

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08369

研究課題名(和文) クロイツフェルト・ヤコブ病の嗅球および嗅粘膜におけるプリオン蛋白沈着の検討

研究課題名(英文) Neuropathological investigation about prion protein deposition of the olfactory bulb and the olfactory mucosa in Creutzfeldt-Jakob disease

研究代表者

岩崎 靖 (Iwasaki, Yasushi)

愛知医科大学・付置研究所・准教授

研究者番号：60378172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MM1型孤発性Creutzfeldt-Jakob病(CJD)11例の嗅球および嗅粘膜を検討した。嗅球では海綿状変化は目立たず、長期経過例でも神経細胞脱落は明らかでなかった。抗プリオン蛋白(PrP)抗体を用いた免疫染色では、嗅球にシナプス型PrP沈着を認め、特に糸球体、僧房細胞層、顆粒細胞層、前嗅核で強かった。嗅粘膜にもPrP沈着を認めた。PrPの沈着所見は短期経過例から長期経過例までほぼ同様に観察された。嗅球は病初期からPrP沈着が認められるものの、CJDの病変進展に対し抵抗性があると考えられた。5例で嗅球のウエスタンブロット解析を施行し、全例で1型PrPを示唆するバンドパターンが得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined pathologic involvement and prion protein (PrP) deposition of the olfactory bulb and the olfactory mucosa in 11 autopsied cases of MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). In the olfactory bulb, spongiform change was not so apparent and the number of neurons was preserved. PrP immunostaining revealed synaptic-type PrP deposition, particularly in the glomerulus, granular cell layer, mitral cell layer, and anterior olfactory nucleus. Consistent PrP deposition from the early disease stage to the prolonged disease stage was recognized. The olfactory mucosa also showed PrP immunoreactivity. These pathologic findings indicated the resistance of these regions to the progression of prion disease pathology. Western blot analysis of the olfactory bulb showed type 1 PrP band pattern in five examined cases.

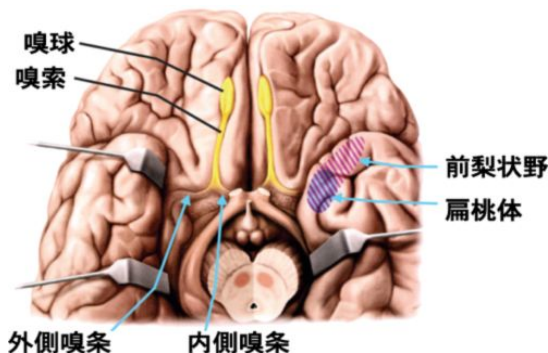
研究分野：神経病理学

キーワード：クロイツフェルト・ヤコブ病 プリオン病 プリオン蛋白 免疫染色 ウエスタンブロット 嗅球 嗅粘膜

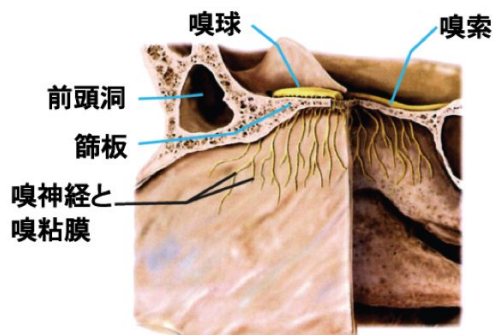
### 1. 研究開始当初の背景

(1) プリオン病はプロテアーゼ抵抗性の異常プリオン蛋白(prion protein; PrP)が中枢神経系に蓄積することにより、特異な海綿状変化(spongiform change)、神経細胞死を呈する致死性神経疾患である。代表的なプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD)は孤発性、遺伝性、感染性に分類されるが、いずれのタイプでも異常 PrP の蓄積にはある程度の年月を要すると考えられる。しかしながら、この潜伏期を経て発症すると大脳皮質を中心とする中枢神経病変は急速に進行し、ほとんどの症例が数ヶ月以内に無動性無言状態に至る。プリオン病の早期診断と病態解明、感染予防および治療法の開発は重要な研究分野となっており、その解決が望まれている。

(2) 異常 PrP の感染経路として、嗅粘膜を通して嗅球から大脳に至るルートが存在する可能性が推定される(図 1、2)。すでに、ヒトプリオン病において嗅粘膜(olfactory mucosa)や嗅球(olfactory bulb)に異常 PrP の沈着を認めたという報告[1]、牛海綿状脳症の嗅球において異常 PrP の蓄積を認めたとする報告[2]がある。家族歴や PrP 遺伝子変異がなく、硬膜移植歴など明らかなプリオン病感染のリスクが認められない CJD 症例は孤発性と考えられているが、孤発性 CJD とされている症例であっても嗅粘膜を介して異常 PrP が外部から感染、伝播した可能性が完全には否定できない。



[図 1. 脳底面の嗅球、嗅索の位置関係]



[図 2. 頭蓋底と嗅球、嗅粘膜の位置関係]

(3) CJD の大脳皮質では、海綿状変化やグリオシス、神経線維網の粗鬆化、神経細胞脱落、PrP 沈着などの神経病理学的変化が発症早期から観察される。一方で、海馬や辺縁系は CJD の病理学的変化の進展に対して比較的抵抗性があることが指摘されている。しかしながら、CJD における嗅球や嗅粘膜の病理学的変化については、ほとんど報告がない。

(4) 近年、アルツハイマー病やパーキンソン病の嗅球において、それぞれタウ蛋白、シヌクレイン蛋白の蓄積が報告されている。さらには、タウ蛋白やシヌクレイン蛋白の感染性が報告され、これらの疾患も広義のプリオン病であるという「プリオン仮説」が提唱されている。

### 2. 研究の目的

(1) 我々は CJD における中枢病変分布の選択性と系統性に着目し、以前から自験剖検例を用いて異常 PrP の正常 PrP に対する病原性および病態発現機序の解明に挑んできた[3-5]。本研究において CJD の嗅粘膜、嗅球における病変の有無及び程度、PrP 沈着の有無を検討することによって、単に CJD における病理学的所見の解析を広げるだけでなく、嗅粘膜や嗅球を通して CJD が感染、伝播する可能性、および嗅粘膜生検による生前の CJD 確定診断の可能性について検討することが可能になると考えた。本研究により、プリオン病研究の一層の発展が期待でき、本研究を含めた連鎖的研究成果が、プリオン病撲滅に向けた画期的治療法の開発、感染予防の重要な布石になるものと考えた。

(2) 本研究では CJD の自験剖検例を用いて、過去にほとんど報告のない CJD における嗅球および嗅粘膜の神経病理学的所見を検討することを第一の目的とする。また、嗅球および嗅粘膜における異常 PrP 沈着の有無や分布を免疫組織学的に検討すること、嗅球および嗅粘膜における異常 PrP の蓄積をウエスタンブロット解析によって検出することを第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 我々がこれまでに行ってきた臨床的研究、古典的な病理学的手法(ヘマトキシリン・エオジン染色やクリューバー・パレラ染色など)を用いた CJD の中枢神経系における病変分布や系統性の研究、免疫組織学的手法(抗 PrP 抗体を用いた免疫染色など)を用いた PrP 沈着パターンや分布および程度の検討に加えて、PrP 遺伝子変異やコドン 129 多型、プロテアーゼ抵抗性の異常 PrP のウエスタンブロット解析とも関連させた網羅的な検討 [3-6]を基盤として検討する。

(2) 当研究所における CJD の剖検時に嗅粘膜および嗅球を採取する。サンプルはホルマリン固定し、一部をウエスタンブロット

解析のために-80 で凍結保存する。古典的な神経病理学的手法を用いた病変分布および程度の検討、免疫組織学的手法を用いた異常 PrP の沈着部位と程度の検討を行う。また、それらの結果を中枢神経系の他の領域(大脳新皮質や辺縁系)と対比して各症例で詳細に検討する。PrP 遺伝子変異およびコドン 129 多型、大脳皮質のプロテアーゼ抵抗性 PrP のウエスタン・プロット解析結果との関連を加えた網羅的な検討も行う。(3) 凍結保存した嗅粘膜および嗅球について、プロテアーゼ抵抗性 PrP のウエスタンプロット解析を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究期間中に嗅球および嗅粘膜が検索可能であった CJD 症例は 11 例であった。全例で PrP 遺伝子解析で変異を認めず、PrP 遺伝子コドン 129 多型はメチオニンのホモを呈した。凍結大脳皮質を用いたウエスタンプロット解析は全例が 1 型 PrP を呈し、全例が最も典型的な臨床病理所見を呈する MM1 型孤発性 CJD[6]であった。11 例の全経過は 2.5~51 ヶ月(平均 15.1 ヶ月)、発症年齢は 65~83 歳(平均 73.5 歳)、脳重は 510~1,250g(平均 955.5g)だった。

(2) 肉眼的には嗅球の萎縮は長期経過例でも比較的軽く、大脳萎縮に比して目立たなかった。組織学的には長期経過例でも嗅球の細胞構造、層構造は確認可能であった。K-B 染色における髄鞘の染色性は長期経過例でも保たれていた。嗅球における糸球体の構造は保たれており、僧房細胞や顆粒細胞の減少も明らかでなかった。グリオーシスと多数のアミロイド小体が観察されたが、海綿状変化は明らかでなかった。前嗅核の神経細胞も保たれていた。全例でほぼ同様の病理所見を呈し、全経過と病変の強度は相関していない印象であった。これらの所見から推測して、嗅球は初期から CJD の病理学的変化が認められるものの、病変の進行に対して抵抗性があると思われる。

(3) 嗅球の抗 PrP 抗体による免疫染色では微細顆粒状のシナプス型(synaptic-type)の PrP 沈着を認め、特に糸球体、僧房細胞層、顆粒細胞層で強かった。長期経過例ではプラーク型 PrP 沈着の混在も認めた。シナプス型 PrP 沈着は前嗅核にも認められたが、神経線維束やアミロイド小体に PrP の染色性はなかった。嗅粘膜の免疫染色では、嗅毛(olfactory cili)や基底細胞に(basal cell)に PrP の陽性所見を認めた。これらの PrP 沈着所見は、長期経過例も含めて、全例でほぼ同様に観察された。

(4) 嗅球および嗅粘膜のウエスタンプロット解析を 5 例で施行し、嗅球は全例で、嗅粘膜は 2 例で大脳皮質と同様の 1 型 PrP を示唆するバンドパターンが得られた。

症例番号	性別	年齢	経過(月)	PrP <sup>Sc</sup> 遺伝子型	コドン129	嗅球および嗅粘膜の免疫組織化学														
						大脳	嗅球	嗅粘膜	嗅球	嗅粘膜	嗅球	嗅粘膜	嗅球	嗅粘膜	嗅球	嗅粘膜				
1	男	65	66	22	Type 1	L259	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	女	72	72	3	N.E.	L150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	男	80	81	4	Type 1	995	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	男	77	78	5	N.E.	L160	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	男	79	79	5	N.E.	945	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	女	72	73	6	Type 1	L190	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	女	83	84	15	Type 1	720	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	男	67	69	22	Type 1	990	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	女	72	74	23	N.E.	760	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	男	70	73	30	N.E.	740	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	女	72	76	51	N.E.	630	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[表 1. CJD11 例の神経病理所見のまとめ]

嗅球は有糸分裂後組織(postmitotic tissue)であり、神経細胞分裂は起こらないが、嗅神経は神経組織であるにもかかわらず盛んに神経細胞分裂を行っている。嗅球は嗅神経を介して外部(嗅粘膜)と接しており、孤発性 CJD であっても異常 PrP が、外部から感染している可能性が否定できない所見と思われた。

今後、嗅粘膜生検で CJD の診断がより簡便に可能となれば、剖検を施行しなくても CJD の早期確定診断が可能となる。感染対策上も有益なだけでなく、CJD の治療薬開発に向けた臨床試験の際にも、発症早期からのエントリーを可能とすることが期待される。

#### < 引用文献 >

Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of Pathologic Prion Protein in the Olfactory Epithelium in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 711-719.

Lee YH, Simmons MM, Hawkins SA, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory bulb of natural and experimental bovine spongiform encephalopathy affected cattle in Great Britain. *Vet Pathol* 2009 ;46: 59-62.

Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Clinicopathologic characteristics of sporadic Japanese Creutzfeldt-Jakob disease classified according to prion protein gene polymorphism and prion protein type. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 561-571.

Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Neuropathologic characteristics of spinal cord lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2005; 110: 490-500

Iwasaki Y, Hashizume Y, Yoshida M, et al. Neuropathologic characteristics of brainstem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 557-566.

Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46: 224-233.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Iwasaki Y, Kato H, Ando T, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with 1-month total disease duration and early pathologic indicators. *Neuropathology* 37; 420-425: 2017. doi: 10.1111/neup.12379.

Iwasaki Y. Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* 37; 174-188: 2017. doi: 10.1111/neup.12355.

岩崎 靖. Creutzfeldt-Jakob 病. *神経治療* 33; 333-337: 2016.

岩崎 靖. プリオン病と自律神経障害. *自律神経* 53; 152-157: 2016.

〔学会発表〕(計8件)

Iwasaki Y. Clinicopathology of human prion disease. Asian Pacific Prion Symposium 2017, 21 Oct, 2017, Melbourne, Australia.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M. Relationship between clinical findings and progression of cerebral cortical pathology in MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. XXIII World Congress of Neurology, 17 Sep 2017, Kyoto, Japan.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M. Neuropathological investigation of the olfactory bulb and olfactory tract in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. PRION2017, 25 May 2017, Edinburgh, UK.

岩崎 靖, 三室マヤ, 吉田真理. クロイツフェルト・ヤコブ病における嗅球病変についての神経病理学的検討. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢.

岩崎 靖. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病. 第57回日本神経病理学会総会学術研究会, 2016年06月03日, 弘前.

岩崎 靖. プリオン病と自律神経障害. 第68回日本自律神経学会総会, 2015年10月30日, 名古屋.

岩崎 靖. プリオン病. 第56回日本神経病理学会学術大会, 2015年6月3日, 福岡.

岩崎 靖, 赤木明生, 三室マヤ, 吉田真理. 当施設におけるプリオン病の剖検検索症例についての検討. 第104回日本病理学会総会, 2015年05月01日, 名古屋.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 靖 (IWASAKI Yasushi)  
愛知医科大学・加齢医科学研究所・准教授  
研究者番号: 60378172

(2)研究分担者

吉田 真理 (YOSHIDA Mari)  
愛知医科大学・加齢医科学研究所・教授  
研究者番号: 60288545