

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300127

研究課題名(和文) 遺伝性プリオン病を対象とした病態機構の解明と克服への展開

研究課題名(英文) Sensitive detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases

研究代表者

新 竜一郎(ATARASHI, Ryuichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：90452846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトプリオン病においてプリオンタンパク(PrP)遺伝子変異による遺伝性は十数%を占める。本研究では遺伝性プリオン病であるGSS(P102L変異)20例、FFI(D178N変異)12例、遺伝性CJD(E200K変異)22例について、我々が以前開発した高感度異常型PrP増幅検出法であるRT-QUIC法により髄液検査を行ったところいずれも80%前後以上の感度を示し、臨床的に有用性が高いことを確認した。さらに免疫抑制剤であるFK506がオートリソソーム系を活性化して異常型PrPの分解を促進し、予防・治療的效果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The genetic form of human Prion diseases (gPrD) is caused by mutations in the prion protein gene. We recently developed a highly sensitive amplification technology, designated real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC). In this study, we evaluated RT-QUIC assay in patients with gPrD, as a diagnostic tool. The detection sensitivities of RT-QUIC were as follows: GSS(78%), FFI(100%), gCJD E200K(87%). In contrast, the detection sensitivities of biomarkers were considerably lower: GSS(11%), FFI(0%), gCJD E200K(73%). Thus, RT-QUIC had a much higher detection sensitivity compared with testing for biomarkers. Moreover, we evaluated the effect of FK506 on prion infection, using cell culture and animal models. We found that FK506 reduced PrPSc and increased the formation of autolysosome in prion-infected cells. The survival periods in prion-inoculated mice were significantly increased when FK506 was administered. These findings show that FK506 could constitute a novel anti-prion drug.

研究分野：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患 遺伝性プリオン病

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は感染性病原体プリオンによって引き起こされる致死性の神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病(CJD)、ヒツジのスクレイピーなどが代表的な疾患である。病原体プリオンはおそらくは単一のタンパク質である異常型Prion protein (PrP)のみから構成されている、とするタンパク単独仮説が提唱されている。

異常型PrPは、主に神経系に発現している正常型PrPが構造上変化したもので、異常型と正常型PrPではアミノ酸配列に違いはなく、その立体構造のみが異なっている。正常型は α -helix構造を多く含み、可溶性で柔軟な構造をしているが、異常型は β -sheet含量が高く、凝集しやすく不溶性、蛋白分解酵素処理に抵抗性などの性質を持つ。遺伝性プリオン病ではPrP遺伝子の変異により、正常型の構造がわずかにほぐれ、長時間の後に異常型への構造変化が自然に誘導されると考えられている。しかし、PrP遺伝子変異が実際にどのように異常型PrP生成に結びつくか、その構造変換プロセスの詳細についてはわかっていない。

我々は、異常型PrP高感度試験管内増幅法(RT-QUIC法: Real-time quaking-induced conversion)の開発に成功し、プリオン患者髄液中の微量な異常型PrPを検出可能であることを証明した(Atarashi R et al. *Nature Medicine* 2011)。このRT-QUIC法を用いて、陰性コントロールを含む100例以上の髄液を検査した結果、ヒトの弧発性CJDを感度80%以上、特異度100%で診断可能であった。すなわち今まで脳生検が必要であったCJDの生前の確定診断が、髄液採取により可能であることが示された。本研究ではこのRT-QUIC法を、遺伝性プリオン病にも適用できるようさらなる検討を行う。遺伝性プリオン病としてはP102L変異のGerstmann-Straussler syndrome (GSS)、E200K変異による遺伝性CJD、D178N変異によるFatal Familial Insomnia (FFI)などが代表的である。

遺伝性プリオン病は弧発性と異なり、遺伝子変異ごとの浸透率から発症予測が可能であるため、浸透率の高いものについてはかなり早期から予防・治療を開始することができるという利点がある。しかし、感染性プリオン病動物モデルにおいて予防・治療効果のある薬剤の報告例は増えているが、発症までの期間(潜伏期)をある程度伸ばす程度であり、遺伝性プリオン病に対する予防・治療法の開発は進んでいないのが現状である。その目的の

ために遺伝性プリオン病のモデルマウスを作製し、解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究ではプリオン病、主に遺伝性プリオン病を標的として、以下に掲げる項目についての研究を行う。

髄液を検体とした試験管内異常型プリオンタンパク(PrP)増幅法(RT-QUIC法)による遺伝性プリオン病診断への有用性を検証する。

遺伝性プリオン病モデルマウスの作製とその解析とそのマウスに対するプリオン病に対する新規発症予防・治療法の開発

3. 研究の方法

(1) RT-QUIC法は、異常型PrPを増幅反応のシード(核)として用いて、リコンビナントPrP(rPrP)の凝集(アミロイドフィブリル形成)反応を連続的に試験管内で行わせ、検体中の異常型PrPを増幅して検出するという方式である。このRT-QUIC法を用いると、サンプルが多数の場合でも非常に簡便に、かつreal-timeに測定可能なシステムを構築することが可能である。本研究ではPrP遺伝子のP102L変異によるGerstmann-Straussler syndrome (GSS)、V180I変異による遺伝性CJD、E200K変異による遺伝性CJD、D178N変異によるFatal Familial Insomnia (FFI)など何種類かの遺伝性プリオン病患者由来髄液検体を用いて、RT-QUIC法を行い、どの程度の感度・特異度があるかどうかを検証した。

(2) ヒト配列PrPに遺伝子変異を導入したTgマウスは自然には発症しないことが報告されている。この原因は不明であるが、一つの可能性としてPrPのC末端側に共有結合しているGPIアンカーの影響が考えられる。そこでGPIアンカーのシグナル配列を欠損させ細胞外へ分泌されるようにした変異PrP-Tgマウスを作製し、検証する。実際、GPIアンカーのないマウス配列PrP-Tgマウスではプリオン感染により野生型マウスでは見られない細胞外に巨大な異常型PrPのアミロイド斑を形成することが報告されており、GPIアンカーの有無が病態像に影響することが示されている。P102L変異によるGSSでも異常型PrPのアミロイド斑を形成することが知られており、このGPI欠損P102L変異PrP-Tgマウスが自然発症するかどうか興味を持たれる。また同じ変異PrPを持つがGPIアンカーを持つものと持たないTgマウス同士を掛

け合わせたダブル Tg マウスも作製し、その両者が同一細胞に発現する場合の影響について観察する。

(3) 免疫抑制剤である FK506 (別名 tacrolimus) は FKBP に結合し、カルシニューリンの活性を阻害することが知られている。我々は FK506 が Autolysosome 系を活性化して異常型 PrP の分解を促進するのではないかと仮説を立て、以下の実験を行った。まずプリオン感染培養細胞に FK506 を添加して異常型 PrP が減少するかどうか検討した。次にプリオン感染マウスに FK506 を投与して予防・治療効果がみられかについても解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝性プリオン病である GSS(P102L 変異)20 例、FFI (Fatal familial Insomnia、D178N 変異) 12 例、遺伝性 CJD (E200K 変異) 22 例について、我々が以前に開発した高感度異常型 PrP 増幅検出法である、RT-QUIC 法により髄液検査を行った。その結果、P102L 変異例では 90% (18/20)、D178N 変異例では 83.3% (10/12)、E200K 変異例では 81.8% (18/22) の感度であった。同時に行った髄液の生化学的マーカーである T-tau protein や 14-3-3 に比べ、とくに P102L 変異例、D178N 変異例では RT-QUIC 法の感度は顕著に高かったのに対して、E200K 変異例では同等レベルであった。この結果は、RT-QUIC 法による髄液検査は遺伝性プリオン病においても有用性が高いことを示している。

(2) 上記研究方法で述べた遺伝性プリオン病モデルマウス (P102L 変異を導入した GPI アンカー (+) と (-) の 2 種類のヒト PrP 配列トランスジェニックマウス) を作製した。現在遺伝的背景を PrP 遺伝子ノックアウトマウスに置き換えている途中であるが、遺伝的背景が野生型のマウスでも GPI アンカー (-) の Tg マウスでは失調歩行や脊柱後彎、体重減少といった症状が見られており、現在解析を進めている。

(3) 本研究により免疫抑制剤である FK506 は、Autolysosome 系を活性化し、プリオン感染細胞に蓄積する異常型 PrP を減少させることを初めて明らかにした。さらにプリオン感染モデルマウスに FK506 を投与すると潜伏期が延長するとともに、それらのマウス脳においてオートファジー関連遺伝子が活性化し、異常型 PrP の蓄積が遅延した。これらの結果は FK506 がプリオン病などの神経変性疾患において蓄積する凝集タンパク質を、

Autolysosome 系を活性化することにより分解を促進し減少させ、神経変性の進行を遅らせる可能性を示すものである。

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 12 件)

1. Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R. Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein. *Prion*, 8(3), 2014. 査読有
2. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep*, 4:6006, 2014. 査読有
3. Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol*, 88(20), 11791-801, 2014. 査読有
4. Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open*, 16;4(5):e004968, 2014. 査読有
5. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep*, 4:4504, 2014. 査読有
6. Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early Detection of Abnormal Prion Protein in Genetic Human Prion Diseases Now Possible Using Real-Time QUIC Assay. *PLoS One*, 8(1): e54915, 2013. 査読有

7. Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. PLoS One, 8(4):e60627, 2013. 査読有
8. Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. Autophagy, 9(9), 1386-94, 2013. 査読有
9. Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. Prion, 6(5):443-6, 2012. 査読有
10. Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J Immunol, 189(4): 1540-1544, 2012. 査読有
11. Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. J Virol, 86(9): 4947-4955, 2012. 査読有
12. Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. BMJ Open, 2(1): e000649, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

1. Atarashi R. Clinical usefulness of the in vitro amplification of prion amyloid formation. JSPS Japan Hungary Joint Seminar, 2014年11月18-20日, 大阪大学(大阪)
2. 新竜一郎, 祖母井香織, 福田茂夫, 西田教行. 異常型プリオンタンパク試験

管内増幅法(Real-time QUIC法)によるプリオン株鑑別診断法の開発と分子機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月22-24日, パシフィコ横浜(横浜)

3. Sano K, Atarashi R, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. Prion2014, May 27-30, 2014. Trieste (Italy)
4. Nakagaki T, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autophagolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. Prion2013, May 26-29, 2013. Banff (Canada)
5. 高月英恵, 新竜一郎, 佐野和憲, 佐藤克也, 西田教行. RT-QUIC法を用いたヒトプリオンサンプル中の Seeding Activityの測定. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月14-16日, 福岡国際会議場(福岡)
6. 祖母井香織, 新竜一郎, 西田教行. プリオン蛋白の構造安定性に対する金属イオンの影響. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月13-15日, 大阪国際会議場(大阪)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 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・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：90452846

(2)研究分担者

なし()

研究者番号：

(3)連携研究者

西田 教行.(NISHIDA, Noriyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40333520

佐藤 克也.(SATO, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70398147