

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670435

研究課題名(和文) 視床型CJDは、FFI(致死性家族性不眠症)の孤発例と考えてよいのか？

研究課題名(英文) Is thalamic CJD a sporadic form of fatal familial insomnia?

研究代表者

北本 哲之(Kitamoto, Tetsuyuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20192560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 視床型CJDが遺伝性でプリオン蛋白遺伝子のコドン178変異を有するFFIの孤発型と同等なのかをヒトのPrPのFFI変異遺伝子を導入したノックインマウスを用いて感染実験を行い、その同等性を検討しようとして計画したものである。感染実験の結果、従来のMM1, VV2, MM2Cとは全く異なる感染性を示し、今観察中のFFI型ノックインマウスの結果ができれば、完全な結論が得られる予定である。

さらに、典型的な視床型CJDのMM2T症例だけでなく、MM1+2症例のなかに下オリーブ核の神経細胞脱落を有する症例を3例同定した。当初目論んだ以上に研究が大きく発展している。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study is to clarify the same infectivity between thalamic form of Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. For this purpose, we did the transmission experiments with humanized prion protein knock-in mouse. Thalamic form prions showed a unique infectivity, and this infectivity was quite different from the MM1, MV2, VV2, or MM2C prions. The result of Ki-178N mice transmission experiment, which is now on-going study, will lead to the conclusion of this study.

In addition to the transmission experiments, we were looking for the cases with MM1 and MM2T prions. We found 3 cases with MM1+2T showing neuronal loss of inferior olivary nucleus. We also have a planning to transmit these MM1+2T cases using humanized knock-in mouse.

研究分野：脳神経科学

キーワード：プリオン FFI ノックインマウス 感染実験

1. 研究開始当初の背景

視床型 CJD は、CJD としては非典型的経過を取ることが多く、欧米と比べてわが国で頻度が高い孤発性 CJD の 1 つのタイプである。視床型 CJD は、その病理像の類似点から FFI (fatal familial insomnia) の孤発症例と考えられているが、ウエスタンブロットでは、タイプ 2 の PrPres (蛋白分解酵素抵抗性プリオン蛋白) を示しながら視床型 CJD と FFI では糖鎖パターンが異なっている。我々は、初めて FFI が感染性であることを示した (Tateishi et al. Nature, 1995)、そしてその確認は翌年他のラボからも報告された (Science, 1996)。しかしながら、視床型 CJD の感染実験は、我々を含めても一部のラボで行われているに過ぎない (Taguchi et al. Am J Pathol, 2003, Moda et al. Brain Pathol, 2012)。このような従来の感染実験では、FFI と thalamic CJD の感染結果は似ているものの、同じプリオンと考えてよいのかという決定的な証拠が得られていないのが現状である。

この問題点を克服すべく、プリオン感染のトレーサビリティを利用するためにヒト FFI 変異を導入したノックインマウスを作製した。プリオン感染のトレーサビリティとは感染性の特徴がプリオン蛋白のシーケンスを越えても (種を超えても) 保たれていることである。

2. 研究の目的

当初の研究目的は、FFI 型の遺伝子導入したノックインマウスへの感染実験にて視床型 CJD が FFI と同様の感染性を示すかを明らかにするという単純な目的であった。しかしながら、感染の同一性を示すためには、単に Ki-FFI (ヒト 178N を導入したノックインマウス) に対する感受性を示すのでは不十分であり、我々が作製したヒト型 PrP のノックインマウス全てに対する感受性を比較してその上で、感染の同一性を比較することの

方が的確に判断できると判断した。そこで、当初の目標に加えて、Ki-129Met/Met, Ki-129Val/Val, Ki-219Lys/Lys, Ki-129Met-Mouse chimera/Met-Mouse chimera をもちいた感染実験も行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 視床型 CJD 3 症例を用いて、それぞれのヒト型 PrP を遺伝子導入したノックインマウスへ感染実験を行った。使用したヒト型 PrP のノックインマウスは Ki-129Met/Met, Ki-129Val/Val, Ki-219Lys/Lys, Ki-129Met-Mouse chimera/Met-Mouse chimera, Ki-178N/178N マウスである。

(2) 接種実験を行ったマウスは、発病した場合は臨床症状観察後剖検し、半脳はホルマリン固定後、H E 染色にて spongiform changes など病理検査と PrP 抗体を用いた異常プリオン蛋白の組織学的検出を行った。またもう半脳は、- 80 で保存しウエスタンブロットにて異常プリオン蛋白の検出、分子量の測定を行った。

(3) ヒトでの視床型 CJD の検出を行う。具体的には、MM1+2 症例は従来からは MM 1 と皮質型である MM 2 C の合併例と考えられてきた。しかしながら少数例かもしれないが MM 2 T の合併例が存在するのかを組織学的に検討する。検討対象として、CJD で侵され易い視床を対象とすると区別が困難であるので、下オリブ核の神経細胞数の低下を検討対象とした。

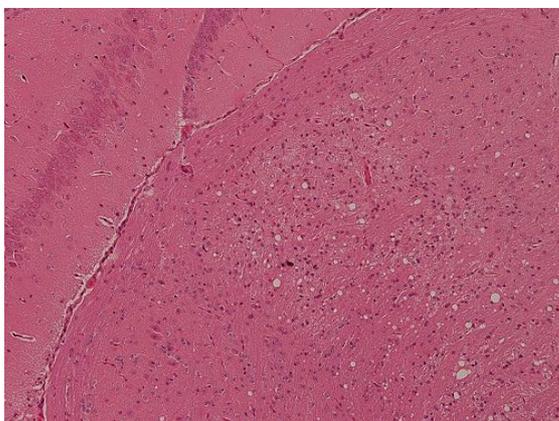
4. 研究成果

(1) 症例 1 の感染実験

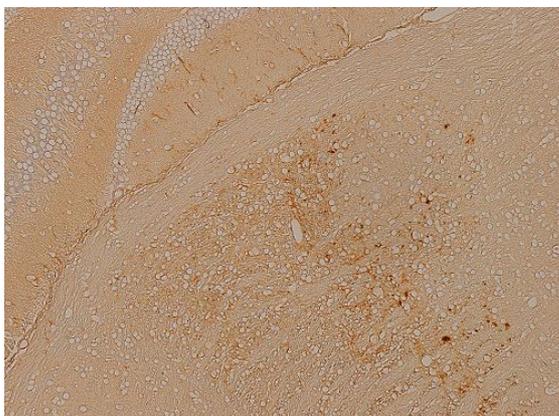
感染実験の結果を以下のようにまとめた。結論として、ヒトとマウスのキメラ型 PrP 以外の動物モデルへの感染は成功していない。成功したキメラ型も組織学的には、視床を犯

すものの、典型的な視床型 CJD の病理像とは異なり、異常プリオン蛋白が容易に検出でき、spongiform changes も陽性であった。

- Ki-129Met/Met (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 662, 763, 788, 806, 537, 648 日
- Ki-129Met/Val (発病 0 匹/接種 5 匹)
観察期間 659, 741, 746, 806, 806 日
- Ki-129Val/Val (発病 0 匹/接種 5 匹)
観察期間 769, 769, 806, 806, 806 日
- Ki-219Lys/Lys (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 547, 547, 687, 687, 708, 761 日
- Ki-chimera/chimera (発病 6 匹/接種 6 匹)
潜伏期間 292, 307, 342, 350, 354, 372 日
- Ki-178N/178N(現在 6 匹接種、観察期間中)



この写真は、Ki-chimera の発病した視床の lateral geniculate body に spongiform changes が認められる。また海綿状脳症を示す部位ではグリオシスも見られる。



上図と同部位、PrP 抗体を用いて免疫染色を行った。異常プリオン蛋白が lateral geniculate body を中心に異常プリオン蛋白の沈着が認められる。

(2) 症例 2 の感染実験

症例 2 に関しても、症例 1 の実験と同様、キメラ型マウスへのみ感染実験が成立した。詳しい結果は以下の通りである。

- Ki-129Met/Met (発病 0 匹/接種 5 匹)
観察期間 498, 792, 806, 599, 645 日
- Ki-129Met/Val (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 669, 700, 768, 790, 806, 806 日
- Ki-129Val/Val (発病 0 匹/接種 5 匹)
観察期間 544, 663, 761, 799, 799 日
- Ki-219Lys/Lys (発病 0 匹/接種 3 匹)
観察期間 302, 302, 377 日
- Ki-chimera/chimera(発病 4 匹/接種 5 匹)
潜伏期間 342, 349, 350, 369 日
- Ki-178N/178N(現在 6 匹接種、観察期間中)

(3) 症例 3 の感染実験

この症例に関しては、残念ながら全ての接種マウスで感染は成立しなかった。

- Ki-129Met/Met (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 782, 800, 800, 800, 800, 796 日
- Ki-129Val/Val (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 524, 630, 792, 792, 800, 800 日
- Ki-219Lys/Lys (発病 0 匹/接種 6 匹)
観察期間 524, 534, 765, 765, 800, 800 日
- Ki-chimera/chimera (発病 0 匹/接種 5 匹)
観察期間 531, 730, 792, 800, 800 日
- Ki-178N/178N(現在 6 匹接種、観察期間中)

(4) ヒト症例で、M1 + 2 T は存在するのか？

従来から、MM 2 T と略される視床型 CJD は、孤発性 CJD の中でも比較的稀な疾患だと理解されていた。しかしながら、孤発性 CJD の中でも最も大多数を占める MM 1 の中に、下オリブ核の神経細胞数が非常に減少している症例を我々は経験し、これらの症例の脳の複数の場所でウエスタンブロットを再施行したところ、タイプ 2 の異常型プリオン蛋白を検出することに成功した。つまり、

MM1と診断されている症例のなかにもMM1+2Tが明らかに存在することを突き止めた。今後の展開としては、タイプ2の検出だけでなく、MM2T型の感染性が存在するのかを証明してゆく予定である。このように、当初の研究計画を越えて視床型CJDの研究は展開しており、今後ともこの分野は広がりを望めそうである。

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20件)

- (1) Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF, McLean CY, Tung JY, Yu LP, Gambetti P, Blevins J, Zhang S, Cohen Y, Chen W, Yamada M, Hamaguchi T, Sanjo N, Mizusawa H, Nakamura Y, **Kitamoto T**, Collins SJ, Boyd A, Will RG, Knight R, Ponto C, Zerr I, Kraus TF, Eigenbrod S, Giese A, Calero M, de Pedro-Cuesta J, Haik S, Laplanche JL, Bouaziz-Amar E, Brandel JP, Capellari S, Parchi P, Pileggi A, Ladogana A, O'Donnell-Luria AH, Karczewski KJ, Marshall JL, Boehnke M, Laakso M, Mohlke KL, Kähler A, Chambert K, McCarroll S, Sullivan PF, Hultman CM, Purcell SM, Sklar P, van der Lee SJ, Rozemuller A, Jansen C, Hofman A, Kraaij R, van Rooij JG, Ikram MA, Uitterlinden AG, van Duijn CM; Exome Aggregation Consortium (ExAC), Daly MJ, MacArthur DG. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med.* 査読有. 2016 Jan 20;8(322):322ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.aad5169.
- (2) Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, **Kitamoto T**.

Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. *Lab Invest.* 査読有. 2016 Feb 15. doi: 10.1038/labinvest.2016.27. [Epub ahead of print]

- (3) Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**.

Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 are Identical in Transmission Properties. *Brain Pathol.* 査読有. 2016 Jan;26(1):95-101. doi: 10.1111/bpa.12264. Epub 2015 Jun 4.

- (4) Oshita M, Yokoyama T, Takei Y, Takeuchi A, Ironside JW, **Kitamoto T**, Morita M. Efficient propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease prion protein using the cell-protein misfolding cyclic amplification technique with samples containing plasma and heparin. *Transfusion.* 査読有. 2016 Jan;56(1):223-30. doi: 10.1111/trf.13279. Epub 2015 Sep 8

- (5) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**. Neuropathological and biochemical criteria to identify acquired Creutzfeldt-Jakob disease among presumed sporadic cases. *Neuropathology.* 査読有. 2015 Dec 15. doi: 10.1111/neup.12270. [Epub ahead of print]

- (6) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, **Kitamoto T**, Yoshida M, Inuzuka T. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis of (99m)Tc-ECD-SPECT images in a case

- of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci.* 査読有. 2015 Nov 15;358(1-2):447-52. doi: 10.1016/j.jns.2015.09.356. Epub 2015 Sep 25.
- (7) Iwasaki Y, Akagi A, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Factors influencing the survival period in Japanese patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci.* 査読有. 2015 Oct 15;357(1-2):63-8. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.065. Epub 2015 Jun 30.
- (8) Kobayashi A, Teruya K, Matsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, **Kitamoto T**. The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol.* 査読有. 2015 Aug;130(2):159-70. doi: 10.1007/s100401-015-1447-7. Epub 2015 May 29.
- (9) Kon T, Miki Y, Arai A, Funamizu Y, Ueno T, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, Nunomura J, Baba M, Oyama Y, Shiga Y, **Kitamoto T**, Tomiyama M. Creutzfeldt-Jakob disease with homozygous M232R mutation: A case report. *J Neurol Sci.* 査読有. 2015 May 15;352(1-2):108-9. doi: 10.1016/j.jns.2015.03.017. Epub 2015 Mar 19.
- (10) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, **Kitamoto T**. Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? *J Virol.* 査読有. 2015 Apr;89(7):3939-46. doi: 10.1128/JVI.03183-14. Epub 2015 Jan 21.
- (11) Nakamaura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, **Kitamoto T**, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive Epidemiology of Prion Disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol.* 査読有. 2015;25(1):8-14. doi: 10.2188/jea.JE20140022. Epub 2014 Oct 4.
- (12) Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, **Kitamoto T**. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP. *Structure.* 査読有. 2014 Apr 8;22(4):560-71. doi:10.1016/j.str.2013.12.019. Epub 2014 Feb 20.
- (13) Barria MA, Balachandran A, Morita M, **Kitamoto T**, Barron R, Manson J, Knight R, Ironside JW, Head MW. Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg Infect Dis.* 査読有. 2014 Jan;20(1):88-97. doi: 10.3201/eid2001.130858.
- (14) 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.* 査読有. 2014 May 16;4(5):e004968. doi: 10.1136/bmjopen-2014-004968.
- (15) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Comparison of the clinical course of Japanese MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease between subacute spongiform encephalopathy and panencephalopathic-type. *Clin Neurol Neurosurg.* 査読有. 2014 Jun;121:59-63.

doi: 10.1016/j.clineuro.2014.03.024. Epub 2014 Apr 1.

(16) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Hashizume Y, Yoshida M. Relation between clinical findings and progression of cerebral cortical pathology in MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Proposed staging of cerebral cortical pathology. J Neurol Sci. 査読有. 2014 Jun 15;341(1-2):97-104. doi: 10.1016/j.jns.2014.04.011. Epub 2014 Apr 13.

(17) Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, **Kitamoto T**. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. Acta Neuropathol Commun. 査読有. 2014 Mar 31;2(1):32. doi: 10.1186/2051-5960-2-32.

(18) Tajima Y, Satoh C, Mito Y, **Kitamoto T**. Creutzfeldt-Jakob disease with a codon 210 mutation: first pathological observation in a Japanese patient. Intern Med. 査読有. 2014;53(5):483-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583440>.

(19) Araki K, Nakano Y, Kobayashi A, Matsudaira T, Sugiura A, Takao M, **Kitamoto T**, Murayama S, Obi T. Extensive cortical spongiform changes with cerebellar small amyloid plaques: The clinicopathological case of MV2K+C subtype in Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 査読有. 2014 Dec;34(6):541-6. doi: 10.1111/neup.12133. Epub 2014 Jul 2.

(20) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nokura K, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Gerstmann-Straeussler-Scheinker disease with P102L prion protein gene mutation

presenting with rapidly progressive clinical course. Clin Neuropathol. 査読有. 2014 Sep-Oct; 33(5):344-53. doi: 10.5414/NP300733.

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本 哲之 (KITAMOTO TETSUYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20192560

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：