

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07417

研究課題名(和文) 蛋白増幅法の検出法をベースとした神経変性疾患を鑑別できる新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of new biomarkers that can distinguish neurodegenerative diseases based on the detection method of protein amplification assay

研究代表者

佐藤 克也 (Sato, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号：70398147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患は、特定の神経系が侵され、神経細胞を中心に退行性変化を呈する疾患群である。その原因は異常蛋白の蓄積にあり、正常には分解されずに凝集体を形成する。生体材料から異常蛋白を検出できれば、新たな診断法となりえる。本研究では、異常蛋白増幅法を利用して神経変性疾患患者の生体材料から疾患特異的な異常蛋白を検出することを目指した。シヌクレインQUIC法を用いて脳組織や髄液中のシヌクレイン、TDP-43 QUIC法でTDP-43の検出に成功した。一方、3Rタウと4Rタウを鑑別検出する系の確立を試みたが、成功していない。生体材料からの異常蛋白検出には実用化に向けてはさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の症状や画像所見に加え、異常蛋白を検出できればより早期の段階で神経変性疾患を診断できる。早期診断により、症状の進行を遅らせたり、QOLを維持したりできる。又異常蛋白の種類や蓄積レベルを定量評価できれば、個々の疾患の発症メカニズムや病態をより深く理解できる。これは新しい治療法の開発につながる。さらに、異常蛋白をバイオマーカーとして用いれば、新薬の有効性評価が正確になり、有望な治療法の臨床開発が促進される。生体材料からの検査は比較的侵襲が少なく簡便であり、検出法が実用化されれば広く普及する。このように異常蛋白検出技術の確立は神経変性疾患の診断・治療の向上に寄与し、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative diseases involve progressive neurodegeneration due to abnormal protein accumulation. This study explored diagnostic approaches by developing amplification techniques to detect disease-specific abnormal proteins in patient samples. Quantitative assays measuring pathological α -synuclein in brain/cerebrospinal fluid (synuclein QUIC) and abnormal TDP-43 (TDP-43 QUIC) were successfully established. In parallel, efforts focused on differentiating 3R/4R tau isoforms, key in tauopathies, but discriminating them proved challenging despite using recombinant tau proteins and assessing amyloid formation. While promising for diagnosis, further optimization and validation are needed before clinical implementation of detecting abnormal protein conformers in biofluids. Reliably identifying disease-specific proteinopathies could complement symptom-based and imaging diagnostics.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経変性疾患 QUIC シヌクレイン TDP-43 タウ蛋白

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患とは、それぞれ特有の領域の神経系統が侵され、神経細胞を中心とする様々な退行性変化を呈する疾患群であり、その多くは神経変性疾患で蓄積するタンパク質が構造異常をおこしている。通常はタンパク質が正しい立体構造をとる過程を折りたたみ（いわゆるフォールディング）と呼ばれているが、神経変性疾患で異常な構造のタンパク質が原因となる一群の疾患をコンフォメーション病と名づけられた。異常なタンパク質は不溶性となり、塊をつくり、沈殿する。これは封入体形成タンパク質の性質そのものであり、神経変性疾患は代表的なコンフォメーション病といえる。異常蛋白はタンパク分解酵素で分解されずにミスフォールドタンパク質として凝集を形成する（図1）。この凝集はアミロイドと呼ばれるが、凝集はランダムではなく、規則的にミスフォールドタンパク質が集合してアミロイド線維を形成する。典型的にアミロイド（A）ペプチドやプリオン蛋白で見られるように、ミスフォールドタンパク質がシート構造をとることがアミロイド線維形成の鍵である。神経変性疾患の原因であるアミロイド線維を検出することが診断に有用であり、このアミロイド線維の形成阻害やアミロイド線維の分解が治療につながる。すでにこの理論に基づきいろいろな診断法や治療法の開発が試みられている。

現在まで神経変性疾患の診断法は臨床症状と画像診断のみである。しかし髄液を含めた生体材料から異常蛋白を検出する事が可能となれば第3の神経変性疾患の診断法となりえる。

2. 研究の目的

本研究課題は神経変性疾患患者の髄液を含んだ生体材料からの原因物質の検出を目的とする。パーキンソン病(PD)及びレビー小体型認知症(DLB)の原因である α -シヌクレイン蛋白、筋萎縮性側索硬化症やピック病の原因であるTDP-43蛋白、神経変性疾患の一部であるタウオパチーの原因であるタウ蛋白(3Rタウと4Rタウ)の4つの蛋白検出の開発を主体とする。

3. 研究の方法

本研究の方法で成功する上でキーポイントはリコンビナント蛋白の精製とQUICする条件(PH、温度、NaCl濃度)である。まずは2年間でリコンビナント蛋白の精製法の確立に当てる。具体的には、以下の3つの方針に沿って進める。

1. シヌクレインを用いた異常シヌクレイン検出法の確立

ヒトシヌクレイン遺伝子のクローニングを行い、大腸菌発現ベクターに組み入れる。次に大腸菌での大量合成と蛋白精製を行う。種々の条件下でシヌクレイン蛋白の構造変換、アミロイド形成を観察する。レビー小体存在下、非存在下でのアミロイド形成反応を比較し、異常シヌクレイン検出系を完成する。申請者はすでにプリオン病を含む多様な認知症状を呈する神経疾患の髄液検体を5000人分以上保管しており、本検査を当教室にて施行する。

2. TDP-43を用いた異常型TDP-43検出法の確立

ヒトTDP-43遺伝子のクローニングを行い、大腸菌発現ベクターに組み入れる。大腸菌での大量合成と蛋白精製を行う。又TDP-43患者脳をbrain bankより入手し、超遠心法により異常型TDP-43の精製を行う。さらに種々の条件下でTDP-43蛋白の構造変換、アミロイド形成を観察す

る。TDP-43 存在下・非存在下でのアミロイド形成反応を比較し、異常 TDP-43 検出系を完成する。

3. タウ蛋白を用いた3Rタウ蛋白と4Rタウ蛋白の検出法の確立と鑑別

ヒトタウ遺伝子のクローニングを行い、大腸菌発現ベクターに組み替えを行う。腸菌での大量合成と蛋白精製を行う。精製したヒトタウ蛋白の構造を解析する。3R タウ検出用のリコンビナント蛋白と4R タウ検出用のリコンビナント蛋白は構造と蛋白発現が全く異なる。そのため2種類のタウ蛋白の精製が必要である。種々の条件下でタウ蛋白の構造変換、アミロイド形成を観察する。タウ蛋白存在下、非存在下でのアミロイド形成反応を比較し、異常化した3R タウ蛋白と4R タウ蛋白検出系を完成する。

4. 研究成果

シヌクレイン QUIC 法を利用し、脳組織における シヌクレイン QUIC 法の定量法の確立を行い、成功した。一方髄液についても シヌクレイン QUIC 法の定量法の確立を行い、成功した。

又ヒト TDP-43 QUIC 法を利用し、TDP-43 **プロテノパチー**脳組織における TDP-43 QUIC 法の定量法の確立を行い、成功した。一方髄液についても DP-43 QUIC 法の定量法の確立を行い、成功した。

一方タウ蛋白を用いた 3R タウ蛋白と 4R タウ蛋白の検出法の確立と鑑別する系の確立を行った。ヒトタウ遺伝子のクローニングを行い、大腸菌発現ベクターに組み替えを行った。大腸菌での大量合成と蛋白精製を行った。R タウ検出用のリコンビナント蛋白と 4R タウ検出用のリコンビナント蛋白は構造と蛋白発現が全く異なるため 2 種類のタウ蛋白の精製が必要であった。タウ蛋白存在下、非存在下でのアミロイド形成反応を比較し、異常化した 3R タウ蛋白と 4R タウ蛋白検出系を行った。しかしながらこの系の確立は極めて難しく確立には至らなかった。

この研究により、シヌクレイン、TDP-43、タウ蛋白など、様々な異常蛋白の高精度な検出法が確立された。これらの検出法は、レビー小体型認知症、TDP-43 プロテノパチー、タウオパチーといった疾患の早期発見と適切な治療介入を可能にすると期待される。さらに、疾患の発症から進行に至る分子メカニズムの解明にも役立ち、新規治療薬の効率的な探索を促進するだろう。また、疾患モデル動物における病態評価や前臨床試験にも活用される。加えて、複数の異常たんぱく質が関与する複合型認知症の正確な病態把握と、症状に応じた層別化治療の実現にも道を拓くことができるはずである。

今後の課題としては、検出系のさらなる高感度化、複数の異常たんぱく質を同時に定量する手法の確立、3R タウと 4R タウを識別する検出法の開発などが挙げられる。しかし、これらの着実な研究の進展により、認知症における革新的な診断法と治療法の確立に大きく貢献できると強く期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Satoh K.	4. 巻 155
2. 論文標題 CSF biomarkers for prion diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 105306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8354-21.	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 Hamada Y, Deguchi K, Tachi K, Kita M, Nonaka W, Takata T, Kobara H, Touge T, Satoh K, Masaki T	4. 巻 61(17)
2. 論文標題 Significance of Cortical Ribboning as a Biomarker in the Prodromal Phase of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2667-2670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8354-21.	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 Matsubayashi T, Akaza M, Hayashi Y, Hamaguchi T, Satoh K, Kosami K, Ae R, Kitamoto T, Yamada M, Shimohata T, Yokota T, Sanjo N.	4. 巻 437
2. 論文標題 Specific electroencephalogram features in the very early phases of sporadic Creutzfeldt -Jakob disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 120265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2022.120265.	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 Suzuki Y, Sugiyama A, Muto M, Satoh K, Kitamoto T, Kuwabara S.	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Early Diagnosis of V180I Genetic Creutzfeldt-Jakob Disease at the Preserved Cognitive Function Stage.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus.	6. 最初と最後の頁 e23374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.23374.	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 T, Kaneko M, Satoh K., Murai K, Saiki K, Matsumoto G, Ogami-Takamura K, Ikematsu K, Akagi A, Iwasaki Y, Tsurumoto T, Nishida N.	4. 巻 386(23)
2. 論文標題 Detection of Prions in a Cadaver for Anatomical Practice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 N Engl J Med.	6. 最初と最後の頁 2245-2246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMc2204116.	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 Yasuda M, Sugiyama A, Hokkoku H, Suichi T, Ito K, Satoh K, Kitamoto T, Kuwabara S.	4. 巻 99(16)
2. 論文標題 Propagation of Diffusion-Weighted MRI Abnormalities in the Preclinical Stage of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology.	6. 最初と最後の頁 699-702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000201221.	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 Hamada S, Takahashi-Iwata I, Satoh K, Kitamoto T, Mizusawa H, Moriwaka F, Yabe I.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Genetic CreutzfeldtJakob disease with 5-octapeptide repeats presented as frontotemporal dementia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-023-00237-w.	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 Muroga Y, Sugiyama A, Mukai H, Hashiba J, Yokota H, Satoh K, Kitamoto T, Wang J, Ito S, Kuwabara S.	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Cerebral cortex swelling in V180I genetic Creutzfeldt- Jakob disease: comparative imaging study between sporadic and V180I genetic Creutzfeldt-Jakob disease in the early stage.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Prion.	6. 最初と最後の頁 105-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336896.2023.2197809.	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 Satoh Katsuya	4. 巻 155
2. 論文標題 CSF biomarkers for prion diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105306 ~ 105306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105306	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 Hamada Yasuhiro, Deguchi Kazushi, Tachi Kisaki, Kita Makoto, Nonaka Wakako, Takata Tadayuki, Kobara Hideki, Touge Tetsuo, Satoh Katsuya, Masaki Tsutomu	4. 巻 2
2. 論文標題 Significance of Cortical Ribbing as a Biomarker in the Prodromal Phase of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8354-21	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 Dong Thi-Thu-Trang, Akagi Akio, Nonaka Toshiaki, Nakagaki Takehiro, Mihara Ban, Takao Masaki, Iwasaki Yasushi, Nishida Noriyuki, Satoh Katsuya	4. 巻 159
2. 論文標題 Formalin RT-QuIC assay detects prion-seeding activity in formalin-fixed brain samples from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105504 ~ 105504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105504	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 Dong Thi-Thu-Trang, Satoh Katsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 The Latest Research on RT-QuIC Assays. A Literature Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 305 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10030305	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 Peter Hermann, Brian Appleby, Jean-Philippe Brandel, Byron Caughey, Steven Collins, Michael D Geschwind, Alison Green, Stephane Haik, Gabor G Kovacs, Anna Ladogana, Franc Llorens, Simon Mead, Noriyuki Nishida, Suvankar Pal, Piero Parchi, Maurizio Pocchiari, Katsuya Satoh, Gianluigi Zanusso, Inga Zerr	4. 巻 20
2. 論文標題 Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Lancet Neurology	6. 最初と最後の頁 235 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1474-4422(20)30477-4	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 該当する

1. 著者名 Fujita Hiroaki, Ogaki Keitaro, Shiina Tomohiko, Onuma Hiroki, Sakuramoto Hirotaka, Satoh Katsuya, Suzuki Keisuke	4. 巻 100
2. 論文標題 V180I genetic Creutzfeldt-Jakob disease with cardiac sympathetic nerve denervation masquerading as Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e24294 ~ e24294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000024294	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤克也
2. 発表標題 非公開プリオン病患者からのホルマリン固定脳からのプリオン活性の検出.
3. 学会等名 第63回日本神経学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克也
2. 発表標題 プリオン病患者の脳のホルマリン固定・ギ酸処理によるプリオン活性の変化
3. 学会等名 第26回日本神経感染症学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克也
2. 発表標題 プリオン病の早期診断と治療薬開発
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会・第37回日本老年精神医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克也
2. 発表標題 プリオン病患者脳ホルマリン固定・ギ酸処理によるプリオン活性の変化
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会・第37回日本老年精神医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克也
2. 発表標題 プリオン病 再考 早期診断の視点から.
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会・第37回日本老年精神医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 克也
2. 発表標題 プリオン病の腰椎穿刺と脳脊髄液マーカー
3. 学会等名 第36回日本老年精神医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤羽寅彦, 佐藤克也
2. 発表標題 ヒトプリオン病の患者の髄液中のバイオマーカー解析
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克也
2. 発表標題 経動脈的な投与による急性脳梗塞に対する骨髄間葉系細胞治療法の確立
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克也
2. 発表標題 プリオン病のup to date
3. 学会等名 第25回日本神経感染症学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克也
2. 発表標題 ヒトプリオン病の患者の髄液中のバイオマーカーの解析
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学 佐藤研究室
<http://www2.am.nagasaki-u.ac.jp/prion-cjd/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------