

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430060

研究課題名(和文) プリオン病剖検脳を用いたプリオン蛋白軸索輸送と変性疾患関連蛋白の神経病理学的検討

研究課題名(英文) Neuropathologic analysis of axon and tau protein of human prion diseases

研究代表者

高尾 昌樹 (Masaki, Takao)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50245487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病におけるプリオンタンパクの脳内伝播に関して、神経病理学的に検討するために、一部の遺伝性プリオン病にみられる神経細胞軸索に一致する抗プリオン抗体陽性所見を検討した。対象には、ブレインバンクの症例として孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)を中心に、遺伝性CJD、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病などを検討した。軸索に一致するような所見はみられなかったが、神経細胞体や樹状突起、軸索を縁取るように細顆粒状に沈着する抗プリオン抗体陽性所見を海馬錐体細胞や側頭葉皮質に認めた。従来VV2プリオンに多くみられる本所見の意義に関して引き続き検討を要する。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the propagation of prion protein of human prion diseases, we neuropathologically analyzed human brain tissue using anti-prion immunohistochemistry. Although axonal immunoreactivity (ir) was reported in the individuals with specific Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (GSS) cases, there was no clear axonal anti-PrP-ir in sporadic and genetic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) as well as GSS. In contrast, anti-PrP-ir was observed along the neuronal cell soma, dendrites and axons in the hippocampus and temporal cortex in most of analyzed cases. Perineuronal PrP-ir was considered as characteristic findings in VV2 prion disease. Since there were no VV2 cases in the present study, we need more analysis the meaning of the findings.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン 軸索輸送 クロイツフェルト・ヤコブ病 アミロイド タウ 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、正常プリオンタンパク (PrP^C) が、不溶性プリオンタンパク (PrP^{Sc}) に構造をかえ、脳内に沈着する疾患である。その代表的な疾患は、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病である。それ以外に、PRNP 遺伝子変異により発症する、遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病などがある。また、不溶性プリオンタンパクが体内にはいることによって発症する医原性プリオン病や、儀式的食人習慣によるクールー、あるいは BSE を介して発症した変異型クロイツフェルト・ヤコブ病が知られている。

PrP^{Sc} の脳内伝播に関する重要な報告として、マウス軸索内における PrP 輸送が示されている (J Biol Chem 1994; 20:14711)。研究代表者は、ヒト GSS A117V 多数例で脳皮質縦走・横走神経線維束に明瞭な PrP 沈着をはじめて発見し報告した (J Neuropathol Exp Neurol 2012;71,555, 図 1)。しかし、ヒト脳における、軸索内 PrP 輸送を示唆する系統化された神経病理学的研究はない。また、本邦では長期経過に伴う高度の白質病変を伴う SCJD も多いが、こういった症例を含めた白質を含む神経線維と神経細胞体における PrP の病態研究もまだ明らかではない。

一方、アルツハイマー病やレビー小体病などで、疾患関連蛋白 (A β 、タウ、シヌクレイン、TDP-43) の神経系等に沿った脳内伝播・拡大が知られ、我々もシヌクレインが嗅粘膜から脳内に拡大することを明らかにした。MRC のグループは、ヒト疾患不溶性タウの動物伝達実験の報告もある (PNAS 2013;110:9535)。アスリートなどにみられる chronic traumatic encephalopathy ですら、タウや TDP-43 が脳内に蓄積・拡大することも明らかになり、多くの疾患でプリオン類似の病態関与が指摘されている (Pruisner, Science 2012;336:1511)。

プリオン病は、感染性に対する脅威から、剖検困難な施設あり、剖検例が集積できていない(全国年間剖検は推定 20 例弱)。したがって先進国でも剖検数が少ないために、一定の数のプリオン病を、系統だって研究できる機会は少ない。

本研究は研究使用のために剖検され蓄積されてきた 30 例以上のプリオン病剖検例を用い、PrP 脳内伝播に関するメカニズムを、プリオン病の表現型別に病理形学的に解析するもので、国内外において現在まで系統的に検討されておらず、プリオン病の発症機序解明、治療対策の一助ともなる内容と考えられ、研究を計画したものである。

2. 研究の目的

プリオン病は、異常プリオンタンパクがなんらかの原因で伝達することにより発症す

ると考えられる。一部の遺伝性プリオン病 (ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病) において、大脳皮質の軸索に沿ったプリオン蛋白の沈着を、免疫組織学的に確認している (J Neuropathol Exp Neurol 2012;71,555)。しかし、プリオン病では圧倒的に多い病型は、孤発性のクロイツフェルト・ヤコブ病であることから、これらの剖検例を中心に、神経軸索に沿ったプリオンタンパクの沈着がみられるかどうかを、連続剖検例で検討することである。

3. 研究の方法

(1) 対象は、プリオン病のブレインバンクに蓄積され、かつ研究期間にもあらたに追加された症例である。

(2) 内訳は、

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病	35 例
遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病	7 例
E200K	
M232R	
V180I	
ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病 P102L	2 例
硬膜移植後プリオン病	1 例

である。

(3) 病理組織標本作成

プリオン病の組織の扱いに関しては、「プリオン病の安全な剖検のために、2012 年版」(編集:厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究班, 日本神経病理学会 プリオン病剖検・病理検査推進委員会) に沿って安全に施行した。それ以前の剖検に関しても、WHO のガイドラインを参照に適切に施行された。

剖検後、原則として右側の脳、小脳、脳幹はすべてドライアイスで速やかに凍結後、分子生物学的検索に供された。

左側に関しては、20%中性緩衝ホルマリンで型どおり固定された。2 週間程度の固定の後に、病理学的に検索を行った。脳の切り出しに関しては、プリオンタンパクがホルマリン固定によっても、その伝達性を有することから、廃水などによる汚染を防ぐために、通常の病理検索であれば施行する水洗いを行わず、直接切り出しを施行した。

(4) 検索部位

ルーチンの検索部位は、原則として以下の 19 ブロックを検討した。

前頭葉, 前帯状回
尾状核頭部, 被殻
淡蒼球, 被殻, 前交連レベル
扁桃体
側頭葉
視床

海馬～海馬傍回前方
海馬～海馬傍回後方
運動野，感覺野
後頭葉
小脳皮質，齒状核
中脳
橋
延髄
前頭葉分水嶺
大脳基底核後方
後部帯状回～楔前部
角回
小脳虫部

(5) 通常染色

ヘマトキシリンエオジン染色を基本として、症例によりクリューバー・バレラ染色を加えた。

(6) 免疫染色

抗プリオンタンパクとして、3F4 を標準として使用した。それ以外に、症例によっては12F10, 1E4, 抗プリオン N 末端、同 C 末端抗体も用いた。

他の神経変性疾患関連蛋白の沈着範囲・程度を決定するため、抗 A (11-28)、抗タウ (AT8)、抗リン酸化 シヌクレイン (抗体名 Psyn64)、抗リン酸化 TDP-43 (S409/410) の各抗体を使用した。

一般染色は準備した全切片で施行。抗プリオン抗体による免疫染色は、3F4 に関しては最低限ブロック (1 - 14) で施行した。ほかの抗体に関しては、現在アルツハイマー病やレビー小体病などの神経病理診断指針で、米国では標準となりつつある NIA-AA に準拠して、一定の部位を免疫染色で検討し、追加が必要な場合は、さらに追加をして検討した。

プリオン不活化の蟻酸処理は、上記ブロックに対応する部位をカセットにいれた段階で指針通り 1 時間施行した。免疫染色における抗原賦活化の処理はすべて我々の施設のプロトコールにより、自動免疫染色装置上の自動処理方法で安全に施行した。

(7) 倫理

本研究は、ブレインバンクに登録された症例を用いた研究である。ブレインバンクは公益財団法人脳血管研究所美原祈念病院の倫理審査を経て承認されている。また、剖検同意は死体解剖保存法により取得され、同時に、バンクへの登録、研究使用も遺族より取得されている。本研究の承認も得られている。

4. 研究成果

(1) 症例

全例で 4 5 例のプリオン病をこの研究に使用した。

(2) 抗プリオン抗体の染色性に関して

3F4 に関しては、基本的に染色性は良好であるといえた。また、エピトープの異なる 12F10 についても、同様に良好な染色性を得ることができた。ほかの抗体に関しては、結果が良好とはいえない。よって、3F4 や 12F10 を中心に使用することがよいと考えられる。特に、本邦の研究ではあまり使用されていないようであるが、良好な結果が得られるものと考えられた。

(3) 神経軸索における抗プリオン抗体所見
結論からいえば、今回対象とした症例において、図 1 にみられたような、軸索に一致した抗 PrP 抗体陽性所見を確認できた症例はなかった。

プリオンの免疫染色は、ときに技術的な問題から、良好な結果が得られない場合もあり、またプリオンの不活化をしているために、ギ酸による組織切片の破壊が顕著なこともある。そのため、染色を再施行した場合もあり、結果としては確かなものである。また、すべてのブロックを抗プリオン抗体で免疫染色をしているので、神経解剖学的に主な部位は検討がなされたものと考えられる。

今回の検討では、遺伝性のプリオン病は限られており、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病の表現型を呈するものは 2 例だけであり、図 1 の症例とも遺伝子変異は異なる。したがって、図 1 にみられる所見は、特定の遺伝子変異症例にかざられるものかどうかもふまえ、さらなる検討を要するものである。

本来施行する予定であった、本邦には報告ない、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病なども検討予定であったが、バンク登録症例の検討に時間がかかり、最終的な検討に至らなかった。

(4) 神経細胞体および樹状突起や軸索に沿ってみられる顆粒状の抗プリオン抗体陽性の所見

今回の検討過程で、当初目的とはしていなかった結果である、神経細胞体および樹状突起あるいは軸索を縁取るようにみられる、細顆粒状の、抗プリオン抗体 (3F4) 陽性の所見がえられた。注意深い観察により、ほぼ全例のクロイツフェルト・ヤコブ病でみられる所見であった。この所見は、特に海馬や側頭葉錐体細胞でみられ、CA4 では明瞭に認められる所見である (図 2)。しかし、この部位でも、軸索に一致する抗プリオン抗体の所見は明らかではなかった。また、V180I や E200K の遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病でも、大脳皮質にもみられ、今後の検討を要する点である。

また、神経細胞周囲の抗プリオン抗体陽性沈着所見は、VW2 プリオン病で特徴的な所見であることが知られている。しかし、プリオンタンパクコドン 129 が VW であることは日本人では極めて稀である。また VW2 プリオン病と比較すると、本研究でみられた所見は、

部位も限局的なものではあるが、恒常的にみられることから、検討を要する。

さらに、V180I 症例の抗プリオン抗体免疫組織学的手法を、確立できつつあることにも意義がある。V180I は本邦に多い遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病で、臨床的には、明瞭かつ高度の MRI 異常所見（拡散強調画像における高信号）を呈する疾患ではあるが、病理学的には抗プリオン抗体の免疫染色性が不良であり、陽性所見が捉えにくいとされてきた。本研究においても染色性は不良であったが、染色条件の変更あるいは 12F10 抗体の使用により、良好な染色結果を得られるものと考えられる。

（5）リン酸化タウによる所見。Small neuritic profile

Kovacs により提唱されている、抗リン酸化タウ抗体によって描出される small neuritic profile も、恒常的に見いだされる所見であった。これが PrP^{res} の沈着により、二次的に誘導されているものかどうかは、現時点では明らかではない。また、こういったタウ沈着が、プリオン病でみられる脳脊髄液のタウタンパク増加に関連するかどうか、検討を要する。プリオン病では、タウ沈着が通常の加齢性変化とは異なるとする報告もあることから（Brain Pathol. 2017;27:332-344）、今後のさらなる検討を要する。

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)

Takao M, Kimura H, Mihara B. How can we increase the number of autopsies for prion diseases? A model system in Japan. J Neurol Sci、査読有、2017、373、58-9

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、査読有、26、2016、95-101

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 Abeta deposition and meningeal amyloid angiopathy. Acta Neuropathol 査読有、132、2016、313-5

Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori

T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-Seeding Activity Is widely Distributed in Tissues of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. EBioMedicine、査読有、12、2016、150-5
高尾昌樹 .剖検における神経病理診断 - 神経内科の立場から - .診断病理、査読有、33、2016、267-282

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. Rapid and Quantitative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases. PLoS One、査読有、10、2015、e0126930
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、査読有 34、2014、541-6

〔学会発表〕(計 1 件)

Newell K, Epperson F, Takao M, Farlow M, Unverzagt F, Ghetti B. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease PRNP A117V: Prion protein deposition in neurosensory retina. 90th Annual meeting of the American Association of Neuropathologists, Inc., Portland, OR, 6/11-14, 2014. J Neuropathol Exp Neurol 2014; 73, 625.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高尾昌樹 (TAKAO, Masaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50245487

(2)研究分担者

美原 盤 (MIHARA, Ban)

公益財団法人脳血管研究所 美原記念病院・院長

研究者番号：30190712

(4)研究協力者

中野雄太 (NAKANO, Yuta)

ベルナルディノ ゲッティ (Bernardino Ghetti)

図 1：ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(A117V)にみられた、大脳皮質神経細胞軸索に一致する、抗 PrP 抗体 (3F4) 陽性の所見。

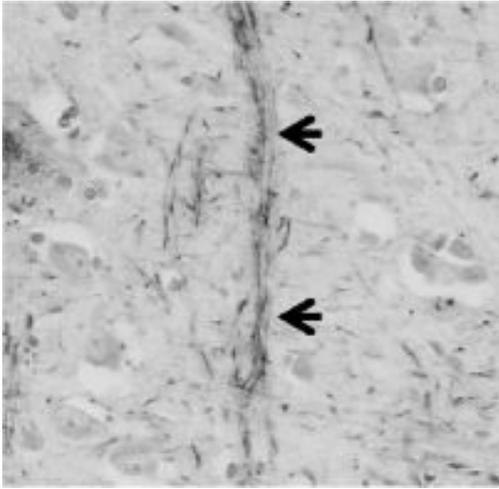


図 2：海馬支脚の神経細胞体や樹状突起に沿った、抗プリオン抗体 (12F10) 陽性の細顆粒状の陽性所見

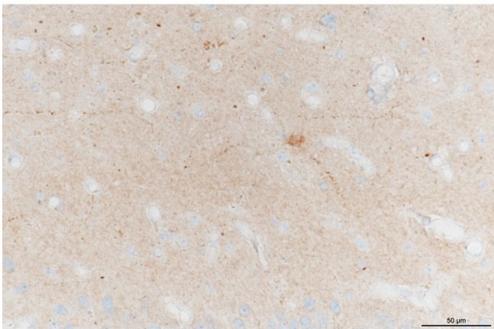


図 3：AT8 陽性の small neuritic profiles

