

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390287

研究課題名(和文) 異常型プリオンタンパク試験管内増幅法によるプリオン病の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Sensitive prion detection by *in vitro* amplification of abnormal prion protein

研究代表者

新 竜一郎 (ATARASHI RYUICHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90452846

研究成果の概要(和文)：ヒトプリオン病、特にクロイツフェルトヤコブ病は痴呆症状を中心とした神経症状が急速に進行し、死に至る神経難病である。そのためにも発症早期に正確に診断することが重要であり、治療法開発とともに、診断法の確立特に生前確定診断法の確立が望まれているが、これまで、生前確定診断には危険性を伴う脳生検が必要であった。研究代表者らは CJD 患者由来の髄液中の異常型プリオンタンパクを増幅し検出する新規アッセイ法 (Real-time QUIC 法) を今研究により開発し、脳生検を行わずに CJD 確定診断が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The development of *in vitro* amplification technology for abnormal forms of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) has generated the possibility for developing a novel diagnostic test for prion diseases. However, ultrasensitive PrP<sup>Sc</sup> detection in easily accessible specimens such as cerebrospinal fluid (CSF) has not yet been successful in human prion diseases. In this study, we developed a new PrP<sup>Sc</sup> amplification assay, designated “real-time QUIC (RT-QUIC)”, allows for the detection of a minute amount of PrP<sup>Sc</sup> in diluted sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) brain homogenate. Moreover, we assessed the technique first in a series of Japanese subjects and then in a blind study of 30 cerebrospinal fluid specimens from Australia, which achieved greater than 80% sensitivity and 100% specificity. These findings indicate the promising enhanced diagnostic capacity of RT-QUIC in the antemortem evaluation of suspected CJD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：感染症内科学  
キーワード：感染症診断学

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトのクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease ; 以下 CJD) は原因のわからない孤発性、プリオンの汚染による感染性、そしてプリオンタンパク (PrP) 遺伝子異常による遺伝性の3種類に分類される。近年、BSE 発症牛からの感染による変異型 CJD や CJD 汚染硬膜移植による感染性 CJD 症例が多数報告され、特に変異型 CJD では輸血感染例や潜伏感染者の存在も指摘され、二次感染を防ぐ観点から早期診断法の開発が強く望まれている。また現在までの多くの動物実験によりプリオン病では早期に治療を開始することが、重要であることが示されている。しかし発症前、発症早期における早期確定診断法は確立されていなかった。CJD などのプリオン病では異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) が検出されることが確定診断と同等の意味を持つが、生前の確定診断には脳生検が必要であり、実施は危険を伴い困難である。そこで本研究では採取が容易な髄液を用いて、それらに含まれる、通常の方法では検出できない微量の PrP<sup>Sc</sup> を検出が容易なレベルまで試験管内で増幅する方法を開発することにより、3年の期限内に CJD を始めとするプリオン病の早期確定診断法を確立したいと考え、実験を開始した。

### 2. 研究の目的

試験管内で PrP<sup>Sc</sup> を増幅する方法によりプリオン病の診断法への応用が摸索されているが、CJD) を始めとするヒトのプリオン病での高感度な PrP<sup>Sc</sup> 検出の成功例は報告されていない。本研究ではヒトプリオン病に適応可能な試験管内異常型プリオンタンパク増幅法を新規に開発し、それを用いて CJD 患者

由来髄液中に含まれるごく微量の PrP<sup>Sc</sup> を増幅することにより、CJD の生前確定診断法を確立することを目的とするものであった。

### 3. 研究の方法

大腸菌からヒト配列のリコンビナント PrP (rPrP) をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、変換反応の基質として用いた。CJD 患者由来の brain homogenate をシードとして QUIC 反応の条件検討を行った。変性剤 (グアニジン塩酸、尿素) の濃度、塩濃度、pH, rPrP の濃度などを中心として行い、Real-time QUIC 法 (RT-QUIC 法) の最適条件を探索した。

その後、実際に日本での CJD の definite case 由来髄液 18 例と非 CJD 症例由来髄液 35 例を用いて RT-QUIC 法を行い、感度、特異度について検証した。さらに Australian National Creutzfeldt-Jakob Disease Registry との共同研究により提供された 30 例の髄液について盲検テストを行い、この方法の有用性について検討した。

### 4. 研究成果

RT-QUIC 法の最適条件を決めた後、日本の CJD 髄液 18 例をテストした結果、15/18 で陽性であった。一方、陰性コントロールとして用いた CJD 以外の疾患由来の髄液 35 症例はすべて陰性であった。オーストラリアの検体を用いた盲検テストでは CJD 髄液、14/16 で陽性、非 CJD 髄液ではすべて陰性であった。日本での症例での感度は 83.3%、特異度は 100%(表 1)、一方オーストラリア症例での盲検テストでは感度は 87.5%、特異度は 100% であった(表 2)。この結果はこれまで CJD の髄液マーカーとして用いられている 14-3-3

タンパクを感度では同等、特異度では上回るものである。また RT-QUIC 法が髄液中の PrP<sup>Sc</sup> を増幅して検出する方法であることから CJD の診断的意義は非常に高いと考えられる。これらの結果から、RT-QUIC 法は CJD の診断に有用性が高く、特に生前の確定診断が髄液検査により可能となったと考えている。

表 1 日本の症例 (CJD18 例、非 CJD 症例 35 例) での RT-QUIC 法と髄液マーカー 14-3-3 タンパクとの感度・特異度の比較

	CSF samples in Japan [Pilot study]	
	RT-QUIC	14-3-3 ( $\gamma$ -isoform)
Sensitivity	83.3% (15/18)	72.2% (13/18)
Specificity	100% (0/35)	85.7% (5/35)

表 2 Blind 条件により行ったオーストラリアの症例 (30 例) での RT-QUIC 法と髄液マーカー 14-3-3 タンパクとの感度・特異度の比較

	CSF samples from Australia [Blind study]	
	RT-QUIC	14-3-3 (all isoforms)
Sensitivity	87.5% (14/16)	87.5% (14/16)
Specificity	100% (0/14)	71.4% (4/14)

## 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 6 件)

- ① Atarashi R, Satoh K, Sano K (以下 14 名省略) : Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine*, 査読有, 17, 2011, 175-178

- ② Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R (以下 6 名省略) : Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathogens*, 査読有, 6(12), 2010, e1001217
- ③ Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R (以下 5 名省略) : Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*, 査読有, 285(19), 2010, 14083-14087
- ④ Smirnovas V, Kim JI, Lu X, Atarashi R, Caughey B, Surewicz WK : Distinct structures of scrapie prion protein (PrP<sup>Sc</sup>)-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange. *J Biol Chem*, 査読有, 284(36), 2009, 24233-24241
- ⑤ Fujihara A, Atarashi R, (以下 7 名省略) : Hyperefficient PrP<sup>Sc</sup> amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique. *FEBS J*, 査読有, 276(10), 2009, 2841-2848
- ⑥ Atarashi R (以下 8 名省略) : Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nature Methods*, 査読有, 5(3), 2008, 211-212

[学会発表] (計 5 件)

- ① 新竜一郎、シンポジウム I 「プリオン病の疫学から治療まで」、第 15 回日本神経感染症学会、平成 22 年 10 月 8 日、福島
- ② 新竜一郎、Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids

- using real-time quaking-induced conversion. Prion2010、平成 22 年 9 月 9 日、オーストリア (ザルツブルグ)
- ③ 新竜一郎、Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion. Asia-Oceania Symposium on Prion diseases 2010、平成 22 年 7 月 25 日、札幌
- ④ 新竜一郎、Real-time QUIC 法によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP<sup>Sc</sup> の検出、2009 年プリオン研究会 平成 21 年 8 月 30 日、宮城県刈田郡 (ラフォーレ蔵王)
- ⑤ 新竜一郎、正常型から異常型へのプリオンタンパク構造変換プロセスの解析、第 8 2 回日本生化学会、平成 21 年 10 月 22 日、神戸

[図書] (計 1 件)

新竜一郎、佐藤克也：プリオン病の髄液診断の可能性 Annual Review 神経、2011、121-128

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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  
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新竜一郎 (ATARASHI RYUICHIRO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・テ  
ニュアトラック助教  
研究者番号：90452846

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：