

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26305030

研究課題名(和文) ヒトプリオン病の髄液診断の確立とフィールドワークを通しての新規プリオン臨床研究

研究課題名(英文) Establishments of diagnosis for patients' CSF in human prion disease and novel prion clinical research through field work

研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号：70398147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はプリオン病患者髄液中の超微量の異常プリオン蛋白の検出に世界で初めて成功した。さらにプリオン病の治療の可能性のある薬剤が報告され、治療介入試験が開始されている。治療研究を目標にし、技術革新によりプリオン病の早期診断法・プリオン病の病態マーカーの確立を研究目的とする。さらに末梢血からのプリオン病の診断を試みる。

一方で急速進行性認知症の研究を世界的研究グループで行い、プリオン病の髄液研究のトップランナーとしてバイオマーカーと異常プリオン蛋白の臨床応用に向けた研究を共同で行う。さらに日本では稀だが、海外で多数報告されている致死性家族性不眠症治療の病態マーカーについて探索を試みていく。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in detecting the ultra-small amount of abnormal prion protein in patients' CSF with prion disease for the first time in the world. Furthermore, drugs with potential for treatment of prion diseases have been reported, and interventional intervention trials have been initiated. We research for therapeutic research and research for the early diagnosis of prion diseases. Establishment of pathology markers of prion diseases for research purpose. We also try to diagnose prion diseases from peripheral blood.

On the other hand, we will perform the global research group of rapid progressive dementia research, and as a top runner in the research of spinal fluid cerebrospinal fluid, we will conduct joint research on clinical application of biomarker and abnormal prion protein. Furthermore, although it is rare in Japan, we will try to explore pathogenic makers of clinical trials of fatal familial insomnia that has been reported abroad.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン病

1. 研究開始当初の背景

我々はプリオン病の患者髄液中の超微量の異常プリオン蛋白の検出に世界で初めて成功した。この技術を改良・臨床応用し、プリオン病患者の髄液診断の精度を後ろ向きおよび前向き研究にて検証する。プリオン病の完治の可能性を秘めた治療薬の報告が数多く報告され、治療介入試験が開始されている。治療研究を目標にし、技術革新によりプリオン病の早期診断法・プリオン病の病態マーカーの確立を研究目的とする。さらに末梢血からのプリオン病の診断を試みる。

一方で急速進行性認知症の研究を世界的研究グループで行い、プリオン病の髄液研究のトップランナーとしてバイオマーカーと異常プリオン蛋白の臨床応用に向けた研究を共同で行う。さらに日本では3例しか報告はないが、海外で100例以上報告されている致死性家族性不眠症の治験の病態マーカーについて探索を試みていく。

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(致死性家族性不眠症)に関する新たな分類・解析

の5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-蛋白測定の 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) 感度特異度検定: CJD 確定例の後ろ向き研究と急速進行性認知症における髄液検査の前向き試験:

国内の CJD 患者については CJD サーベイランス委員会を通して、CJD 確定例および CJD 疑い患者髄液を集積する。オーストラリア CJD サーベイランス委員会(メルボルン大学 Dr. Steve Collins) および EU 内多国間 CJD 研究チーム(代表ドイツ・ゲッティンゲン大学 Dr. Inga Zerr) と協力協議を行い、CJD 確定患者髄液および急速進行性認知症の髄液を送付してもらった確約を得ている。各国の研究者と年に1ないし2回は直接研究打ち合わせを行う。患者髄液検体送付方法について英語マニュアルを作成する。年間約500検体のアッセイを行う。CJD のバイオマーカーである14-3-3蛋白・総タウ蛋白の測定と RT-QUIC 法を実施する。海外の症例(ドイツおよび EU 諸国・オーストラ

リアのCJD確定例)の髄液について500検体程度を同様に検査する。14-3-3蛋白はモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、半定量法にて定量する。またアイソフォームについてはMBLと共同開発したELISAキットを用いて定量する。総タウ蛋白ELISAキットは市販のものを用いる。RT-QUIC検査は正常型リコンビナントヒトプリオン蛋白(129M,全長)を基質として用いる。陽性検体ではエンドポイント法により異常プリオン定量評価を追加して行う。得られた結果を患者CJD病型別ならびに髄液採取時期別に解析する。

非CJD患者髄液はこれまでに既に100例以上のアルツハイマー病患者髄液を用いて、偽陽性がないことを確認したが、他の疾患特に神経梅毒やHIV脳症患者など慢性感染症患者についての検討は十分ではない。海外施設の症例を含み可能な限り(100例ほど)集め、偽陽性率を追加検討する。

全国の神経内科(1896施設)、精神科(1530施設)に書面にて協力を願い、急速進行性認知症患者の登録と髄液採取、とくに脳生検を予定されている患者の脳生検施行前の髄液採取を依頼する。髄液のバイオマーカー検査ならびにRT-QUIC法を行い、CJD検出率を検討する。髄液検査結果を送付し、脳生検結果やその他の検査結果、臨床経過を提供してもらい、髄液検査の正診率、正診時期を詳細に検討する。特に5つの施設を基盤とし、今後多数の機関を呼びかけ、剖検を勧めていく。

(4) 髄液中の異常プリオン蛋白の半定量法の確立:

CJD患者の脳組織をRT-QUIC法を利用し、異常プリオン蛋白の半定量化の確立を行う。さらにその方法を利用し、髄液中の異常プリオン蛋白の半定量を行う。

(5) DLB診断法開発:

異常シヌクレイン検出のためのDLB-QUIC法を開発する。

4. 研究成果

(1) 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。平成24年10月から平成27年9月までに測定依頼のあった1030症例について検討を行った。

(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ついては十分できるようになり、進行している。論文も作成し、十分成功した。

(3) この1030症例について髄液中のバイオマーカーの検討と異常プリオン蛋白試験管内増幅法(RT-QUIC法)による解析を前向き試験にて行った。(表1)

表1 1030症例の内訳

・プリオン病患者は511症例 (probable cases)	
・ 孤発性プリオン病	455 症例
・ 遺伝性プリオン病	49 症例
・ 獲得性プリオン病	2 症例
・ 非プリオン病は519症例	
・ てんかん(原発及び症候性を含めて)	125 症例
・ VGKCを含めた自己免疫性脳炎・脳症	115 症例
・ アルツハイマー型認知症	104 症例
・ 低酸素脳症	10 症例
・ 脊髄小脳変性症	43 症例
・ その他	114 症例

孤発性プリオン病 455 症例について髄液中のバイオマーカーの検討と異常プリオン蛋白試験管内増幅法(RT-QUIC法)による解析を前向き試験にて行った。孤発性プリオン病 455 症例について発症時期、検査所見について詳細に検討した。

表2 総タウ蛋白、14-3-3蛋白、QUIC法の感度・特異度 (プリオン病 511症例と非プリオン病519症例)

	14-3-3 protein ELISA	14-3-3 protein WB	総タウ蛋白	RT-QUIC assay
感度	78.9%	70.2%	75.7%	70.1%
特異度	81.1%	89.5%	79.8%	97.8%

(4) 髄液の定量化については十分できない。症例によりかなり誤差が生じるためになりに難しい。

5) 異常シヌクレイン検出のためのDLB-QUIC法を開発する。

成功し、論文投稿している。

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 17 件)

1. An autopsy-verified case of FTL-D-TDP type A with upper motor neuron-predominant motor neuron disease mimicking MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Hayashi Y, Iwasaki Y, Takekoshi A, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. Prion. 2016 Nov;10(6):492-501. (査読有り)
2. Prion-Seeding Activity Is widely Distributed in Tissues of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. EBioMedicine. 2016 Oct;12:150-155. (査読有り)
3. Preserved regional cerebral blood flow in the occipital cortices, brainstem, and cerebellum of patients with V180I-129M genetic Creutzfeldt-Jakob disease in serial SPECT studies. Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A, Yamada M, Asano T, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Inuzuka T. J Neurol Sci. 2016 Nov 15;370:145-151. (査読有り)
4. The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Müller-Cramm D, Collins S, Atarashi R, Satoh K, Orrù CD, Groveman BR, Zafar S, Schulz-Schaeffer WJ, Caughey B, Zerr I. Nat Protoc. 2016 Nov;11(11):2233-2242. doi: 10.1038/nprot.2016.120. Epub 2016 Oct 13. (査読有り)
5. Sequential Washing with Electrolyzed Alkaline and Acidic Water Effectively Removes Pathogens from Metal Surfaces. Nakano Y, Akamatsu N, Mori T, Sano K, Satoh K, Nagayasu T, Miyoshi Y, Sugio T, Sakai H, Sakae E, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Fujita Y, Yanagihara K, Nishida N. PLoS One. 2016 May 25;11(5):e0156058. doi: 10.1371/journal.pone.0156058. eCollection 2016. (査読有り)
6. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. McGuire LI, Poggiolini A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M, Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haïk S, Parchi P, Pocchiari M, Green A. Ann Neurol. 2016 Jul;80(1):160-5. (査読有り)
7. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Nakagaki T, Ishibashi D, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Nishida N. Sci Rep. 2016 Apr 26;6:24993. (査読有り)
8. Validation of 14-3-3 Protein as a Marker in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnostic. Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL, Golanska E, Baldeiras I, Satoh K, Sanchez-Valle R, Ladogana A, Skinningsrud A, Hammarin AL, Mitrova E, Llorens F, Kim YS, Green A, Zerr I. Mol Neurobiol. 2016 May;53(4):2189-99. (査読有り)
9. Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Schroeder B, Raeber A, Vargas D, Kim YS, Satoh K, Collins S, Zerr I. Mol Neurobiol. 2016 Apr;53(3):1896-1904. (査読有り)
10. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis

of (99m)Tc-ECD-SPECT images in a case of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. J Neurol Sci. 2015 Nov 15;358(1-2):447-52. (査読有り)

11. Rapid and Quantitative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases. Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. PLoS One. 2015 Jun 12;10(6):e0126930. doi: 10.1371/journal.ppat.1001217. (査読有り)

12. Ubiquitin-specific protease 14 modulates degradation of cellular prion protein. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Mori T, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Sci Rep. 2015 Jun 10;5:11028. (査読有り)

13. Creutzfeldt-Jakob Disease with a prion protein gene codon 180 mutation presenting asymmetric cortical high-intensity on magnetic resonance imaging. Amano Y, Kimura N, Hanaoka T, Aso Y, Hirano T, Murai H, Satoh K, Matsubara E. Prion. 2015;9(1):29-33. (査読有り)

14. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Sci Rep. 2014 (査読有り)

15. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. J Virol. 2014 Oct;88(20):11791-801. (査読有り)

16. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. 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. BMJ Open. 2014 May 16;4(5):e004968. (査読有り)

17. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Sci Rep. 2014 Mar 28;4:4504. (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称： - シヌクレイン検出方法
発明者：西田教行、佐藤克也、新 竜一郎、
布施隆行、佐野和憲
権利者：長崎大学、福岡大学
種類：特許
番号：特願 2016-231861
出願年月日：平成 28 年 11 月 29 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 克也 (SATOH, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学
科)・教授

研究者番号：70398147