

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07097

研究課題名(和文) 各種プリオン病の全身臓器における異常プリオン蛋白検出と意義

研究課題名(英文) Determination of abnormal prion protein in peripheral organs of various prion diseases

研究代表者

本田 裕之 (Honda, Hiroyuki)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90624057

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)：複数の孤発性プリオン病と遺伝性プリオン病(ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病)における組織学的な検討にて、下垂体前葉細胞にプリオン蛋白の陽性所見をみとめた。下垂体サンプルを用いたプロテオミクス解析においてもプリオン蛋白は同定された。western blotでは、過剰な糖鎖修飾がある事が示され、またプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白(PrPres)も検出された。その他、組織学的に膵ランゲルハンス島や皮膚、筋、末梢神経にもプリオン蛋白沈着を同定した。ヒトの内分泌機構にプリオン蛋白が関与している事を示唆し、またプリオン病症例の下垂体組織にはPrPresが含まれており感染源になるうる事も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの下垂体前葉細胞の細胞質に、多くのプリオン蛋白が含まれており、それらが通常のプリオン蛋白と異なり過剰な糖鎖修飾をされていた。また、プリオン病症例の下垂体組織にはプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白が含まれている事も同時に示した。ヒトの内分泌機構にプリオン蛋白が関与しており、またプリオン病症例の下垂体組織は感染源になりうる可能性がある事を示した。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry for prion protein (PrP) on some prion diseases (sporadic Creutzfeldt-Jakob diseases and Gerstmann-Strussler-Scheinker diseases) revealed positive findings of PrP in many adenohypophyseal cells. Proteomics analysis also revealed PrP in pituitary samples. Western blots showed excessive glycosylation was attached to pituitary PrP, and protease-resistant PrP (PrPres) was also detected. In addition, PrP deposition was also identified histologically in the islets of Langerhans, skin, muscle and peripheral nerves. It was suggested that PrP is involved in human endocrine mechanism, and it was also shown that pituitary tissue of prion disease cases contains PrPres and may be a source of infection.

研究分野：神経病理学

キーワード：プリオン蛋白 下垂体 内分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

九州大学神経病理学教室では、1987年から現在に至るまでプリオン病症例114例の剖検を継続的に行っている。当施設では、プリオン病患者においても全身解剖を基本としており、中枢神経系のみならず全身臓器も多数保存している。孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)だけでなく、多種類の遺伝性プリオン病、また獲得性プリオン病を検討している。従来、プリオン病においては、感染性や病原性を持つ異常型プリオン蛋白(scrapie PrP = PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積は脳内に限られるとされていた。しかし近年、孤発性CJD症例の脾や膵、骨格筋、口蓋扁桃、リンパ節などの全身臓器においてもPrP<sup>Sc</sup>が同定されている。更に、近年確立された高感度検出法(QuIC法)により、腎、肝、肺、副腎においても微量ではあるがPrP<sup>Sc</sup>が検出された。当施設においても、複数の全身臓器においてプリオン蛋白の沈着を確認しており、それらの感染性・病原性に対して、感染予防の観点から社会的な注意が高まっている。ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)は本邦に多い遺伝性プリオン病の一つであり、病理学的にはプリオン蛋白で構成されるKuru斑が中枢神経内に多く見られる。我々が検索を行ったGSS症例において、下垂体、副腎、腸管のアウエルパツハ神経叢など、中枢神経系以外にもプリオン蛋白の沈着が確認された。従来、成長ホルモン製剤由来の医原性プリオン病が報告されているがその詳細は未だ明らかでない。我々の検討からは、GSSだけでなくsCJDにおいてもそのリスクが想定され詳細な検討が必要であると思われた。他の臓器に沈着するプリオン蛋白も含め、その感染性の解明が必要である。

我々は、プリオン蛋白コドン178番に2塩基欠失が生じ、結果としてC末のGPIアンカーが喪失した遺伝性プリオン病を検討した(178変異プリオン病)。臨床的には、末梢神経障害から発症後に軽度の認知症状を示し、通常のプリオン病とは異なる経過を示した。病理学的には、多くの異常プリオン蛋白の沈着を中枢神経系にみとめた。本症例は、中枢神経系のみならず末梢神経(大腿神経、腓腹神経、交感神経幹)や心筋、骨格筋、膀胱壁、腸管壁、副腎などにもプリオン蛋白の沈着が確認された。C末抗体(EP1802Y、8H4)のみで認識される14kDaPrP<sup>res</sup>は正常アレル由来であることを同定した。正常アレル由来のPrP<sup>res</sup>はごく微量であり病態への関与は少ないと思われたが、これら蛋白化学的特徴は新規の所見であり、全身臓器のプリオン蛋白沈着パターンと共に論文発表した。孤発性CJDや遺伝性プリオン病(GSSや178変異プリオン病など)において中枢神経系のみならず、全身臓器においても異常プリオン蛋白の存在が指摘されている。プリオン蛋白の伝播では、異常プリオン蛋白を鋳型とし正常プリオン蛋白が重合し、プリオン蛋白オリゴマーを形成する。プリオン蛋白オリゴマーは最も感染性や病原性が高い。近年、輸血による感染者も発生し、全身臓器の異常プリオン蛋白の感染性や病原性は一層注目されている。当施設は、プリオン病においても全身解剖を従来基本としており各臓器のサンプルを多く蓄積している。また、当施設はプリオン蛋白オリゴマーを解析出来る、本邦で数少ない施設の一つである。感染防止の観点において、我々の研究成果は重要な知見をもたらすと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトプリオン病患者の全身臓器における、異常プリオン蛋白の蓄積部位や重合状態(オリゴマー)、感染性を明らかにする事である。近年、脳内のみならず末梢神経や全身臓器においても異常プリオン蛋白が検出され、その感染の危険性や病原性が問題視されている。急務の課題であるが、その詳細な検討は未だなされていない。当施設は、プリオン病患者においても全身解剖を従来基本としており、脳だけでなく多くの全身臓器の蓄積がある。プリオン蛋

白はオリゴマーの状態以最も強い感染性と神経毒性を持つ。我々は、ゲル濾過法を用いたプリオン蛋白オリゴマー解析法を確立しており、その評価が可能である。

### 3. 研究の方法

#### 概要

ヒトプリオン病の、剖検症例より得られた全身臓器の凍結サンプルから Homogenate を作製する。Homogenate を遠心ゲル濾過カラムにてサイズ分画を行い、オリゴマー分画とモノマー分画を分取する。分取したサンプルに PK 処理を施行し、Western blot にて可視化する。各臓器におけるオリゴマー分画とモノマー分画の PrP<sup>res</sup> のバンドパターンを検討する。

#### 組織学的検討

剖検脳の重量を計測し、10%ホルマリンで固定した。標本は大腦や小脳、脊髄、全身臓器より採取し、感染性を失活させるためにギ酸処理を施した。パラフィンに包埋し、6µm の切片とし hematoxylin-eosin 染色(HE)や Klüver-Barrera 染色を施行した。免疫染色には抗プリオン蛋白抗体(mouse monoclonal 3F4, Signet, Cambridge, MA, USA)を用いた。

#### Homogenate 作製

全身臓器と脳組織は、プリオン病患者から剖検時に採取され、Homogenate 作製まで-80 で凍結保存する。試料は、遠心ゲル濾過法に用いるために、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate = SDS)を加えた溶液緩衝液(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS, pH7.6)中で最終的に10%の濃度になるように調整する。試料は、ビーズ破碎法(MicroSmash MS-100; Tomu Seiko Co, Ltd, Tokyo, Japan)を用い5000回毎分30秒で粉碎する。粉碎物は250G 5分で遠心分離し、その上清を-80 で保存する。

#### 遠心ゲル濾過法

遠心カラムは市販の spin-column kit: CHROMASPIN-100 (Clontech, San Francisco, CA, USA)を用いて施行する。上記で調整した Homogenate を spin-column 内に滴下する。その後、120g、2分間で遠心し最初の分画を収集チューブに採取する。サイズによって分けられた分画を順次採取するために、次の分画を収集する前に新たに40µLの緩衝溶液をカラム内に加え遠心を施行する。この作業を繰り返し、分画1から9を採取する。これらの作業は swing-bucker rotor (A-4-62: Eppendorf, Hamburg, Germany)を用いて施行する。サイズマーカーを遠心ゲル濾過し Western blot で検討すると早く抽出された分画ほど大きな分子サイズが同定される。

#### Western blotting

作製した Homogenate や遠心ゲル濾過にて採取した分画2から9を用いて電気泳動を施行する。分画1は遠心カラムに当初から含まれている溶液であり、Homogenate からの試料は含まれていない。そのため Western blot の解析からは除外が可能である。また、分画されたサンプル2から9と同時に、分画前の Homogenate も基準とするために同時に電気泳動を施行する。電気泳動は SDS ポリアクリルアミドゲル(Any kD precast gel: Bio-Rad, Hercules, CA, USA)にて施行し、二フッ化ポリビニリデン膜(Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA)に転写し、適合する抗体を用いて可視化する。二次抗体としてペルオキシダーゼ複合体抗マウス IgG

(AP192P, 1:2000; Millipore, Billerica, MA, USA)、ラビット IgG (AP187P, 1:2000; Millipore, Billerica, MA, USA)を用いて同定する。この免疫反応は ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare; Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)を用いて可視化する。早期に溶出した分画 2~4 には分子サイズの大きい蛋白オリゴマーが含まれ、遅れて溶出した分画 7~9 には分子サイズの小さな蛋白モノマーが検出される。178 変異プリオン病の脳サンプルを用い western blotting を施行すると、PK 処理前における検討でオリゴマー分画とモノマー分画においての信号パターンの違いが示された。各分画をそれぞれ PK 処理すると、178 変異プリオン病に特徴的な低分子量 PrP<sup>res</sup> がオリゴマー分画に多くみられており重合度が高い事が示された。

#### 4 . 研究成果

- (1) Frequent Detection of Pituitary-Derived PrPres in Human Prion Diseases : (J Neuropathol Exp Neurol. 2019 Oct 1;78(10):922-929) : 医源性プリオン病の原因の一つに、ヒト下垂体から抽出した成長ホルモン製剤が指摘されているが、その詳細は明らかになっていない。6 症例のプリオン病症例 (GSS:3 症例、sCJD: 2 症例、硬膜移植後 CJD: 1 症例 ) と非プリオン病 3 症例の下垂体組織を用い、western blot や免疫組織化学、プロテオミクス解析などを用いて検討した。Western blot では、25kDa から 40kDa にかけてスメア状のプリオン蛋白のシグナルをみとめた。通常の神経組織を用いた western blot では、無糖鎖型、一糖鎖型、二糖鎖型のプリオン蛋白のシグナルが 25kDa から 35kDa にみられるが、下垂体プリオン蛋白はそれらに比して分子量が高い結果であった。糖鎖切断処理による再検討で、下垂体プリオン蛋白は過剰な糖鎖修飾を受けている事が明らかになった。プロテオミクス解析でも下垂体組織にプリオン蛋白が存在する事が示された。組織学的には、下垂体前葉、特に成長ホルモン産生細胞の細胞質において強いプリオン蛋白陽性像をみとめた。これらの所見は非プリオン病においても同様の結果であった。また、プロテイナーゼ K 処理後のプリオン病下垂体サンプルからは、プロテイナーゼ抵抗性プリオン蛋白 (PrPres) が検出された。PrPres はオリゴマー分画においてのみ同定された。非プリオン病の下垂体サンプルには PrPres はなかった。これらは新規の所見であり、下垂体前葉における内分泌機構にプリオン蛋白が関与している事やプリオン病症例においては下垂体組織も感染源になる可能性がある事を示唆した。
- (2) 全身臓器に沈着するプリオン蛋白 : 複数例のプリオン病解剖症例、孤発性 CJD、遺伝性プリオン病 (GSS、D178fs25) の全身臓器において免疫組織化学的な検討を加えた。一部の sCJD 症例や GSS 症例において、末梢神経周囲、筋、皮膚、脾などにおいて異常なプリオン蛋白沈着をみとめた。Western blot や RE-QUIC 法を用いて確認作業を施行中である。
- (3) Accumulation of Astrocytic Aquaporin 4 and Aquaporin 1 in Prion Protein Plaques : (J Neuropathol Exp Neurol. 2020 Apr; 79(4):419-429) : 日本における 2 つの主要な遺伝性プリオン病は P102L 遺伝子変異を伴う Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) と V180I 遺伝子変異を伴う家族性 Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) である。GSS と V180I 変異 CJD の一部は特徴的なプリオン蛋白が形成するプラークを持つ。近年、孤発性 CJD においてアストロサイトに発現する水チャネル蛋白であるアクアポリン (AQP) 1 と AQP4 の過剰発現が報告されている。プラークが蓄積するタイプのプリオン病患者脳における AQP1 と AQP4 の病理学的な特徴を明らかにするため、GSS 患者 5 名、V180I 変異 CJD 患者 2

名、コントロールとして非神経疾患 2 名を加え、免疫染色法、また二重免疫蛍光法を用い検討した。AQP1 と AQP4 の強い発現をプリオンプラーク周囲、特にプラークに深く入り込んだアストロサイトの突起遠位部に認めた。アルツハイマー病患者脳における老人斑や ghost tangle でも同様の報告があり、AQP4 がプラーク周囲に再分布することでプラークによる有害作用に対しバリアとして働くという AQP4 の保護的な役割が示唆されている。プリオンプラーク周囲に同様の AQP 集積を認めた我々の結果から、AQP がプリオン病におけるプラーク形成にも保護的な役割を持つ可能性がある。

- (4) Different Complicated Brain Pathology in Monozygotic Twins with GSS: ( J Neuropathol Exp Neurol. 2017 Oct 1;76(10):854-863): 発症に 17 年の差をみとめた GSS 一卵性双生児姉妹例の病理学的検討を行った。組織学的に症例 1 は、GSS に特有のプラーク以外に Lewy body pathology を辺縁系中心にみとめた。一方で、症例 2 では、GSS 病理以外に、老人や神経原線維変化を多くみとめアルツハイマー病の合併がみられた。発症年齢や罹病期間に違いはあり、何らかの非遺伝的な要素が病理所見に關与した可能性が示唆された。
- (5) DCTN1 F52L mutation case of Perry syndrome with progressive supranuclear palsy-like tauopathy: ( Parkinsonism Relat Disord. 2018 Jun;51:105-110): ダイナクチン遺伝子異常を有する (DCTN1 F52L) 剖検例に組織学的な検討を施行した。中枢神経系において、TDP-43 proteinopathy は比較的軽度であったが、進行性核上性麻痺 (PSP) に類似する tauopathy 病変を強くみとめた。また、ダイナクチン陽性の異常凝集物も多数同定された。Perry 症候群はダイナクチン遺伝子異常による疾患として知られているが、臨床像は多様であり、Parkinsonism 以外に motor neuron disease や PSP の症状を呈するという報告もある。本報告は Perry 症候群に PSP 類似の tauopathy を合併した初の報告である。
- (6) Expanded polyglutamine impairs normal nuclear distribution of fused in sarcoma and poly (rC)-binding protein 1 in Huntington disease:( Neuropathology. 2019 Oct;39(5):358-367): 4 症例の Huntington 病剖検例に關して組織学的な検討を施行した。Huntington 病においては、神経細胞の核内にポリグルタミン陽性の核内封入体が見られる事が知られている。我々の検討において、RNP の一種である fused in sarcoma (FUS) が核内封入体に共局在している事が明らかにされた。RNP は RNA 代謝に密接に關与しており、Huntington 病の病態機序として RNA 代謝異常の關連も示唆された。ヒト剖検例において初の知見であり論文報告をした。
- (7) Mitochondrial dysfunction and altered ribostasis in hippocampal neurons with cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy:( Neuropathology. 2019 Apr;39(2):170.): 多系統萎縮症 (MSA) は glial cytoplasmic inclusion (GCI) を代表とする  $\alpha$ -synucleinopathy として知られている。近年、認知症を有する MSA において神経細胞内に凝集する neuronal cytoplasmic inclusion (NCI) も指摘されている。12 症例の MSA 剖検例に關して組織学的な検討を施行した。NCI を有する神経細胞において、RNP の一種である hnRNP A1 の核内からの消失がみられ、またミトコンドリア代謝異常や酸化ストレスの關与も同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Norihisa Maeda, Hiroyuki Honda, Satoshi O Suzuki, et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction and altered ribostasis in hippocampal neurons with cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 361-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12482.	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 -

1. 著者名 Hiroyuki Honda	4. 巻 76
2. 論文標題 Different Complicated Brain Pathologies in Monozygotic Twins With Gerstmann-Straussler-Scheinker Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 654-863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nlx068	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 -

1. 著者名 Hiroyuki Honda	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 DCTN1 F52L mutation case of Perry syndrome with progressive supranuclear palsy-like tauopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parkreldis.2018.02.038.	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 -

1. 著者名 Honda Hiroyuki, Matsumoto Masaki, Shijo Masahiro, Hamasaki Hideomi, Sadashima Shoko, Suzuki Satoshi O, Aishima Shinichi, Kai Keita, Nakayama Keiichi I, Sasagasako Naokazu, Iwaki Toru	4. 巻 78
2. 論文標題 Frequent Detection of Pituitary-Derived PrPres in Human Prion Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 922 ~ 929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nlz075	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 -

1. 著者名 Sadashima Shoko, Honda Hiroyuki, Suzuki Satoshi O, Shijo Masahiro, Aishima Shinichi, Kai Keita, Kira Junichi, Iwaki Toru	4. 巻 79
2. 論文標題 Accumulation of Astrocytic Aquaporin 4 and Aquaporin 1 in Prion Protein Plaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 419 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa010	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 -

1. 著者名 Mori Shinichiro, Honda Hiroyuki, Ishii Takashi, Yoshimura Motoi, Sasagasako Naokazu, Suzuki Satoshi O., Taniwaki Takayuki, Iwaki Toru	4. 巻 39
2. 論文標題 Expanded polyglutamine impairs normal nuclear distribution of fused in sarcoma and poly (rC) binding protein 1 in Huntington's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1111/neup.12600	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiroyuki Honda, Chang Shen, Satoshi O Suzuki, et al.
2. 発表標題 Dynactin is involved in Lewy body pathology
3. 学会等名 日本神経病理学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田裕之、松本雅紀、濱崎英臣
2. 発表標題 ヒトprion病における下垂体由来異常型prion蛋白の検出
3. 学会等名 日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Honda
2. 発表標題 Trends in dementia prevalence over 31 years of the Hisayama study
3. 学会等名 日本神経病理学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田裕之
2. 発表標題 脳内占拠性病変を有したAIDSの一部検例
3. 学会等名 日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田裕之
2. 発表標題 進行性核上性麻痺に類似したタウオパチーを合併したPerry症候群 (DCTN1, F52L) の1剖検例
3. 学会等名 日本神経病理学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----