

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07276

研究課題名（和文）ヒト孤発性プリオン多様性の検証

研究課題名（英文）Verification of human sporadic prion diversity

研究代表者

中垣 岳大（Nakagaki, Takehiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：80722917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトプリオン病の代表である孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)はウエスタンブロット法での異常型プリオンタンパク(PrPSc)のバンドパターンと遺伝子多型の組み合わせで病型が分けられ、MM1型がsCJDの85%を占める。我々は、14例のsCJD\_MM1型の患者から作成した脳乳剤(Brain Homogenate: BH)をアルカリ製剤で処理した。すると、ウエスタンブロット法で検出されるPrPScのパターンが他とは異なる症例があることを見出した。現在、感受性のあるマウスに脳乳剤を接種して、生存期間や感染性などの違いが認められるか検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオンは遺伝子を持たない病原体であるが、ウイルスの様に様々な株が存在する。ヒトプリオン病の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)は主に6つの病型に分けられるが、発症から死亡までの期間や症状は異なる。これはプリオン株の違いに基づくものと考えられており、異常型プリオンタンパクの生化学的な性質が異なることが報告されている。孤発性CJDのMM2型には皮質型と視床型というサブタイプが知られているが、我々はアルカリ製剤に対する反応性を検証することで、孤発性CJDで最も多いMM1型にもサブタイプが存在する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD), a representative of human prion diseases, is classified based on the combination of abnormal prion protein (PrPSc) banding patterns on Western blotting and genetic polymorphisms. MM1 type accounts for 85% of sCJD cases. We treated brain homogenates (BH) prepared from 14 cases of sCJD\_MM1 type patients with an alkaline reagent. Subsequently, we discovered cases with PrPSc patterns detected by Western blotting that were different from others. Currently, we are investigating whether differences such as survival period and infectivity can be observed by inoculating brain homogenates into susceptible mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病の病原体はプロテアーゼ K (PK) に抵抗性の異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) を主体とし、PK 感受性の正常型プリオンタンパク (PrP<sup>C</sup>) を PrP<sup>Sc</sup> へと構造変換する。これが繰り返されることで、PrP<sup>Sc</sup> が中枢神経系を中心に体内に蓄積し、神経細胞死やグリア細胞の増生を引き起こす。ヒトプリオン病の場合、病因論的に孤発性 CJD、遺伝性プリオン病、獲得性プリオン病に分類され、孤発性 CJD は全体の 3/4 を占める。典型例では急速進行性の認知症、ミオクローヌス、錐体路、錐体外路症状を呈し、約半年で無動無言に至る。PrP の 129 番目のアミノ酸はメチオニン (M) とバリリン (V) の多型が存在している。さらにウエスタンブロット法 (WB) におけるプロテアーゼ抵抗性バンドの泳動パターン (type1 と type2) との組み合わせによって、孤発性 CJD は MM1、MV1 など 6 つのサブタイプに分類される。臨床的には MM1 型と MV1 型は急速に進行し、80% 以上に脳波異常 (周期性同位性放電: PSD) が認められるが、MM2、MV2 型は緩徐な経過をたどり PSD は認められない。MM2 はさらに皮質型 (MM2C) と視床型 (MM2T) さらにそのミックスタイプ (MM2C+T) の 3 つの臨床病理的に異なるサブタイプが報告されている。こうした臨床的な相違がどのようなメカニズムで生じるのか明らかになっていない。現在までのところ、MM1 型には MM2 型のようなサブタイプの報告はされていない。しかし、MM1 型にも緩やかに進行し、長い経過をとった例などの報告があり、MM1 型にもサブタイプが存在してもおかしくない。

研究代表者らは先行研究として孤発性 CJD-MM1 型の患者から脳乳剤を作成し、アルカリ水溶液 (CAC717) に対する PrP<sup>Sc</sup> の反応 (構造の変化) を検証した。2 例の MM1 型患者由来の脳乳剤を CAC717 で処理した後、N 末端側を認識する 3F4 抗体 (エピトープ a.a.109-112) を用いたウエスタンブロットにおいて、PrP<sup>Sc</sup> が約 90% 減少していた。やや C 末端側を認識する ICSM18 抗体 (a.a.143-156) を用いた場合でも約 80% の減少が確認された。C 末端を認識する Human PrP-C 抗体 (以降 hPrPC 抗体と表記する。a.a.214-228) では約 75% が減少した (これをパターン A とする)。一方、3F4 で 80%、ICSM18 では 46% の減少にとどまるが、hPrPC 抗体では 90% が減少したパターン (パターン B) や 3F4 と ICSM18 はともに約 65% が減少し、hPrPC 抗体は 90% が減少したパターン (パターン C) が 1 例ずつ認められた。(表 1)

表1. アルカリ製剤による PrP<sup>Sc</sup> の反応性の違い

症例		1	2	3	4
バンドパターン		A		B	C
reduction of PrP <sup>Sc</sup>	3F4 (109-112)	92.1% (<5min)	90.7%	83% (<30min)	66.0%
	ICSM18 (143-156)	79.5% (<10min)	79.7%	46.1% (<10min)	65.4%
	hPrPC (214-228)	73.8%	77.8%	90%	81% (<30min)

2. 研究の目的

本研究では、孤発性 CJD-MM1 型の症例数を増やして、患者脳の PrP<sup>Sc</sup> の生化学的特性の違いと臨床像の関連性を明らかにし、モデルマウスへの感染性および病原性の違いを解析し、サブタイプの存在を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ウエスタンブロット法による検証：孤発性クロイツフェルトヤコブ病 (sCJD) MM1 型患者由来の脳乳剤にアルカリ水溶液(CAC717)を加えると異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>)が減少する。症例数を追加して MM1 型患者由来の脳乳剤を作成した。10%脳乳剤に 5 倍量 (液量) の CAC717 を加えて室温で静置した後、20mg/mL のプロテアーゼ K (PK) を加えて 37 °C で 30 分反応させた。3F4 抗体、および SAF61(a.a.142-160)の 2 種類の抗体を用いたウエスタンブロット法で PrP<sup>Sc</sup>の減少の程度とパターンを検証した。なお、先行研究では ICSM18 を使用していたが、入手が困難になったため、ほぼ同じエピトープを持つ SAF61 で代用した。

シード活性の評価：10%脳乳剤を段階希釈して、大腸菌から作成したヒト PrP を含むバッファーに加え、Real Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC)法を用いて、シード活性を評価した。

### 4. 研究成果

ウエスタンブロット法による検証

今回は 10 例の MM1 型患者の組織を検証した。

3F4 抗体を用いたウエスタンブロットによる検出では、10 例とも約 90%の減少が認められた。PrP<sup>Sc</sup> の量に個体差があったため、SAF61 抗体で検証できた症例は 4 例にとどまった。これら 4 例は 80~90%の減少が認められた (図 1)。

以上の結果から、SAF61 で検証できなかった症例は存在するものの、3F4 抗体では全例で PrP<sup>Sc</sup> が 90%減少しており、CAC717 に対する反応性は A のパターンをとると考えられる。

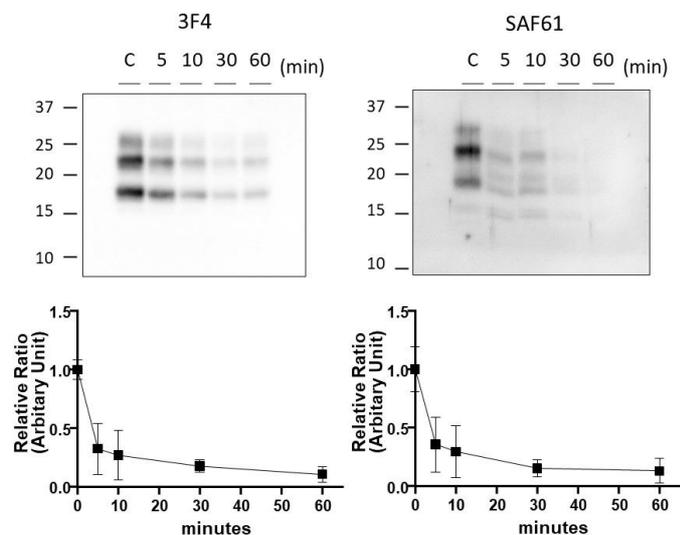


図1. CAC717処理によるPrP<sup>Sc</sup>の減少

今回検証した症例ではいずれもPrP<sup>Sc</sup>が同様の減少パターンを示した。

シード活性の評価：今回 4 症例について CAC717 処理後に RT-QuIC 法でシード活性を評価した。検証した症例すべて 50% Seeding Dose (SD<sub>50</sub>)がおよそ 10<sup>-9</sup>~10<sup>-10</sup>になったが、症例間ではっきりとした違いは見られなかった。

先行症例と合わせて 14 例の MM1 型について検証したが、CAC717 に対する反応性ではパターン A を示す症例が典型例で、パターン B や C を示す症例は特異な症例であると考えられる。ウエスタンブロット法で PrP<sup>Sc</sup>を検出する場合、正常型プリオンタンパク (PrP<sup>C</sup>)と区別するために PK 処理を行うが、CAC717 によって PrP<sup>Sc</sup>の構造が変化した結果、PK によって消化されやすくなる。この時、PrP<sup>Sc</sup>の構造が他の症例と異なる場合、CAC717 によって変性する部位(さらに PK がアプローチできる部位)も異なるため、ウエスタンブロットで検出される部位が異なってくると考えられる。今回の結果は MM1 型にも MM2 型の様にサブタイプが存在する可能性を示すものである。一方

で RT-QuIC 法におけるシード活性に明らかな違いは認められなかった。今回はヒト PrP を用いて検証したが、他のリコンビナント PrP を用いて違いが出るか検証したい。

現在、ヒト-マウスキメラ PrP を発現するノックインマウス (KiChM マウス) に各パターンを示した症例の脳乳剤を接種し、経過を観察しているところである。今後解剖したマウスの PrP<sup>Sc</sup> についても同様に検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakaie Mari, Katayama Fumihiro, Nakagaki Takehiro, Yoshida Sakura, Kawasaki Masao, Nishi Kodai, Ogawa Kazuma, Toriba Akira, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio, Fuchigami Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-(Benzofuran-2-yl)-chromone Derivatives for In Vivo Imaging of Prion Deposits in the Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1869 ~ 1882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.2c00142	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagaki Takehiro, Kaneko Miho, Satoh Katsuya, Murai Kiyohito, Saiki Kazunobu, Matsumoto Gen, Ogami-Takamura Keiko, Ikematsu Kazuya, Akagi Akio, Iwasaki Yasushi, Tsurumoto Toshiyuki, Nishida Noriyuki	4. 巻 386
2. 論文標題 Detection of Prions in a Cadaver for Anatomical Practice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 2245 ~ 2246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMc2204116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakaie Mari, Katayama Fumihiro, Nakagaki Takehiro, Kawasaki Masao, Yoshida Sakura, Toriba Akira, Ogawa Kazuma, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio, Fuchigami Takeshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Synthesis and Characterization of Hydroxyethylamino- and Pyridyl-Substituted 2-Vinyl Chromone Derivatives for Detection of Cerebral Abnormal Prion Protein Deposits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 211 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakagaki Takehiro, Nishida Noriyuki, Satoh Katsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of $\alpha$ -Synuclein Real-Time Quaking-Induced Conversion as a Diagnostic Method for $\alpha$ -Synucleinopathies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2021.703984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Dong Thi-Thu-Trang, Akagi Akio, Nonaka Toshiaki, Nakagaki Takehiro, Mihara Ban, Takao Masaki, Iwasaki Yasushi, Nishida Noriyuki, Satoh Katsuya	4. 巻 159
2. 論文標題 Formalin RT-QuIC assay detects prion-seeding activity in formalin-fixed brain samples from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105504 ~ 105504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tange Hiroya, Ishibashi Daisuke, Nakagaki Takehiro, Taguchi Yuzuru, Kamatari Yuji O., Ozawa Hiroki, Nishida Noriyuki	4. 巻 296
2. 論文標題 Liquid-liquid phase separation of full-length prion protein initiates conformational conversion in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100367 ~ 100367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fuse Takayuki, Nakagaki Takehiro, Homma Takujiro, Tange Hiroya, Yamaguchi Naohiro, Atarashi Ryuichiro, Ishibashi Daisuke, Nishida Noriyuki	4. 巻 171
2. 論文標題 Dextran sulphate inhibits an association of prions with plasma membrane at the early phase of infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 34 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takehiro Nakagaki.
2. 発表標題 An undiagnosed case of prion disease found in donated bodies for anatomical practice of medical students
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中垣岳大, 金子美穂, 西田教行
2. 発表標題 MM1型プリオン多様性の検証
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中垣岳大, 金子美穂, 佐藤克也, 赤木明生, 岩崎靖, 西田教行.
2. 発表標題 解剖実習御遺体のプリオンスクリーニング
3. 学会等名 日本神経感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehiro Nakagaki, Miho Kaneko, Akio Akagi, Yasushi Iwasaki, Katsuya Satoh, Noriyuki Nishida.
2. 発表標題 An undiagnosed case of prion disease found in donated bodies for anatomical practice of medical students
3. 学会等名 PRION2022. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中垣岳大, 金子美穂, 赤木明生, 佐藤克也, 岩崎靖, 西田教行.
2. 発表標題 解剖御遺体におけるプリオン病未診断例の探索
3. 学会等名 九州微生物フォーラム.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中垣岳大、佐藤克也、西田教行
2. 発表標題 孤発性プリオン多様性の検証
3. 学会等名 神経感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiro Nakagaki, Miho Kaneko, Akio Akagi, Yasushi Iwasaki, Katsuya Satoh, Kazuya Ikematsu, Noriyuki Nishida.
2. 発表標題 A preclinical case in cadavers for forensic anatomy
3. 学会等名 PRION 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中垣岳大
2. 発表標題 試験管内アミロイド増幅法を用いた プリオン病未診断例の探索
3. 学会等名 第47回 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中垣岳大	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 688
3. 書名 標準微生物学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 経皮吸収型貼付剤	発明者 中垣岳大、後藤雅宏、西田教行、佐藤克也、小坂秀斗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/041928	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------