

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07490

研究課題名(和文) PMCA法を用いた視床型クロイツフェルト・ヤコブ病の病態解明に関する研究

研究課題名(英文) Neuropathological studies of thalamic form of Creutzfeldt-Jakob disease using protein misfolding cyclic amplification

研究代表者

竹内 敦子 (Takeuchi, Atsuko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00535239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：異常プリオン蛋白のin vitro増幅系であるprotein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法により、孤発性視床型クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD-MM2T) のプリオン (M2Tプリオン) を効率よく増幅できることが分かった。そこで、M2Tプリオンにより引き起こされる家族性プリオン病である致死性家族性不眠症に見られる表現型の違いに着目し、PMCA法によりその増幅特性を比較したところ、それぞれ別のプリオンにより引き起こされていることが明らかとなった。また、M2Tプリオンの脳内分布についてPMCA法により半定量的に比較することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PMCA法はCJDの発症前診断やプリオンの高感度検出系として期待されてきた。しかしながらヒトプリオンへの応用は今日まで困難であり、増幅に成功したのはこれまで変異型CJDのみであったが、本研究ではsCJD-MM2Tを引き起こすM2TプリオンのPMCA法による高感度検出を成功させた。免疫染色やウェスタンブロット法でも検出量は極めて微量、実験動物への感染もほぼ成立しないこのM2Tプリオンの高感度検出法が確立したことにより、その脳内での局在性や視床型プリオン病の鑑別診断にも応用可能となった。

研究成果の概要(英文)：Fatal familial insomnia (FFI) is a genetic prion disease which is associated with the D178N point mutation at the prion protein (PrP) gene. Although the hallmark pathologic feature is thalamic and olivary degeneration, there is an atypical FFI patient without the hallmark feature. We compared one atypical clinicopathologic FFI phenotype case and typical FFI phenotype cases or sporadic fatal insomnia (sFI) cases with protein misfolding cyclic amplification (PMCA). PMCA could amplify both typical FFI cases and sFI cases but not the atypical FFI phenotype or other sporadic Creutzfeldt-jakob disease subtypes. In addition to clinical findings and neuropathological features, the transmission properties using humanized knock-in mice and the amplification properties were also different between the typical and the atypical FFI phenotypes. It is suggested that two distinct prions were associated with the diversity in the FFI phenotype.

研究分野：プリオン病

キーワード：プリオン病 クロイツフェルト・ヤコブ病 PMCA法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) は致死性の神経変性疾患であり、治療がなく、有効な不活化手段も存在しない。そこで発症前診断やプリオンの高感度検出系として期待されてきたのが Protein misfolding amplification (PMCA) 法である。しかしながらヒトプリオンへの応用は今日まで困難であり、世界的にも増幅に成功したといえるのは申請者の成果も含めて変異型 CJD のみであった。申請者は、ヒト胎児腎細胞由来浮遊 293 細胞にヒト正常プリオンタンパク質 (PrP^C) を大量発現させたりコンビナント PrP^C を基質として用いる cell-PMCA (cPMCA) 法を開発し、孤発性 CJD (sporadic CJD: sCJD) のうち MV2 および VV2 タイプを引き起こすプリオン株である V2 プリオンの増幅に成功した。しかしながら依然としてヒトプリオンの試験管内増幅の効率は低く、最も典型的なタイプである sCJD-MM1 タイプのほか日本人には比較的多い MM2 タイプのプリオンもほとんど増幅できない状況であった。このような状況の中で、タイプ毎に適切な条件検討を重ねるうち、sCJD-MM2 視床型 (sCJD-MM2 Thalamic: sCJD-MM2T) を引き起こす M2T プリオンの高効率な試験管内増幅が新たに可能となった。

2. 研究の目的

sCJD-MM2T は視床変性症とも呼ばれ視床および下オリブ核の高度な神経変性を病理上の特徴とするプリオン病である。しかしながら沈着する異常プリオン蛋白量は免疫染色でも検出することができないほど少なく、大脳皮質には病変を認めない。現在、cPMCA 法による M2T プリオンの高感度検出が可能となったことで、視床型プリオン病に関する新たな知見が得られつつある。一つは致死性家族性不眠症 (Fatal familial insomnia: FFI) との関連である。FFI はプリオン遺伝子 D178N 変異により引き起こされる家族性のプリオン病であるが、変異のない sCJD-MM2T は孤発性致死性不眠症 (sporadic fatal insomnia: sFI) と呼ばれており FFI と類似した病態を示すことが知られている。この二つは同じプリオン株により引き起こされているのかを cPMCA 法の増幅特性を比較することで明らかできる可能性がある。そこで本研究では、(1) M2T プリオンは、従来病理像から同一視されていた致死性家族性不眠症 (FFI) プリオンと PMCA の増幅プロパティも同一であるのか、また M2T プリオンを特異的に増幅できることを利用して、(2) sCJD-MM1 または MM1+2C と診断された症例の中に本当に MM2T を併発する症例は存在しないのか、(3) M2T プリオンは果たして視床や下オリブ核以外には局在していないのか、この 3 点を cPMCA 法により解析する。

3. 研究の方法

FFI 及び MM2 症例について cPMCA を行う。PMCA はヒトプリオンタンパク質を安定高発現させたフリースタイル 293 細胞 (293F 細胞) によるコンビナントタンパク質を基質として実施する。FFI 症例 (3-5 例程度)、sCJD-MM2 症例 (視床型および皮質型を含む 10 例程度)、sCJD-MM1+2 症例 (100 例程度) について cPMCA を行い顕著な増幅が見られるか、増幅できる症例の下オリブ核病変や皮質の海綿状変化の程度といった病理像との関係についても検討した。M2T プリオンの脳内分布については各部位の希釈系列を調製し、検出限界の差を比較してプリオン量の推定を行う。

4. 研究成果

(1) M2T プリオンは、従来病理像から同一視されていた致死性家族性不眠症 (FFI) プリオンと PMCA の増幅プロパティも同一であるのか

sCJD-MM2T が FFI とよく似た病理像を示すため、cPMCA 法における増幅プロパティの比較によって FFI プリオンと同一のプリオンであることを明らかにすることが目標の 1 つであった。この目標を達成するに当たり、まず FFI には病態の全く異なる 2 つのタイプがあることに着目した。この FFI2 例は親子であるが、母親 (FFI-Mother) は下オリブ核病変を示さず、むしろ sCJD-MM1 に一般的な海綿状変化が大脳皮質に見られる他、異常プリオン蛋白がシナプティックに染色される非典型例であった。一方子 (FFI-Child) は下オリブ核に限局した病変を示す典型的な視床型であり、大脳皮質に海綿状変化は認められない。当研究室におけるノックインマウスを用いた感染実験の結果により、この 2 つのタイプの FFI が全く異なる感染性を持つことが明らかとなっていたことから、

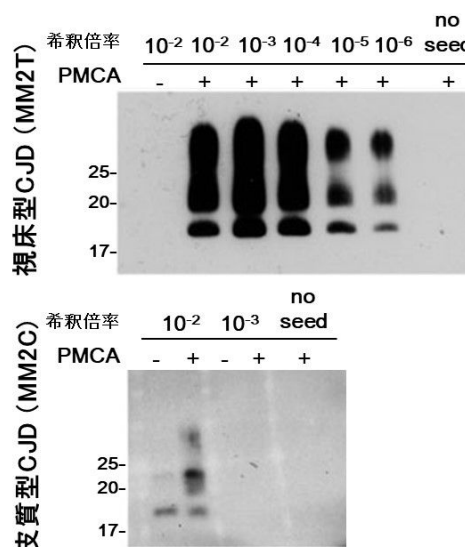


図1 PMCA法によるM2Tプリオンの増幅

皮質型CJD (sCJD-MM2C) を引き起こすM2Cプリオンはほとんど増幅が見られないのに対し、視床型CJD (sCJD-MM2T) では10⁻⁶希釈した脳からM2Tプリオンが検出された。

cPMCA 法による増幅効率の比較を行った。その結果、その増幅効率は FFI のタイプによりそれぞれ全く異なっており、増幅が可能であるのは病理学的に下オリブ核に顕著な病変を持つ典型的な FFI プリオンのみであることが明らかとなった。この結果をもとに sCJD-MM2T 症例についても cPMCA 法による増幅を行ったところ、FFI 同様下オリブ核病変を有する sCJD-MM2T 症例が顕著に増幅された (図 1, 表)。100 例を超える sCJD 症例について (sCJD-MM1, -MM2C, -MM2T, MV2, VV2, および non-CJD) cPMCA 法による増幅を試みたが、結果的に下オリブ核病変を引き起こすプリオン、つまり M2T プリオンのみが特異的に増幅されることが明らかとなった。増幅可能であった症例とその病理像を表 1 に示した。下オリブ核における神経細胞の数は、CJD-MM1 では平均約 50 個前後であるのに対し、視床型と診断される症例では 10 前後から多くは 5 以下である。驚くべきことに、視床病変を引き起こさないタイプの FFI-Mother では cPMCA でプリオンは増幅されず、M2T プリオンは関与していないことが明らかとなった。ノックインマウスによる感染性の比較及び cPMCA 法による増幅の有無を総合して考察すると、典型的な FFI と sCJD-MM2T は M2T プリオンにより引き起こされており、FFI-Mother のような非典型例に関しては全く異なるプリオンが関与することが明らかとなった。

表 sCJD-MM2T 及び FFI の病理学的診断と cPMCA 法による増幅結果

Case number	PRNP genotype	Histopathology		Amplification with cell-PMCA ^c
		Olivary degeneration (number of neurons in the olivary nucleus/mm ² (mean±S.E.M)) ^a	Spongiform changes ^b	
FFI-Mother		Negative (55.1±15.9)	+++	Negative
FFI-Child	129M/M 219E/E	Positive (11.8±2.8)	-	Positive
FFI-I37	D178N	Positive (4.5±6.5)	+	Positive
FFI-I75		Positive (0.3±0.8)	+	Positive
sCJD-MM2T-H91		Positive (2.2±1.2)	+	Positive
sCJD-MM2T-I110		Positive (1.2±1.1)	+	Positive
sCJD-MM2T-T00/06		Positive (7.0±7.3)	++	Positive
sCJD-MM2T-I48		Positive (0.6±0.8)	+++	Positive
sCJD-MM2T-J86		Positive (5.0±3.9)	-	Positive
sCJD-MM2T-H10	129M/M 219E/E	Positive (0)	+	Positive
sCJD-MM2T-H94		Positive (1.2±1.2)	+	Positive
sCJD-MM2T-J93		Positive (2.7±3.1)	+	Positive
sCJD-MM2T-I43		Positive (1.8±2.0)	+++	Positive
sCJD-MM2T-J99		Positive (6.8±3.1)	-	Positive

^a 下オリブ核領域 1 mm² 当たり 5 か所の神経細胞数の平均値及びその標準偏差

^b - = absent; + = spotty (1 mm² 以下); ++ = partial (gyrus または cortical layers に広がる状態); +++ = widespread (各 lobe を超えて広範囲に広がった状態)

^c 10⁻³ に希釈した患者脳から PMCA 法により陽性が確認された場合を positive とした

(2) sCJD-MM1 または MM1+2C と診断された症例の中に本当に MM2T を併発する症例は存在しないのか

表には FFI 及び sCJD-MM2T のみ病理像及び PMCA による M2T プリオンの増幅結果を示したが、この項目で述べたように 100 例以上の孤発例についても同様の解析を行った。sCJD-MM2C と sCJD-MM2T を引き起こすプリオンはいずれもタイプ 2 でありウェスタンブロットティングでは区別することができない。MM2T の単独発症であればプリオンの蓄積量が極めて少ないことも診断上の参考になるが、cPMCA 法による増幅の結果、M2T プリオンが増幅できたものにはプリオン量が非常に多い症例もあった。これは MM2T の単独発症ではなく、MM1, MM2C との併発があることを示唆していた。ウェスタンブロットティングの結果 sCJD-MM1+2, あるいは MM2 である症例において、実際に病理像を確認したところ、下オリブ核の神経細胞の脱落が認められ、MM2T を併発していることが確認された症例が複数見出された (MM1+2T, MM1+2C+2T 及び MM2C+2T 症例)。一方でウェスタンブロットティングによりタイプ 2 プリオンの確認できなかった症例では cPMCA によっても M2T プリオンが増幅できた症例はなかった。ウェスタンブロットティングでタイプ 2 プリオンが検出され、病理上 MM2C 病変が顕著である場合視床型の併発を疑うことは少なくなりがちであり、MM2T の併発は見逃されやすい現状が明らかとなった。

(3) MM2T プリオンは果たして視床や下オリブ核以外には局在していないのか

M2T プリオンはこれまでヒト化マウスを用いた動物実験では感染が成立しないか感染効率が非常に低く、M1 プリオンや M2C プリオンを併発している場合これらの感染性と M2T プリオンの感染性が区別できなくなることから、動物実験によって M2T プリオンの脳内分布を明らかにすることは現実的でなくほぼ不可能であった。しかしながら cPMCA 法によれば、M1 プリオンや M2C プリオンが同時に存在していてもこれらのプリオン株は cPMCA では増幅されないため、M2T プリオンのみを選択的に効率良く増幅することができる。そこで本研究では cPMCA 法を M2T プリオンの半定量的解析に応用した。PMCA 法では、希釈率が高くなればなるほど増幅され検出される確率は少なくなる。そこで FFI 及び sCJD-MM2T の患者脳の複数部位について

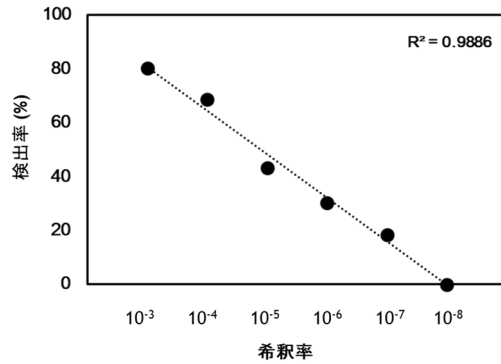


図2 PMCA法によるM2Tプリオンの検出

PMCAでは感染脳の希釈率が大きくなればなるほどそのM2Tプリオンの検出率は低下する。検出率と希釈率は強い負の相関があるため、基準となる部位を検量線と決め各部位の希釈系列を作り検出率を比較すれば定量的解析を行うことができる。

希釈系列を調製し、検出率と希釈率との関係を検討した (図 2)。その結果、検出率と希釈率の間には負の相関があり、M2T プリオンの蓄積量を見積もるに十分な精度があることがわかった。この方法によって、実際に複数部位の凍結脳が利用可能であったいくつかの FFI 及び sCJD-MM2T について、M2T プリオンの脳内分布を解析した。図 3 には、各部位における希釈率と M2T プリオンの検出率を示した。M2T プリオンによる病変は、視床、下オリブ核に限局しているが、M2T プリオンの存在は症例毎にバラツキが多いものの小脳は 4 例とも共通して蓄積量が低いことがわかった。興味深いことに、視床病変と M2T プリオンの蓄積量の関係については、ある程度関連があるが (図 3 の矢印を参照)、FFI-Mother の症例については、前頭葉が最も蓄積量が多く、視床への蓄積は顕著ではなかった。潜伏期間との関連も薄く、症例毎に異なる脳内における M2T プリオンの局在性についてはまだ解析を続ける必要がある。

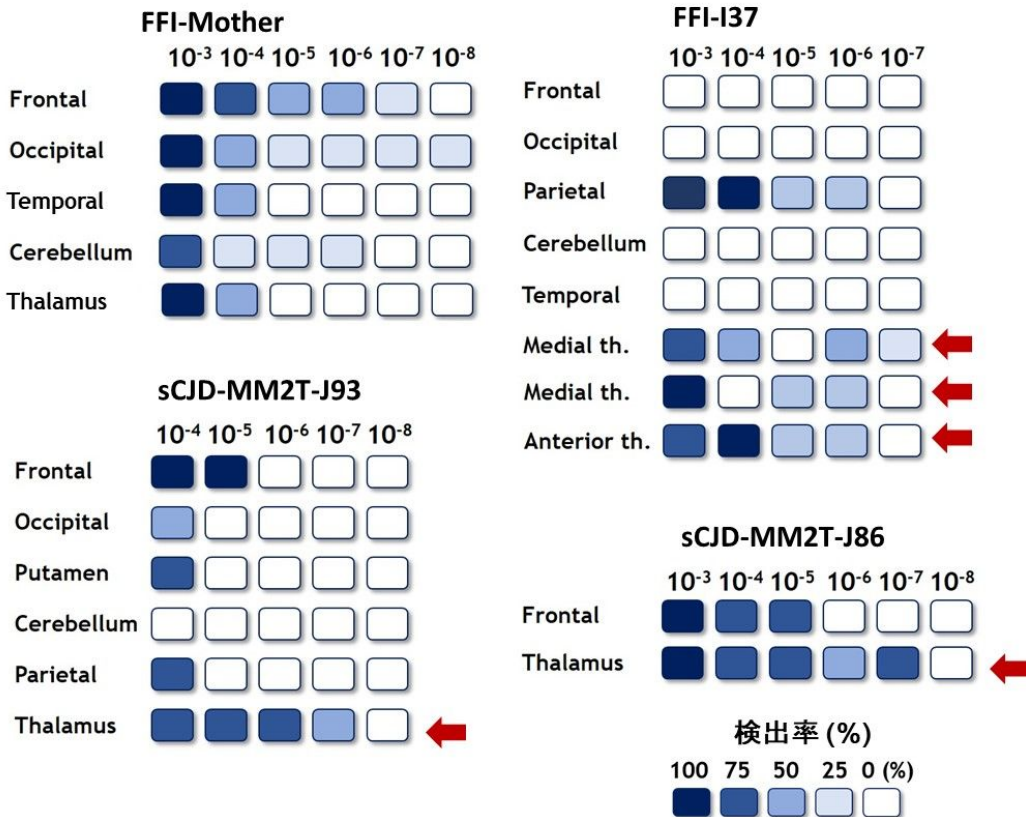


図3 sCJD-MM2T及びFFI患者脳の各部位におけるM2Tプリオンの比較

sCJD-MM2T及びFFI患者各2例のM2Tプリオンの脳内分布を示す。検出可能な希釈率が高いほど、蓄積しているM2Tプリオン量が多いことを示している。矢印で示した部位でよりM2Tプリオンの蓄積量が高い。FFI-Motherを除き比較的thalamusに蓄積量が多い傾向が認められたが、cerebellumではsCJD-MM2T, FFIともにM2Tプリオンの蓄積は非常に少ないことがわかった。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atsuko Takeuchi, Shirou Mohri, Hideaki Kai, Akira Tamaoka, Atsushi Kobayashi, Hidehiro Mizusawa, Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Hiroshi Shimizu, Shigeo Murayama, Shigetoshi Kuroda, Masanori Morita, Piero Parchi, Tetsuyuki Kitamoto	4. 巻 1
2. 論文標題 Two distinct prions in fatal familial insomnia and its sporadic form	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain communications	6. 最初と最後の頁 fcz045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcz045	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi A, Matsuura Y, Takeuchi A, Yamada M, Miyoshi I, Mohri S, Kitamoto T	4. 巻 29
2. 論文標題 A domain responsible for spontaneous conversion of bank vole prion protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 155-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12638	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 Shintaku Masayuki, Nakamura Takeshi, Kaneda Daita, Shinde Akiyo, Kusaka Hirofumi, Takeuchi Atsuko, Kitamoto Tetsuyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Genetic Creutzfeldt-Jakob disease-M232R with the cooccurrence of multiple prion strains, M1 + M2C + M2T: Report of an autopsy case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12722	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------