

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500309

研究課題名（和文） プリオン蛋白オリゴマー検出のための簡便な検査法の開発

研究課題名（英文） Simplified method for the detection of prion protein oligomers

研究代表者

佐々木 健介（SASAKI KENSUKE）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80380616

研究成果の概要：遠心カラムを利用した簡便なゲル濾過法により、異常プリオン蛋白オリゴマーと正常型モノマーを分離する方法を開発した。ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病の剖検脳標本と、モデルマウスを用いた経時的解析で、オリゴマーの増加が病理変化の強さや病期の進行と相関することが示された。異常オリゴマーは従来のプロテアーゼ抵抗性という指標に対して中間的な性質を示した。この検査法は病態解明のための新たな解析方法として有用である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学・神経病理学

キーワード：プリオン蛋白、オリゴマー、界面活性剤、ゲル濾過、遠心カラム、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病（以下、ヤコブ病）に代表されるプリオン病は、正常型から構造変換した異常なプリオン蛋白が脳内に沈着し、急速に認知症が進行する致死性の神経変性疾患の総称である。異常型プリオン蛋白は正常型に比べて、界面活性剤に難溶性である。プロテアーゼに部分的に抵抗性である。シートの割合が高く凝集体を形成しやすい、という特徴がある。従来のプリオン病の確定診断には、proteinase K (PK) 処理後に未分解なプリオン蛋白フラグメント (PrP^{res}) を ELISA 法やウェスタン・ブロット

法で検出する方法が用いられ、異常型プリオン蛋白の プロテアーゼ抵抗性、という性質を指標とした診断法といえる。

しかし近年、プロテアーゼ感受性のプリオン蛋白の中にも、正常型とは性質の異なる異常プリオン蛋白が含まれることがわかり、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白 PK-resistant PrP^{Sc} (rPrP^{Sc})=PrP^{res} に対して、sensitive PrP^{Sc} (sPrP^{Sc})といわれる。また、プリオン病の発症、感染性には高度な凝集体よりも異常プリオン蛋白オリゴマーの関与のほうが強いことが示唆されており、従来から示されてきた、アルツハイマー病における

アミロイド蛋白オリゴマーの病態への強い関与とも共通する過程が考えられる。プリオン蛋白オリゴマーがモノマーと凝集体の中間的な状態であるとすれば sPrP^{Sc} に相当する可能性もあり、以上のことからプロテアーゼ抵抗性以外の指標を用いた異常プリオン蛋白の検出方法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白を検出する従来の検査法とは全く異なる指標から、異常プリオン蛋白オリゴマーを検出する簡便な検査法を開発することにある。

(1) 市販の遠心ゲル濾過カラムキットを用いた、蛋白のサイズ別分画

分子サイズによるプリオン蛋白の分画は、ゲル濾過法を含め先行研究ですでに試みられているが、本研究で開発を目指す手法は遠心カラムのキットを用いるという点で汎用性があり簡便である。また、カラムをスタンドに立てて行う実験よりチューブの中で閉鎖系にて操作できるという点で安全である。本手法は、上記の通りプロテアーゼ処理を行わずにヤコブ病と非ヤコブ病を区別することから、sPrP^{Sc} を検出できる可能性があり、これまでよりも広い範囲でヤコブ病診断に応用できる可能性がある。

サンプル調製のバッファーの条件（界面活性剤の種類と濃度など）や蛋白濃度などにより、プリオン蛋白の重合の程度がかなり異なってくることが考えられる。また、遠心カラムの担体の孔径や遠心条件によっても分画結果が大きく異なると考えられるため、まずプリオン蛋白オリゴマーを分画するための至適条件を決定する。

(2) プリオン蛋白オリゴマーの病態への関与および生化学的性質の解明

開発した遠心ゲル濾過法でヒト・プリオン病の剖検脳標本におけるプリオン蛋白重合度を解析して、病理変化の程度とオリゴマー形成の相関を検討する。プリオン病モデルマウスの時系列標本を用いて、病期ごとの分画パターンの変化を検討する。また、病期ごとに海綿状変化などの病理変化や PrP^{Res} の出現、シナプス蛋白の変化などのデータとつぎ合わせて、オリゴマーの増加がどの段階から病態形成に関与しうるものか検討する。

さらに、得られたプリオン蛋白オリゴマーのプロテアーゼ抵抗性やリンタングステン酸存在下での凝集性などを検討して、いわゆる PrP^{Res} との異同を明らかにする。これにより病態形成の本質にせまることができると期待される。

3. 研究の方法

(1) 至適条件の検討

用いるカラムは、市販の核酸精製用ゲル濾過遠心カラムキットで、Clontech 社の CHROMA SPIN カラムと GE Healthcare 社の MicroSpin カラムを試みた。界面活性剤を含むバッファーで脳乳剤を作成し、準備したカラムに添加した。低速遠心と溶出バッファーの補充を繰り返して、蛋白の分子サイズごとの分画を行った。条件設定の検討では、遠心カラムの担体の孔径、遠心速度と時間、ローターの種類、脳乳剤の蛋白濃度、界面活性剤の種類と濃度を変更して、至適条件を決定した。

(2) ヒト・プリオン病における検討

当施設にて病理解剖を行った孤発性ヤコブ病症例のうち、病型は同じだが罹病期間がそれぞれ異なる 6 例を抽出して、遠心ゲル濾過法にてプリオン蛋白重合度の変化を検討した。対照としてプリオン病以外の精神神経疾患で死亡した 3 例についても解析を行った。症例ごとに、脳重量低下との関連を検討したほか、海綿状変化とグリオーシスの程度を半定量化して、プリオン蛋白オリゴマー形成と病理変化の指標との関連を調べた。

(3) モデルマウスにおける経時的解析

NZW マウスに福岡 1 株を脳内接種して、1.5 ヶ月後から病末期の 4 ヶ月まで半月ごとに採取した脳標本を用いて、遠心ゲル濾過法によりプリオン蛋白重合度の変化を経時的に解析し、病期の進行との相関を検討した。病期ごとに得られた分画を、プロテアーゼ処理、あるいはリンタングステン酸沈澱処理を行い、従来の指標でとらえられる異常プリオン蛋白との異同を検討した。また、プリオン蛋白の糖鎖修飾の割合の変化を病期ごとに比較した。

4. 研究成果

(1) 至適条件

様々な条件で分子サイズごとの分画パターンを検討したところ、以下の条件で良好な結果が得られた。遠心カラムは、CHROMA SPIN-200 を用いる（MicroSpin よりもベッド容積が大きく分画の用途に耐えうる。担体の孔径がより大きい CHROMA SPIN-400 は、遠心操作中にゲルベッドがつぶれてしまい分離能が低下する）。遠心条件は、バッファー交換時 200 g、3 分、分画時 120 g、2 分で、各分画で 40 μ l ずつ溶出バッファーを補充する。この遠心条件は核酸精製のための製品プロトコールより低速かつ短時間である。スイングローターでもアングルローターでも、同様の結果が得られた。蛋白濃度が低いほど分離能は高く、マウスでは 1%脳乳剤でも十分にプリオン蛋白が検出されたが、ヒトのサンプルでは病理変化が高度で組織が粗鬆化した症例も多いため、5%濃度の脳乳剤を要した。溶解バッファーの界面活性剤は、マウスの標本の場合は 0.5% NP-40 と 0.5%

デオキシコール酸を組み合わせた汎用組成で良好な結果が得られたが、ヒトの標本では非プリオン病症例の正常プリオン蛋白が一部重合していた。ヒトの標本では蛋白濃度を高めに設定していることと、死後変化の影響も考えられたため、界面活性剤を 1% SDS に変更して、正常プリオン蛋白をほぼモノマーの状態に可溶化することができた。

以上、分画 2~4 はオリゴマー状態のプリオン蛋白が溶出し、モノマーの正常プリオン蛋白は分画 7 をピークとして回収される条件を確立することができた。本法によるサイズ分画は先行研究と比較して分解能は劣るが、モノマーとオリゴマーのプリオン蛋白を分離する用途には十分実用的であり、簡便かつ短時間で、閉鎖系にて安全に操作できるメリットがある。

(2) 孤発性ヤコブ病におけるプリオン蛋白オリゴマー形成

孤発性ヤコブ病の剖検脳標本を解析したところ、罹病期間が長期にわたり病理変化が高度な症例ほど異常オリゴマーが増加していた(図 1)。非ヤコブ病コントロール例では、プリオン蛋白オリゴマーはほとんど検出されなかった。さらに、正常型モノマーは罹病期間の短期例でもすでに減少している傾向がみられ、これらの分子種の動的な変化が病態に関与している可能性が高いと考えられた(図 2)。プリオン蛋白オリゴマーの増加は、病理変化の指標の中でも特に GFAP 陽性アストロサイトの増生と相関していた。症例ごとに各分画をプロテアーゼ処理したところ、罹病期間の長短に関わらずプリオン蛋白オリゴマーはいずれもプロテアーゼ抵抗性を示した。

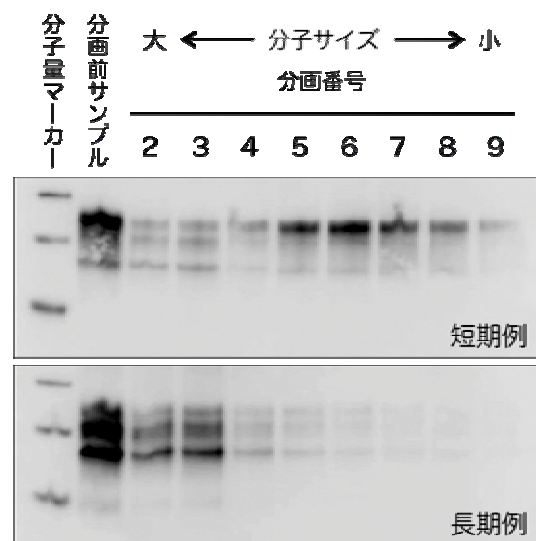


図 1. 孤発性ヤコブ病のプリオン蛋白分画パターン

プリオン蛋白は全てモノマーの状態にして検出しているのと同じサイズに見えるが、分画 2、3 のシグナルはもともと分子サイズの大きい異常オリゴマーが存在していたことを示している。短期例：罹病期間 2 ヶ月、長期例：10 ヶ月。

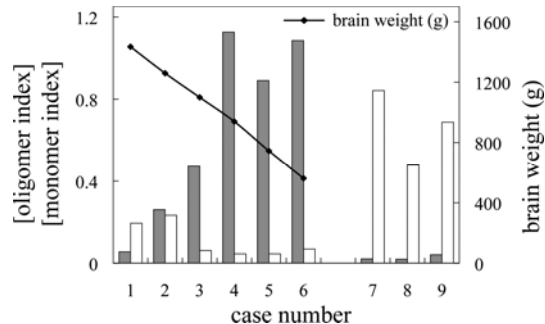


図 2. 症例ごとのプリオン蛋白オリゴマー(灰色)とモノマー(白)の割合
症例 1~6: 孤発性ヤコブ病、症例 7~9: 非ヤコブ病コントロール。折れ線グラフ: 脳重量(右軸、単位グラム)

(3) モデルマウスにおける経時的変化

NZW/福岡 1 株脳内接種モデルマウスを用いて経時的な解析を行い、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白の形成に先行してプロテアーゼ感受性の異常オリゴマーが形成されていることが確認できた(図 3)。異常オリゴマーの形成は、海綿状変化などの病理変化の出現をより鋭敏に反映していた。同程度の大きさのオリゴマー分子でも、病期の進行に伴ってプロテアーゼ抵抗性やリンタングステン酸存在下での凝集性が高まることが示され、異常型プリオン蛋白の性質には連続するスペクトルがあることが示された。また、正常モノマーのプリオン蛋白は 2 糖鎖型が優位であり、プロテアーゼ抵抗性を獲得すると 3 本全ての糖鎖修飾のバンドが同程度のシグナル強度を示すが、感染早期のオリゴマーでも 2 糖鎖型が優位を保っていた。

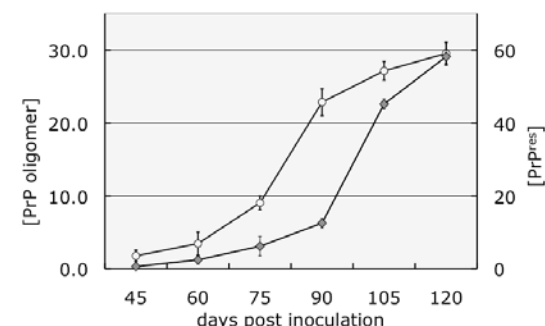


図 3. モデルマウスにおける異常プリオン蛋白の経時的変化
異常オリゴマー(白丸)は接種後 90 日有

意に増加しているのに対して、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白(灰色菱形)は105日から遅れて増加する。

(4) 成果のまとめ

本研究にて開発した簡便な遠心ゲル濾過法にて、ヒトおよびマウスの脳から抽出したプリオン蛋白の重合度を検討することが可能になり、プロテアーゼ感受性でありながらオリゴマー状態を示す異常プリオン蛋白が病初期に出現して、早期の病態形成に関与している可能性が示された。異常型プリオン蛋白の性質には連続するスペクトルがあり、従来の基準とは異なる性質を指標として幅広く異常型プリオン蛋白を検出し、病態への関与を検討することが必要である。

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9件)

Sasaki K, Minaki H, Iwaki T. Development of oligomeric prion-protein aggregates in a mouse model of prion disease. J Pathol (in press). 査読有

Minaki H, Sasaki K, Honda H, Iwaki T. Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns. Neuropathology (in press). 査読有

Fujimi K, Sasaki K, Noda K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Matsui Y, Sekita A, Iida M, Kiyohara Y, Kanba S, Iwaki T. Clinicopathological outline of dementia with Lewy bodies applying the revised criteria: the Hisayama study. Brain Pathol 18 (3): 317-325, 2008. 査読有

前川敏彦, 佐々木健介, 安岡克倫, 田北昌史, 門司晃, 神庭重信. 退行期うつ病で長期入院中に発症した孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病. 精神科治療学 22(11): 1313-1318, 2007. 査読有

佐々木健介, 岩城徹. プリオン病の病理解剖と標本作製の留意点. 病理と臨床 25: 1124-1130, 2007. 査読無

Fujimi K, Noda K, Sasaki K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Iida M, Kiyohara Y, Kanba S, Iwaki T. Altered Expression of COX-2 in

Subdivisions of the Hippocampus during Aging and in Alzheimer's Disease: The Hisayama Study. Dement Geriatr Cogn Disord 23(6): 323-331, 2007. 査読有

[学会発表](計8件)

佐々木健介, 皆木晴彦, 岩城徹. プリオン病モデルマウスにおける重合プリオン蛋白形成の経時的解析. 第49回日本神経病理学会 東京 2008年5月20日-22日

皆木晴彦, 佐々木健介, 岩城徹. プリオン蛋白オリゴマーの簡便な検出法. 第49回日本神経病理学会 東京 2008年5月20日-22日

本田裕之, 皆木晴彦, 柴野智子, 佐々木健介, 岩城徹. プリオン病の病理形態学的および蛋白生化学的定量解析の試み. 第49回日本神経病理学会 東京 2008年5月20日-22日

Sasaki K, Minaki H, Iwaki T. Time course of the development of PrP aggregates in a mouse model of prion disease. Prion 2007, Edinburgh, September 26-28, 2007
佐々木健介, 皆木晴彦, 岩城徹. 伝達性海綿状脳症におけるシナプス関連蛋白発現の経時的解析. 第48回日本神経病理学会 東京 2007年5月30日-6月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 健介 (SASAKI KENSUKE)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 80380616

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩城 徹 (IWAKI TORU)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 40221098