

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2006～2008
課題番号：18209031
研究課題名（和文） プリオン感染病態の研究

研究課題名（英文） Study of the pathomechanism in the prion infection

研究代表者

北本 哲之 (KITAMOTO TETSUYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20192560

研究成果の概要：

プリオン感染に関してその感染源を特定できる方法として、トレースバック現象を見だし報告した。また、このトレースバック現象を利用して、従来感染源が不明であった硬膜移植後 CJD with plaques (dCJD/PL と略す) の感染源が孤発性 CJD の VV2 であることを証明し、また MV2 も感染源になりうることを学術論文として報告した。dCJD/PL の感染源を特定したのは世界初である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：遺伝子 感染症 神経科学 痴呆 プリオン

1. 研究開始当初の背景

我々はプリオン感染に対する最適なモデル動物を作製するために、プリオン蛋白遺伝子をマウスからヒトに相同組み換えを行ったノックイン動物を作製してきた。このノックイン (Ki-) マウスとして、ヒトの

Hu129Met, Hu129Val, Hu219Lys の3種類と BSE 感染に対してウシの Bov を作製してきた。そして、作製した Ki-Hu, Ki-Bov を使って、vCJD (英国のバリエーション型の CJD) の輸血や手術における2次感染がどの遺伝子型のヒトを侵すのか調べたところ、

vCJD プリオンは、VV 以外のヒトを侵すことを明らかにした。これは、英国人の 88%・日本人では 100%のヒトが vCJD に感染に侵される可能性を示唆し、さらに驚いたことに、vCJD プリオンがウシ型のノックインマウスまで簡単に侵すことという結果が得られた。このようなヒトのプリオンは調べた限り vCJD のみである。つまり、この方法論を使えば感染源を追及できることになる（トレースバック可能となる）。

それでは、実際に感染がほぼ証明されている硬膜移植後の CJD を使って、トレースバック現象によって感染源が追求できるか検証する。硬膜移植後の CJD で、コドン 129MM の症例にも関わらずアミロイド斑を持つ症例は硬膜移植の少なくとも 30%以上にある。しかしながら、このような症例は硬膜移植以外に弧発性 CJD では存在しないのである。この硬膜移植例 CJD の感染源を追求するためにトレースバック現象をはじめとしたプリオン感染分子機構の解明への期待が研究の背景として存在していた。

2. 研究の目的

我々は、感染因子プリオンがどのようにして蛋白の構造を変換し感染という行為を成立させているのかを追及してきた。このプリオン感染のメカニズムを明らかにするという研究の中で、動物モデルを使った感染病態の解明、実際のヒトの脳のなかでどのように異常化が起こっているのかを解明することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) FDC を使った感染実験

硬膜移植後 CJD with plaques プリオンの感染実験と同じ条件で孤発性 CJD のうちのコード

ン 129VV でしかも異常プリオン蛋白がタイプ 2 である (いわゆる VV2) の感染実験を行う。具体的には、VV2 プリオン 50 マイクロリットルをノックインマウス (Ki-Hu129MM, 129MV, 129VV) 腹腔内に投与する。投与後、75 日の観察期間の後、脾臓組織の半分を Western blot に、そして半分を IHC (免疫染色) で検査を行う。FDC を使用した検査は、観察期間が最長でも 75 日と平成 18 年中に結果の評価が可能である。

(2) 脳内投与による感染実験

短期間で感受性を調べるには、FDC を用いたアッセイ方法が最適であるが感染力価を測定するなど定量的な解析には脳内投与による潜伏期間を同定しなければならない。感受性の比較に可能なのはノックインマウスで発現量を一致させたモデルであるが、発現量が多くなると潜伏期間が長すぎるという我々の経験からノックインマウスだけでなく過剰発現を得るためトランスジェニックマウスとノックインマウスを交配したモデルも作製している。ただコドン 129 のヘテロマウスをトランスジェニックで作ることは不可能であるので、過剰発現系は Ki-Hu129MM+Tg-129M と Ki-Hu129VV+Tg-129M とに限定して作製する。硬膜移植後 CJD with plaques プリオンでは、Ki-Hu129VV の潜伏期間が 270 から 300 日、過剰発現の Ki-129MM+Tg-129M で 500 日以上を要するので、VV2 の感染実験も脳内投与後 2 年間の観察期間を予定している。

4. 研究成果

(1) 代表的な sCJD プリオンの感染実験

マウス遺伝子型	接種プリオン	潜伏期間
Ki-Hu129MM	MM1	430日
Ki-Hu129MM	VV2	720日
Ki-Hu129VV	MM1	640日
Ki-Hu129VV	VV2	310日

上の表のように、基本的には sCJD プリオンは、その遺伝子型が同じマウスを用いた感染実験の方が、潜伏期間は短かった。つまり MM1 のプリオンは、129MM のノックインマウスを用いた時に、VV2 のプリオンは 129VV のノックインマウスを用いた時に短い潜伏期間を示し、シークエンスを越えた感染ではそれよりも遥かに長い潜伏期間を必要とした。

更に、VV2 プリオンを 129MM マウスに接種した感染実験では、PrPres の分子サイズは、タイプ 1 とタイプ 2 の中間型 (intermediate form) を呈した。

(2) 硬膜移植後 CJD/アミロイド斑プリオンの感染実験

マウス遺伝子型	接種プリオン	潜伏期間
Ki-Hu129MM	硬膜 Mmi	>520日
Ki-Hu129VV	硬膜 Mmi	300日

硬膜移植後 CJD/アミロイド斑の症例は、コドン 129 が MM にも関わらず多数のアミロイド斑が見られるという sCJD には存在しないような症例である。この PrPres は、詳しく調べるとタイプ 1 とタイプ 2 の中間型を示しており、VV2 を感染させた 129MM のプリオンに非常に似た性質を示した。そこで、この硬膜 Mmi プリオンを用いて感染実験を行ったところ、接種したプリオンの遺伝子型とは異なる 129VV マウスに感受性が高いことが明らかとなった。この現象は、トレースバック現象であると考え、感染源は VV2 プリオンであり、このプリオンがシークエンスを越えて 129MM のヒトに感染したのが硬膜移植後 CJD/アミロイド斑の症例であるということにな

る。

(3) トレースバック現象は、実験動物で再現されるのか？

すでに、4-1 の赤字で示したように、VV2 プリオンを 129MM マウスに感染させ発病させたマウスの脳を我々は所有している。4-2 の実験で硬膜 Mmi が本当にトレースバック通り VV2 プリオン由来であるとする、4-1 の実験で得られた VV2 を接種した 129MM マウスの脳を感染実験すると、硬膜移植 Mmi と同様に、129VV のマウスに非常に高い感受性を示し、129MM のマウスには感染が難しいという結果が得られた。つまり、トレースバック現象は感染源の追求に役立つことが直接証明された訳である。

マウス遺伝子型	接種プリオン	潜伏期間
Ki-Hu129MM	MM[VV2]i	684日
Ki-Hu129VV	MM[VV2]i	306日

(4) MV2 というプリオン

硬膜 CJD/PL のプリオンが、VV2 プリオンが 129M/M のヒトに感染したからという結果は、移植された硬膜の感染源が何であったかという点で、一部しか答えていないのが事実である。何故なら、硬膜 CJD/PL は日本の硬膜移植後 CJD の 30% を占めるにも関わらず、ヨーロッパの VV2 の頻度は、10-15% 程度であるからである。ここで考慮しなければならない孤発性 CJD のプリオンは MV2 である。我々は、VV2 のプリオンが 129M/M のヒトに感染し、その結果 Mmi という新しいプリオンを生じることを 4-1 で示した。129M/V のヒトの脳内で、129V の分子が異常化して V2 と仮定すると、この V2 プリオンは 129M の分子も異常化させることができ、結果として Mi というプリオンが生じる可能性が示唆される。現実的に MV2 のプリオンの分子量を解析

すると、MV2+i であることが解った。残念ながら、129M 分子と 129V 分子を同定することは不可能であるので、MV2 が V2 と Mi から構成されるかどうかは不明であるが、MV2 が V2+Mi ならば 129M/M のヒトに感染した場合、V2 でも Mi でも Mmi を生じるはずである。よって、Mmi を作製可能なプリオンは、VV2+MV2 となりヨーロッパの孤発性 CJD のほぼ 30% を占める割合となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

1) Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T. The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 (in press) 査読有

2) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Human PrP^{219K} is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in vCJD infection. *J Biol Chem*. 2009, 284: 3603-3609 査読有

3) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 15:265-271. 査読有

4) Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T: Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion* 3:1-4, 2009 査読有

5) Ikeda S, Kobayashi A, Kitamoto T.

Thr but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding.

Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 16;369(4):1195-1198. 査読有

6) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Sobue G. Clinicopathologic characteristics of five autopsied cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2008 Feb;28(1):51-61. 査読有

7) Hoshino A, Iwasaki Y, Izumi M, Kimura S, Ibi T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y, Sahashi K. MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with unusually prolonged disease duration presenting with panencephalopathic-type pathology. *Neuropathology*. 2008 28(3):326-332 査読有

8) Niimi Y, Iwasaki Y, Umemura T, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Hirayama M, Sobue G. MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with early stage cerebral cortical pathology presenting with a rapidly progressive clinical course. *Neuropathology*. 2008 28(6):645-651 査読有

9) Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T. Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients.

Acta Neuropathol. 2008 116(5):561-566. 査読有

10) Ikeda S, Kobayashi A, Kitamoto T. Thr but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 ;369:1195-1198 査読有

11) Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol*. 2007 Nov;254(11):1509-1517. 査読有

12) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Ito M, Kitamoto T, Wakayama Y, Sobue G: Enhanced Aquaporin-4 immunoreactivity in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2007; 27: 314-323. 査読有

13) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. *J Biol Chem*. 2007;282:30022-30028 査読有

14) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology*. 2007 Jul 24;69(4):360-367. 査読有

15) Shin RW, Ogino K, Shimabuku A, Taki T, Nakashima H, Ishihara T, Kitamoto T. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models:

a role to mediate interaction of Abeta and tau. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007 Jun;113(6):627-636. 査読有

16) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Ophthalmic surgery in prion diseases. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jan;13(1):162-164. 査読有

17) Iwasaki Y, Iijima M, Kimura S, Yoshida M, Hashizume Y, Yamada M, Kitamoto T, Sobue G. Autopsy case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with signs suggestive of brainstem and spinal cord involvement. *Neuropathology*. 2006 Dec;26(6):550-556. 査読有

18) Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Sobue G. Clinicopathologic characteristics of sporadic Japanese Creutzfeldt-Jakob disease classified according to prion protein gene polymorphism and prion protein type. 査読有
Acta Neuropathol (Berl). 2006 Nov;112(5):561-571. 査読有

19) Hirose K, Iwasaki Y, Izumi M, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Sahashi K. MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with widespread neocortical pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2006 Oct;112(4):503-511 査読有

20) Ishihara K, Sugie M, Shiota J, Kawamura M, Kitamoto T, Nakano I. Severe cortical involvement in MV2 Creutzfeldt-Jakob disease: an autopsy case report.

Neuropathology. 2006 Oct;26(5):433-437. 査読有

21) Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Shirasaki H, Komai K, Kitamoto T, Yamada M. The MM2-cortical form of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with visual disturbance. 査読有

Neurology. 2006 Aug 8;67(3):531-3.

22) Kawauchi Y, Kamitani T, Yagishita S, Kitamoto T, Kishida H. Autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with Met/Val heterozygosity at codon 129 and type 1 protease-resistant prion protein presenting some florid-type plaques and many Kuru plaques in the cerebellum.

Neuropathology. 2006 Aug;26(4):313-317. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本 哲之 (KITAMOTO TETSUYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20192560

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし