

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659451

研究課題名（和文） PrP129Val/Val 遺伝子をもつ vCJD 患者の迅速確定診断法の樹立

研究課題名（英文） To establish a rapid diagnostic test in a vCJD patient with Codon 129 Val/Val

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（和文）：

脳内接種を行ったヒト型 PrP129V/V ノックインマウスは、半分以上の動物が発病した。しかし、実際のヒトでは 129V/V 遺伝子型の発病はなく、129VPrPvCJD がいかなる感染性を示すのかは不明である。そこで、我々はウシ型 PrP を導入したノックインマウスに感受性が存在するのかを検討したところ、vCJD プリオンと同様 129V の PrPvCJD 分子もウシ化マウスに感受性を示し、確実な診断法となることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that bovinized knock-in mice were successfully infected with the agent from knock-in mice with codon 129V/V inoculated with variant Creutzfeldt-jakob disease as well as that from Humanized knock-in mice with codon 129M/M inoculated with variant Creutzfeldt-jakob disease, that from humanized knock-in mice with codon 129M/V inoculated with variant Creutzfeldt-jakob disease, and that from variant Creutzfeldt-jakob disease patients. It provides a new opportunity to re-analyze sporadic Creutzfeldt-jakob disease patients with the 129V/V genotype in countries with bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-jakob disease, particularly in cases with atypical clinical and neuropathological features.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

ヨーロッパを中心に発病している

vCJD(variant)は、現時点では 129Met/Met の遺伝子型のヒトのみの発病が見られるだけ

である。しかしながら、我々の感染実験でヒト型ノックインマウスに頭蓋内投与を行うと高い頻度で Hu129Val/Val や Hu129Met/Val のヒト型マウスが感染することが明らかとなった。129Val/Val の sCJD(sporadic)は、タイプ2の異常プリオン蛋白を有しアミロイド斑も陽性である。129Val/Val の vCJD の確定診断にはウエスタンの diglycoform が多くなろう (129Met/Met の vCJD からの推定) という点でしか区別できないのが現実である。そこで、我々が提唱したトレースバック現象を用いてウシ化ノックインマウスへの感染性で 129Val/Val の sCJD と vCJD の鑑別を行うというのが本申請である。腹腔内投与による FDC での感染性のチェックによって、14 日以内に確定診断を行える方法を樹立するというもので、この方法が確立されればヨーロッパの CJD は全て本方法により再チェックの必要性が出てくるものと思われる。

- (1) 研究室で作製した、ヒト型ノックインマウスを用いて vCJD に感受性の高いヒトの遺伝子型を調べたところ、129M/M, 129M/V はもとより新しく 219K/K, 219E/K が感受性であることを報告した (Hizume et al, JBC 2009) .下の図の灰色の部分、vCJD に感受性のある遺伝子型である。上段は、英国のコードン 129 の遺伝子型の頻度であるが、ノックインマウスの腹腔内感染の結果では 11% の V/V のヒト以外は全てのヒトが感受性であり、下段は日本のコードン 219 の遺伝子型であるが、残念ながら 219E/K の遺伝子型 (12%) も含め全ての遺伝子型が感染する可能性が存在した。
- (2) 今年になって 2 例の 219E/K 遺伝子型をもつ vCJD が存在することが報告された (Lukic et al, Arch Neurol 2010) 。我々の動物モデルを使った vCJD の感染

動向は見事に的中したわけである。

- (3) 最近、もっとも感受性の高い投与方法である頭蓋内投与の感染実験の結果がでてきた。腹腔内感染では陰性であった 129Val/Val のノックインマウスでも、733±10 日の潜伏期間後に 5 匹中 4 匹のマウスで感染が成立することが明らかになった。ちなみに 129Met/Val の遺伝子型では 100% 感染が成立している。英国でもヒト化マウスでの感染実験の結果があるが 16 匹中 1 匹のみ感染が成立しているのみである。我々の感染実験では、寿命一杯観察した結果もっと高率であることが解った。
- (4) 129Val/Val, 129Met/Val のヒトが vCJD を発病した場合、その診断が非常に困難である。129Met/Met の sCJD は、ウエスタンでタイプ2の異常プリオン蛋白を呈しても脳内にアミロイド斑は存在しなかった。その点で、vCJD と確実に診断できたわけであるが、129Val/Val, 129Met/Val の sCJD では、タイプ2の異常プリオン蛋白をしめすと全員がアミロイド斑を有するのである。よって、これらの遺伝子型では vCJD と sCJD の鑑別は困難と言わざるを得ない。Diglycoform の比率が高いというのが、vCJD のウエスタンで有効であったが、これも 129Val/Val の遺伝子型でも有効な鑑別点となるのかは未だ明らかでない。
- (5) 129Met/Met の vCJD を感染させると、2006 年にウシ型ノックインマウスに感染しやすいことを報告した。このウシ型ノックインマウスへの感染性は、129Met/Met の sCJD や dCJD (硬膜例) では認められず、もともとウシの BSE から感染した vCJD だけに見られる現象であり、プリオン感染にはトレーサビリティ

が存在しこの現象をトレースバック現象として報告した。

## 2. 研究の目的

vCJD に感染したヒト 129Val/Val ノックインマウスの脳を用いて、Ki-Bov への感染性が存在するのか、存在すれば最短何日で感染性を示すことができるのかが、本申請の骨子である。すでにプレリミナリーではあるが、129Val/Val[vCJD]のプリオンは、75 日間の観察期間では Ki-Bov に感染すること、またこの観察期間では sCJD の VV2 のプリオンは感染しないことを確かめている。

## 3. 研究の方法

各種プリオンを Ki-Bov (ウシ型ノックインマウス) マウスの腹腔に接種し、感染が成立したかどうかを投与後の 14 日、30 日、45 日、60 日、75 日と経時的に脾臓、リンパ節、パイエル板をサンプリングし、PrPSc の蓄積を免疫染色法とウエスタンブロット法で確認する。各種プリオンとして、特に重要なプリオンは Hu129Val/Val[vCJD 感染後]と sCJD の VV2 である。

### リンパ装置 (脾臓、リンパ節、パイエル板) の免疫染色

プリオン接種後 14 日、30 日、45 日、60 日、75 日とほぼ 2 週間ごとに脾臓、リンパ節、小腸のパイエル板を採取する。採取後に、ホルマリン固定を行いパラフィン包埋後の切片を用いて免疫染色を行う。通常の免疫染色では、異常型プリオン蛋白を描出することはできず、hydrolytic autoclaving 法という前処理を行って異常型プリオン蛋白を検出する。この hydrolytic autoclaving 法が、野生型マウスで有効である (Kitamoto et al, J. Virol 1991)、そしてヒト型ノックインマウスで有効であることもすでに報告済みである (Kitamoto et al, BBRC 2002)。陽性の

所見は、この図のように lymph follicle に存在する follicular dendritic cells (FDC) が陽性に染まることで検出できる。切片中に存在する lymph follicles の数を分母とし、異常プリオン蛋白陽性の FDC の数を分子とすることで半定量解析も可能である。この図は、vCJD に感染した Hu129Val/Val のノックインマウス脳を Ki-Bov に接種し 75 日後の所見である。明らかな FDC 陽性像をすでに得ている。脾臓を用いた異常プリオン蛋白のウエスタンブロット

免疫染色用に脾臓を採取する際に、全てのノックインマウスで脾臓を 2 つに分け、半分は免疫染色用にホルマリン固定、残りの半分はウエスタンブロット解析の為に凍結保存を行っている。脾臓のウエスタンブロットは、脳と異なり前処理として collagenase 処理が必要である (Hizume et al, JBC 2009)。collagenase 処理後、sarkosyl 不溶性分画を Proteinase K で処理したものをウエスタンブロット法にて異常プリオン蛋白を検出する。

## 4. 研究成果

### Ki-Hu129V/V[vCJD]プリオンの感染性 (FDC アッセイ)

発病したノックインマウスの脳を用いて、Ki-Bov (ウシ型マウス) への感染実験を行った所、75 日後に全ての接種マウスでの感染が確認された。確認方法は、免疫染色と脾臓を用いたウエスタンブロットである。対照として用いた sCJD VV2 プリオンでは全て陰性であった。

### Ki-Hu129V/V[vCJD]プリオンの感染性 (脳内投与)

当初より、研究が進んだため脳内投与の感染実験の結果も得ることが出来た。脳内投与でも平均 772 日ですべての Ki-Bov に感染が成立した。いっぽう sCJD VV2 プリオンでは 813

日を超える潜伏期間後も感染はみとめられなかった。

このように、予定通り Ki-Bov への感受性があることによる v C J D プリオンの証明は、その遺伝子型が 129V であっても成立することを証明し、v C J D プリオンの確定診断法を確立した。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

#### 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

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：