

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590999
 研究課題名（和文）
 本邦プリオン病サーベイランス髄液検体を用いたサロゲートマーカー探索
 研究課題名（英文） Search of surrogate maker for diagnosis of CJD using CSFs collected by nationwide surveillance
 研究代表者
 調 漸 （Shirabe Susumu）
 長崎大学・保健・医療推進センター・教授
 研究者番号 40264220

研究成果の概要：

クロイツフェルト・ヤコブ病の診断法として頭部 MRI 拡散強調画像と髄液の総タウ蛋白、14-3-3 蛋白などの有効性が知られている。これらを含め、最も感度・特異度が優れた検査法を検討する目的でプリオン病サーベイランス委員会の協力を得て、日本における世界に発信できる髄液検査法の確立をめざして髄液の中の総タウ蛋白、14-3-3 蛋白の有用性を検討した。また、これらはかなりの診断精度であるにも関わらず、病因論的には特異的とは言えない。病理診断の機会が少ない本邦において、髄液などの比較的低侵襲で得られる検体で、病因特異的、即ち「異常プリオン蛋白」を検出する方法として PMCA 法の開発を目指した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：①プリオン病②髄液診断③タウ蛋白④PMCA

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病の診断法として頭部MRI拡散強調画像と髄液の総タウ蛋白、14-3-3蛋白などの有効性が知られているが、まだどの検査法が最も特異度・感度において最も優れた方法であるかについての統一された認識はない。

また、これらはかなりの診断精度であるにも関わらず、病因論的には特異的とは言えない。特に病理診断の機会が少ない本邦において、髄液などの比較的低侵襲で得られる検体で、病因特異的、即ち「異常プリオン蛋白」を検出する方法の登場が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 現在までに、髄液を用いた診断法としては 14-3-3 蛋白、総タウ蛋白を初めとする生化学マーカーの報告があり、日常診療においてもこれらのマーカーが使用されるが、その診断精度についての詳細な報告はなく、診断基準に供するにはまだまだ不十分である。14-3-3 蛋白の判定基準においては、検査法がウェスタンブロット法であることから、その判定法は明確でなく、欧米も含めて慣習的に

同じサンプルを被験者の違う2人で行うか判定に利用したフィルムを熟練した研究者が2人で別個に判定し、最終判断するなど非常に効率性が悪く、手間がかかる。この問題を解決するために半定量化による診断法の標準化を目指すことを目標とした。

(2) CJD の髄液マーカーとして報告例の多いマーカーである総タウ蛋白、14-3-3 蛋白、NSE、S-100 蛋白については長崎大学にてすでに検討した症例について検討を行った。(キットについては最も一般的に広く利用されているキットを利用し、再度 CJD の cut-off 値を特異度 70%以上とした。)

(3) CJD 患者由来の検体(髄液等)中の PrP^{Sc}を検出し、診断に用いる目的で、チオフラビン T (ThT) の蛍光強度測定による簡便でかつ real-time に PrP^{Sc}を検出できるリコンビナント PrP を用いた無細胞増幅法(real-time QUIC: QUaking-induced Conversion)の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームでの判定基準の明確化

共同実験の飛梅先生より提供された既知濃度の 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームのリコンビナント蛋白を基準として CJD 患者での脳脊髄液サンプルを、Western blot 法にて検出し、Western blot 法における半定量化を行った。CJD 患者(193 例)と認知症患者(93 例)による Western blot 法における 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームの半定量化を行い、cut-off 値を決定した。

(2) 多数例における脳脊髄液中の生化学マーカー、画像、脳波の検討

①対象

対象は CJD 患者(193 例)と認知症患者(93 例)とした。

②方法

- a. 対照群 (N=93) と CJD 患者(N=193)の脳脊髄液 14-3-3 蛋白(14-3-3- β 及び γ アイソフォーム定性) (IBL) 抗体を用いて検討を行った。
- b. 対照群 (N=93) と CJD 患者(N=193)において脳脊髄液中の Tau 蛋白定量 (Innogenetics 社)による比較検討を行った。
- c. 対照群 (N=93) と CJD 患者(N=193)において脳脊髄液中の S-100b 蛋白、NSE 蛋白は SRL に委託した。
- d. 対照群 (N=93) と CJD 患者(N=193)において画像検査(拡散強調画像)による比較検討を行った。

(3) CJD 患者由来の検体(髄液等)中の PrP^{Sc}を検出し、チオフラビン T (ThT) の蛍光強度測定による簡便でかつ real-time に PrP^{Sc}を検出できるリコンビナント PrP を用いた無細胞増幅法 (real-time QUIC: QUaking-induced Conversion) を施行した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の提供にあたり、患者及び患者家族に研究の内容・意義・検査結果のデータの公表など多岐にわたり、informed consent を行い、同意を得た。

4. 研究成果

(1) Western blot 法の統一プロトコールを作成した。

(標準プロトコール)

脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の検出方法 Western blot 法の統一プロトコール

1. (12%ゲル) 80VX10min→100VX10min→120V(70min)

2. トランスファー 15% MeOH X 30mA overnight

3. ブロッキング 5% スキムミルク室温 60min

1次抗体 (IBL社β isoform) (1:1000) 4°C overnight

4. 室温で 3×10min with TTBS wash

5. 2次抗体(1:5000) 室温で1時間

6. 室温で 3×10min with TTBS wash

7. ECL 処理

1-a. 14-3-3蛋白のβアイソフォームのリコンビナント蛋白にてスタンダードサンプルを Western blot 法にアッセイし、ECL 処理後 Las mini system を利用し、検出限界を検定した。βアイソフォームについては1回ごとの結果が大きく異なるために Western blot 法を行うたびにスタンダードサンプルを置き、半定量化を行った。CJD患者(193例)と認知症患者(93例)において半定量化し、cut-off 値を決定した。

1-b. 14-3-3蛋白のγアイソフォームのリコンビナント蛋白にてスタンダードサンプルを Western blot 法にアッセイし、ECL 処理後 Las mini system を利用し、検出限界を検定した。βアイソフォームについては1回ごとの結果が大きく異なるために Western blot 法を行うたびにスタンダードサンプルを置き、半定量化を行った。CJD患者(193例)と認知症患者(93例)において半定量化し、cut-off 値を決定した。

図 CJD 患者とアルツハイマー型認知症 (ATD) 患者での脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白のβアイソフォーム半定量的結果 CJD 患者 112 症例 VS 認知症患者 93 症例

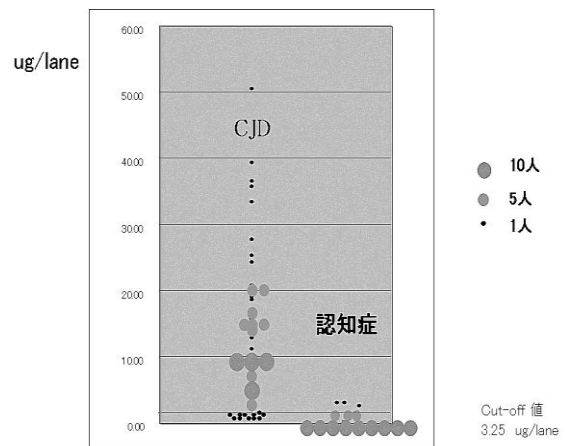
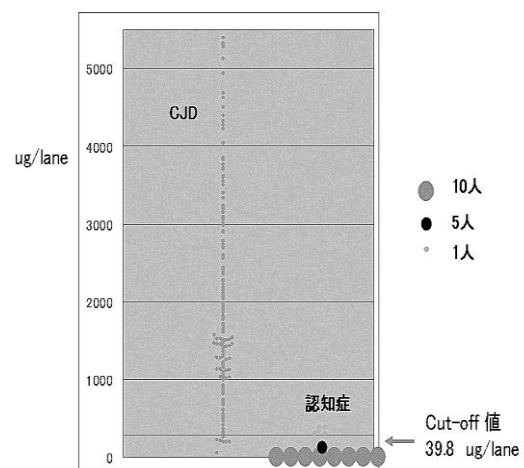


図 CJD 患者とアルツハイマー型認知症 (ATD) 患者での脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白γアイソフォームの半定量的結果

CJD 患者 112 症例 VS 認知症患者 93 症例



(2) 総タウ蛋白、NSE 及び S-100b 蛋白の測定における cut-off の結果

a. 総タウ蛋白

Inogenetics 社総タウ蛋白 (ELISA キット)。cut-off は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 1260pg/ml とした。(ヨーロッパ基準 1300pg/m としている。)

b. NSE

栄研 NSE キット。(SRL に委託)。cut-off は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は

35ng/ml とした。(ヨーロッパ基準は 25pg/m としている。)

c. S-100b 蛋白

SRL に委託。cut-off は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 2.2 ng/ml とした。

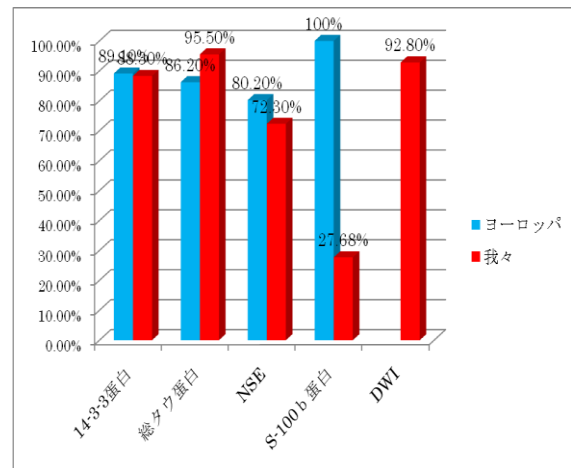
(ヨーロッパ基準 4.2pg/m としている。)

(3) プリオン病患者 193 例中の病型別分類のプロファイリングは表で示す。又 CJD 患者 (N=193) における画像検査 (MRI 拡散強調画像)、脳脊髄液 (t-tau 蛋白、14-3-3 蛋白 (14-3-3-β 定性) による比較検討の結果では古典型 CJD193 症例での生化学マーカーの陽性率の検討では (14-3-3 蛋白 : 88.7%、総 tau 蛋白 : 95.7%、S-100 蛋白 : 36.1%) 総計 193 症例 (14-3-3 蛋白 : 86.5%、総 tau 蛋白 : 95.5%、S-100 蛋白 : 40.5%) となった。同時にヨーロッパとの比較について検討した。

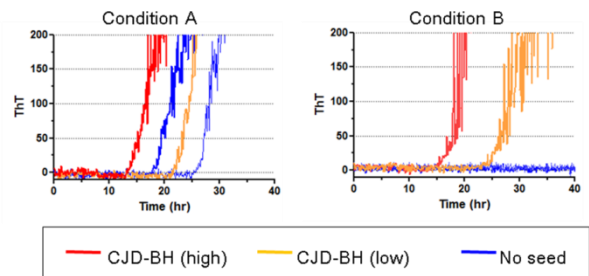
表 1. CJD 193 症例の検査結果のまとめ

	総数	14-3-3 蛋白	総タウ蛋白	NSE	S-100 蛋白	DWI
古典型 CJD	157 例	88.7%	95.9%	81.5%	33.1%	95.5%
MV 非典型	1 例	0%	0%	0%	0%	100%
MM2 皮質型	7 例	50%	100%	28.6%	0%	100%
家族性						
V180I	10 例	50%	80%	40%	0%	100%
M232R	2 例	0%	100%	50%	0%	100%
144 塩基対挿入	2 例	0%	50%	0%	0%	0%
硬膜移植後 CJD	8 例	100%	100%	100%	25%	100%
GSS	6 例	0%	33.3%	0%	0%	0%

DWI と髄液中の生化学的マーカーの検討



(4) PMCA 法を改良した無細胞増幅法 (real-time QUIC: QUaking-induced Conversion) の開発を試みたところ今期研究では rBoPrP (recombinant bovine PrP) の精製までに止まり、BSE 脳乳剤をシードに用いて QUIC 反応の条件検討を行うことはできなかったが、rHuPrP (recombinant human PrP)、CJD での条件検討を詳細に行うことができた。



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 5 件)

1. KuwataK, NishidaN, MatsumotoT, KamatariO . Y, MutoH. J, Kodama K, Nakamura K. H. Kimura K, KawasakiM, TakakuraY, ShirabeS, TakataJ , KataokaY, KatamineS: Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc Natl Acad Sci USA 104 (29) : 11921-11926, 2007 (IF: 9.598) (査読有)

2. SatohK, ShirabeS, EguchiH Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. Dementia and geriatric cognitive disorders 23(6) : 372-381, 2007 (査読有)

3. Satoh K, Shirabe S, Eguchi K.
[Clinical typing and diagnosis of sporadic human prion diseases (classic sporadic CJD, MM2-cortical form CJD, MM2-thalamic form CJD)]. Nippon rinsho 65(8):1423-1432, 2007(査読有)

4. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Dementia and geriatric cognitive disorders 24(3):207-212, 2007 (査読有)

5. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T,
Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. J Neurol. 2007 Nov 2(査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Matsui Y, Satoh K, Kataoka Y, Shirabe S
The useful application of rapid diagnostic screening system of heart-type fatty acid binding protein in CSF of CJD patients as a quick bed-side diagnostic tool
PRION 2008 Madrid Spain 2008.10.7-10

2. Satoh K, Minoru T, Matsui Y, Shirabe S,
Eguchi K, Testutarou S Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF
PRION 2008 Madrid Spain 2008.10.7-10

3. 佐藤克也、調 漸、江口勝美、
プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討 日本神経学会総会 横浜
2008.05.15-17

4. 六倉和生、佐藤克也、辻野 彰、本村政勝、
調 漸、江口勝美
クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者における簡易診断キットの有効性 日本神経学会総会 横浜 2008.05.15-17

5. 佐藤克也、調 漸、江口勝美、
日本におけるプリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカーと画像検査の検討 第12回
日本神経感染症学会総会 福岡
2007.10.12-13

6. 佐藤克也 重松和人, 西田教行, 調 漸, 江

口勝美 プリオン感染腎特異的遺伝子発現とヒトプリオン病での意義 第48回日本神経学会総会、愛知、2007.05.16-18

7. 調 漸、佐藤克也、江口勝美、志賀裕正、
浜口 毅、山田正仁、三條伸夫、水澤英洋
日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討、第48回日本神経学会総会、愛知、2007.05.16-18

8. 佐藤克也、中桶了太、西浦義博、辻野彰、
福田 卓、江口博人、福島直美、本村政勝、
調 漸、江口勝美、吉村俊朗
脳ドッグにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者に対する quinacrine 投与経験、第25回日本神経治療学会総会、
宮城、2007.06.21-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

調 漸

長崎大学 保健・医療推進センター・教授
研究者番号：40264220

(2) 研究分担者

佐藤 克也

長崎大学 医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70398147

西田 教行

医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40333520

(3) 連携研究者