

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430050

研究課題名(和文) 病型分類別にみたプリオン蛋白の重合度解析と蛋白化学的異常化の評価

研究課題名(英文) Evaluation of prion protein oligomerization and abnormality on human prion diseases

研究代表者

本田 裕之 (HONDA, HIROYUKI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90624057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々の病型のヒトプリオン病において、遠心ゲル濾過法を用いてプリオン蛋白オリゴマーを分取し、その性状を検討した。調べ得た全ての病型(孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、E200K変異を伴うCJD、V180I変異を伴うCJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、コドン178番2塩基欠失を伴うプリオン病)において、オリゴマー分画にはプロテイナーゼK抵抗性プリオン蛋白が多く含まれていた。低分子量のプロテイナーゼK抵抗性プリオン蛋白も同様の性状を示した。我々の実験結果より、プロテイナーゼK抵抗性プリオン蛋白はオリゴマー形成を示す事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We used size exclusion gel chromatography to evaluate oligomeric prion protein on some human prion diseases. In all examined samples (sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), CJD with E200K mutation, CJD with V180I mutation, Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (P102L), D178fs25 Prion disease), oligomeric fraction contained a lot of proteinase K resistant prion protein (PrPres), respectively. Low molecular PrPres detected in some kinds of prion diseases were also contained in the oligomeric fraction. Our results suggested that PrPres tends to form oligomeric state.

研究分野：総合領域

キーワード：プリオン病 プリオン蛋白 オリゴマー ゲル濾過 遠心カラム

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるプリオン病は、急速に認知症が進行する致死性の神経変性疾患であり、未だ治療法は開発されていない。プリオン病は、脳内に存在する正常型プリオン蛋白が構造変換し異常型プリオン蛋白となり、それが蓄積し発症する。異常型プリオン蛋白は、以下の様な特徴がある。(1)界面活性剤に難溶性 (2)プロテアーゼに部分的に抵抗性 (3)シートの割合が高く凝集体を形成し易い、などである。従来、プリオン病の確定診断にはプロテイナーゼ K (PK) に抵抗性のプリオン蛋白 (PrP^{res}) を検出する事を指標としていた。しかし近年、プロテアーゼに感受性をしめすプリオン蛋白の中にも、病原性を有するものがある事が指摘されている。また同時に、プリオン病の発症や感染性には、高度に凝集したプリオン蛋白よりも、オリゴマー状態のプリオン蛋白 (PrP) が最も関与している事が示唆された。これらは、アルツハイマー病におけるアミロイド 蛋白オリゴマーの病態への関与と共通する機序も考えられる。我々は現在までに、市販の遠心ゲル濾過キットを用いて、簡便かつ安全にマウス及びヒトプリオン病脳から、PrP オリゴマー分画を分取する事に成功している。マウスモデルでの検討では、海綿状変化などの病理変化に先行して、PrP オリゴマーが形成される事が確認された。ヒトプリオン病においては、孤発性 CJD (sCJD) や遺伝性 CJD (E200K、V180I)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (P102L)、PRNP コドン 178 変異プリオン病など多様な病型があり、その病理組織や Western blot における PrP^{res} のバンドパターンも多様である。各病型における、その組織変化や PrP^{res} のパターンと PrP オリゴマーとの関係を明らかにする事は、プリオン病の病態解明において非常に重要な知見をもたらすと期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多様なヒトプリオン病において、それぞれの PrP オリゴマーを分取し生化学的性質 (分子量・プロテアーゼ抵抗性・糖鎖修飾) を明らかにし、各病型における病理学的な特徴との関連を検討する事である。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

我々の施設で剖検され、凍結脳標本が保存されている、孤発性 CJD (sCJD)、V180I 変異を伴う CJD (V180I CJD)、E200K 変異を伴う CJD (E200K CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (P102L GSS: 一卵性姉妹例)、PRNP コドン 178 変異プリオン病 (D178fs25 Prion) などを対象とした。

(2) 脳乳剤作成

脳乳剤は、プリオン病患者の剖検脳から採

取され、-80 で凍結保存している前頭葉皮質 (一部の症例は小脳皮質も併せて作成した) から作成する。その脳試料は、遠心ゲル濾過法に用いるために、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate = SDS) を加えた溶液緩衝液 (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS, pH7.6) 中で最終的に 10% の濃度になるように調整した。脳試料は、ビーズ破砕法 (MicroSmash MS-100; Tomu Seiko Co, Ltd, Tokyo, Japan) を用い 5000 回毎分 30 秒で粉碎した。粉碎物は 250G5 分で遠心分離し、その上清を -80 で保存した。

(3) 遠心ゲル濾過カラムキットを用いた PrP オリゴマーの採取

遠心カラムは市販の spin-column kit CHROMASPIN-200 (Clontech, San Francisco, CA, USA) を用いて施行した。上記で調整した脳乳剤を spin-column 内に滴下し、その後 120G2 分間で遠心し最初の分画を収集チューブに採取した。サイズによって分けられた分画を順次採取するために、次の分画を収集する前に新たに 40 µL の溶液緩衝液をカラム内に加え遠心を施行した。繰り返し分画 1 から 9 を採取した。これらの作業は swing-bucker rotor (A-4-62; Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いた。現在までの検討で、分画 2 から 4 に PrP オリゴマーが分取され、分画 7 から 9 にモノマーが多く分取される事が確認されている。

(4) Western blotting

遠心ゲル濾過法にて採取した分画 2 から 9 を用いて電気泳動を施行した (12% NuPAGE Bis-Tris ゲル: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。電気泳動によって分離された各サンプルは PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写し、適合する抗 PrP 抗体を用いて可視化した。

(5) 組織学的検討

剖検脳の重量を計測し、10%ホルマリンで固定した。標本は大脳や小脳、脊髄、全身臓器より採取し、感染性を失活させるためにギ酸処理を施した。パラフィンに包埋し、6 µm の切片とし hematoxylin-eosin 染色 (HE) や Klüver-Barrera 染色を施行した。免疫染色には抗プリオン蛋白抗体 (mouse monoclonal 3F4, Signet, Cambridge, MA, USA) を用いた。

4. 研究成果

(1) sCJD

組織学的には、大脳皮質において、神経細胞脱落や反応性グリオシス、海綿状変化がみられた。抗 PrP 抗体を用いた免疫染色では、大脳皮質や被殻、小脳皮質において主に細顆粒状のシナプス型沈着をみとめた。大脳皮質から採取した凍結サンプルを用いて western blotting を施行した。PK 処理後のサンプルにおいて、無糖鎖型の PrP^{res} を 21kDa にみとめ、sCJD で最も多くみられる type 1 のバンドパターンであった。遠心ゲル濾過法にて得られたサンプルを用いた western blotting

において、オリゴマー分画に21kDaから35kDaにかけて3本のPrP^{res}を示すバンドをみとめた。sCJDに関して、複数例の解析をしており、脳重量が低下していたり組織の粗鬆化が強い症例ほどPrPオリゴマーが多く含まれる事が示されている。(Honda et al. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology* (32): 124-132, 2012)

(2) V180I CJD (雑誌論文)

死亡時72歳の女性。死亡6年前に地誌的障害と記憶障害で発症した。頭部MRIにて大脳皮質に異常な高信号がみられ、また遺伝子検査でPrP遺伝子のV180I変異が同定された。ペントサンポリサルフェートの脳室内投与をされるも奏効なく死亡した。Western blottingでは、PK処理前のサンプルにて多くの2糖鎖型のPrPをみとめ、同時に1糖鎖型、無糖鎖型のPrPもみとめた。PK処理後は、2糖鎖型のPrPは消失し、1糖鎖型と無糖鎖型のPrP^{res}のみが残存した。このPrP^{res}のバンドパターンは、現在までに報告されているV180I CJDの特徴に合致していた。遠心ゲル濾過法にて得られたサンプルを用いたwestern blottingでは、オリゴマー分画に無糖鎖型と1糖鎖型のPrPを主にみとめ、更に、通常のサンプルを用いたwestern blottingではみられなかった低分子量のPrPも同定された。ゲル濾過法により濃縮され、感度が上昇したためと思われる。モノマー分画には主に2糖鎖型PrPをみとめた。PK処理後は、オリゴマー分画に無糖鎖型と1糖鎖型、また13kDaにもPrP^{res}をみとめた。この13kDaのPrP^{res}はC末抗体で認識出来なかったことから、C末が切断されたPrPである事が示唆された。モノマー分画ではシグナルはほぼ消失した。オリゴマー分画には異常アレル由来のPrPが多く含まれ、それらは凝集しやすくオリゴマーを形成しておりPK抵抗性を持っている事が示された。また、モノマー分画には正常アレル由来のPrPが多く含まれている事が示された。組織学的には、大脳皮質に神経細胞脱落や海綿状変性がみられ、シナプス型のPrP沈着をみとめた。また、新規の所見として、大脳皮質に小球状のPrPの沈着をみとめた。

(3) E200K CJD

死亡時63歳の男性。死亡1年前に物忘れ症状で発症し、歩行障害や視覚障害を呈し無動性無言状態となり死亡した。生前にプリオン蛋白遺伝子コドン200番のE(グルタミン酸)からK(リシン)への変異がみとめられており、E200K変異を有するCJDと診断されていた。脳重量は1120gであり瀰漫性萎縮を呈していた。大脳皮質は菲薄化し、被殻も含めて変性着色をしめた。組織学的には、大脳皮質に神経細胞脱落や強いグリオーシスをみとめ、neuropilの粗鬆化も高度であった。抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色では、

主に細顆粒状のシナプス型沈着を主に大脳皮質や被殻にみとめた。その他として、淡蒼球や視床、扁桃核、海馬、小脳皮質、小脳歯状核、黒質、青斑核、橋核、下オリブ核など広汎な部位にシナプス型のPrP沈着がみられた。Western blottingでは、PK処理後のサンプルにおいて、無糖鎖型のPrP^{res}を21kDaにみとめ、sCJDで示されるバンドパターンと同様であった。遠心ゲル濾過法にて得られたサンプルを用いたwestern blottingにおいて、オリゴマー分画に21kDaから35kDaにかけて3本のPrP^{res}を示すバンドがみられ、これもsCJDとほぼ同様のパターンであった。

(4) P102L GSS (一卵性姉妹例)(学会報告)

Case 1. 姉

死亡時66歳。死亡8年前に歩行失調で発症し、以後、認知症や無動性無言を呈し死亡した。脳重量は790gであり著明に萎縮していた。中脳の萎縮も明らかであり黒質は脱色していた。組織学的には、大脳皮質の神経細胞脱落やグリオーシス、neuropilの粗鬆化が高度であった。抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色では、多数のプラークをみとめた。シナプス型沈着は軽度であった。中脳では黒質の脱落が強く、多数のLewy小体が見られた。Lewy小体は、迷走神経背側核や青斑核、経嗅内野にもみられた。Western blottingでは、PK処理後のサンプルにおいて、21kDaから35kDaにかけて3本のバンドと、約8kDa付近のPrP^{res}をみとめた(図1)。

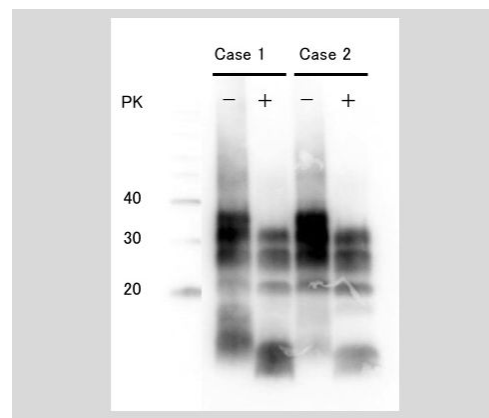


図1. Case 1、Case 2におけるwestern blotting: PK処理後において21kDaから35kDaにかけて3本のPrP^{res}がみられる。また8kDaのPrP^{res}もみられる。Case 1、Case 2共に同様のバンドパターンをしめす。

PK: proteinase K

遠心ゲル濾過法にて得られたサンプルを用いたwestern blottingでは、PK処理前のサンプルにおいて、オリゴマー分画に約20kDa~35kDaと10kDa前後のPrPをみとめた。モノマー分画には中等度の強さの2糖鎖型と1糖鎖型、ごく少量の無糖鎖型PrPをみとめた(図2)。PK処理後はオリゴマー分画に21kDaから35kDaにかけて3本のバンドと、約8kDaのPrP^{res}をみとめた。モノマー分画にPrP^{res}

はみとめなかった。

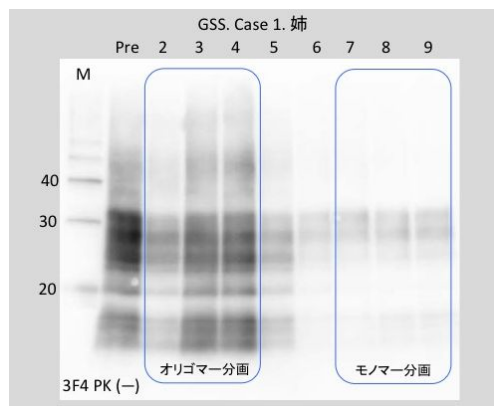


図 2. ゲル濾過によるオリゴマー解析 (Case 1): レーン 2-4 のオリゴマー分画において、低分子量、また 20kDa から 30kDa 付近の PrP を多くみとめる。レーン 7-9 のモノマー分画には 20kDa から 30kDa にかけて少量の PrP をみとめる。

Case 2. 妹

死亡時 79 歳。死亡 4 年前に歩行失調で発症し、認知症や無動性無言を呈し死亡した。脳重量は 1170g であり軽度の萎縮を示した。両側脳室や両側脳室下角の拡大がみられた。黒質の色調は保たれていた。組織学的には、大脳皮質に神経細胞脱落や海綿状変性がみられるが、Case 1 と比較すると軽度であった。抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色では、プリオン蛋白のプラーク型沈着とシナプス型沈着を共に多くみとめた。また、アミロイド 陽性の core を持つ老人斑を多数みとめた (CERAD: frequent)。リン酸化タウ (AT8) 陽性の神経原線維変化も大脳新皮質に汎くみとめ (NFT Braak stage V) Alzheimer 病の病理所見に合致した。Western blotting では、21kDa から 35kDa にかけて 3 本のバンドと、8kDa の PrP^{res} をみとめ、Case 1 と同様のバンドパターンであった (図 1)。遠心ゲル濾過法を用いた western blotting においても、PK 処理前後のサンプルにおいて、Case 1 と同様のバンドパターンをしめした。

まとめ

Case 1 姉は発症が Case 2 妹よりも 17 年早く罹病期間が長かった。また Case 1 はより脳萎縮が著明で組織の変性も強かった。プリオン蛋白の沈着は、Case 1, 2 とともにプラーク型が主であったが、Case 2 ではシナプス型沈着も目立った。しかし蛋白化学的には、Case 1, 2 とともにほぼ同様のバンドパターンであり、オリゴマー分画におけるバンドパターンにも明らかな違いは見い出せなかった。他の病理学的な変化として、Case 1 には Lewy body がみられ α -synucleinopathy の合併がみとめられた。Case 2 には、多くのアミロイド 陽性の老人斑と、リン酸化タウ陽性の神経原線維変化を汎くみとめ Alzheimer 病理が合併していた。 α -synucleinopathy の合併はなかった。一卵性の姉妹例でありながら病

理組織の違いがみられた。発症年齢や罹病期間も含めて、何らかの非遺伝的な要素の関与が示唆された。

	Case 1 (姉)	Case 2 (妹)
発症年齢	58y	75y
死亡時年齢	66y	79y
罹病期間	8y	4y
脳重量	790g	1170g
PrP プラーク	++	++
シナプス型	+	++
α -synucleinopathy	+	-
老人斑 (CERAD)	None	Frequent
リン酸化タウ (Braak)	III	V

(5) D178fs25 Prion (雑誌論文)

死亡時 37 歳の女性。死亡 11 年前に尿閉や体温調節障害、温痛覚障害で発症し、軽度の認知症を伴い死亡し剖検された。遺伝子検査にて、プリオン蛋白遺伝子 (*PRNP*) コドン 178 番に 2 塩基欠失があり、その後の 25 アミノ酸がフレームシフトを生じストップコドンを示した (D175fs25 Prion 病)。結果としてプリオン蛋白の C 末末端にある GPI アンカーが欠損している変異 PrP が生じていた。組織学的に、大脳や小脳などの neuropil には、多くの粗大な PrP 沈着をみとめた。これらは一部が C 末抗体にも陽性であり、正常アレル由来の PrP も一部含まれている事が示唆された。また、粗大な PrP 沈着は、中枢神経系のみならず、末梢神経や心筋、腸管壁、膀胱、副腎などにもみとめられた。Western blotting では、PK 処理前のサンプルにて、主に約 10kDa から 36kDa の強いバンドがみられ、更により高分子量を示すスメアー状のバンドもみられた。PK 処理後では、9kDa の PrP^{res} が多くみられ、より高分子量を示すスメアー状のバンドも少量みられた。9kDa PrP^{res} は 3F4 (エピトープ: 109-112) や 8G8 (エピトープ 95-110) などの抗体で認識され、主に変異アレル由来と思われた。遠心ゲル濾過法にて得られたサンプルを用いた western blotting では、オリゴマー分画に約 10kDa から 35kDa、またより高分子量を示すスメアー状のバンドがみられ、モノマー分画においては約 30kDa から 35kDa の強いバンドをみとめた。PK 処理後は、オリゴマー分画に強い 9kDa PrP^{res} のバンドをみとめた。モノマー分画でみられていた 30kDa から 35kDa の強いバンドはほぼ全て消失した。変異アレル由来の 9kDa PrP^{res} が主体をなしており、それらは凝集しやすくオリゴマーを形成している事が示唆された。

(6) 成果のまとめ

複数の病型のヒトプリオン病脳において、凍結サンプルを用い PrP オリゴマーの解析と組織学的な検討を行った。いずれの病型においても、オリゴマー分画に多くの PrP^{res} が同定された。sCJD でみられる PrP^{res} のみならず、

GSS や V180I, D178fs25Prion でみられた低分子量 PrP^{res} も同様にオリゴマーを形成する傾向をしめし、PrP オリゴマーが病態形成に大きく関与している可能性が示された。その機序の解明は今後の研究の蓄積が必要である。

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7件)

Honda H, Sasaki K, Hamasaki H, Shijo M, Koyama S, Ohara T, Ninomiya T, Kiyohara Y, Suzuki SO, Iwaki T. Trends in autopsy-verified dementia prevalence over 29years of the Hisayama study. *Neuropathology* (in press) 査読有

Matsuzono K, Honda H, Sato K, Morihara R, Deguchi K, Hishikawa N, Yamashita T, Kono S, Ohta Y, Iwaki T, Abe K. 'PrP systemic deposition disease': clinical and pathological characteristics of novel familial prion disease with 2-bp deletion in codon 178. *Eur J Neurol* 23 (1): 196-200, 2016 査読有

Honda H, Hamasaki H, Wakamiya T, Koyama S, Suzuki SO, Fujii N, Iwaki T. Loss of hnRNPA1 in ALS spinal cord motor neurons with TDP-43 positive inclusions. *Neuropathology* 35 (1): 37-43, 2015. 査読有

Wakamiya T, Suzuki SO, Hamasaki H, Honda H, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Iwaki T. Elevated expression of fatty acid synthase and nuclear localization of carnitine palmitoyltransferase 1C are common among human gliomas. *Neuropathology* 34 (5): 465-474, 2014. 査読有

Hamasaki H, Honda H, Suzuki SO, Hokama M, Kiyohara Y, Nakabeppu Y, Iwaki T. Down-regulation of MET in hippocampal neurons of Alzheimer's disease brains. *Neuropathology* 34 (3): 284-290, 2014. 査読有

Hokama M, Oka S, Leon J, Ninomiya T, Honda H, Sasaki K, Iwaki T, Ohara T, Sasaki T, LaFerla FM, Kiyohara Y, Nakabeppu Y. Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama study. *Cereb Cortex* 24 (9): 2476-2488, 2014. 査読有

Honda H, Ishii R, Hamano A, Itoh K, Suzuki SO, Fushiki S, Nakagawa M, Iwaki T. Microsphere formation in a subtype of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation and codon 129 MM polymorphism. *Neuropathol Appl*

Neurobiol 39 (7): 844-848, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

本田裕之, 岩城徹. 一般住民における認知症病理の時代的変遷. 久山町研究. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会 福岡 2015年6月3日-5日

司城昌大, 本田裕之, 渡邊暁博, 大八木保政, 藤井直樹, 岩城徹. 錐体外路症状で発症した GSS の一例. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会 福岡 2015年6月3日-5日

松園構佑, 本田裕之, 佐藤恒太, 河野祥一郎, 菱川望, 太田康之, 山下徹, 出口健太郎, 岩城徹, 阿部康二. Pathology of the novel familial prion disease revealed the prion deposits of the whole organ. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会 福岡 2015年6月3日-5日

本田裕之, 高島洋, 森大輔, 佐々木健介, 濱崎英臣, 吉村俊朗, 鈴木諭, 岩城徹. 発症に17年の差をみとめた GSS 一卵性双生児姉妹例の病理学的検討. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会 東京 2014年6月5日-7日

本田裕之, 石井亮太郎, 濱野愛, 伊東恭子, 中川正法, 伏木信次, 岩城徹. プリオン蛋白陽性の小球状構造物を有する V180I CJD における免疫組織化学的・蛋白化学的検討. 第54回日本神経病理学会総会学術研究会 東京 2013年4月24日-26日

〔図書〕(計1件)

本田裕之, 鈴木諭. クロイツフェルト・ヤコブ病. 病理診断クイックリファレンス 病理と臨床 (33): 336, 2015. 査読無

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuropath/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 裕之 (HONDA HIROYUKI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90624057

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：