

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07807

研究課題名(和文) 採取容易な検体を用いたクロイツフェルト・ヤコブ病早期診断法の確立

研究課題名(英文) Development of an early diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease using easily collected specimens

研究代表者

森 剛志 (MORI, Tsuyoshi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40426565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病は致死性の神経変性疾患であり、現時点では有効な治療法や早期診断法は存在しない。申請者のグループにて開発された異常型プリオン蛋白(PrP)試験管内増幅法(Real Time Quaking-Induced Conversion; RT-QUIC法)はプリオン病罹患者の脳や髄液中に含まれる異常型PrPを検出可能とした高感度アッセイ系である。本研究は、さらに微量の異常型PrPを検出する発展型RT-QUIC法を構築することを目的とした。大量試料や高濃度試料から微量存在する異常型PrPを濃縮しRT-QUIC法の感度を上げることで初期症状患者の血液等の体液を用いた診断を可能とすることを期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速な神経細胞変性をきたす致死性の疾患、プリオン病。その代表的な病気である孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)は発症早期に正確に診断することが臨床現場から切望されている。ここで高濃度の血清に混合させたCJD罹患者脳乳剤から異常型プリオン蛋白が分離濃縮され、RT-QUIC法により検出できたことは、脳脊髄液以外の採取容易な血液等の検体からの診断且つ早期診断確立において大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders for which there is currently no effective treatment or early diagnosis. The Real Time Quaking-Induced Conversion (RT-QUIC) reaction is a highly sensitive assay system that can detect abnormal PrP in the brain and spinal fluid of prion disease patients. The aim of this study was to develop an advanced RT-QUIC assay to detect even smaller amounts of abnormal PrP. Increase the sensitivity of the RT-QUIC assay by concentrating trace amounts of abnormal PrP from large volume or high concentration samples. We hope that this new assay will make it possible to make diagnoses using blood and other body fluids from patients with early symptoms.

研究分野：感染症内科学

キーワード：孤発性CJD QUIC法

## 1. 研究開始当初の背景

日本では出生数が年々減少しており少子高齢化が一気に加速している。また、日本だけでなく先進諸国全体において高齢化が急速に進行しており、それに伴い高齢者問題が大きな社会問題として浮き彫りになってきた。高齢者問題の一つとして認知症が挙げられるが、その患者数は今後高齢化がさらに進むことで膨らんでいくことが懸念されている。認知症の原因疾患としてアルツハイマー病などが知られているが、ヒトプリオン病もその一つである。

プリオン病は神経変性疾患の一つであり、レビー小体症 ( $\alpha$ シヌクレイン) やアルツハイマー ( $A\beta$ ) 等と同様に脳内に蛋白の異常凝集が認められる。ヒトのプリオン病はクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) を代表とし、病因により孤発性 CJD (sCJD)、家族性 CJD 等 (遺伝性) 及び獲得型の医原性 CJD・変異型 CJD (vCJD) の3種に分類されるが、いずれも生体内に存在する正常型 PrP (PrP<sup>C</sup>) の構造が異常になった異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) の蓄積凝集が確認されるのが特徴である。蓄積量は臓器により異なり、いずれのタイプにおいても中枢神経系での蓄積が顕著である。

## 2. 研究の目的

現在のプリオン病の診断法としては、髄液検査、脳波、MRI による画像検査等があり、鑑別診断にはそれなりに有効ではあるが、確定診断ではない。生前確定診断に至るには現在もリスクの高い脳生検により、最も確実なプリオン病のマーカーである PrP<sup>Sc</sup> の直接的な証明 (ウェスタンブロット法、ELISA 法) に頼らざるを得ないのが現状である。しかし、いずれの方法も 10~30 ng の PrP<sup>Sc</sup> が検出限界で、症状初期の検査や中枢神経系以外の臓器・体液等の検体を用いた検査には不向きである。

一方、申請者の所属グループは異常型 PrP 凝集体の高感度検出法 (Real time quaking-induced conversion; RT-QUIC 法) を開発し、CJD 罹患脳乳剤中の PrP<sup>Sc</sup> を 1 fg まで検出可能とした (Atarashi et al., Nature Medicine 2011)。また本法は脳生検よりも採取容易な髄液中に微量存在する PrP<sup>Sc</sup> の検出も可能とし、いまでは国内外におけるプリオン病の髄液検査の項目の一つとして活用されている。しかしながら現時点で RT-QUIC 法は比較的 PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が顕著な脳乳剤や髄液のみが診断対象であり、採取がより容易な血液・尿等の体液では成功に至っていない。英国での vCJD の血液製剤による感染事例 (3 例) より、血液にも PrP<sup>Sc</sup> は存在する。また、マウス BSE (狂牛病) 血漿中での検出も報告されている (Fujihara et al., FEBS J. 2009)。しかしながら日本で 7 割以上を占める sCJD での検出の報告はない。そこで、本研究では、sCJD の血液中に PrP<sup>Sc</sup> が存在するのか、また、血液には診断的有用性があるのか、を検証することとした。

血液等で RT-QUIC 法が成功しない理由に、「PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量の少なさ」と「他成分による QUIC 反応の阻害」の2点が挙げられる。RT-QUIC 法は、試験管内に CJD 罹患試料と基質となる PrP リコンビナントを反応させることで効率よく PrP<sup>Sc</sup> を増幅させる方法で微量の脳乳剤からの PrP<sup>Sc</sup> 検出に優れている。しかしながら濃い脳乳剤では PrP<sup>Sc</sup> の陽性シグナルが極端に減少する傾向がある。この現象は髄液においても観られ、試料に含まれる何らかの成分が QUIC 反応を阻害していると考えられるが、現時点では解明されていない。

そこで本研究は PrP<sup>Sc</sup> を他成分より分離し、その試料 (濃縮 PrP<sup>Sc</sup>) を用いた RT-QUIC 法を構築することを目的とした。具体的には、試料を金属ビーズと共培養させ、PrP の有する金属結合能により金属ビーズに吸着させることで分離し、これらビーズを用いて RT-QUIC 法を行う (RT-QUIC 法 with beads: B-QUIC 法)。試料中の QUIC 反応阻害因子と分離することで QUIC 法が成立することを期待できる。また、感度を上げることで現時点で成功していない血液等を用いた診断も期待できる。PrP<sup>Sc</sup> は血液、尿や他臓器にも微量に存在する。申請者らは、孤発性 CJD 罹患患者より剖検時に採取した非神経系組織 (脾臓・肝臓・腎臓・肺・副腎) にもプリオン活性が存在することを証明した (Takatsuki et al., EBio Med 2016)。しかしながら CJD 罹患患者血液を用いた QUIC 法は成功していない。最終的には、高濃度試料 (脳組織、髄液、血液等) 中の微量 PrP<sup>Sc</sup> を検出するビーズを用いた B-QUIC 法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 課題1: ビーズを用いた RT-QUIC 法の最適条件の決定

ヒトの試料を用いる前段階としてスパイクテストを行った。どのビーズが RT-QUIC 法に有効であるのか (PrP<sup>Sc</sup> 結合能、QUIC 反応阻害因子回避能の面より)、シード活性既知の脳乳剤を添加 (Spike) した希釈サンプルを、様々な材質のビーズとインキュベートさせ、各々のビーズを RT-QUIC 法に用いた。最適ビーズ素材、反応溶液量及びリンスの有無等を検討した。

### (2) 課題2: ヒト検体を用いた B-QUIC 法検出限界値の決定

血液の代替え実験として高濃度の牛胎児血清 (FBS) を用いた。FBS に段階希釈した CJD 罹患

者脳乳剤を混合させ、B-QUIC 法を行い、血液からの診断に有用であるかを検討した。

(3) 課題3: B-QUIC 法の精度比較対象は CJD 罹患患者および非 CJD の髄液および血液。髄液は原液または希釈したものを準備し、B-QUIC 法を行い、既存の RT-QUIC 法と比較する(診断結果の誤差の有無)。また、CJD 罹患患者の血液において B-QUIC 法を行い、髄液検査の結果とどのような関係を示すかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 課題1: まずは金属ビーズと RT-QUIC 反応の相性について検証した。様々な材質のビーズ(φ2 mm)を用いて希釈プリオン罹患脳乳剤と共培養させ、RT-QUIC 法を試みたところ、マウス順応スクレーパープリオン株感染マウス脳及び CJD 罹患患者脳乳剤において陽性シグナルが得られた。特にビーズ B は偽陽性シグナルがみられないことから(no seed では陰性)、B-QUIC 法において最適素材であることが示唆された(図1)。また、さらに小さなサイズのビーズについても検証した。φ4.5 μm の磁気ビーズ(Dynabeads; ThermoFisher Scientific) 10 μL 分を反応に用いたところ、金属ビーズと同様、QUIC 陽性シグナルが得られたことから、金属ビーズと同様に磁気ビーズ Dynabeads は PrP<sup>Sc</sup> の濃縮に適した材料であることが示唆された。

(2) 課題2: 様々な濃度の FBS に段階希釈した CJD 罹患患者脳乳剤を混合させ(共培養)、PBS(-)にてリンス後、B-QUIC 法を行ったところ、FBS 存在下において QUIC 陽性反応が得られた。本来では QUIC 反応を完全に阻害する 100% の FBS においても陽性シグナルが得られた(図2)。これらの結果は血清中に QUIC 反応阻害因子が存在しており、ビーズを使うことでこれらの因子を排除でき、QUIC 反応が可能となることを示している。実際、共培養後に PBS(-)によるリンス未処理では 100% FBS 存在下で培養したビーズでは陽性シグナルが得られなかった(図3)。また、RT-QUIC 法は濃い濃度の脳乳剤では反応阻害が起きるが、B-QUIC 法は濃い濃度の脳乳剤において反応がみられた。

(3) 課題3: CJD 罹患患者髄液を用いて B-QUIC を試みた。髄液は原液(100%)、濃度 10%(等量)及び 10%(10 倍量)を準備し、ビーズと共培養させリンス処理後、B-QUIC 解析した。結果、原液で処理したビーズのみ陽性シグナルがみられた。これは φ2 mm のビーズでは表面積が小さいことが示唆された。10 μL 分の磁気ビーズでは表面積が大きくなるが高額であることから、安価である金属パウダーに注目した。様々な素材のパウダーを準備し、[課題1]と同様、最適パウダー・量・濃度を決定した。FBS の代わりにヒト健常人の血清を用いて CJD 罹患脳乳剤を希釈し、B-QUIC 解析を行った。FBS と比較すると 100% ヒト血清では若干反応が阻害された。また、50% ヒト血清でリンス処理が重要であることが示唆された(図4)。これらの結果を基に CJD 罹患患者の血液数検体を用いて B-QUIC 法を行ったが、現在のところ陽性シグナルは得られていない。

本研究課題は、所属グループの新博士が開発した異常型 PrP 高感度検出法(RT-QUIC 法)を改良することで血液からのプリオン病診断が可能であるか検討するために開始した。プリオン病罹患脳乳剤を様々な材質のビーズで共培養した結果、PrP<sup>Sc</sup> は多種の金属素材と結合することが示唆された。また、高濃度検体においても B-QUIC 法は有用であることが示唆された。CJD 罹患患者由来血清を用いた B-QUIC は今のところ陽性シグナルが得られていない。今後は血液検体数を増やして検討する。また、共培養血清の最適濃度、ビーズ・パウダーの最適濃度を検討していく。髄液を用いた PrP<sup>Sc</sup> の濃縮についても同時に検討していく。さらに、本研究課題により得られた情報を基に血液中に PrP<sup>Sc</sup> は存在するのか、またそれはどれくらいの量か、髄液との比較、罹患期間等を深く検討する予定である。

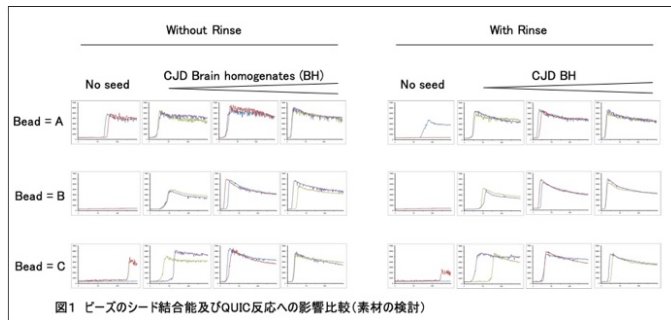


図1 ビーズのシード結合能及びQUIC反応への影響比較(素材の検討)

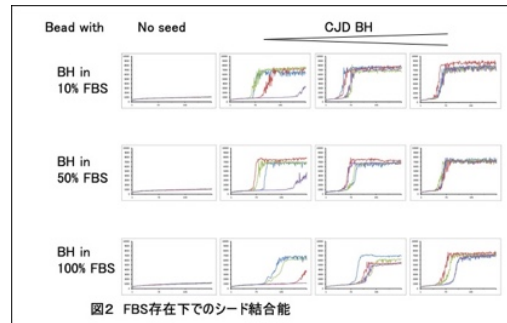


図2 FBS存在下でのシード結合能

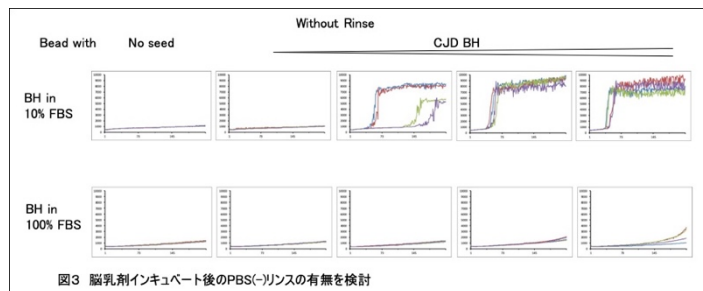


図3 脳乳剤インキュベート後のPBS(-)リンスの有無を検討

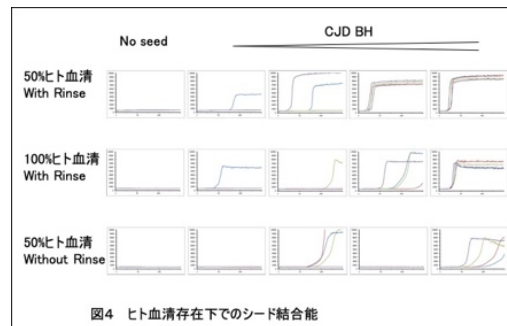


図4 ヒト血清存在下でのシード結合能

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takatsuki Hanae, Imamura Morikazu, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Pentosan polysulfate induces low-level?persistent prion infection keeping measurable?seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12049-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imamura Morikazu, Tabeta Naoko, Iwamaru Yoshifumi, Takatsuki Hanae, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 613
2. 論文標題 Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 67～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Uchiyama Keiji, Hara Hideyuki, Chida Junji, Pasiana Agriani Dini, Imamura Morikazu, Mori Tsuyoshi, Takatsuki Hanae, Atarashi Ryuichiro, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Ethanolamine Is a New Anti-Prion Compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11742～11742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ubagai Kaori, Fukuda Shigeo, Mori Tsuyoshi, Takatsuki Hanae, Taguchi Yuzuru, Kageyama Soichi, Nishida Noriyuki, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 526
2. 論文標題 Discrimination between L-type and C-type bovine spongiform encephalopathy by the strain-specific reactions of real-time quaking-induced conversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1049～1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagaki Takehiro, Ishibashi Daisuke, Mori Tsuyoshi, Miyazaki Yukiko, Takatsuki Hanae, Tange Hiroya, Taguchi Yuzuru, Satoh Katsuya, Atarashi Ryuichiro, Nishida Noriyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Administration of FK506 from Late Stage of Disease Prolongs Survival of Human Prion-Inoculated Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-020-00870-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森 剛志、今村 守一、高月 英恵、井口 洋美、大野 美奈子、新 竜一郎
2. 発表標題 ヒトグリオーマ細胞におけるプリオン感染動態の解析
3. 学会等名 第68回に本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	佐藤 克也  (SATOH Katsuya)  (70398147)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学科)・教授   (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------