

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591001

研究課題名 (和文)

新規プリオン感染抑制因子の検討

研究課題名 (英文)

Analysis of the inhibiting factor in prion infectivity

研究代表者

佐藤 克也 (KATSUYA SATOH)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：70398147

研究成果の概要 (和文)：

異常プリオン蛋白の沈着には正常プリオン蛋白が必須この結果よりプリオン感染マウスでは腎臓・精巣では正常プリオン蛋白が存在しているにもかかわらず、異常プリオン蛋白が沈着していない。つまり他臓器とは異なり、正常プリオン蛋白が異常プリオン蛋白のコンフォメーションの場ではないことを示しており、何かの機序により正常プリオン蛋白が異常プリオン蛋白のコンフォメーション変化を抑制している可能性が考えられた。我々は cDNA substration アッセイによりプリオン感染マウス腎臓において、正常マウスとプリオン感染マウスでの腎臓での mRNA での遺伝子発現の違いを比較・検討した。(図2)つまりプリオン感染マウスの腎臓において強発現している遺伝子がいわゆるプリオン抑制遺伝子の候補である。今回の手法にて6個の候補遺伝子を見つける事ができた。その候補遺伝子の中で脳内では強発現し、腎臓では遺伝子発現が低い遺伝子を同定することが可能となった。その6つの候補遺伝子の中で1つの遺伝子が最も考えやすい遺伝子であり、遺伝子を同定した。その遺伝子のノックアウトマウスの作成に成功し、感染実験を行っている。

研究成果の概要 (英文)：

The normal prion protein is essential to the deposition of the abnormal prion protein. The normal prion protein is present with kidney or the testis with the prion infection mouse, but the abnormality prion protein does not deposit it in the kidney or testis. In other words, unlike the other organs, we show that the normal prion protein is not the place of the conformation of the abnormal prion protein. The possibility that the normal prion protein inhibited the conformation change of the abnormal prion protein was thought about by some kind of mechanisms.

We analyzed and compared the difference of the gene expression in the mRNA with the kidney with the prion infection mouse with the normal mice in prion infection mouse kidney by cDNA substration assay. In this assay, we think that one over-expression or low-expression in the kidney of the prion infection mouse is the candidate of so-called prion suppressive gene.

We were able to find six candidate genes by this procedure. A gene expression could identify low-expression gene with the kidney and over-expression gene with the brain. We found the gene which one genes were the most suitable to think about in the six candidate genes most and identified genes. The making of the genetic knockout mouse is successful and we started to perform the infected-prion experiment in the knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	0	1,000,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：プリオン病、感染抑制因子、オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は急速に進行する痴呆に加えてパーキンソン様症状や小脳失調をきたす致死性の疾患であり、かつヒトの脳や硬膜由来製剤などを介してヒトへ感染を引き起こす。わずか15年の間にヒト由来成長ホルモン製剤、ヒト乾燥硬膜、そして狂牛病に関連した変異型ヤコブ病と過去3回の感染禍が引き起こされ、人々をパニックに陥れた。この病気の本質はヒトを始めとするほ乳類に正常に発現している α -ヘリックス構造に富んだ蛋白質である正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が翻訳後に何らかの修飾をうけて立体構造変換(コンフォメーション変化)を起こして β -シート構造に富んだ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})に変換され、PrP^{Sc}が難溶性の凝集体やアミロイドとなって組織に沈着することにあると考えられている。

2. 研究の目的

その1) 異常プリオン蛋白質の沈着には正常プリオン蛋白質が必須この結果よりプリオン感染マウスでは腎臓・精巣では正常プリオン蛋白質が存在しているにもかかわらず、異常プリオン蛋白質が沈着していない。つまり他臓器とは異なり、正常プリオン蛋白質が異常プリオン蛋白質のコンフォメーションの場ではないことを示しており、何かの機序により正常プリオン蛋白質が異常プリオン蛋白質のコンフォメーション変化を抑制している可能性が考えられた。

その2) 我々はcDNA substration アッセイによりプリオン感染マウス腎臓において、正常マウスとプリオン感染マウスでの腎臓での mRNA での遺伝子発現の違いを比較・検討した。(図2)つまりプリオン感染マウスの腎臓において強発現している遺伝子がいわゆるプリオン抑制遺伝子の候補である。今回の手法にて6個の候補遺伝子を見つけた事ができた。その候補遺伝子の中で脳内では強発現し、腎臓では遺伝子発現が低い遺伝子を同定することが可能となった。条件であり、正常プリオン蛋白質ノックアウトマウスを利用した感染実験では明らかに感染できない事が知られている。この結果から異常プリオン蛋白質が沈着している臓器には正常プリオン蛋白質の存在がしないことにはありえない。現在まで正常プリオン蛋白質の分布はわかっており、正常マウスと感染マウスでの正常と異常プリオン蛋白質の沈着は確認している。プリオン感染マウスの腎臓の免疫染色においても異常プリオンの検出はできなかった。

その3)

今回プリオン抑制遺伝子の候補の中でまず最初に1個の遺伝子(遺伝子A)のクローニングを行った。この遺伝子Aが本当にプリオン抑制遺伝子

であるかどうか？さらにはその他の5個の候補遺伝子がプリオン抑制遺伝子であるかどうか明確にすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) プリオン抑制候補遺伝子のクローニング及び同定

現在まで上記方法にて6個の遺伝子をスクリーニングした。現在までに1個の遺伝子(遺伝子A)についてクローニングできた。残りの5個の候補遺伝子をクローニングすることを目的にする。プリオン感染マウス腎臓にて高発現していた残り5個の候補遺伝子をクローニングし、正常マウス・プリオン感染マウスでの脳内・腎臓内での発現量のチェックを northern blot 又は real time PCR にて発現量の違いを比較検討する。

2) プリオン抑制候補遺伝子のノックアウトマウスの作成・それらノックアウトマウスに対するプリオン感染実験の施行

今回我々は遺伝子Aのノックアウトでのマウス(既知遺伝子のためノックアウトでのマウスは市販されている)に対し、プリオン感染実験を施行する。その他の遺伝子はノックアウトが販売されているケースではそのマウスを購入し、市販されていないケースではノックアウトマウス作成し、プリオン感染実験を施行する。

3) さらに新たな方法によるプリオン抑制遺伝子の検索

スイスのグループの実験結果(Science. 2005 Oct 14;310(5746):324-6.)では腎炎モデルマウス(NZW・NZB:SLE 腎炎モデルマウス)に対するプリオン感染実験では症状としては明確ではないが、マウス感染実験の後期では尿での感染性が示されている。この結果から類推すると膀胱・腎臓に異常プリオン蛋白質の沈着には腎臓の炎症が必要であるという結果である。

我々は腎炎モデルマウスのプリオン感染実験で、正常マウスに対するプリオン感染実験を行った方法と同様な方法で、プリオン感染実験早期と後期、さらには腎炎モデルマウスに対して正常プリオン蛋白質接種の腎臓での mRNA を含む micro-RNA を比較検討する。

4) プリオン抑制候補遺伝子のヒトサンプルでの発現量の検討(他の神経疾患との比較検討)

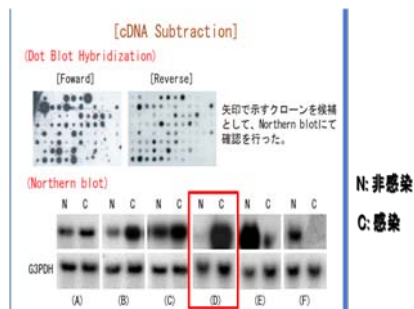
ヒトサンプル(血清・髄液)中の候補遺伝子の発現量を他の神経変性疾患・認知症疾患と対比する。候補遺伝子が脳内でどのような役割を担っている

のかを検討するために、正常人・神経変性疾患・神経認知症疾患・CJD 患者間での脳切片において免疫染色を施行する。

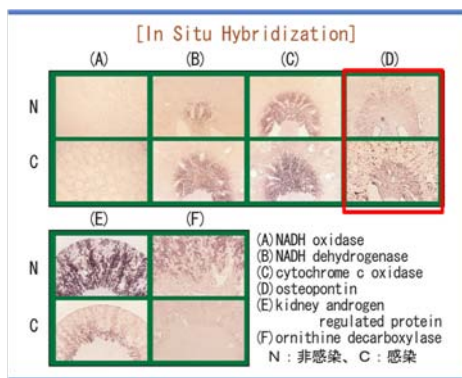
4. 研究成果

1. プリオン抑制候補遺伝子のクローニング及び同定

我々はプリオン抑制候補遺伝子と考えられる6個の候補遺伝子を見出した。



2. この候補遺伝子の脳及び腎の発現量の検討
この候補遺伝子について in situ ハイブリダイゼーションを行った。



その中の1つの遺伝子は脳内の発現が強く、腎での発現が弱い遺伝子がプリオン感染抑制遺伝子と考えた。

3. ノックアウトマウスの作成

我々は当初の遺伝子Dのノックアウトマウスを行った。二回のエレクトロポレーションに失敗した。

そのためにノックアウトマウス作成業者に委託するものの、成功しなかった。そのために遺伝子改変したノックアウトマウスに準じたマウスを買い、感染実験を開始した。

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 件)

1. Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T: Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest.* 2010; 90(11): 1637-44

2. Satoh K, Kawakami A, Shirabe S, Tamai M, Sato A, Tsujihata M, Nagasato K, Eguchi K: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian. *Acta Neurol Scand.* 2010;121(5):338-41.

3. Matsui Y, Satoh K, Mutsukura K, Watanabe T, Nishida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y: Development of an Ultra-Rapid Diagnostic Method Based on Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Levels in the CSF of CJD Patients. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(7):991-999

4. Atarashi R, Satoh K, Sano K et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature medicine.* 2011;17:175-178

6. Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Satoh K, Tamai M, Nakamura H, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Ida H, Origuchi T, Eguchi K: The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford).* 2010 [Epub ahead of print]

2. Hara S, Henmi T, Kawakami A, Fujikawa K, Mukae H, Ishimatsu Y, Sakamoto N, Kakugawa T, Kaji K, Fujimoto M, Kuwana M, Tsukada T, Satoh K, Motomura M, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Hayashi T, Origuchi T, Eguchi K, Kohno S: Clinical, serologic and magnetic resonance imaging of 3 cases of inflammatory

myopathy with abundant macrophages in the Japanese population. Rheumatol Int. 2010 [Epub ahead of print]

5. Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Satoh K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K: Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory myopathy: histologic and MRI study. Rheumatol Int. 2010;30(10):1381-1383.

6. Satoh K, Nakaoka R, Nishiura Y, Tsujino A, Motomura M, Yoshimura T, Sasaki K, Shigematsu K, Shirabe S, Eguchi K: Early detection of sporadic CJD by diffusion-weighted MRI before the onset of symptoms. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010 [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 9 件)

1. 佐藤克也、調漸、江口勝美: プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討第 51 回神経学会総会 東京 2010.5.20-22

2. 六倉和生、佐藤克也、調 漸、岸田日帯、黒岩義之、三條伸夫、水澤英洋: CJD における血清バイオマーカーに用いた血液脳関門(BBB)についての検討 第 51 回神経学会総会 東京 2010.5.20-22

3. Satoh K, Atarashi R, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Amelia McGlade, Steven John Collins, Shirabe S, Nishida N Analysis of Biochemical markers and the method of abnormal prion protein in CSF in Human Prion Diseases as Diagnostic markers BIT's 1st Annual World Congress of NeuroTalk-2010. 2010.6.25-28. シンガポール

4. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamanaka H, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Amelia McGlade, Steven John Collins, Shirabe S, Katamine S, Nishida N: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal

fluids using real-time quaking-induced conversion Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases 札幌 2010.7.24-25

5. Satoh K, Atarashi R, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Amelia McGlade, Steven John Collins, Shirabe S, Nishida N: Analysis of Biochemical markers and the method of abnormal prion protein in CSF in Human Prion Diseases as Diagnostic markers Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases 札幌 2010.7.24-25

6. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamanaka H, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Amelia McGlade, Steven John Collins, Shirabe S, Katamine S, Nishida N: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids by real-time quaking-induced conversion PRION 2010 Salzburg, Austria 2010.9.8-11

7. Ohara M, Sanjo N, Hizume M, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shiga Y, Satoh K, Satoh T, Shirabe S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H: Genetic Prion disease in Japan, An analysis based on the Japanese CJD Surveillance, 1999-2009 PRION 2010 Salzburg, Austria 2010.9.8-11

8. Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, Shirabe S, Atarashi R, Kataoka Y, Nishida N: Evaluation of a sandwich ELISA for the gamma-isoform of 14-3-3 proteins for laboratory diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease PRION 2010 Salzburg, Austria 2010.9.8-11

9. Satoh K, Mutsukura K, Atarashi R, Shirabe S, Matsui Y, Kishida H, Kuroiwa Y, Sanjo N, Mizusawa H, Nishida N: Brain MRI activity and serum biochemical markers for evaluating blood-brain barrier function in Creutzfeldt-Jakob disease PRION 2010 Salzburg, Austria 2010.9.8-11

[図書] (計 2 件)

1. 佐藤克也、調 漸、江口勝美: 検査所見

－脳脊髄液－ プリオン病と遅発性ウイルス感染症 2010 pp.88-95
2. 新 竜一郎、佐藤克也 Annual Review
神経 2011 pp 120-129

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cm/index.html>

<http://prion.umin.jp/survey/index.html>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克也 (KATSUYA SATO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：70398147

(2) 研究分担者

三好 一郎 (ICHIRO MIYOSHI)
名古屋大学・医学研究科・教授
研究者番号：10183972