

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650185

研究課題名(和文) MV2プリオンをもつ孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の新分類法

研究課題名(英文) new classification of sporadic CJD with MV2.

研究代表者

北本 哲之 (KITAMOTO, Tetsuyuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20192560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)の分類でプリオン蛋白のコドン129のアミノ酸と異常プリオン蛋白のタイピングによってMV2という分類がなされている。このMV2のなかで、M分子が異常化した症例とV分子が異常化した症例を分類することに成功した。MV2症例の感染性がVV2プリオンと同じ症例では、V2プリオンによってM分子が異常化したMiプリオンが存在し、我々の作成した抗体でV2プリオンの異常化した症例を検出し、M2プリオンの異常化と鑑別可能であることを報告した。

研究成果の概要(英文)： There are MV2 cases in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. We established the method to classify these MV2 cases into cases with V2 prions or M2 prions. In Western blot analysis, T-1 antibody revealed Mi PrPres molecule in cases with V2 prions, while this antibody did not detected in cases with M2 prions. In cases with V2 prions, the infectivity shows the similar pattern with VV2 prions. Therefore, we established the practical classification method of MV2 prions.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：プリオン MV2 感染性 ノックアウト 新分類

1. 研究開始当初の背景

現在、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) の分類でプリオン蛋白のコドン 129 のアミノ酸と異常プリオン蛋白のタイピングによって MV2 という分類がなされているが、本来この MV2 は、理論的には M が異常になった皮質型 M2C と視床型 M2Th と、V が異常になった V2 というタイプが含まれているはずである。我々は、2 例の MV2 の感染実験から、病的には M2C の病変である Perivacuolar PrP deposits を認める症例でも、感染性が VV2 と同様であること明らかにしている。しかしながら、全ての MV2 の症例の感染実験をすることは不可能であり、稀な M2C や M2Th 由来の存在を否定することは困難である。そこで、本研究ではウエスタンブロットや組織学的所見を用いて MV2 を分類しなおすことを目標とした。

2. 研究の目的

現在、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) の分類でプリオン蛋白のコドン 129 のアミノ酸と異常プリオン蛋白のタイピングによって MV2 という分類がなされているが、本来この MV2 は、理論的には M が異常になった皮質型 M2C と視床型 M2Th と、V が異常になった V2 というタイプが含まれているはずである。我々は、2 例の MV2 の感染実験から、感染性が VV2 と同様であること明らかにしつつある。しかしながら、全ての MV2 の症例の感染実験をすることは不可能であり、稀な M2C や M2Th 由来の存在を否定することは困難である。そこで、V2 プリオンに特異的な *in vitro* 増幅法 (PMCA 法) を用いて MV2 症例で増幅可能な V2 プリオン由来の症例を同定する。さらに V2 プリオンが引き起こす、Mi (20K という中間的分子量の分子) プリオンをウエスタンにて同定するという 2 つの方法で MV2 を分類するという感染性による新分類法を確立する。

3. 研究の方法

(1) Cell PMCA 法による検索

293-F 細胞に強制発現したレコンビナント Hu129Met および Hu129Val PrP を基質として利用する cell PMCA 法を行う。具体的には、CJD 患者の凍結脳を用いてホモジネートを作製し、この脳ホモジネートを 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} に希釈したものを PMCA 法の種 (シード) として増幅する。増幅は、今回の検索では複数回行う所謂マルチラウンド PMCA 法の必要はなく、V2 プリオンであれば Hu129Val を基質とすると 10^{-4} 希釈でも十分増幅することが可能で、PMCA の前後で 100 倍以上の増幅が可能である。シングルラウンド PMCA 法での増幅後のサンプルは、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の Proteinase K で処理し、PrPres の量を Western blot を行い Versa Doc を用いて増幅率を定量解析する。

(2) Western blot 法による検索

V2 プリオンが存在すると、129Met のプリオン蛋白も異常化し、その異常化した Met 分子はタイプ i (20K) という分子量を示すことが我々の研究で明らかとなった。本研究のウエスタンブロットによる検索では、解りやすいように PNGaseF 処理を行い、糖鎖を除去した後にウエスタンブロットを行いタイプ i (20K) が存在するのかをどうかを検討する。また、タイプ 2 分子とは反応しない、T-1 抗体を用いて簡便な検出法も開発する。

(3) MV2 を始めとする感染実験

MV2 症例の内 V2 プリオンの可能性を指摘できた症例、つまり 129Val で cell PMCA 法にて増幅され、かつタイプ i (20K) が証明された症例以外の症例に関しては、必ず感染実験を行いどのような感染性を示すのか各遺伝子型のノックインマウスを用いて検討する。感染実験には、700 日という長期の観察期間を必要とするため、本研究の研究期間を 2 年間

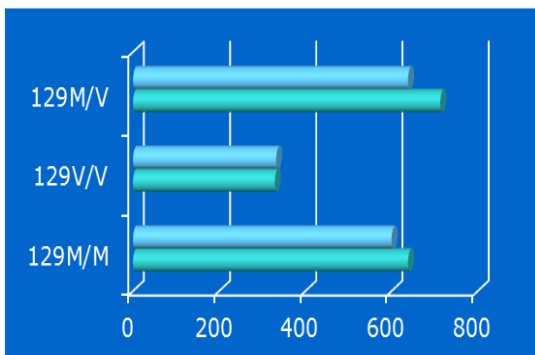
とした。発病または死亡したノックインマウスは、脳およびリンパ臓器(脾臓とリンパ節)の半分を凍結しウエスタンブロットや感染実験に用い、残りの半分の組織をホルマリン固定後、免疫染色をはじめ組織学的検索を行って感染が成立しているかどうかを検査する。

4. 研究成果

わが国の MV2 症例には、大きく分けて MV2K 症例がほとんどで、ごく稀に MV2C 症例が存在することが明らかとなった。MV2K 症例は、V2 プリオンと同様の感染性を示し、MV2C プリオンは現在もまだ感染実験中であるが MM2C プリオンと同様ほとんどのヒト型 PrP 導入マウスに対して感染が成立していない。つまり、単に MV2 として孤発性 CJD を分類するよりも、より詳しく MV2K と MV2C を鑑別することは感染性から考えてもリーズナブルな分類であることを明らかとした。以下に具体的な研究成果を示す。

MV2 プリオンの感染実験

MV2K の典型例と、MV2K 病変に MM2C に類似した perivacuolar PrP deposit をもつ MV2K+C 症例の感染実験を行ったところ、以下の図のように Ki-129Val/Val マウスに対して最も潜伏期間が短い V2 プリオンにそっくりな感染性を示した。



ウエスタンブロットによる分類

V2 プリオンが 129Met PrP 分子を異常化させると、タイプ intermediate の分子量の Mi 分子が形成される病的にはアミロイド斑が形成されることが動物実験で明らかとなってきたので、MV2 症例のうち、Mi 分子を検出するために、tohoku-1 抗体を用いて検出されることを検討した。MV2K 症例では、例外なく Mi 分子が同定され、病理ではクル斑が証明された。また MV2C 症例では、tohoku-1 に反応する分子がほとんどないことを明らかとした。つまり、ウエスタンブロットで、この 2 種類の分類が可能であることを明らかとした。

PMCA による分類

今後すべての MV2 症例を鑑別のために感染実験するわけにはいかないの、in vitro での感染実験に代わる方法として PMCA 法を検討した。MV2 症例のうち、MV2K に関しては、129Val PrP 分子を基質とした PMCA で効率よく増幅できることを明らかにした。しかしながら、PMCA 法は脳の保存状態が悪いと増幅効率も悪くなることが明らかとなった。つまり増幅できなかったからと言って MV2K プリオンであることを否定することはできないという結論になった。つまり、効率よく増幅できた場合に MV2K プリオンであると考えることが可能であるという程度に留まった。

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 13 件)

(1) Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP.Structure. 2014 Apr 8;22(4):560-71. doi: 10.1016/j.str.2013.12.019. Epub 2014 Feb 20. 査読有.

(2) Barria MA, Balachandran A, Morita M, Kitamoto T, Barron R, Manson J, Knight R, Ironside JW, Head MW. Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jan;20(1):88-97. doi: 10.3201/eid2001.130858. 査読有.

(3) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, Mori K, Ito M, Kitamoto T, Yoshida M. Panencephalopathic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with circumscribed spongy foci. *Clin Neuropathol*. 2014 Mar-Apr;33(2):160-4. doi: 10.5414/NP300684. 査読有.

(4) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2013 Aug 23;3(8):e003400. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003400. 査読有.

(5) Taguchi Y, Mistica AM, Kitamoto T, Schätzl HM. Critical significance of the region between Helix 1 and 2 for efficient dominant-negative inhibition by conversion-incompetent prion protein. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003466. doi: 10.1371/journal.ppat.1003466. Epub 2013 Jun 27. 査読有.

(6) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater

graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Oct;84(10):1171-5. doi: 10.1136/jnnp-2012-304850. Epub 2013 Apr 17. 査読有.

(7) 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*. 2013;8(3):e60003. doi: 10.1371/journal.pone.0060003. Epub 2013 Mar 28. 査読有.

(8) Xiao X, Yuan J, Haik S, Cali I, Zhan Y, Moudjou M, Li B, Laplanche JL, Laude H, Langeveld J, Gambetti P, Kitamoto T, Kong Q, Brandel JP, Cobb BA, Petersen RB, Zou WQ. Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease. *PLoS One*. 2013;8(3):e58786. doi: 10.1371/journal.pone.0058786. Epub 2013 Mar 19. 査読有.

(9) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 1;432(1):86-91. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.081. Epub 2013 Jan 30. 査読有.

(10) Iwasaki Y, Yokoi F, Tatsumi S, Mimuro M, Iwai K, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene codon 232 and type 1+2 prion protein. *Neuropathology*. 2013 Jan 16; 33(5):568-75. doi: 10.1111/neup.12013. Epub 2013 Jan 16. 査読有.

(11) Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon 129 genotypes. *J Biol Chem*. 2013 Jul 26;288(30):21659-66. doi: 10.1074/jbc.M113.470328. Epub 2013 Jun 21. 査読有.

(12) Kobayashi A, Iwasaki Y, Otsuka H, Yamada M, Yoshida M, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M/V and type 2 abnormal prion protein. *Acta Neuropathol Commun*. 2013 Nov 13;1(1):74. doi: 10.1186/2051-5960-1-74. 査読有.

(13) Takeda N, Yokota O, Terada S, Haraguchi T, Nobukuni K, Mizuki R, Honda H, Yoshida H, Kishimoto Y, Oshima E, Ishizu H, Satoh K, Kitamoto T, Ihara Y, Uchitomi Y. Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different disease courses: A clinicopathological study. *J Neurol Sci*. 2012, Jan 15;312(1-2):108-16. doi: 10.1016/j.jns.2011.08.008. Epub 2011 Oct 7. 査読有.

〔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 TETUYUKI)
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：