

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10022

研究課題名（和文）クロイツフェルト・ヤコブ病のタイプを鑑別可能なコンビネーションQUIC法の構築

研究課題名（英文）Establishment of a method for diagnosing subtypes of Creutzfeldt-Jakob disease

研究代表者

森 剛志（MORI, Tsuyoshi）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40426565

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトプリオン病の一つである孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）は予後の進行状況によりいくつかのタイプに別れる。本研究は孤発性CJDのタイプ分けを早期に可能とする発展型RT-QUIC法を構築することが目標である。様々なプリオン蛋白（PrP）のペプチドを準備し、RT-QUIC法に用いたところ、ペプチド配列によりわずかではあるが個々の患者脳乳剤間でQUIC法感受性に違いがみられた。さらに効果のあったペプチドを複数混合（コンビネーションQUIC）で用いたところ、QUIC法感受性への影響がさらにみられた。結果、プリオンタイプによりQUIC法でのPrPの重要領域が異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速な神経細胞変性をきたす致死性の疾患、プリオン病。その代表的な病気である孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）はタイプにより予後の進行状況が異なることから、発症早期にタイプを含めた孤発性CJDを正確に診断することが臨床現場から切望されている。ここでプリオンタイプによりRT-QUIC法でのPrP重要配列が異なることが示唆されたことは、予後診断法の確立において大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD), a majority of human prion diseases, is classified in different subtypes which contribute to the occurrence of distinct clinical-pathological phenotypes. In this study, we tested whether a modification of the real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC) assay, a sensitive diagnostic test for prion disease, could distinguish subtypes of sCJD. We prepared various PrP peptides and used them in the QUIC assay to derive those that show a promoting or inhibiting effect. RT-QUICs were performed with brain homogenates from several types of prion disease patients. As a result, by using several PrP peptide, there were slight differences in the RT-QUIC signaling between specimens. Furthermore, the use of multiple peptides further affected the RT-QUIC signal between specimens.

研究分野：分子生物学

キーワード：孤発性CJD QUIC法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本だけでなく先進国全体において高齢化が急速に進行しており、それに伴い高齢者問題が大きな社会問題として浮き彫りになってきた。高齢者問題の一つとして認知症が挙げられるが、その患者数は今後高齢化がさらに進むことで膨らんでいくことが懸念されている。認知症の原因疾患としてアルツハイマー病などが知られているが、ヒトプリオン病もその一つである。

プリオン病は、孤発性、遺伝(家族)性、獲得性に分類される。遺伝性は、プリオン病の重要因子であるプリオン蛋白(PrP)遺伝子の変異により引き起こされ、ゲルストマン・ストロイスラー・シェインカー症候群(GSS)や家族性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)等が含まれる。獲得性は、硬膜移植等による医原性CJDや牛海綿状脳症(BSE)由来からの伝播が考えられる変異型CJDが含まれる。孤発性CJDは、病因が不明の孤発的に発症する病気であるが、その発症比率はヒトのプリオン病の75%以上を占めている。

PrPのアミノ酸配列は種によって異なり、また同一種内でも遺伝的多型性が存在する。ヒトではコドン129番目のメチオニン(M)あるいはバリン(V)の多型がよく知られ、CJDの病理像に影響することが報告されている。この多型の割合は人種、民族間で大きく異なり、例えばイギリス人ではMVタイプが51%を占め、次いでMMが37%、VVが12%であるのに対して、日本人では90%以上がMMである。また異常型PrPは、プロテアーゼ処理後のウェスタンブロット法による泳動パターンの違いから2つのタイプ(type1, type2)に分類され、孤発性CJDは現在のところ大きく6種類(MM1, MM2, MV1, MV2, VV1, VV2)に分類される。このうちMM1とMV1は、認知症、ミオクローヌス、錐体路・錐体外路症状が急速に進行し半年程度で無動性無言に至る、いわゆる古典型CJDの病型を示す。それ以外では進行が緩徐で、生前診断が難しい例も多い。日本では特にMM1とMM2が多く、病気の進行速度・生存期間に大きな違いがある。またこれまでの研究からタイプの違いにより治療効果が大きく異なることが予測される。分類を決定するためには、遺伝子検査によるPrP配列の決定(MM, MV又はVV)とPrP抗体を用いたWestern blot解析による脳組織中の異常型PrPの型判断(type1, type2)が必要である。従って通常、死後病理解剖が行われな限り、分類は確定せず、推測レベルにとどまる。そのため、発症早期にタイプ(病理型)も含めて孤発性CJDを正確に診断することが臨床現場から切望されている。

### 2. 研究の目的

現在のプリオン病の診断法としては、髄液検査、脳波、MRIによる画像検査等があり、鑑別診断にはそれなりに有効ではあるが、確定診断ではない。生前確定診断に至るには現在もリスクの高い脳生検により、最も確実なプリオン病のマーカーである異常型PrPの直接的な証明に頼らざるを得ないのが現状である。一方、申請者の所属グループは異常型PrP凝集体の高感度検出法(Real time quaking-induced conversion; RT-QUIC法)を開発し、より容易に採取可能な髄液中にごくわずかに存在する異常型PrPの検出に成功した(孤発性CJDで感度>80%)(Atarashi et al.2011 Nature Medicine)。現在、研究分担者である長崎大学医学部教授の佐藤克也が中心となり国内外におけるプリオン病の髄液検査を実施しており、RT-QUIC法も中心的な検査として含まれている。しかしながら現時点では、RT-QUIC法は孤発性CJDのタイプを見分けることはできない。

最近、申請者らは、牛海綿状脳症(BSE)の異なる2株においてRT-QUIC法への感受性の違いを見出した。BSEはウェスタンブロット法による異常型PrP泳動パターンにより定型型(C-BSE)、非定型BSE(L-BSE)などに分けられる。ここでハムスター・ヒト・マウス配列のリコンビナントPrP(recPrP)を基質としてRT-QUIC法を行ったところBSEタイプにより全く異なった感受性がみられた(Ubagai et al.2020 Biochem Biophys Res Commun)。基質感受性の違いはおそらくこの2株の異常型PrPの構造の一部に違いがあるためではないかと考えている。

また申請者らは、PrPの一部の配列を有するペプチド断片(PrPペプチド)がRT-QUICの反応に影響を与えることを見出した。RT-QUIC法は、rec-PrPを基質として検体中に含まれる異常型PrPの凝集能を試験管内で検出するアッセイであり、それにより異常型PrPの有無を決定する。この反応液に様々なPrPペプチドを入れてRT-QUIC法を試みたところ、CJDタイプによって幾つかのペプチドでわずかにあるがQUIC反応の遅延効果がみられた(競合阻害効果)。そこでペプチドをさらに2種3種組み合わせ(コンビネーションQUIC)、遅延効果を強く示すペプチド配列を導き出し、QUICによる孤発性CJDタイプを鑑別可能とする新規方法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 課題1: ペプチドを用いたRT-QUIC法

同時に複数のPrPペプチドを用いてRT-QUIC法の競合阻害実験(コンビネーションQUIC)を行い、孤発性CJD患者脳乳剤でRT-QUIC法の反応を阻害または遅延させる組み合わせを検討した。

#### (2) 課題2-1: rec-ヒトPrP(デリーションミュータント)の作成

課題1の結果を基に効果の得られた配列を欠失させたrec-PrP(デリーションミュータント)の作成を試みた。

#### (3) 課題2-2: 作成・精製したrec-ヒトPrPを用いたQUIC法

作成・精製したrec-ヒトPrP(デリーションミュータント)はRT-QUIC法の基質として用い、孤

発性 CJD 患者脳乳剤間での反応に違いがあるかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 課題1: プリオン病タイプ間 (MM1、MM2 皮質型、MM2 視床型) における RT-QUIC 反応感受性を制御している重要配列を同定するために様々な PrP ペプチドを用いて競合阻害実験を行った。従来の RT-QUIC 反応液に PrP ペプチドを加えて、上記タイプの患者脳乳剤試料を用いて凝集反応をみた。MM1 型脳乳剤では、いくつかの PrP ペプチドで僅かではあるが QUIC 反応遅延効果がみられた。また、MM2 視床型脳乳剤においても僅かながら延効果がみられる PrP ペプチドが得られた。しかし、MM2 皮質型ではどのペプチドにおいても大きな効果は得られなかった。また、PrP ペプチドを複数混合加えた RT-QUIC 法 (コンビネーション QUIC) をタイプ別で比較したところ、2 種混合ペプチドや 3 種混合することで MM1 型や MM2 視床型脳乳剤においてさらなる遅延効果を示すペプチドの組み合わせが得られた (図 1)。

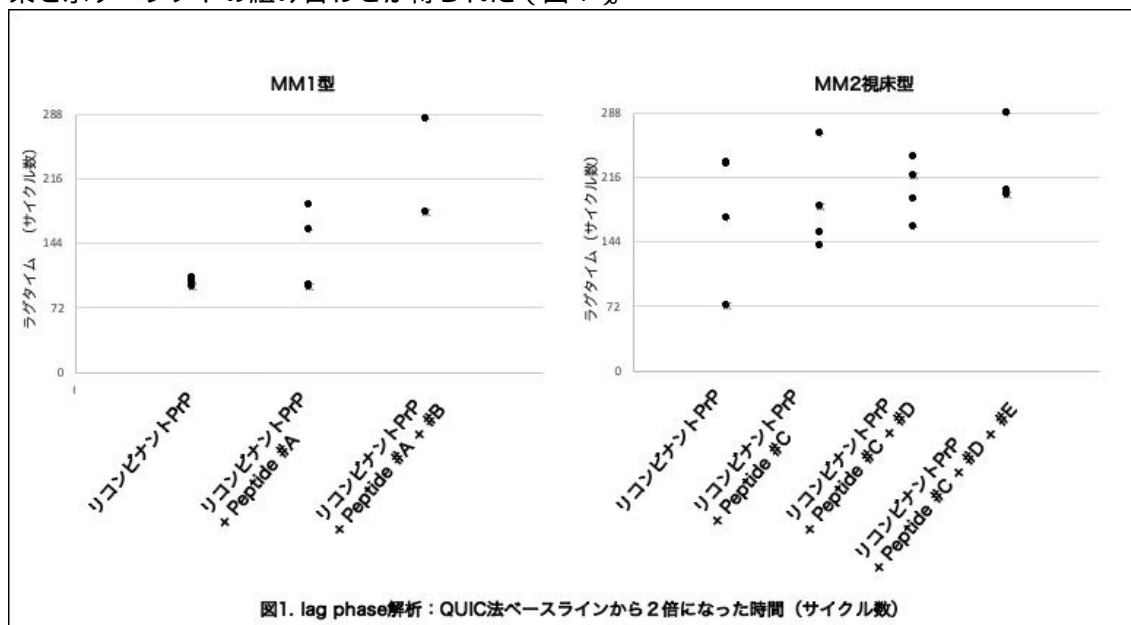


図1. lag phase解析: QUIC法ベースラインから2倍になった時間 (サイクル数)

(2) 課題2-1: 課題1の結果を基に効果の得られた配列を欠失させた rec-PrP (デリション mutant) の作成を試みた。ここでは PrP を N 末端から欠失させた rec 及び N 末端 C 末端両方を欠失させた rec-ヒト PrP の作成を試みた。N 末端を欠失させた 10 種のリコンビナントの内、欠失領域が最大の rec-ヒト PrP のみは精製不可であった。また、2 種の欠失 rec-ヒト PrP についても微量しか精製できないものがあった。N 末端 C 末端両方を欠失させた rec-ヒト PrP については微量しか精製できなかった (詳細・機序についてはさらなる研究が必要である)。

(3) 課題2-2: 精製した rec-ヒト PrP (デリション mutant) は RT-QUIC 法の基質として用い、孤発性 CJD タイプ間での反応に違いがあるかを検討した。ここでは大量精製した 2 種類の rec-ヒト PrP を比較したが、PrP ペプチドほど明確な差が孤発性 CJD 間でえられなかった。他の rec-ヒト PrP については検討中である。

本研究課題において、連携研究者である新博士が開発した異常型 PrP 高感度検出法 (RT-QUIC 法) をプリオン病のタイプ判別に応用可能であるか検討するために開始した。様々な PrP ペプチドを用いて競合阻害実験した結果、単一ペプチドにおいてもわずかではあるが MM1 型および MM2 視床型の脳乳剤による QUIC 反応遅延効果がみられた。また、2 種 3 種混合させた QUIC 法 (コンビネーション QUIC) においてはさらなる遅延効果を示す組み合わせが得られた。欠失させた rec-ヒト PrP を用いた QUIC 法では今のところ顕著な差は得られていない。今後は、作成した残りの rec-ヒト PrP について検討していく。また、PrP の中間領域の該当配列を欠失させた rec-ヒト PrP の作成・精製も同時に検討していく。最終的には、孤発性 CJD のタイプを鑑別する新規方法の確立を目指したい。さらに、本研究課題により得られた反応の差異にどのような意義があるかを検討することで、プリオン病における PrP 凝集形成機序だけでなく、発症機序の解明にもつながる可能性を秘めていると考える。今後、これらの反応の違いの重要性について深く検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ubagai Kaori, Fukuda Shigeo, Mori Tsuyoshi, Takatsuki Hanae, Taguchi Yuzuru, Kageyama Soichi, Nishida Noriyuki, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 526
2. 論文標題 Discrimination between L-type and C-type bovine spongiform encephalopathy by the strain-specific reactions of real-time quaking-induced conversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1049 ~ 1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Daisuke, Homma Takujiro, Nakagaki Takehiro, Fuse Takayuki, Sano Kazunori, Satoh Katsuya, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro, Nishida Noriyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awz016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Susumu, Horie Nobutaka, Satoh Katsuya, Ishikawa Takeshi, Mori Tsuyoshi, Maeda Hajime, Fukuda Yuhtaka, Ishizaka Shunsuke, Hiu Takeshi, Morofuji Yoichi, Izumo Tsuyoshi, Nishida Noriyuki, Matsuo Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Age of donor of human mesenchymal stem cells affects structural and functional recovery after cell therapy following ischaemic stroke	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X17731964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mori T, Imamura M, Takatsuki H, Iguchi H, Ohno M, Atarashi R
2. 発表標題 Comparison of RT-QUIC reactions using various recombinant prion protein
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takatsuki H, Mori T, Imamura M, Atarashi R
2 . 発表標題 Pentosan polysulfate induces latent prion infection in Fukuoka-1 strain-infected cells
3 . 学会等名 APPS2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Mohri S, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2 . 発表標題 Isolation of hidden minor prion conformers from classical scrapie isolates in advanced protein misfolding cyclic amplification in the presence of arginine ethyl ester
3 . 学会等名 APPS2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2 . 発表標題 Simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester improves in vitro amplification of PrPSc derived from various prion strains.
3 . 学会等名 APPS2018
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2 . 発表標題 Highly sensitive detection of PrPSc derived from various prion strains by simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester to protein misfolding cyclic amplification.
3 . 学会等名 Prion 2018
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Yokoyama T, Murayama Y, Mori T, Takatsuki H, Atarashi R
2. 発表標題 Spontaneously-generated baculovirus-derived abnormal recombinant prion protein has infectivity.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 克也  (SATO H Katsuya)  (70398147)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授   (17301)	
連携研究者	新 竜一郎  (ATARASHI Ryuichiro)  (90452846)	宮崎大学・医学部・教授   (17601)	