

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591268

研究課題名(和文) 遺伝性プリオン病の診断法の確立と新規分類・解析法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a diagnosis of hereditary prion disease and the development of new classification and analysis

研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70398147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒトプリオン病における髄液診断法の画期的な方法として微量の異常型プリオン蛋白をin vitroにて増幅させ、Real-time QUIC法を報告し、高い評価を得ていた。プリオン病サーベイランス委員会により収集された本邦の遺伝性プリオン病患者髄液を検体とし、我々が開発したRT-QUIC法を用いて国内プリオン病全症例の検体を解析し、従来から報告している種々の生化学的マーカーと比較検討し、遺伝性プリオン病の診断法の確立を目指し、成功しえた。さらに遺伝性プリオン病疾患群に対して新たな治療法の開発を目指し、現在治療薬候補となる薬剤を発見した。スクリーニング中である。

研究成果の概要(英文)：We succeed to amplify a very small amount of abnormal prion protein in in vitro as an epoch-making method of CSF as a diagnostic stool in human prion disease and reported the Real-time QUIC method and got a high evaluation. I collected CSF samples in cooperation with prion disease surveillance Committee. I analyzed the specimen of all country prion disease cases using the RT-QUIC method which we developed and elevated on biochemical markers which I reported conventionally and aimed at the establishment of the diagnostic method of genetic prion disease and was able to succeed. Furthermore, I aimed at the development of a new therapy for genetic prion disease disease and discovered the drug that it was with a therapeutic drug candidate now. I am screening it.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン病 遺伝性

### 1. 研究開始当初の背景

我々は本年度ヒトプリオン病における髄液診断法の画期的な方法として微量の異常型プリオン蛋白を *in vitro* にて増幅させ、Real-time に検出する QUIC 法を報告し、高い評価を得ている。クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) サーベイランス委員会により収集された本邦の遺伝性プリオン病患者髄液を検体とし、我々が開発した RT-QUIC 法を用いて国内プリオン病全症例の検体を解析し、従来から報告している種々の生化学的マーカーと比較検討し、遺伝性プリオン病の診断法の確立を目指す。さらにその中で家族内での浸透率が高く、原因遺伝子が特定されている遺伝性プリオン病疾患群や極めて緩徐進行の経過をとる遺伝性プリオン病疾患群に対して新たなる治療法の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

我々は本年度ヒトプリオン病における髄液診断法の画期的な方法として微量の異常型プリオン蛋白を *in vitro* にて増幅させ、Real-time に検出する QUIC 法を報告し、高い評価を得ている。

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) サーベイランス委員会により収集された本邦の遺伝性プリオン病患者髄液を検体とし、我々が開発した RT-QUIC 法を用いて国内プリオン病全症例の検体を解析し、従来から報告している種々の生化学的マーカーと比較検討し、遺伝性プリオン病の診断法の確立を目指す。さらにその中で家族内での浸透率が高く、原因遺伝子が特定されている遺伝性プリオン病疾患群や極めて緩徐進行の経過をとる遺伝性プリオン病疾患群に対して新たなる治療法の開発を目指す。遺伝性プリオン病の診断法の確立と治療法の開発が本研究の主題である。

本研究では

#### 1) 遺伝性プリオン病の髄液の生化学的マ

#### ーカーの検討

2) 遺伝性プリオン病の髄液での RT-QUIC 法の検討

3) 異常プリオン蛋白の判定量 (いわゆる end-point アッセイ) の確立・検討

4) 遺伝性プリオン病に関する新たな分類・解析

の 4 つの柱を中心に研究を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) タウ蛋白・14-3-3-蛋白測定 of ELISA 法の作成・確立

初年度は髄液中の 14-3-3-蛋白のアッセイとして抗 14-3-3 抗体を 4 種類作成した。昨年度より ELISA 系の開発を行っている。ウエスタンブロット法と ELISA 法との比較検討を行う。本年度 ELISA 系の開発に成功し、多数例での検討に入った。

#### 2) 髄液のタウ蛋白・14-3-3蛋白測定による診断法確立のためのデータ標準化

標準化できた測定法を用いて、プリオン病の病型ごとの標準値を明らかにする。孤発性 CJD、家族性 CJD、硬膜移植後 CJD に分類しそれぞれの病型での標準値を決定する。現在国際的な標準化に向け、他の国々との間にて標準化を始めた。

#### 3) *in vitro* PrPSc 増幅法 (QUIC 法) による診断法開発

QUIC 法は、リコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) を反応基質として用い、異常プリオン蛋白 PrPSc) を *in vitro* で増幅する方法である。これまでの検討により、正常型から異常型への変換が高い効率で起こるには界面活性剤や変成剤を一定量加える必要があり、その種類と濃度が大きな影響を与えることを見出し、今後はその最適化を行う。また間欠的に攪拌を行うことで rPrP 凝集体が断片化され、増幅反応の核 (シード) の量が増え、反応が劇的に促進されることも判明した。さらに、この rPrP 凝集体の検出に、アミロイド線維と結合すると

強い蛍光を発するチオフラビン T (ThT) を用いることができることも我々は確認している。従って、サンプルが多数の場合でも非常に簡便に、かつreal-timeに測定可能なシステムを構築することが可能となった。予備的結果ではあるが、definite cases 18 症例でのCJD患者由来の髄液中のPrPScを増幅することに成功し、その中には髄液中の14-3-3蛋白陰性かつ総タウ蛋白陰性症例も含まれており、そのプリオン病の診断への有効性が期待できる。

#### 4. 研究成果

- 1) 新規遺伝性プリオン病を発見し、髄液解析を行った。
- 2) 髄液のタウ蛋白・14-3-3蛋白測定による診断法確立のためのデータ標準化に成功し、EUのデータの比較が可能となった。
- 3) 遺伝性プリオン病のQUIC陰性と陽性の症例の検討より新規タイプのプリオン病を定義づけることが可能となった。

#### 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14件)

1. Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Schroeder B, Raeber A, Vargas D, Kim YS, Satoh K, Collins S, Zerr I. Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Mol Neurobiol*. 2015. [Epub ahead of print] (IF:5.286) 「査読あり」
2. Amano Y, Kimura N, Hanaoka T, Aso Y, Hirano T, Murai H, Satoh K, Matsubara E. Creutzfeldt-Jakob disease with a prion protein gene codon 180 mutation presenting asymmetric cortical high-intensity

on magnetic resonance imaging. *Prion*. 2015;2. [Epub ahead of print] (IF: 1.967) 「査読あり」

3. Fukuda Y, Horie N, Satoh K, Yamaguchi S, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Hayashi K, Nishida N, Nagata I. Intra-Arterial Transplantation of Low-Dose Stem Cells Provides Functional Recovery Without Adverse Effects After Stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 35(3):399-406. 2015 (IF:2.201) 「査読あり」
4. Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol*. 88(20):11791-801. 2014 (IF: 4.648) 「査読あり」
5. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep*. 4:6006. 2014 (IF: 5.078) 「査読あり」
6. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep*. 4:4504. 2014 (IF: 5.078) 「査読あり」
7. Nakamura T, Satoh K, Fukuda T, Kinoshita I, Nishiura Y, Nagasato

- K, Yamauchi A, Kataoka Y, Nakamura T, Sasaki H, Kumagai K, Niwa M, Noguchi M, Nakamura H, Nishida N, Kawakami A. Pentosan polysulfate treatment ameliorates motor function with increased serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 in HTLV-1-associated neurologic disease. *J Neurovirol.* 20(3):269-77. 2014 (IF: 5.078) 「査読あり」
8. Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open.* 4(5):e004968. 2014 (IF:3.323) 「査読あり」
  9. Nakamura T, Matsuo T, Fukuda T, Yamato S, Yamaguchi K, Kinoshita I, Matsuzaki T, Nishiura Y, Nagasato K, Narita-Masuda T, Nakamura H, Satoh K, Sasaki H, Sakai H, Kawakami A. Efficacy of proslutiamine treatment in patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: results from an open-label clinical trial. *BMC Med.* 11: 182. 2013 (IF: 7.276) 「査読あり」
  10. Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. *Autophagy.* 9(9):1386-94. 2013 (IF: 11.423) 「査読あり」
  11. 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.* 33(4):1059-64. 2013 (IF: 1.627) 「査読あり」
  12. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke.* 44(3):720-6. 2013 (IF: 6.018) 「査読あり」
  13. Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One* 8(3):e60003. 2013 (IF: 3.534) 「査読あり」
  14. Sano K, Satoh K, Atarashi R,

Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. PLoS One. 8(1):e54915. 2013 (IF: 3.534)  
「査読あり」

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
准教授

研究者番号：70398147

〔学会発表〕(計3件) シンポジウム

1. 佐藤 克也, 新 竜一郎, 西田 教行.  
ヒトプリオン病患者における髄液中の生化学的バイオマーカーと異常プリオン蛋白の検出について. 第17回日本神経感染症学会総会学術集会, 10/19-20, 2013 京都
2. 佐藤 克也. プリオン病の最新情報  
髄液によるプリオン病の診断と鑑別診断 第54回日本神経学会学術大会, 5/29-6/1, 2013. 東京
3. 佐藤 克也. プリオン病の新しい診断法, 第32回日本認知症学会, 11/8-10, 2013. 松本

〔図書〕(計3件)

1. 佐藤 克也, 新 竜一郎, 西田 教行.  
プリオン病の液診断の可能性. 最新医学.; 68(9):1950-7. 2013
2. 佐藤 克也, 新 竜一郎, 西田 教行.  
【プリオン病-up to date】プリオン病の診断と治療 髄液検査のポイントと鑑別診断. Clinical Neuroscience.31(9):1080-2. 2013
3. 佐藤 克也, 新 竜一郎, 西田 教行. 検査からみる神経疾患 髄液 14-3-3 蛋白とタウ蛋白増加の鑑別診断. Clinical Neuroscience.;31(7):850-1. 2013

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕