

平成30年 8月29日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18384

研究課題名(和文) 試験管内増幅法を用いた孤発性ヤコブ病のプリオン体内分布と増幅機構の解明

研究課題名(英文) Distribution of seeding activity in patients with sporadic CJD using RT-QUIC

研究代表者

高月 英恵 (Takatsuki, Hanae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80773978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)は異常型プリオンタンパク質が中枢神経系に蓄積することで神経細胞変性を起こす致死性疾患である。感染リスクを正しく認識するために、体内のプリオン分布を明らかにすることは重要である。孤発性CJD患者より採取された脳、脾臓、腎臓、肝臓および肺組織中のアミロイド形成活性をRT-QUIC法によって検出し、50% Seeding Doseを算出した。非中枢神経系組織においてもシード活性が $10^{-5}$ - $10^{-7}$ /g tissueの範囲で検出された。中枢神経系だけでなく体内に感染性プリオンが広く分布している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human prion diseases are neurodegenerative disorders caused by abnormally folded prion proteins in central nervous system, which can be detected using the quaking induced conversion assay. Because the assay is extremely sensitive comparing with bioassay, the distribution of the prion in patients diagnosed as sporadic form of Creutzfeldt-Jakob disease, at autopsy was examined. Although it has been regard as infectivity can be restricted within central nervous system in case of sporadic form, we found that the prion activities reach at up to  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ /g of 50% seeding dose in non-neuronal tissues, suggesting that infectious prions exist in various organs.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：プリオン クロイツフェルト・ヤコブ病 試験管内異常型プリオン増幅法 シード活性 非神経系組織

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が構造変換により異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)となり、中枢神経系に蓄積することで、認知症や様々な運動障害を呈する致死性中枢神経系疾患である。プリオン病はウイルスと同様に株が存在することが特異な点であり、株によって症状・徴候および臨床経過が異なる。ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)はその発症要因に従って、孤発性、遺伝性、感染性の大きく3つに分類される。孤発性CJD患者では神経系組織に感染性が限局しているとされてきたが、感染性CJD患者ではリンパ組織、虫垂、消化管、血液などでも感染力価が認められている。手術や移植だけでなく輸血や消化管内視鏡を介した感染リスクがあることが報告されており、各臓器の感染性の再評価が必要になっている。

PrP<sup>Sc</sup>の検出方法としてマウスを用いた動物試験が行われているが、検出期間が長期に及ぶことが問題となっている。また、PrP<sup>Sc</sup>はプロテナーゼK(PK)抵抗性であるため、サンプルをPK処理し、ウエスタンブロットを行うことでPrP-resを検出することができる。しかし非神経系組織に含まれるPrP<sup>Sc</sup>は中枢神経系組織よりも低いと考えられ、WBの検出感度では微量のPrP<sup>Sc</sup>を検出することはできない。そこで、当研究グループは極微量のPrP<sup>Sc</sup>を検出可能とする試験管内異常型プリオン増幅法<sup>1)</sup>と段階希釈法を組み合わせることで、シード活性の定量を行い、プリオン病患者由来脳組織中のプリオン活性を50% seeding dose (SD<sub>50</sub>)として定量する系を確立した。<sup>2)</sup>

## 2. 研究の目的

医療行為によるプリオン感染のリスクを抑えるために、体内のプリオン分布を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)プリオン病患者由来組織のシード活性評価。プリオン病患者由来組織(脳・脾臓・腎臓・肺・肝臓・副腎)をEnd-point quaking induced conversion assay (RT-QuIC)(図1)およびWB法を用いて解析した。またRT-QuICによって形成されたアミロイドの二次構造をフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いて解析した。

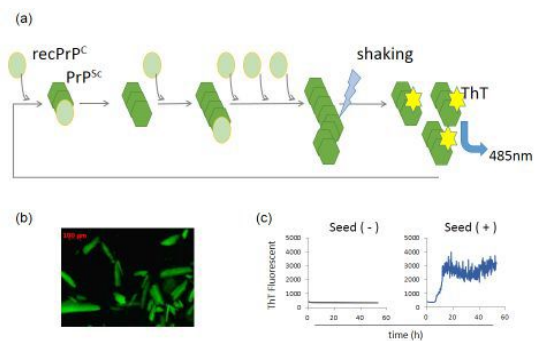


図1. (a) RT-QuIC 反応の模式図。リコンビナントPrP (recPrP<sup>C</sup>)に極少量のPrP<sup>Sc</sup>をシードとして加え、撹拌を繰り返すことでシード依存的なrecPrPのアミロイド形成を促進させる。形成されたアミロイドフィブリルに結合するチオフラビンT(ThT)の蛍光値を測定することで検出する。(b) RT-QuIC産物の蛍光顕微鏡写真。(c) seed(-)では反応は起こらないが、seed(+)では蛍光値の上昇が観察される。

(2)ヒトプリオンタンパク発現トランスジェニックマウス(Ki-ChM)を用いた感染性評価。10倍段階希釈したプリオン病患者由来脳乳剤をKi-ChMマウスに脳内接種し、LD<sub>50</sub>を評価した。発症したマウスを剖検し、各組織のシード活性を調べた。

## 4. 研究成果

(1)4症例の孤発性CJD患者由来組織のシード活性をEnd-point RT-QuICによって測定した。一つの検体に3回同様の実験を行った。(表1)4症例のCJDtypeはいずれも典型例であるMM1であった。脳組織中のSD<sub>50</sub>は約

10<sup>10</sup>/g であった。脾臓・肺・肝臓においては 4 症例中 3 症例でシード活性が 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup>/g 検出された。腎臓および副腎においては 4 症例全てでシード活性が検出され、SD<sub>50</sub> は 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup>/g と算出された。

	log SD <sub>50</sub> /g tissue											
	Patient 1			Patient 2			Patient 3			Patient 4		
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>
脳	9.75	9.25	9.25	10.0	10.5	10.25	10.25	10.0	10.25	9.75	9.5	9.75
脾	-	-	-	6.0	5.75	6.0	5.5	5.5	<6.25	6.25	6.5	5.75
腎	6.0	<4.75	7.0	5.75	6.25	6.5	5.5	5.5	<6.0	6.25	6.5	6.75
肺	-	-	-	6.75	7.25	6.75	<5.25	5.75	5.75	6.25	6.25	6.0
肝	<6.5	<6.5	6.5	6.75	6.75	7.25	5.5	<6.5	<6.0	-	-	-
副腎	7.0	6.5	6.5	6.75	6.5	6.75	<5.0	<5.0	<5.25	7.25	7.5	7.5

(-) = not detected

表 1 . 孤発性 CJD 患者由来臓器のシード活性

一症例ずつではあるが CJD-MM1 および CJD-MM2 の異なる CJDtype の脳乳剤をシードとした RT-QuIC 産物 (アミロイド) の二次構造を FT-IR を用いて解析した。シート構造を示す波数 (1620-1640cm<sup>-1</sup>) にそれぞれ異なる形のピークが観察された。今後、非神経系組織においても同様の特徴が観察されるのか解析を行う。CJD-MM1 と CJD-MM2 では罹病期間が異なるが、type1 と type2 を判断するには脳組織の WB を行いバンドパターンを調べるほかない。末梢組織または髄液をシードとした RT-QuIC の産物を FT-IR 構造解析し、CJDtype の判別に用いることが出来るか検討する予定である。

また、孤発性 CJD 患者由来非神経系組織の WB を行ったところ PrP-res は検出されなかった。そこで超遠心法を用いてサンプルを 1000 倍濃縮して WB を行ったところ、10<sup>7</sup>/g のシード活性を持つ副腎サンプルにて PrP-res のバンドが確認された。

(2) 一症例の孤発性 CJD (MM1) 患者由来脳乳剤を 10 倍段階希釈し Ki-ChM マウスに脳内接種を行った。150 日以降発症が確認され、LD<sub>50</sub> は 10<sup>5.7</sup>/g と算出された。(図 2)

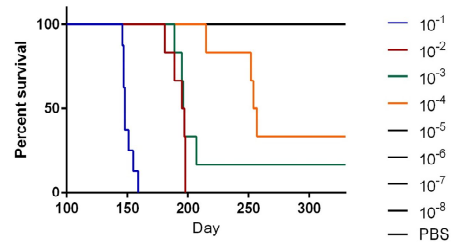


図 2 . 孤発性 CJD 患者由来脳乳剤接種マウスの生存率

瀕死期の発症マウスを安楽死させ各種臓器を採取し、End-point RT-QuIC を行った。脳・脾臓組織において 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup>/g のシード活性が検出された。非神経系組織においては、肝臓と小腸で 10<sup>6</sup>/g のシード活性が検出されたが、肺・腎臓・胃・筋肉では検出されなかった。異なる CJDtype (MM2, MV2) の感染実験は現在行っており、今後、臓器親和性や感染様式に焦点を当て研究を進めていく。

(1)(2) の結果より、RT-QuIC による SD<sub>50</sub> は動物試験による LD<sub>50</sub> よりも約 10<sup>4</sup> 倍感度が高いことが示された。そして、非神経系組織においても 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup>/g の範囲でシード活性が検出され、脳組織の 1/1000 以下と低い値ではあるが、移植された場合に感染源となる可能性が考えられる。今後、さらに症例数を増やして慎重に検討していく必要があるが、RT-QuIC によるドナー検査は移植医療などの安全性向上に寄与しうると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Atarashi et al. Nature Med (2011) 17(2):175-8.
- 2) Takatsuki et al. Plos one (2015) 12;10(6):e0126930.

#### 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 1 件)

Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T,

Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N, Satoh K: Prion-seeding activity is widely distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. EBioMedicine 12:150-155 (2016) DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.033 ( 査読有り )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

高月英恵 (Takatsuki Hanae) 宮崎  
大学・医学部・助教  
研究者番号:80773978