレスのマーカー分子などこれから実験に着手するにあたって有用な情報をご教示いただきましたので、今後の解析は必要に応じて改めてメールで相談することも考えながら進めていきたいと思います。

## 2. 研究内容に関するディスカッション

私達は 2 年前の SaSSOH2016 に Dr. Moreno を招聘し、プリオン病の分子機序について発表された研究について講演していただきました。Dr. Moreno は ER ストレスに対する細胞の生理的な応答である Unfolded Protein Response (UPR) に薬物及び分子生物学的手法で介入することで、プリオン病の進行を制御できることを 2012 年に Nature に報告し、神経変性メカニズム解析における金字塔を打ち建てました。以降世界中の研究者が UPR に焦点を当てた解析を進めており、私は特にグリア細胞からの刺激を受けない神経細胞で PrP<sup>Sc</sup> が産生された時に生じる UPR の活性化状態の変化に着目して解析を進めてきました。その結果、神経細胞単独で起こる UPR の活性化は細胞間コミュニケーションの下で起こ

る活性化と部分的に異なることが明らかになりつつあったことから、今回のインターンシップを機に双方の研究成果について直接討論を行いました。Dr. Moreno には私の現在の研究について興味をもって聞いていただき、彼女の In Vivo 試験結果を踏まえた解釈を示していただきました。またさらに深く掘り下げるべき点や今後の検討課題について具体的なアドバイスを頂いたので、それらを参考に現在改めて実験計画を組みデータを取得しているところです。

### 3. プリオン感染実験における大動物（シカ）取り扱い技術の習得

先に述べた通り、完全屋内飼育によるシカへのプリオン感染実験は世界でも唯一本施設でのみ実施されており、コロラド州立大学プリオン研究センターを特色付ける研究の一つです。私は日本の獣医師免許を所持しているとはいえ、現在はマウス以外の動物を扱う機会はなく、大型の動物を動物・研究者双方が安全であるように取り扱う技術は持ち合わせていませんでした。さらにバイオセーフティを考慮した大型動物の取り扱いは、世界でも限られた施設でしか経験できないものです。一方で、現在までに報告されているプリオン病の自然宿主はウシ、ヒツジ、シカなどの大型動物が多いことから、プリオン病の研究においては特に野外検体などの調査で大動物の取り扱い技術が将来的に必要な可能性があります。また、獣医学のバックグラウンドを持つ研究者としては、場合によって周囲から期待される技術であるとも考えました。今回の訪問時、本施設では 30 余頭のオジロジカが実験グループに応じてそれぞれの区画で飼育されており、5 日間にわたって 4 グループ計 20 頭からサンプリングを行いました。最も若く小柄なグループは導入から 1 週間後の 3 か月齢のグループで、体重は 25 kg 前後でした。しかしこの最軽量グループでさえ、大柄な男性でも鎮静剤の筋肉注射のためにごく短時間捕獲するのがやっとで、興奮した個体が人の背を飛び越えんばかりに飛び跳ねるのを目の当たりにしました。これをきっかけに改めて大動物の取り扱いに慎重を期し、群飼育であるため鎮静のかかっていない周りの個体の行動にも気を配り、採材時は確実に隔離するなどの特有の注意点も学びました。計 20 頭ものサンプリングに参加させていただいたことで、一連の動作に習熟するとまでは言えませんが、ずいぶんと慣れることができました。将来的に獣医師としての動物取扱スキルを求められた時には、この経験を活かして積極的に期待に応えていきたいと思えます。



図 4. 定期モニタリングでの採材の様子

左から鼻腔スワブの採取、頸静脈からの採血、開口器を用いた保定と扁桃のバイオブシー。左二枚は本人が採材している。採材前に麻酔銃を用いて鎮静・麻酔をかけている。他に唾液、尿、糞、直腸粘膜のバイオブシーを行った。タイムポイントによっては水、床敷などの環境試料を採取することがある。

### 今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

このインターンシップで米国の研究機関に 1 ヶ月間滞在する目的のひとつは、自身の卒業後のキャリアプランを立てるにあたって必要な情報を集めることにあります。私がこれまでに参加してきたプリオン研究分野の学会では、毎回少なからず海外の研究者も参加しており、ポスター発表であっても海外の研究者とディスカッションする機会を得られてきたことは幸いに思っています。しかし、実際に欧米諸国で今現在進められているプリオン病研究の動向と若手研究者の研究環境を目にしておくことは、卒業後の進路を選択するにあたって非常に重要な情報となります。実際に現地で生活し、日常的な研究活動に参加させていただく中で、いくつかのポイントが気になりました。

まず、研究グループメンバーのバックグラウンドが多様です。プリオン研究センターとして研究者が集まっているので純粋に人数が多い、ということもありますが、教員だけでなくスタッフや学生の経歴も多岐にわたり、研究を充実させる一助となっているように感じました。学生に関しては、特に学部生が特定の研究室への所属を決定する前に、およそ 2 週間を 1 クールとしたローテーション方式で複数の研究室での活動に参加しているとのことで、このことが様々な研究を広く知り彼らのバックグラウンドに厚みをもたせることに貢献しているのではないかと思います。またこのマンパワーの充足した環境はいわば集合知のようなものを形成しており、各々の研究を発展させるのに非常に有効に機能していると感じました。事実として、研究発表セミナーにはセンター内の 5 つの研究室から学生を除

いても 20 名以上のプリオン研究者が集まっており、発表者に対してそれぞれの視点から数多くの突っ込みが入れられ大変盛り上がった議論がなされていました。このような、多様な知的背景に支持される活発な議論が課題解決の糸口をつかむのに有利にはたらくとの思いから、共通のキーワードで数十人が緩やかにつながりながら各々の研究課題に取り組む、というチームが理想像の一つとなりました。次のポイントとして、研究室単位で見たときに人数に対してプロジェクトの本数が比較的少ないと感じた点を挙げます。結果として、それぞれの研究プロジェクトは教員に加えてポスドク、大学院生、テクニカルスタッフ、学部生まで含めた複数の研究者からなるチームによってうまく運営されており、個人の都合に合わせて臨機応変に作業を分担、あるいはシェアすることができていました。このような進め方は、アメリカのワークスタイルの特長の一つであり、日本と大きく異なる部分だと思います。一方で、研究室単位のプロジェクト数が多くないということは、それぞれの研究室がある程度テーマを絞り込んで研究に取り組んでいるということでもあります。実際にプリオン研究センターでは、研究室によってプリオンの生理的機能、CWD プリオンの生化学的性状、CWD の生体内・個体間伝播、というように異なる主テーマをもち、その周辺領域に集中してチームの総力を挙げて取り組むスタイルをとっていました。したがって将来にわたって追究したいテーマがある程度決まっている場合は、そのプロジェクトが採用されるか、という視点で慎重に研究室を選ぶべきだと感じました。私はタンパク質のミスフォールディングから神経変性に至るまでの分子機序に興味があるので、キャリアプランを立てるにあたりまず神経変性メカニズムの解明に注力し実績のある研究グループを探ることが重要であると考えました。

最後に、私の研究スキルがどれほど通用するのか、自己評価を少し述べたいと思います。まず、日常的な実験量については CSU の大学院生に比べ私達のほうが圧倒的に多くをこなしており、CSU の先生方も私がこれまでの 5 年間にわたる研究経験を通して習得した実験技術、実験の原理原則に関する知識といったテクニック面については、高く評価してくださいました。トレーニングの際もデモンストレーション後すぐに私自身で実験を進めさせてくださったことから、技術については信頼されていると感じ自信になりました。一方 CUS で会った学生は総じて勉強量が多く、研究テーマについて背景や周辺領域を含めた知識が充実していると感じました。この守備範囲の広さについては、先にも述べた学生のローテーションシステムが貢献しているのかもしれない。今回のインターンシップでは、3 つの研究室に受け入れていただき、多くの研究者と活動を共にしたことで、自己評価と他己評価を得ることができました。これから卒業に向けて、専門分野だけでなく周辺領域についてもより積極的に知識を吸収し理解を深めていく必要があると強く感じています。そのようにして海外の若手人材に対する知識不足を埋め、キャリアパスを自由に選べるようさらに研鑽を積みたいと思います。

今回のインターンシップを通じて CSU の研究者と直接知り合うことができ、いつでも相談にのっていただける関係を築けたことは、卒業後も研究を続けて行くうえで研究面でもキャリア面でも、非常に大きな強みとなりました。また日本とは異なる研究環境、研究方針の下での活動を経験し、今後のキャリアプランを決める際の価値基準となるポイントを定めることができました。最後になりましたが、私のインターンシップ活動を受け入れてくださったコロラド州立大学の Dr. Zabel, Dr. Moreno, Dr. Denkers, その他多くのスタッフや学生の皆様、およびこの機会を与えていただき事前準備から帰国までご支援くださったに北海道大学の皆様に心より感謝申し上げます。

指導教員確認欄	<p>指導教員所属・職・氏名</p> <p>北海道大学大学院獣医学研究院獣医衛生学教室 教授</p> <p>堀内 基広</p>
---------	---

※1 電子媒体を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。

※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。

※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp