

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（海外学術調査）

研究期間：2013～2016

課題番号：25257506

研究課題名（和文）BSE（牛海綿状脳症）由来vCJDプリオン高感度検出法の臨床応用研究

研究課題名（英文）Study for highly sensitive PMCA amplification with vCJD prions

研究代表者

北本 哲之（KITAMOTO, TETSUYUKI）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20192560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：鋭敏なPMCA法の開発とその臨床応用を行うため、PMCA法の迅速化、英国でのPMCA法の標準化、血漿を用いた阻害効果の排除を中心に研究を行った。迅速化に関しては、当初予想もしなかったイオン交換樹脂の中でプリオン蛋白には結合能力のない担体が画期的に迅速化を促進することを見出し、英国における標準化も東北大学と同等のレベルかそれ以上希釈したサンプルでもPMCAで増幅できることを確かめた。現在は、臨床応用一歩手前のvCJDプリオンの血漿を用いた標準サンプルを用いた試験の最中である。さらに、血漿中の阻害因子を排除する方法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）： To establish a highly sensitive PMCA method, we studied the method to perform PMCA in a short period, the standardization in UK, and the exclusion of the inhibitory factor in plasma. Fortunately, we found the special carrier to enhance PMCA sensitivity in a short period. We also succeeded the standardization between Tohoku University and Scotland blood bank research group in the same amplification level. Now, UK group is going to examine plasma samples with or without vCJD infection. Finally, we found the new method to exclude the inhibitory factor in plasma samples

研究分野：プリオン感染

キーワード：プリオン BSE vCJD感染 PMCA法 鋭敏な検出法

1. 研究開始当初の背景

牛海綿状脳症 (BSE) 由来の variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) の出現によって、輸血や血液製剤への vCJD プリオンの混入が危惧されていた。実際、英国では輸血によって vCJD が感染したと考えられる症例が 4 例存在するし、現時点でも英国は自国の血液を使用した血液製剤の作製を中止したままである。翻って、我が国では 2001 年に BSE の存在が明らかとなり、2005 年英国への渡航歴のある前述の症例が 1 名 vCJD を発病し、現在でも献血の除外項目として、英国 1 カ月、ヨーロッパ 6 カ月の滞在者が挙げられている。vCJD 患者では、中枢神経系以外に全身のリンパ装置の中にある FDC (濾胞樹状細胞) に異常プリオン蛋白が認められ、孤発性 CJD と比較して血液や腸管などの感染性が高いことが当初より想像されていたが、現実問題として輸血での感染例が報告されるに至り、血液などを利用した高感度のプリオン検出法の開発は、急を要する研究課題となった。

2. 研究の目的

BSE (牛海綿状脳症) 由来の vCJD は、輸血など血液を介する 2 次感染が報告され、感染拡大が懸念されている。我々は、vCJD の血液という量的に少ないプリオンをも 10^{10} 倍以上に増幅し得る cell PMCA 法を開発した。本申請では、英国の CJD サーベイランスユニットと協力してこの cell PMCA 法の臨床応用し、微量のプリオンの検出を行い、安全な輸血体制を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Cell PMCA 法の迅速化

我々の開発した cell PMCA 法は、vCJD プリオンを 10^{10} 倍以上増幅するという血液や髄液からの増幅には十分な感度を有している。しかしながら、その増幅期間としてまだ 2.5 週間程度必要とし、血液製剤等の検査としては実用的であるが、輸血用の血液検査と

してはこの検査法を迅速化する必要がある。まず、cell PMCA 法の迅速化を目指して研究を行う。

(2) 英国研究室との cell PMCA 法の標準化

本研究は英国での海外調査を主として行うものであり、英国の CJD サーベイランスユニットの研究者とは、すでに cell PMCA 法に使用する基質や材料をやり取りしあって英国でも vCJD プリオンの増幅に有効であることを確認しているが、東北大学での 10^{10} 倍増幅までの水準には達していないのが現状である。PMCA に使用するチューブ、PMCA 機器の標準化、sonication & incubation の条件など英国との PMCA 法の方法論の標準化を行う。特に、この標準化には頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム (平成 24 年度開始 JSPS) により、竹内助教を直接英国に派遣して標準化を進める。

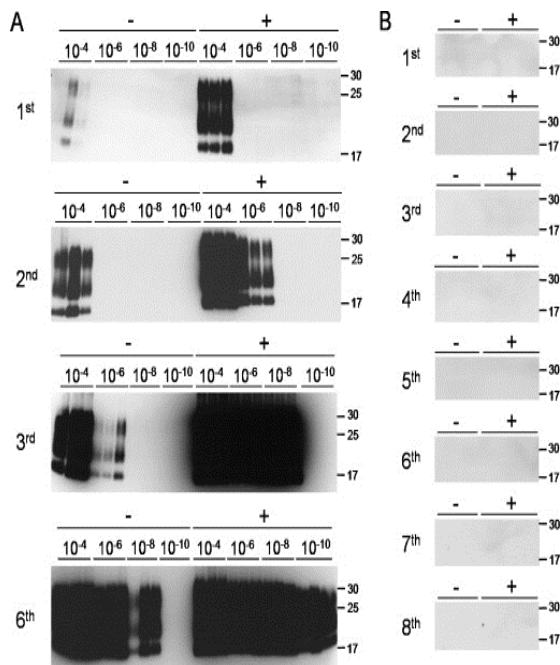
(3) 血漿等材料の検討

髄液などの共存するタンパク質の少ない溶液と異なり、血液からの増幅は、PMCA 法による増幅阻害因子が血漿中に存在するという報告もあり、これらの阻害因子を回避する方法を開発することも研究に加えた。

4. 研究成果

(1) Cell PMCA 法の迅速化

我々の開発した cell PMCA 法は、ヒトの脳やトランスジェニックマウスの脳ホモジネートを利用するのではなく、293F 細胞に発現させた 129Met 型のプリオン蛋白を使用することによって、再現性良く施行することが可能であり、しかも本方法の開発中に見出した、ヘパリンの添加によって 10^{-10} 倍まで希釈したサンプルも増幅できる系となった。しかし、1 ラウンド当たり 3~4 日必要とする系であるので、次頁図のように 6 ラウンド繰り返すには 18~24 日という長期間の検査日数が必要である。



そこで、プリオン蛋白と結合する担体を見つけてより効率よく PMCA を行う目的で、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂などの担体を PMCA の tube 内に入れて迅速化を目指したところ、当初目指していた結合する担体ではなく、全く結合しない担体の中に画期的に PMCA の迅速化に役立つ担体が存在することを突き止めた。本担体を用いることによって 2 ラウンドの PMCA で 10^{-11} 希釈したサンプルを増幅可能であることを発見した。

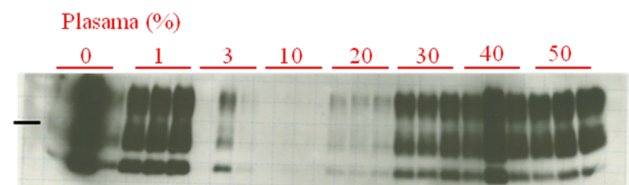
(2) 英国研究室との cell PMCA 法の標準化

頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラムにサポートされて、英国研究室へ共同研究者の竹内助教を 2014 年度 1 年間派遣することが出来た。彼女の派遣によって、画期的に英国での標準化が進んだ。また、彼女が持参した正常 PrP のサンプルを基質として英国の CJD サーベイランスでは独自の PMCA を行い、共同論文として報告した。当初目標として掲げた、PMCA 標準化に関しては、スコットランド血液バンクの Mark Turner らのグループが東北大学レベルの 10^{-10} 倍まで希釈したサンプルを増幅可能とし、さらに最新のデータでは 10^{-11} 倍までの希釈の増幅にも成功している。彼女をエジンバラに派遣したことによって最も困難が予

想された日英での標準化に成功した。Turner 博士らのグループによって、本 PMCA 法の臨床応用に向けた標準サンプルを用いた検査が現在も進行中である。

(3) 血漿等材料の検討

血漿中の PMCA 増幅の阻害因子を解析するため、まず我々はどの程度の希釈で阻害効果がなくなるのかを検討した。



その結果、上図のように全く予想外の結果が得られた。ほとんどの予想、ないし血液での阻害効果は 10% 程度の希釈に留まっており、我々も 3% ~ 20% までの希釈では阻害効果が前面に出ている結果であったが、なんと 30% 以上の濃度で血漿を検査するとむしろ阻害効果というよりも促進効果が見られることを明らかとした。現時点での、阻害効果と促進効果の 2 相性であることを Transfusion 誌に報告し、さらに報告前から英国の共同研究者にもこの効果を開示している。現在は、特に促進効果をもたらす因子を同定するという新しい目的に向かって研究を開始するという当初では予想もしなかった方向に研究が進んでいる。

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 29 件)

1) Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K,

Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H, Yamada M. Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2016 Aug;132(2):313-5. doi: 10.1007/s00401-016-1588-3. Epub 2016 Jun 17. 査読有.

- 2) Cescatti M, Saverioni D, Capellari S, Tagliavini F, **Kitamoto T**, Ironside J, Giese A, Parchi P. Analysis of Conformational Stability of Abnormal Prion Protein Aggregates across the Spectrum of Creutzfeldt-Jakob Disease Prions. *J Virol.* 2016 Jun 24;90(14):6244-54. doi: 10.1128/JVI.00144-16. Print 2016 Jul 15. 査読有.
- 3) Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, **Kitamoto T**. Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. *Lab Invest.* 2016 May;96(5):581-7. doi: 10.1038/labinvest.2016.27. Epub 2016 Feb 15. 査読有.
- 4) Oshita M, Yokoyama T, Takei Y, Takeuchi A, Ironside JW, **Kitamoto T**, Morita M. Efficient propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease prion protein using the cell-protein misfolding cyclic amplification technique with samples containing plasma and heparin. *Transfusion.* 2016 Jan;56(1):223-30. doi: 10.1111/trf.13279. Epub 2015 Sep 8. 査読有.
- 5) Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, **Kitamoto T**, MacArthur DG, et al.(64 人, 20 項目) Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med.* 2016 Jan 20;8(322):322ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.aad5169. 査読有.
- 6) Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**. Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 are Identical in Transmission Properties. *Brain Pathol.* 2016 Jan;26(1):95-101. doi: 10.1111/bpa.12264. Epub 2015 Jun 4. 査読有.
- 7) Nakatani E, Kanatani Y, Kaneda H, Nagai Y, Teramukai S, Nishimura T, Zhou B, Kojima S, Kono H, Fukushima M, **Kitamoto T**, Mizusawa H. Specific clinical signs and symptoms are predictive of clinical course in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Neurol.* 2016 Sep;23(9):1455-62. doi: 10.1111/ene.13057. 査読有.
- 8) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**. Neuropathological and biochemical criteria to identify acquired Creutzfeldt-Jakob disease among presumed sporadic cases. *Neuropathology.* 2016 Jun;36(3):305-10. doi: 10.1111/neup.12270. Epub 2015 Dec 15. 査読有.
- 9) Iwasaki Y, Akagi A, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Factors influencing the survival period in Japanese patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci.* 2015 Oct 15;357(1-2):63-8. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.065. Epub 2015 Jun 30. 査読有.
- 10) Kobayashi A, Teruya K, Matsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, **Kitamoto T**. The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol.* 2015 Aug;130(2):159-70. doi: 10.1007/s00401-015-1447-7. Epub 2015 May 29. 査読有.
- 11) Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, **Kitamoto T**, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol.* 2015;25(1):8-14. doi: 10.2188/jea.JE20140022. Epub 2014 Oct 4. 査読有.

- 12) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, **Kitamoto T**. Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? *J Virol*. 2015 Apr;89(7):3939-46. doi: 10.1128/JVI.03183-14. Epub 2015 Jan 21. 査読有.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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*. 2014 May 16;4(5):e004968. doi: 10.1136/bmjopen-2014-004968. 査読有.
- 16) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Hashizume Y, Yoshida M. Relation between clinical findings and progression of cerebral cortical pathology in MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Proposed staging of cerebral cortical pathology. *J Neurol Sci*. 2014 Jun 15;341(1-2):97-104. doi: 10.1016/j.jns.2014.04.011. Epub 2014 Apr 13. 査読有.
- 17) Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, **Kitamoto T**. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Mar 31;2:32. doi: 10.1186/2051-5960-2-32. 査読有.
- 18) Araki K, Nakano Y, Kobayashi A, Matsudaira T, Sugiura A, Takao M, **Kitamoto T**, Murayama S, Obi T. Extensive cortical spongiform changes with cerebellar small amyloid plaques: The clinicopathological case of MV2K+C subtype in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2014 Dec;34(6):541-6. doi: 10.1111/neup.12133. Epub 2014 Jul 2. 査読有.
- 19) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nokura K, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Gerstmann-Straeussler-Scheinker disease with P102L prion protein gene mutation presenting with rapidly progressive clinical course. *Clin Neuropathol*. 2014 Sep-Oct;33(5):344-53. doi: 10.5414/NP300733. 査読有.
- 20) 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.
- 21) 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.

22) 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.

23) 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.

24) 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 Oct;33(5):568-75.
doi: 10.1111/neup.12013. Epub 2013 Jan 16.
査読有.

25) 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.

26) 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;1:74.
doi: 10.1186/2051-5960-1-74. 査読有.

27) 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.

28) 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.

29) 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.

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