

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26461507

研究課題名(和文) プリオン高感度検出法を用いたヤコブ病タイプ鑑別診断法の開発とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Development of useful method in differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob diseases

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病の一つである孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)はタイプにより予後の進行状況が異なる。本研究は孤発性CJDのタイプ分けを早期に鑑別可能とするパネルRT-QUIC法を構築するために行った。RT-QUIC法は、基質としてリコンビナントPrP(recPrP)を要するが、RT-QUIC法はこのrecPrPの配列に依存すると考えられている。そこで様々な変異recPrPを構築し、それを用いてQUIC法を試みた。その結果、リコンビナントやプログラム条件により、個々の脳乳剤間でわずかではあるがQUIC法感受性に様々な違いがみられた。

研究成果の概要(英文)：Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD), a majority of human prion diseases, is classified in different subtypes which contribute to the occurrence of distinct clinical-pathological phenotypes. In this study, we sought to determine whether a modification of real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC) assay, a sensitive diagnostic test for prion diseases, allows for distinguish between subtypes of sCJD. We constructed a several different types of recombinant prion protein (recPrP) mutant as a substrate for RT-QUIC reaction. We compared the prion detective sensitivities of RT-QUIC reaction with mutant recPrPs. RT-QUICs were performed with brain homogenates from several types of prion disease patients or infected mice. As a result, there were slightly differences in RT-QUIC signals between specimens by using mutant recPrP as substrate.

研究分野：分子生物学

キーワード：パネルRT-QUIC法 孤発性CJD

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む先進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やレビー小体型認知症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。

ヒトプリオン病はその病因の違いにより、遺伝性・獲得性・孤発性に分類される。遺伝性は、プリオン病の重要因子であるプリオン蛋白 (PrP) 遺伝子の変異により引き起こされる。獲得性は、硬膜移植等による医源性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) や牛海綿状脳症由来からの伝播が考えられる変異型 CJD が含まれる。孤発性 CJD は、ヒトのプリオン病の 75%以上を占めるが、未だ原因は不明である。

PrP のアミノ酸配列は種によって一部異なり、また同一種内でも遺伝的多型性が存在する。ヒトではコドン 129 番目のメチオニン (M) あるいはバリン (V) の多型があり、CJD の病理像に影響することが報告されている。また異常型 PrP の電気泳動パターンには 2 つのタイプ (type1, type2) があることから、孤発性 CJD は、少なくとも 6 種類 (MM1, MM2, MV1, MV2, VV1, VV2) に分類され、病気の進行速度・生存期間に大きな違いがある。またこれまでの研究から上記のタイプの違いにより治療効果が大きく異なることも予測される。分類を決定するためには、遺伝子検査による PrP 配列の決定 (MM, MV 又は VV) と PrP 抗体を用いた Western blot 解析による脳組織中の異常型 PrP の型判断 (type1, type2) が必要である。従って通常、死後病理解剖が行われない限り、分類は確定せず、推測レベルにとどまる。そのため、発症早期にタイプ (病理型) も含めて孤発性 CJD を正確に診断することが臨床現場から切望されている。

## 2. 研究の目的

現在プリオン病の診断法としては、髄液バイオマーカー、脳波、MRI 等があり、鑑別診断にはそれなりに有効ではあるが、確定診断には至らない。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異常型 PrP の直接的な証明に頼らざるを得ないのが現状である。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、採取のより容易な髄液中にごくわずかに存在する異常型 PrP の検出を試みたところ、孤発性 CJD を感度 80%以上で診断可能であった (Atarashi et al.2011 Nature Medicine)。現在、研究分担者である佐藤克也が中心となり国内外におけるプリオン病の髄液検査を実施しており、RT-QUIC 法も中心的な検査として含まれている。しかしながら現時点では、RT-QUIC 法は孤発性 CJD のタイプを見分けることはできない。

そこで本研究では、プリオン病 (特に孤発性 CJD) のタイプ分けを可能とする RT-QUIC 法を開発することを目的とする。RT-QUIC 法は基質としてリコンビナント PrP (recPrP) を用いるが、ここでは様々な変異を加えた recPrP を構築し、これら複数の変異型 recPrP を用いて RT-QUIC を同時に行う (パネル RT-QUIC 法)。各々のプリオン株 (タイプ) に対する RT-QUIC 法における反応性の違いを網羅的に測定する。それらのうち特に日本に多いとされる MM1 と MM2 で顕著な違いを示す変異型 recPrP の組み合わせを見出すことができれば、両者を見分けることが可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 様々な変異リコンビナント PrP (recPrP) の精製

全長 RecPrP (ヒト、マウス、ハムスター、ウシ) はすでに有している。本研究では、一つのアミノ酸残基を置換させた recPrP (一アミノ酸置換型 recPrP) や数アミノ酸残基を欠失させた recPrP (アミノ酸欠失型 recPrP) の構築を試みた。一アミノ酸置換型 recPrP の候補としては、プリオン感染細胞を用いた解析においてマウス順応スクレイピーの 2 つの株 (Chandler 株と 22L 株) で株特異的な変換反応を示した変異体を基にした recPrP の構築を試みた。アミノ酸欠失型 recPrP は、N 末端側からの欠失型及び C 末端側からの欠失型の構築数種類を試みた。構築した recPrP は、大腸菌に大量発現させた後、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

### (2) 上記方法により精製した種々の recPrP を基質とした RT-QUIC 法: プリオンタイプ間の反応性の違いの解析

種々の recPrP を QUIC 反応基質とし、様々なプリオン株由来脳乳剤の希釈系列 (例えば  $10^{-5} \sim 10^{-9}$ ) を反応シードとして RT-QUIC 法を行い、反応性に違いがないかを解析した。

我々が保有しているマウスプリオン株 (Chandler 株と 22L 株) や BSE 株を用いた場合の株間の反応性の違いについても検証した。

(3) CJD 患者髄液を検体とした RT-QUIC 法の実施

研究分担者である佐藤は、国内外のプリオン病の髄液検査を行っており、CJD を含む様々な脳疾患患者の髄液を保存している。それらの検体の一部 (陰性コントロールと CJD の MM1、MM2) を用いて (1)(2) により得られた結果を基に RT-QUIC 法を行った。

#### 4. 研究成果

(1) **一アミノ酸置換型 recPrP については、デザインした 4 種全てを構築・精製した。アミノ酸欠失型 recPrP については、N 末端側からの欠失型 4 種及び C 末端側からの欠失型 2 種を精製した。** 欠失型 recPrP については、構築は可能であったが精製は不可な変異体 recPrP が存在した (詳細・機序についてはさらなる研究が必要である)。

(2) **一アミノ酸置換型 recPrP を用いて RT-QUIC 解析を行ったところ、プリオン株間 (特に動物種) においてわずかではあるが QUIC 反応に違いが得られた。** アミノ酸欠失型 recPrP を用いて RT-QUIC 解析を行ったところ、**個々の脳乳剤間で様々な QUIC 反応が得られた** (詳細について検討中)。

(3) **一アミノ酸置換型 recPrP を用いた RT-QUIC 解析においては、検体間で目立った反応の違いはみられなかった** (現在、QUIC 反応の条件の最適化を検討している。また、アミノ酸欠失型 recPrP においても最適条件を検証している)。

本研究課題において、連携研究者である新が開発した微量異常型 PrP 凝集体検出法 (RT-QUIC 法) のさらなる発展性を期待できる結果が得られた。RecPrP の違いによりわずかではあるが様々な QUIC 反応が得られた。今後、最適な QUIC 反応条件を決定づけることによりその差を顕著にしていくことが最重要課題である。そのために、さらに細かく欠失させた recPrP を設計・構築した。今後、これらの recPrP を大量精製し、様々な CJD タイプの脳乳剤に対する QUIC 反応に用いることでどのような結果が得られるかを検討する。最終的には、孤発性 CJD のタイプを診断可能とする組み合わせ (パネル RT-QUIC 法) を導き出す。さらに、本研究課題により得られた反応の違いにどのような意義があるか

を検討することにより、プリオン病における PrP 凝集体形成機序だけでなく、発症機序解明への一步に近づける可能性も秘めている。今後、これら異なる反応の重要性について深く検討していく予定である。

#### 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 5 件)

Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Nakagaki T, Ishibashi D, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Nishida N. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. Sci Rep. 6: 24993, 2016. 査読有り doi: 10.1038/srep24993

Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-Seeding Activity Is widely Distributed in Tissues of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. EBioMedicine. pii: EBioMedicine. 12:150-155. 2016. 査読有り doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.033

Nakano Y, Akamatsu N, Mori T, Sano K, Satoh K, Nagayasu T, Miyoshi Y, Sugio T, Sakai H, Sakae E, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Fujita Y, Yanagihara K, Nishida N. Sequential washing with electrolyzed alkaline and acidic water effectively removes pathogens from metal surfaces. PLoS One. 11(5):e0156058, 2016. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0156058

Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. Rapid and Quantitative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases. PLoS One. 10(6):e0126930, 2015. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0126930

Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Mori T, Satoh K, Atarashi R,

Nishida N. Ubiquitin-specific protease 14 modulates degradation of cellular prion protein. Sci Rep. 5:11028, 2015. 査読有り doi: 10.1038/srep11028

〔学会発表〕(計 3件)

Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi, Hanae Takatsuki, Katsuya Satoh, Takehiro Nakagaki, Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida. "Wire-QuIC": a new detection system of human prion. PRION 2016 TOKYO. 2016/5/10 ~ 13. Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building (Tokyo)

Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh, Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Noriyuki Nishida. Wire-QuIC reaction can detect abnormal human prion seeds from contaminated stainless steel-wire. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2016/10/23~25. 札幌コンベンションセンター (Sapporo, Hokkaido)

森剛志、新竜一郎、佐藤克也、石橋大輔、中垣岳大、高月英恵、布施隆行、宮崎幸子、西田教行。ステンレスワイヤーを用いた新規のプリオン検出法 (Wire-QuIC法)。The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2015/11/22~24. 福岡コンベンションセンター (Fukuoka, Fukuoka)

〔図書〕(計 0件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

無し

取得状況 (計 0件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/about/1410/>

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

新 竜一郎 (ATARASHI Ryuichiro)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号: 90452846

(4) 研究協力者

無し