

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790871

研究課題名(和文)PMCA法によるクロイツフェルト・ヤコブ病の新しいタイピング

研究課題名(英文)Characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains with protein misfolding cyclic amplification

研究代表者

竹内 敦子 (TAKEUCHI, Atsuko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00535239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：異常プリオンタンパク質(PrPSc)のin vitro増幅系であるProtein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法の基質にリコンビナント正常プリオンタンパク質(rPrPC)を用いるcell-PMCA(cPMCA)法を用いて、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)の新しいタイピングを行った。CJD症例のPrPScを遺伝子型が129Mまたは129Vの基質によって増幅し、増幅特性の違いを元に新たなCJDの特徴付けを行ったところ、硬膜移植後CJDの中には遺伝子型が129M/Mであるにもかかわらず、129Vにより顕著に増幅する症例があった。

研究成果の概要(英文)：Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) is currently one of the most sensitive method of detecting PrPSc, by which protease-resistant isoform of prion protein can be amplified in vitro. However, when human brains were used as substrate, the efficiency of sporadic Creutzfeldt-Jakob CJD (sCJD) prions was considerably lower than that of scrapie-derived hamster-adapted strain. Then, we used human cell lysates overexpressing human PrPC as substrate instead of human brains (cell-PMCA), resulting in the improvement of amplification efficacy of some types of CJD prions. In this study, we amplified CJD prions from a large number of CJD cases including various types with cPMCA. As a result, prions from MV2, VV2 and dura-mata grafted CJD (dCJD) showing the plaque type depositions of PrPSc (p-dCJD) in the brains were strongly amplified with 129V substrate. Interestingly, p-dCJD prions could be amplified efficiently with 129V substrates whereas the genotype of these cases was 129M/M.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科

キーワード：クロイツフェルトヤコブ病 プリオン PMCA

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は致死の感染性神経変性疾患であり、治療がない。その上 CJD の感染因子である異常型プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) は、一般的な滅菌法によって不活化させることが不可能である。そのため最も懸念されるのが、発病前の患者に対する脳外科手術を介した感染リスクの存在、輸血や血液製剤、臓器移植等を介した CJD の二次感染であり、これを未然に防ぐためには CJD の早期診断法の確立が緊要である。超高感度検出系として、齧歯類や羊のスクレイピーなど動物のプリオン病で成功している Protein Misfolding Cyclic Amplification (以下 PMCA) 法が知られているが、今日、CJD の高感度検出および早期診断法として、新たに Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QUIC) 法 (Atarashi et al., 2008) が注目されている。PMCA 法に関してはヒトプリオンの増幅系は変異型 CJD (vCJD) 以外現時点で成功していない。

2. 研究の目的

本研究では、当研究室で保有している 200 症例以上の sCJD (MM1、MM2、MV2、VV2) や fCJD、dCJD について、ヒト型 129M リコンビナント正常プリオンタンパク質 (Hu129MrPrP^C) とヒト型 129V リコンビナント正常プリオンタンパク質 rPrP^C (Hu129VrPrP^C) を基質とした PMCA (cell-PMCA; cPMCA) を行って網羅的に増幅特性を解析し、臨床像や病型と関連づけながら、新たな CJD の特徴づけを試みることにした。

3. 研究の方法

cPMCA 法の具体的な手順を示す (図 1)。FreeStyle293F 細胞 (Invitrogen) は浮遊系のヒト由来細胞であり、リコンビナント蛋白の大量発現に向く株であるが、内在性の PrP^C が微量ながら存在している (遺伝子型は 129M)。内在性の PrP^C のみからはいかなるタイプの CJD プリオンも増幅されなかったが、PK 抵抗性プリオン蛋白質 (PrPres) への構造変換過程における heterozygous inhibition (Hizume et al., 2009, Kobayashi et al., 2009) が生じる可能性を考慮し、shRNA 発現ベクターを用いて作製した内在性 PrP^C ノックダウン株 (内在性 PrP^C の発現量は 10%以下) を以降の実験に用いた。

(1) 細胞破砕液および脳ホモジネートの調製

293F 細胞に Hu129MrPrP^C またはヒト Hu129VrPrP^C を一過性に発現させ、最終濃度 20% (w/v) で PMCA バッファを用いて超音波ホモジナイザーを用いて破砕し、基質として用いた (図 1)。一方、CJD 脳は最終濃度 10% (w/v) となるよう PMCA バッファ中で磨砕し調製した (10%脳ホモジネート中の PrP^C 量に対し、本実験で用いる 20% 293F

細胞破砕液中に含まれる PrP^C 量は約 5-10 倍となる)。

(2) PMCA によるヒトプリオンの増幅

CJD 脳 10% ホモジネートと Hu129MrPrP^C または Hu129VrPrP^C を発現している 293F 細胞破砕液にてそれぞれ 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 希釈し、全自動交差超音波蛋白質活性装置 Elestein 070-GOT (エレコン科学) を用いて 48 サイクルの PMCA 反応に供した (図 1)。PMCA 反応後、30 μl を Proteinase K (PK) 処理 (50 μg/ml, 37 °C, 1hr) に供し、ウェスタンブロット法により産生された PrPres を検出後、増幅効率を定量的に評価し比較した。

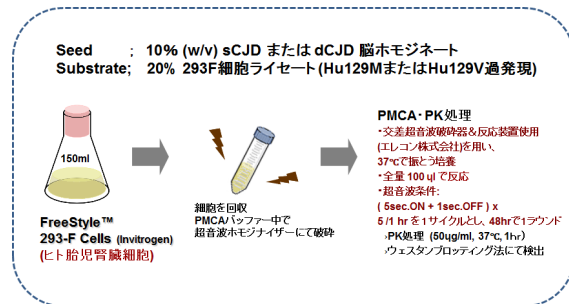


図 1 細胞破砕液の調製法と PMCA 条件

(3) 解析の対象となる CJD 症例について

解析の対象となる CJD 患者さんの脳は、東北大学・北本教授より分与された。保有する脳は東北大学の倫理規定に従い、本研究に使用可能な症例である。本研究では sCJD (MM1、MM2、MV2、VV2)、家族性 CJD、硬膜移植後 CJD (シナプス型、ブランク型; p-dCJD の 2 種類)、vCJD の脳ホモジネートをそれぞれ cPMCA のシードとして用いた。

4. 研究成果

まずヒトプリオンの cPMCA 法による増幅の特徴に関して、本研究の成果も含めて図 2, 3 に示す。vCJD プリオンは Hu129MrPrP^C を用いたときのみ顕著に増幅された。一方 sCJD-MM1, sCJD-MM2 では基質の遺伝子型にかかわらず増幅効率は低かった。しかしながら同じ MM1 タイプでもその増幅効率には違いがあり (図 4)、また Hu129MrPrP^C よりも Hu129VrPrP^C を用いたほうが増幅効率が向上した。一方、sCJD-MV2, sCJD-VV2 は基質遺伝子型が 129V のときに顕著に増幅効率が大きく、10⁻⁹ 希釈から PrP^{Sc} が増幅可能であった。一方で Hu129MrPrP^C を用いた場合には非常に増幅効率が低いことから、cPMCA において Hu129VrPrP^C を基質に用いたときのみに見られる極端な基質選択性が、sCJD-MV2 および sCJD-VV2 を特徴づける性質であると考えられた。また、dCJD には遺伝子型が 129M/M の場合、臨床症状や病理診断上 2 種類のタイプが存在することが知られている。一つは sCJD-MM1 と区別の困難なシナプス型、一方は遺伝子型が

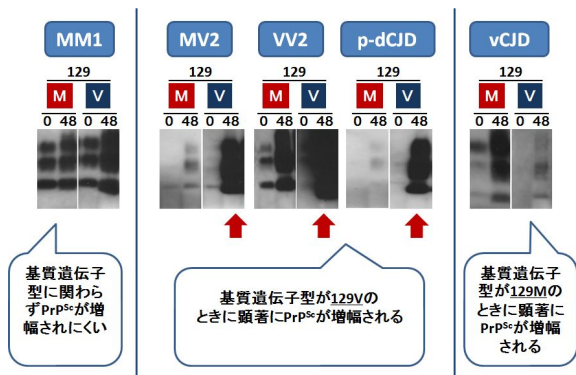


図2 cPMCA法におけるヒトプリオン増幅の特徴

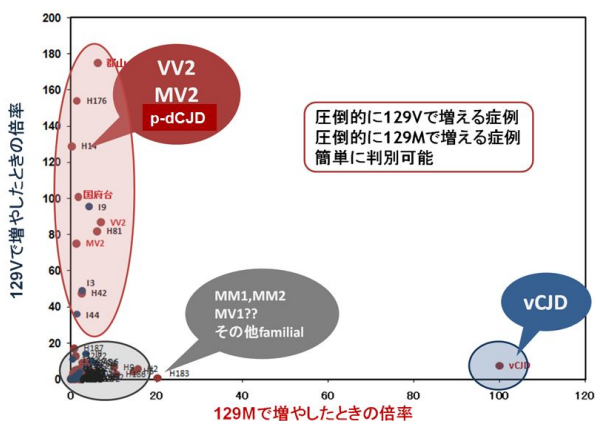


図3 cPMCA法におけるヒトプリオン増幅の特徴

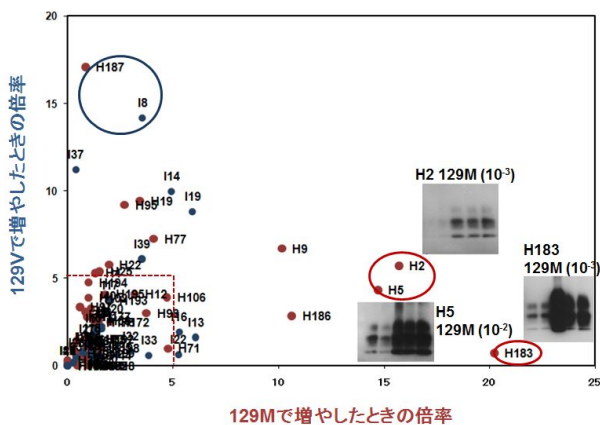


図4 cPMCA法におけるMM1プリオン増幅の特徴

129M/Mにもかかわらず、脳内にプラーク状の PrP^{Sc} の沈着を認めるプラーク型 (p-dCJD) である。p-dCJD は非糖鎖型の PrP^{Sc} の分子量が 20 kDa であり、タイプ 1 プリオンとタイプ 2 プリオンの中間型の特徴を示す (タイプ MM intermediate ; MMi と表記、図 5)。シナプス型の増幅効率および基質の選択性は sCJD-MM1 の特徴と非常によく似ていた。しかしながら p-dCJD は Hu129VrPrP^C により顕著に増幅され、高感度検出可能な程度まで増幅可能であり、この増幅効率と基質の選択性は sCJD-MV2 および sCJD-VV2 の特徴と非常によく似ていた。そこで、当研究室で所持する 200 例以上の CJD 症例を網羅的に PMCA に供して調べた

ところ、sCJD-MV2、sCJD-VV2 以外に Hu129VrPrP^C でのみ極端に顕著な増幅を示す症例は p-dCJD のみであることが明らかとなった。

この現象は、これまでに我々がヒト型ノックインマウスを用いて実験的に証明を行ってきた、「プリオンの PrP のアミノ酸配列を越えた感染の後も元の配列の PrP を異常化する性質」(Kobayashi et al., 2010) が、*in vitro* 増幅系である PMCA 法によっても再現できる可能性があることを示唆している。今回、(1) cPMCA 法によるヒトプリオンの増幅は基質特異的であり、(2) cPMCA 法による増幅実験ではマウスを用いた感染実験と比較的に近い結果が得られることが分かった。上述の p-dCJD のように、129M/M でありながら Hu129VrPrP^C で効率よく増幅されるような症例は非典型的な症例である可能性が高く、遺伝子型 129M/M のヒトが sCJD-MV2 や sCJD-VV2 に感染した獲得性 CJD である可能性を強く示唆するものである。Hu129MrPrP^C または Hu129VrPrP^C を用いた cPMCA 法はこうした問題例を簡単に診断できるツールとして極めて有用であると考えられた。

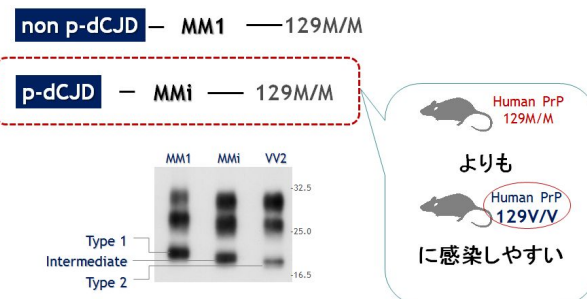


図5 p-dCJDのヒト型ノックインマウスへの感染性

本研究で得られた知見をまとめると、(1) vCJD プリオンは Hu129MrPrP^C を用いたときのみ高い効率で増幅可能である、(2) sCJD-MV2、sCJD-VV2、p-dCJD タイプは Hu129VrPrP^C を用いることで圧倒的に増幅させることが可能である。遺伝子型が 129M/M であるにもかかわらず、Hu129VrPrP^C を用いた場合に顕著に増幅される症例に関しては感染が疑われる問題例である可能性が非常に高い (この増幅効率は Hu129MrPrP^C を用いたときと比較して非常に劇的な違いがあり、容易に判別可能)、(3) sCJD-MM1 の cPMCA における増幅効率は sCJD-MV2、sCJD-VV2、p-dCJD と比較すれば非常に低いものの、Hu129VrPrP^C を用いたほうがより増幅効率は改善する、(4) 同じ sCJD-MM1 でも基質の遺伝子型が 129M か 129V かに関わらず、症例によって増幅効率が大きく異なることが明らかとなった (図 4)。

今後の課題として、sCJD-MM1 や sCJD-MM2、fCJD は PMCA 法によるプリオン増幅が困難なタイプであり、世界的に見

てもヒト型マウス脳および 293F 細胞を用いた系で高効率なプリオン増幅には成功していないことから、上記タイプのプリオン増幅効率改善のための試みが挙げられる。

トランスジェニックマウス脳を基質に用いる PMCA 法と比較して cPMCA 法では基質となるプリオンタンパク遺伝子への変異導入が容易であることから、今回 CJD プリオンの増幅効率向上を目的として、基質遺伝子型の変異がそれぞれの CJD プリオン増幅効率に及ぼす影響について検討しているところである。Hu129VrPrP^C を用いた場合に非常に高効率に PrP^{Sc} が増幅される sCJD-MV2、sCJD-VV2、p-dCJD に関しても、Hu129VrPrP^C を用いた場合よりも高い増幅効率を示す変異は現時点では見つかっていない。しかしながら、p-dCJD については、129M であっても変異の導入箇所によっては増幅効率が向上する変異があり、PMCA 法における PrP^{Pres} 増幅の基質選択性は sCJD-MV2、sCJD-VV2 と比較して若干の違いがある可能性が示唆されている。一方 vCJD プリオンに関しては、C 末端のハムスター型（またはウシ型）変異は増幅効率を大きく向上させる可能性が示唆された。

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 1 件)

1. Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. (2013) Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon 129 genotypes. *J Biol Chem* 288: 21659-21666. 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
竹内 敦子 (TAKEUCHI ATSUKO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00535239

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：