

平成30年 5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09307

研究課題名(和文) PMCA法を用いた獲得性CJDの迅速診断法の確立

研究課題名(英文) Rapid diagnosis of acquired Creutzfeldt-jakob disease with 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プリオンのin vitro増幅系であるProtein Misfolding cyclic amplification (PMCA)を用いて、獲得型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)のうちV2プリオンが129Met/Metに感染することによって生じる新たなタイプであるCJD-MMiKを迅速に診断できることを明らかにした。これまで感染実験でしか同定できなかったMMiKは、感染源であるV2プリオンと、基質特異性及び増幅産物のタイプに関して全く同じ増幅特性を示すことが明らかとなった。数年の観察期間を必要とする感染実験とは異なり、本法によりCJD-MMiKは1週間で同定可能となった。

研究成果の概要(英文)：Plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jacob disease (p-dCJD) prions showed distinct amplification features from those of non p-dCJD (np-dCJD) prions in protein misfolding cyclic amplification (PMCA). Although no amplification from np-dCJD prions was observed with 129M or 129V substrates, p-dCJD prions were amplified drastically with the 129V substrates but not with the 129M substrates despite the PRNP codon 129 incompatibility between seed and substrate. Moreover, we found that type 2 PMCA products were newly generated from p-dCJD prions using type 2 PrPSc-specific antibody, while PrPSc in p-dCJD cases did not react with the type 2 PrPSc-specific antibody. These findings suggest that our PMCA is a useful tool for easily and rapidly identifying acquired CJD associated with the transmission of the V2 CJD strain of codon 129 methionine homozygotes, based on the preference for the 129 V substrate and the type of the amplified products.

研究分野：プリオン

キーワード：プリオン クロイツフェルト・ヤコブ病 試験管内増幅 獲得型CJD

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は致死の感染性神経変性疾患であり、治療がない。その上 CJD の感染因子である異常型プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) は、一般的な滅菌法によって不活化させることが不可能であるため、発症前の患者に用いた手術器具、あるいは発症前の患者からの輸血や血液製剤を介した二次感染を未然に防ぐためには CJD の早期診断法の確立が緊要である。今日、CJD の高感度検出および早期診断法として期待されている検出系には、共に *in vitro* 増幅系である PMCA 法、また Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QUIC) 法があり、RT-QUIC 法は生前診断法として実用化されつつある。一方でヒトプリオンの PMCA に関しては、基質となる適切な正常プリオン蛋白 (PrP^C) の選択に困難を伴う上、CJD のタイプごとに PMCA 条件の最適化が必要となるなど現時点でもクリアすべき問題が多く、未だヒトプリオンの高感度増幅系に関する報告はほとんど存在しない。我々はこれらの問題点を克服する方法の1つとして、ヒト胎児腎細胞由来浮遊 293 細胞 (293F 細胞) に大量発現させたりコンビナント PrP^C (rPrP^C) を基質として用いる cell-PMCA (cPMCA) 法を開発し、ヒトプリオンがこれまで報告されている以上の高効率でプロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質 (PrP^{Res}) に変換されることを見出した。しかしながら、この cPMCA 法を用いてもなお、我々は日本人に最も多いタイプである孤発性 CJD (sCJD)-MM1 プリオンの高感度増幅には成功していない。一方で sCJD-MV2 および VV2 については、ヒト型 129MrPrP^C (Hu129MrPrP^C) と 129VPrP^C (Hu129VrPrP^C) をそれぞれ基質として PMCA に供したところ、MV2 及び VV2 プリオンは Hu129VrPrP^C を用いたときのみ顕著に増幅されることが分かった。この結果は、ヒト型ノックインマウスを用いた感染実験において、129Val/Val マウスが MV2 または VV2 プリオン (以下 V2 プリオン) に対して非常に高い感受性を示す結果とよく合致するものであった。

2. 研究の目的

我々は、V2 プリオンが Hu129VrPrP^C で特異的に増幅されることから、この増幅特性を硬膜移植後 CJD の診断法として応用することを目的とした。我が国では 129Met/Met の遺伝子型の硬膜移植後 CJD (dura-mater graft-associated CJD: dCJD) にはそれぞれ異なる病理像を示す2つのタイプがあることが知られている。1つは sCJD-MM1 と区別つかないタイプ (non plaque-type: np-dCJD) と、非典型的な病理像を示す plaque-type dCJD (p-dCJD) である。p-dCJD の感染源はヒト化マウスを用いた感染実験の結果から、M1 プリオンではなく V2

プリオンであり、V2 プリオンが 129Met/Met の遺伝子型を持つヒトに感染した結果生じた新しいタイプのプリオンであることが分かっている。このタイプの PrP^{Sc} は特徴的な分子量であり(タイプ 1 (21 kDa) と 2 (19 kDa) の中間型 (20 kDa) : MM intermediate: MMi)、脳内に kuru 斑を生じさせ、かつ V2 プリオンと同等の感染性を持つプリオンである (以下 MMiK プリオン、**図 1**)。

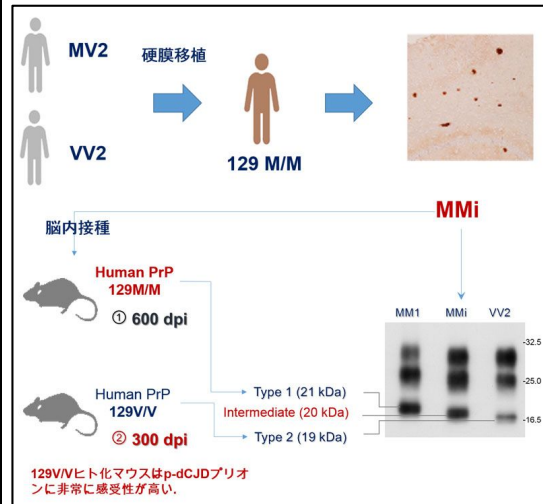


図 1 V2 プリオンに感染による MMiK の病態

これらの結果により p-dCJD は、ウエスタンブロットングによる PrP^{Sc} のタイプ解析、及び 129Val/Val のヒト型マウスへの高い感染性から同定できることが分かった。しかしながら、タイプ 1 とタイプ 2 各々に非常に近い分子量 (20 kDa) を持つ MMiK プリオンを、ルーティンのウエスタンブロットングにより同定することは大変困難である上、マウスを用いた感染実験は 700 日以上という非常に長い観察期間を必要とする。そこで我々は、上述した V2 プリオンを高効率に増幅する cPMCA 法を応用し、V2 プリオンと同じ感染性を示す MMiK プリオンが PMCA 法においても V2 プリオンと同じ増幅特性を示すかどうかを解析し、さらにその特徴を応用した p-dCJD の新しい迅速診断法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

cPMCA に用いる 293F 細胞 (Invitrogen) は、内在性の PrP^C が微量ながら存在するため、shRNA 発現ベクターを用いて作製した内在性 PrP^C ノックダウン株 (内在性 PrP^C の発現量は 5% 以下) を用いた。CJD 脳 (sCJD-MM1, -MM2, -MV2, -VV2, np-dCJD, p-dCJD) 10% (w/v) ホモジネートを Hu129MrPrP^C または Hu129VrPrP^C を発現している 20% (w/v) 細胞破砕液にてそれぞれ 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ の 3 段階で希釈し、全自動交差超音波蛋白質活性装置 Elestein 070-GOT (エレコン科学) を用いて 48 サイクルの PMCA 反応に供した。PMCA 反応後、

Proteinase K 処理 (50 µg/ml, 37°C, 1 hr) を行い、3F4 抗体およびタイプ 2 プリオン特異抗体 (tohoku2: T2) を一次抗体に用い、増幅効率および増幅産物のタイプを解析した。さらに MmiK タイプの診断法としての特異性を確認するため、これらに加えて汚染されたヒト成長ホルモン製剤の投与によるフランスの医原性 CJD 症例 (human growth hormone-treated CJD: hGH-CJD) 5 例、および移植歴のない MmiK 疑い 2 例を加えて同様の解析を行った。

4. 研究成果

Hu129MrPrP^C または Hu129VrPrP^C を基質として cPMCA を行い、114 症例の sCJD 及び dCJD 患者の PrP^{Sc} の増幅効率を比較した。各 CJD 症例の増幅効率の一部に関する代表的なウェスタンブロットの結果を図 2 に示す。

全ての sCJD-MM1 または sCJD-MM2 プリオン、np-dCJD プリオンは、基質の遺伝子型が 129M であるか V であるかに関わらず、増幅は確認できなかった (図 2, A, B)。一方 sCJD-VV2 および MV2 プリオンは Hu129VrPrP^C を基質に用いた場合、 10^{-3} ないし 10^{-4} 倍希釈まで増幅され、タイプ 2 特異抗体 (T2) を一次抗体に用いて解析した結果、増幅産物はすべてタイプ 2 であった (図 2, E)。V2 プリオンの増幅特性は、ヒト型マウスを用いた感染実験の結果と一致することから、MmiK プリオンに関しても Hu129MrPrP^C ではなく Hu129VrPrP^C で増幅される可能性が示唆された。結果的に MmiK プリオンは、V2 プリオンと同様、Hu129VrPrP^C で顕著に増幅された (図 2, C)。さらに MmiK はそもそもタイプ 2 抗体には反応しないが、増幅産物はタイプ 2 であり、この結果も動物実験と矛盾せず、MmiK は PMCA 法により迅速に診断可能である結果を得た。そこで我々は、硬膜移植や輸血、臓器移植のヒストリーを持たない、129Met/Met の非典型 CJD に注目した。この 2 例は脳内にアミロイドプラークを沈着し、PrP^{Sc} の分子量が 20 kDa である、これまでの sCJD-MM1 では見られない病理像を示すタイプであり、獲得性 CJD である可能性が強く示唆されていた。その後のヒト型マウスを用いた感染実験により V2 プリオンを感染源とする獲得性 CJD であることが同定されたため、cPMCA でも確認を行ったところ、いずれの症例も Hu129VrPrP^C で顕著に増幅され、増幅産物はタイプ 2 であった (図 2, D)。

我々はさらにフランスから hGH-CJD 5 例についても同様の解析を行った。これらの遺伝子型は 5 例中 3 例が 129Met/Met、2 例が 129Met/Val であった。3 例の 129Met/Met 症例の PrP^{Sc} の分子量は 20 kDa、脳内には特徴的なアミロイド班の沈着が認められた。これらも予想通り 5 例すべてが Hu129VrPrP^C で顕著に増幅され、増幅産物はタイプ 2 であった。この結果から、3 例の 129Met/Met 症例はすべてが MmiK タイプであることが同定された。

本研究の範囲には含まれていないが、その後これら hGH-CJD 症例の感染性がヒト型マウスを用いた感染実験の結果から明らかとなり、MmiK と完全に一致していることが確認された。

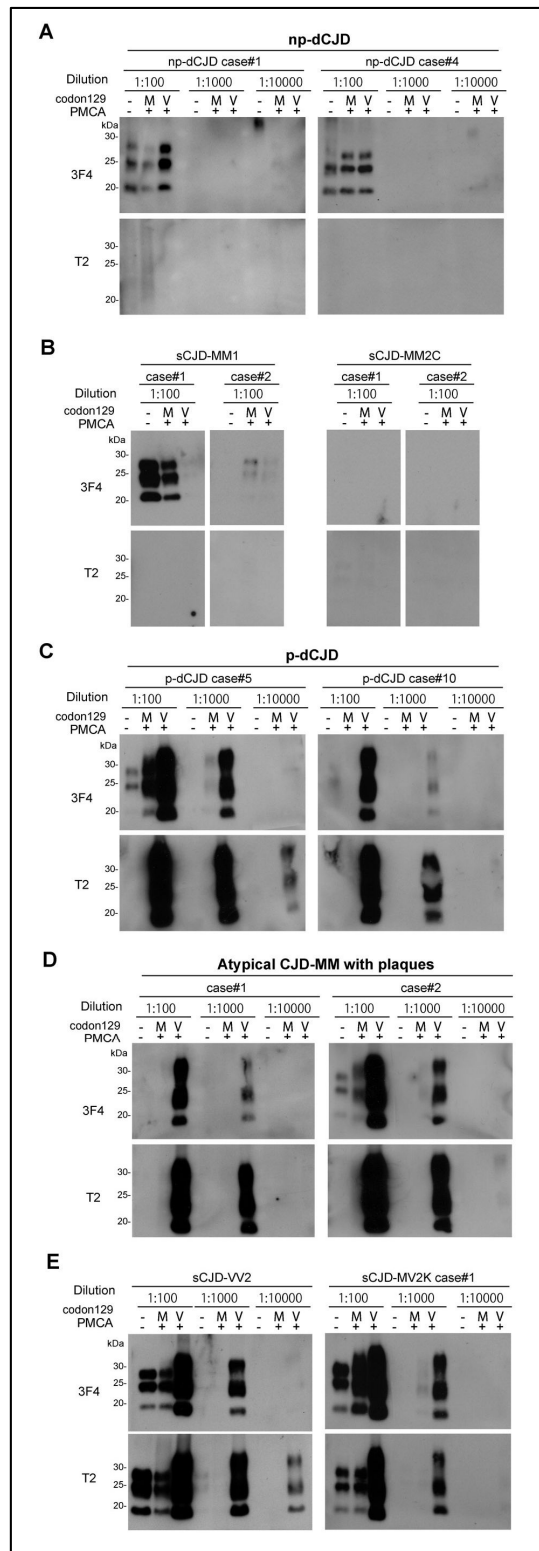


図 2 cPMCA による CJD プリオンの増幅特性

本研究により、従来動物実験で 2 年以上をかけて同定されてきた CJD-MMiK が、cPMCA の増幅特性、すなわち 129V の基質での増幅、増幅産物がタイプ 2 であるという特徴

を解析することにより、約1週間で解析可能となった。今後、CJDの二次感染被害の拡大を防ぐためにも、129Met/Metの非典型的な症例が見つかった場合には、cPMCA法による同定もまた動物実験に加えて重要となるだろう。

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4件)

1. Takeuchi A, Kobayashi A, Morita A, Kitamoto T (2017) Application of protein misfolding cyclic amplification for the rapid diagnosis of acquired Creutzfeldt-Jakob disease. Med Res Arch 5: doi: 10.18103/mra.v5i4.1078 査読有

2. Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, Kitamoto T (2016) Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. Lab Invest 96:581-587 査読有

3. Oshita M, Yokoyama T, Takei Y, Takeuchi A, Ironside JW, Kitamoto T, Morita M (2016) Efficient propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease prion protein using the cell-protein misfolding cyclic amplification technique with samples containing plasma and heparin. Transfusion 56:223-230 査読有

4. Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, Kitamoto T (2015) Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? J Virol 17:8999-9009 査読有

[学会発表](計3件)

1. Takeuchi A, Kobayashi A, Morita M, Kitamoto T: Diagnosis of MMiK type acquired Creutzfeldt-Jakob disease with cell-protein misfolding amplification (PMCA). 第36回認知症学会学術集会(2017)

2. Takeuchi A, Yamamoto M, Parchi P, Hai K S, Morita M, Kobayashi A, Kitamoto T: Identification of the origin of Creutzfeldt-Jakob disease after cadaver-sourced pituitary growth hormone treatment using an amplification property in protein misfolding cyclic amplification. Prion2016 (2016)

3. Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, Kitamoto T: cell-PMCA of acquired Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Society of Prion Research (2015)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

北本 哲之 (Kitamoto, Tetsuyuki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20192560

(4) 研究協力者

()