
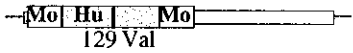


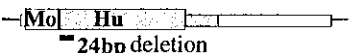
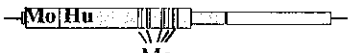
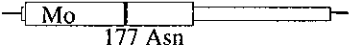



Table 1 Summary of PrP transgenic mice

Constructs	No. of Founders	No. of Stable Lines	Phenotype	
			Fo	Line
Chw 	8	6	1	1
129 	5	2	2	1
Bovine 	3	3	0	1
Sheep 	5	5	1	1
Hu 	1	1	0	0*
Hu5Mo 	3	3	0	0
FFI-Mo 	3	2	0	1
TgMo 	5	3	1	0

導入遺伝子の名称とそのexon3を模式的に示した。キメラ型導入遺伝子 (Chwおよび 129, Bovine, Sheep)のプリオン蛋白をコードするORFは、シグナルペプチドを含むN末端、および、GPIアンカーが結合するC末端は129SVマウス(Mo)由来のものを用い、その間にヒト(Hu129MetまたはHu129Val)あるいはウシ(Bo)、ヒツジ(Sh)由来プリオン蛋白の配列が位置する。Huはプロセッシングを受けマウス(Mo)由来のsignal peptideが除かれると全てヒト型になるが8アミノ酸の繰返し配列の一つ(24bp)を欠失している多型、Hu5Moはヒト型のORFの5カ所をマウス型に置換したもの、FFI-Moはcodon 177がAsnに置換されたマウス型プリオン蛋白を発現する導入遺伝子である。TgMoでは野生型マウスプリオンを発現する。各々の導入遺伝子について、得られたFounderマウスの数、および確立された系統数、過剰発現症状を示したFounder(Fo)の個体数、系統数を示した。

Table 2 Transmission tests to TgMo transgenic mice

Mouse	Mo PrP expression	Affected/Inoculated	Incubation periods
#22	2.0	6/6	107±6.6
#39	1.1	3/3	154±11.0
#61	2.2	ND	ND
Control	1.0	12/12	163±2.4

Inoculated with 10% Fukuoka-1 strain via i.c.

Fig. 1 Targeting of the mouse PrP gene with human PrP vector

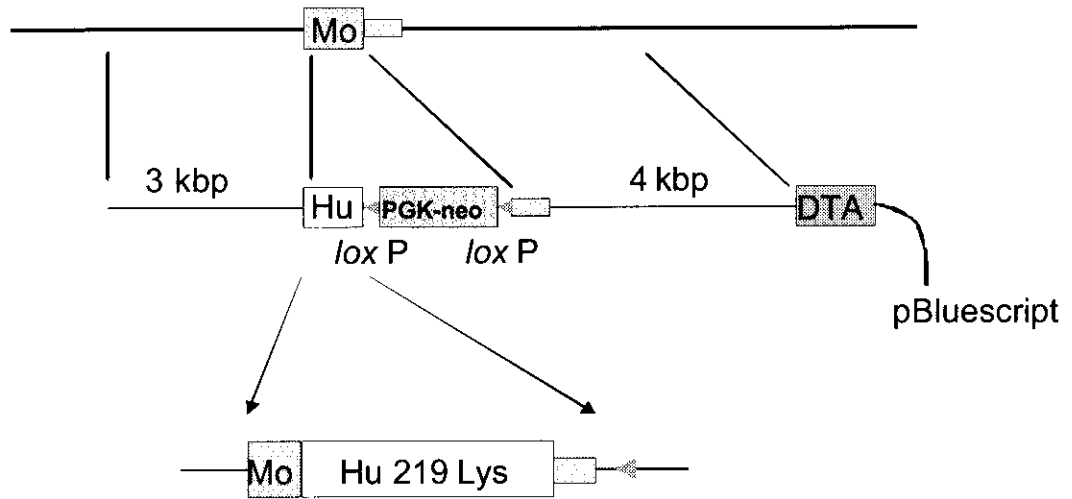
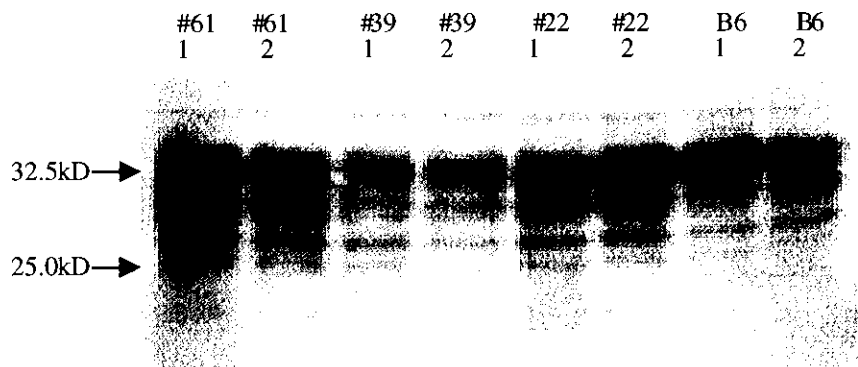


Fig. 2 Western blot analysis of TgMo mice



Expression of PrP in brain tissue from TgMo#61 (#61 -1, -2), #39 (#39 -1, -2), #22 (#22 -1, -2), and C57BL/6 (B6 -1, -2) mice were estimated by Western blot analysis using 1B3 rabbit anti- sheep PrPsc polyclonal antibody.

## ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験（その4）

班 員：毛利 資郎（九州大・大学院医・実験動物学）  
班 員：北本 哲之（東北大・大学院医・病態神経）  
班 員：三好 一郎（東北大・大学院医・動物実験施設）  
班 員：中村 健司（東大医科研・ヒト疾患・高次機能）  
研究協力者：石川有紀子（九州大・大学院医・実験動物学）

### [研究要旨]

系統的にプリオンタンパク遺伝子機能やプリオンタンパク質の構造解析を行うためには、本来の部位に正しく組み込まれ一定量のプリオンタンパク質を常に発現するヒトプリオン遺伝子発現系マウスが必要である。そこで、相同組替えによるノックインマウスを作製し、ホモ化を行い、感受性試験を行った。マウスプリオン遺伝子の第3エクソンの SmaI サイト以降をヒトプリオン遺伝子に置換し、BstEII から C 末端を再度マウスプリオン遺伝子にした pChW マウス、同様に第3エクソンの SmaI サイト以降をすべてヒトプリオン遺伝子に置換し、ORF をすべてヒト型に置き換えた pW マウスの2系統について幾つかのヒトプリオンを接種し、感受性の評価を行った。その結果、pW はヒトプリオンに低い感受性であったが、pChW は非常に高い感受性を示し、ヒト・プリオンタンパク遺伝子導入マウスの導入遺伝子 C 末構造はプリオン感受性と沈着に参与していることが考えられた。高感受性の系統である pChW において、孤発性 CJD 患者由来および硬膜移植後 CJD クラシックタイプのノックインマウスへの伝達は非常に容易であったが、硬膜移植後 CJD バリエントタイプのプリオンは難伝達性であった。また、患者脳乳剤によるマウス抹消からのプリオン伝達に初めて成功した。

Susceptibility for the knock-in mice expressing human prion gene or human/mouse chimeric prion gene to human prion

Shirou MOHRI<sup>1</sup>, Tetsuyuki KITAMOTO<sup>2</sup>, Ichiro MIYOSHI<sup>3</sup>, Kenji NAKAMURA<sup>4</sup>, Yukiko ISHIKAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup> Department of Neurological Science

<sup>3</sup> Institute for Animal Experimentation, Tohoku University Graduate School of Medicine

<sup>4</sup> Division of DNA Biology and Embryo Engineering, Center for Experimental Medicine,  
The Institute of Medical Science, the University of Tokyo.

### ABSTRACT

We estimated two knock-in mouse strains that the coding region of the exon 3 in mouse prion gene was replaced with a chimeric prion gene of human and mouse (pChW) or human prion gene (pW). Incubation periods of these knock-in mice inoculated with 10% brain homogenate (H3) of a sporadic CJD case via intracerebrally were 151 days (pChW) and 624 days (pW) respectively and intraperitoneal transmission to pChW with H3 was 283 days incubation period. It is the first report that a human prion is directly transmitted to mouse by peripheral route. These suggested that a chimeric prion gene structure of human and mouse is needed to high susceptibility for human prion to knock-in

mouse.

Dura-associated classic type CJD case material (TDu/c) was transmitted to pChW with 167 days incubation period. However, two dura-associated variant type CJD (TDu/v and KDu/v) have not been affected yet. The results demonstrate that the knock-in mouse, pChW, has high and relatively wide-ranged susceptibility for human prions.

#### [はじめに]

これまで我々は、ヒト PrP 遺伝子導入トランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製し、ノックアウトマウスと交配して、内在性のマウスプリオンタンパク質が排除されたヒト/マウスキメラ遺伝子のみを発現する Tg マウスのヒトプリオンに対する感受性試験を行い、ヒトプリオンに対して世界で最も高い感受性を有するマウスが樹立されたことを報告した<sup>1)</sup>。しかしながら、Tg マウスでは新規に作製する毎に導入遺伝子の発現部位と発現量が異なること、Tg 高発現系マウスでは、遺伝子の脱落が起こったり、過剰発現によると考えられる運動失調や後肢麻痺などの症状が観察されることもある。

今後、系統的にプリオンタンパク遺伝子機能やプリオンタンパク質の構造解析を行うためには、本来の部位に正しく組み込まれ一定量のプリオンタンパク質を常に発現するヒトプリオン遺伝子発現系マウスが必要であると考えて、相同組替えによるノックインマウスを作製した。今回は、それらのノックインマウスについて感受性試験による評価の結果を報告する。

#### [材料と方法]

ノックインマウス：作出方法等についてはすでに平成 10 年度の本研究班で中村らが報告したように<sup>2)</sup>、マウスプリオン遺伝子の第 3 エクソンの SmaI サイト以降をヒトプリオン遺伝子に置換し、BstEII から C 末端を再度マウスプリオン遺伝子にした pChW マウス、同様に第 3 エクソンの SmaI サイト以降をすべてヒトプリオン遺伝子に置換し、ORF をすべてヒト型に置き換えた pW マウスの 2 系統である。ただし、pW では 8 アミノ酸の欠落も判明した。

使用に際してはマウスの PrP の発現を調べるために、可溶化した脳総膜画分(30  $\mu$ g タンパク)を SDS-PAGE(15%)で分離した後、ウェスタンブロットティングを行った。1 次抗体として、ヒトプリオンタンパク検出用にマウスモノクローナル抗体"3F4"を、マウスプリオンタンパク検出用にエジンバラ BBSRC & MRC、NPU より分与されたウサギ抗ヒツジスクレイビーポリクローナル抗体"1B3"を用いた。また、2 次抗体として抗ウサギ IgG Alkalinephosphatase conjugate (Promega)を用い、NBT/PCIB システムで発色させた。

感染実験：129Met/Met 型 PrP 遺伝子 (H3)、129Val/Met 型 PrP 遺伝子 (Su) をそれぞれ有する sporadic CJD 患者 10%脳溶剤 2 例、硬膜移植後 CJD の患者についても 3 例 (TDu/c, TDu/v, KDu/v) を脳内 (i.c.)へそれぞれ 20  $\mu$ l、H3 については pChW 腹腔内 (i.p.) へも 50  $\mu$ l 接種した。

潜伏期間：接種日を 0 日とし、反応遅延、運動失調、消瘦、無動などの臨床症状を呈し安楽死させる日までを潜伏期間とした。

確定診断：安楽死させたマウスは全てホルマリンに固定後、実験室内汚染防止のため蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE 染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色は hydrolytic autoclaving 法による前処理の後、一次抗体として抗 N 未合成ペプチドウサギ血清とモノクローナル抗体 3F4 を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、動物実験委員会による実験計画書の審査を受け、感染実験は物理的封じ込め設備を有する専用の感染実験室でおこなった。

#### [結果と考察]

ウェスタンブロットティングの結果、pChW、pW 共にヒト型のプリオンタンパク質のみがきちんと発現されていることが確認された (Fig.1)。

われわれが、ヒトプリオンの基準として用いている 129Met/Met 型 sporadic CJD 患者 10%脳乳剤 H3 の潜伏期間は pChW マウスでは  $151 \pm 6.7$  日であるのに対して pW では  $624 \pm 28.0$  日であった (Table 1.)。また、ノックイン遺伝子がヘテロ群についても pChW が  $317 \pm 21.9$  日に対して pW は 752 日以上を要し、同じ系統でノックイン遺伝子をもたない野生型マウスも 725 日以上の潜伏期間を要した。ヒトプリオンに対する感受性において、PChW マウスはこれまでの Tg マウスのうちで最も感受性の高い Tg30 マウスと同じか、それ以上に高い感受性をもつことが明らかになった。さらに、PChW のプリオン遺伝子は今までに評価してきた Tg マウスと同じヒト/マウスキメラ型であることから、マウスにおいてはヒト/マウスキメラ型の遺伝子構造がヒトプリオンに対する感受性に重要であると考えられた。

発症マウスにおける病理組織所見で pChW は大脳皮質と外側膝状体、視床にシナプス型のプリオン沈着を認めた。それに対して、pW においては脳梁を中心に plaque が認められるのが大きな特徴であった。海綿状変化は大脳皮質、海馬に認められ、pChW では強く pW では非常に軽い傾向にあった。

これらの所見をあわせると、pW における 8 アミノ酸の欠損に加えて、ヒトプリオン遺伝子導入マウスにおいて C 末の遺伝子構造が潜伏期間とプリオン沈着に大きく関わっていることが考えられた。

一方、Table 2. に示すように、pChW マウスにおいては、H3 の腹腔内接種によって潜伏期間は  $283 \pm 9.2$  日で伝達できた。これはヒトプリオンのマウス抹消からの伝達に成功したきわめて貴重な例である。また、129 Val/Met 型患者 (Su) 由来のヒトプリオンに対する脳内接種による潜伏期間も  $141 \pm 5.3$  日といずれも非常に短かく、末梢からの接種、脳内接種、いずれもこれまでのマウス順化株におけるマウスからマウスへの伝播潜伏期間の平均値の範囲内であり、pChW マウスのヒトプリオンに対する感受性は、マウス間の伝達と同様であり、種の壁を越えたと判断して差し支えないと思われる<sup>3)</sup>。

硬膜移植後 CJD 患者由来のプリオン接種結果では、シナプス型の病理変化を示すクラシックタイプ (TDu/c) の感染は比較的短い潜伏期間で成立したが、ブラック形成を伴うバリエントタイプ (TDu/cv, KDu/v) の伝播にはこれまでのところ成功していない (Table 2.)。このノックインマウス、pChW は、現時点でもヒトプリオンに対する感受性に関しては、世界で最も高く、これだけでヒトプリオンの安全性試験に十分に有用であると考えられるが、硬膜移植後 CJD の伝播困難な点なども踏まえて、ヒトプリオンに対し、さらに広範囲で高い感受性を有するマウスの開発を行い、プリオン解明と治療、安全性試験に適用できるマウスを確立追加しなければならない。

## [結 論]

1. ヒト・プリオンタンパク遺伝子導入マウスの導入遺伝子 C 末構造はプリオン感受性と沈着に関与していることが考えられた。
2. 孤発性 CJD 患者由来および硬膜移植後 CJD クラシックタイプのノックインマウスへの伝達は非常に易であったが、硬膜移植後 CJD バリエントタイプのプリオンは難伝達性であった。
3. 患者脳乳剤によるマウス抹消からのプリオン伝達に成功した。

## [参考文献]

- 1) 毛利資郎、北本哲之、三好一郎：ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その 2)、厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之) 平成 10 年度研究報告書：87-93、1999
- 2) 中村健司、北本哲之、中尾和貴、勝木元也、：実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発。厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之) 平成 10 年度研究報告書：81-83、1999.
- 3) Mohri, S. and Tateishi, J. : Host genetic control of incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in mice.

【研究発表】

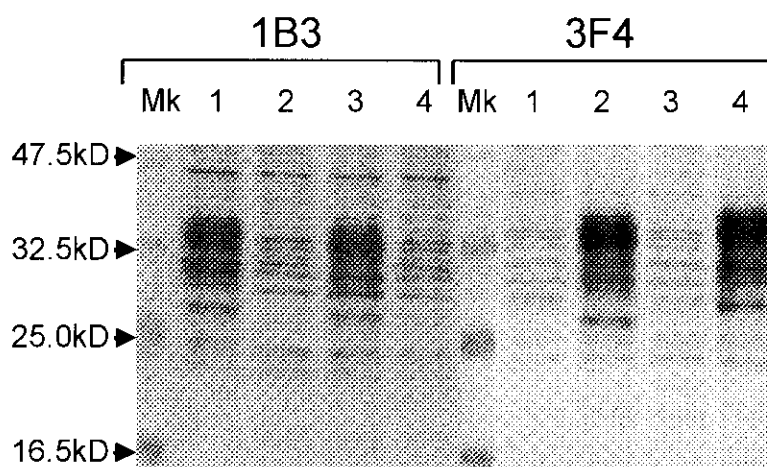
1.論文発表

1)毛利資郎:プリオン病の感染予防. 脳の科学.22:751-756, 2000

2.学会発表

1)毛利資郎, 三好一郎, 笠井憲雪, 北本哲之:ヒトプリオン病モデルマウス. (ワークショップ「脳神経疾患モデル動物」) 第130回日本獣医学会学術集会, 大阪, 2000

Fig 1. Western blot analysis of pW and pChW mice



1: NZW, 2: pW, 3: 129/SvJ, 4: pChW

Table 1. Transmission tests to chimeric or human PrP knockin mice

Mouse	Genotype KI gene construct	Met/Met		Met/w		w/w	
		Incubation periods	Affected /Inoculated	Incubation periods	Affected /Inoculated	Incubation periods	Affected /Inoculated
pChW	Mo/Hu /Mo	151 ± 6.7	7/7	317 ± 21.9	5/5	>725	0/4
pW	Mo/Hu /Hu	624 ± 28.0	4/4	>752	4/6		

Inoculated via i.c. with 10% brain homogenate of Sporadic CJD(129M/M)-H3

Table 2. Transmission studies to pChW mouse

Mterial	Route	Incubation periods (days)	Affected /Inoculated
Sporadic CJD(129M/M), 10 % Human brain-H3	i.c.	151 ± 6.7	7/7
	i.p.	283 ± 9.2	11/11
Scodary passage, 10% Mouse brain	i.c.	123 ± 10.0	6/6
Sporadic CJD(129V/M), 10 % Human brain-Su	i.c.	141 ± 5.3	5/5
Post cadaveric dura matter graft CJD(129M/M),	10 % Human brain-TDu/c	i.c.	167 ± 24.7
	10 % Human brain-TDu/v	i.c.	>420
	10 % Human brain-KDu/v	i.c.	>330

i.c. : intracerebral, i.p. : intraperitoneal

# フラグメント・プリオン蛋白の研究

班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

## 〔研究要旨〕

フラグメント・プリオン蛋白は、昨年度硬膜移植後のクロイツフェルト・ヤコブ病の分類に役立つ方法として報告したものであるが、今年度はさらに詳しく検討し、以下のような結論を得た。まず、フラグメント・プリオン蛋白は、C末端の2つのヘリックスとその前のループの一部から構成されるプリオン蛋白のフラグメントである。このフラグメントは、蛋白分解酵素処理を行わなくても存在し、2ヶ所ある糖鎖付加部位には糖鎖のないプリオン蛋白分子種である。異常プリオン蛋白のタイピングに使用されているタイプ1にもタイプ2にもフラグメント・プリオン蛋白が存在するプリオン病があり、フラグメント・プリオン蛋白の存在によって、プリオン病を分類する新しい分類法が確立可能となった。また、ヒト化マウスでの感染実験によって、フラグメント・プリオン蛋白の有無が感染性に非常に影響することが明らかになり、このフラグメントの解析の重要性が増してきた。

## Fragmented Prion Protein

Tetsuyuki KITAMOTO

Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

## ABSTRACT

In 1999, we found the fragmented prion protein (PrP) molecules to differentiate between dura-classic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and dura-variant CJD. We report herein that the fragmented PrP is a useful marker to classify human prion diseases, and also a clue to analyze abnormal PrP structures. The fragmented PrP was detected in patients with classic-type CJD, sporadic thalamic-type CJD, familial CJD with codon 200 or 232 mutation, or familial Gerstmann-Straussler syndrome (GSS) with codon 102 mutation. Among patients with type-1 abnormal PrP, the transmission study was successful in CJD with the fragment PrP, but not in CJD without the fragmented PrP.

## 〔はじめに〕

昨年度、硬膜移植後のCJD症例と孤発例のなかの古典的CJD症例の異常プリオン蛋白をWestern blotで解析する際に、fragmented PrPが古典的CJDにのみ検出できることを報告した。今年度は、このfragmented PrPに関して、以下のような研究を行った。1)fragmented PrPは、その他の抗体でも検出できるのか？ 2)Proteinase K抵抗性PrPとして、認識できるが、Proteinase K処理前はどんな形で存在するのか？ 3)Glycosylationを受けているのか？ 4)異常PrP分子のタイプ分類である、タイプ1とタイプ



2 による違いはあるのか？ 5)どのような症例で、検出できるのか？ 6)病態や感染性に及ぼす影響はどうか？ これらの質問に答えることによって、本当に fragmented PrP をプリオン病の分類に使用する価値があるのかを検討した。

#### 〔材料及び方法〕

1)抗体の検討：fragmented PrP を検出するために、今年度新たに検討した抗体として、Matsuda#175、TNT#9、TNT#2065、TNT#383、6H4、ChW が挙げられる。Matsuda#175 と TNT シリーズは、すでに本年度の報告書の松田、田中班員のところで述べたように、PrP ノックアウトマウスに Human PrP 122-230 の可溶性蛋白を免疫し得られた Mab である。6H4 は、プリオニクス社製の抗体で helix A を認識する抗体である。ChW はヒト・マウスキメラ型 PrP の 122 - 230 までのレコンビナント蛋白に対するポリクローナル抗体である。

2)Proteinase K 処理：fragmented PrP が Proteinase K 処理の前後でどのように変化するかを、各種のプリオン病で検討した。また、Proteinase K 処理の前後で、Urea 処理・TCA 処理・Methanol/Chloroform 処理・aceton 処理などを行い、fragmented PrP が検出されるかどうかを検討した。

3)Glycosylation：プリオン蛋白には、2ヶ所の N-glycosylation sites が存在し、その2つとも糖鎖の存在するもの、1ヶ所だけのもの、糖鎖のないものと3種の PrP が Western blot で確認できるが、PNGaseF で処理すると全ての N-Glycosylation が切断される。よって、fragmented PrP において、PNGaseF 処理後に分子量が変化するかどうかを検討した。

4)症例・異常プリオン蛋白のタイピング：42 症例のプリオン病の剖検脳を用いて、異常プリオン蛋白のタイピングを行い、同時に fragmented PrP の有無の検討を行った。

5)感染実験：10 %脳乳剤を作製し、ヒト型トランスジェニックマウス、ノックインマウスへの伝播実験を行っている。

#### （倫理面への配慮）

動物実験に際しては、動物実験委員会の審査を受け行った。

#### 〔結果及び考察〕

##### 1)各種抗体での fragmented PrP の検出

fragmented PrP を検出しうる抗体は、TNT#41/71、TNT#2065、ChW であった。また検出し得ない抗体は、3F4、6H4、TNT#383、TNT#9、Matsuda#175 であった。これらの結果とそれぞれの抗体のエピトープ解析から、fragmented PrP は helix B と C を中心とした C 末部分の PrP でごく一部の helix B へいたるループ部分も存在することが明らかとなった。また、helix A やそれを囲む逆平行ベータシート構造は含まないことが示された。

##### 2)fragmented PrP は N-glycosylation を受けているのか

fragmented PrP に含まれる部分には、2ヶ所の N-glycosylation 部位がある。この部位の糖鎖の有無を検討するため、PNGaseF にて糖鎖の切断を行った。Proteinase K 処理後の PrP 27-30 は全て糖鎖が除かれ 21KDa の PrP (タイプ 1 の場合) となったが、fragmented PrP の分子量は不変で 11 - 12KDa のままであった。よって、fragmented PrP 11 - 12KDa は、non-glycoform である。

##### 3)fragmented PrP は Proteinase K 処理の前後で、どのような影響を受けているのか？

昨年度報告したように、Urea 処理後 Proteinase K 消化を行うためには Urea を除去し、蛋白を濃縮するために Chloroform/Methanol で濃縮操作を行っていた。この Chloroform/Methanol 処理によって、脱脂肪

が起り電気泳動がうまく行われ fragmented PrP の検出が容易となったことが明らかとなった。つまり、fragmented PrP は、Proteinase K 処理前から存在し、Proteinase K 処理前に存在しない症例では、Proteinase K 処理をしても出現することはなかったのである。また、検出を容易にするためには、Chloroform/Methanol 濃縮か TCA 濃縮が有効であることが明らかとなった。

#### 4)異常プリオン蛋白のタイピングと fragmented PrP

・タイプ1で fragmented PrP 陽性例

孤発例 CJD classic type (129M/M, 219E/E) 17 例

孤発例 CJD classic type (129V/M, 219E/E) 1 例

硬膜移植後 CJD classic type (129M/M, 219E/E) 3 例

家族性 CJD codon200 (129M/M, 219E/E) 2 例

家族性 CJD codon232 (129M/M, 219E/E) 2 例

家族性 CJD codon232 (129V/M, 219E/E) 1 例

家族性 GSS codon102 (129M/M, 219E/E) 2 例

・タイプ1で fragmented PrP 陰性例

硬膜移植後 CJD variant type (129M/M, 219E/E) 5 例

・タイプ2で fragmented PrP 陽性例

孤発例 CJD thalamic type (129M/M, 219E/E) 3 例

・タイプ2で fragmented PrP 陰性例

孤発例 CJD plaque type (129V/M, 219E/E) 2 例

孤発例 CJD plaque type (129V/V, 219E/E) 1 例

variantCJD イギリス (129M/M, 219E/E) 3 例

上記のように、fragmented PrP は遺伝子タイプ、プリオン病の特有の病型に認められプリオン病の分類に役立つ検査であることが明らかとなった。また、驚くべきことにタイプ2の異常プリオン蛋白をもつ thalamic form の CJD でも、同じ分子量の fragmented PrP が検出された。

#### 5)感染実験

大部分の感染実験は現在継続中であるが、タイプ1に関しては以下のような結果が出つつある。

タイプ1・fragmented PrP(+)の症例は、孤発例・家族性に関らず短期間で、ヒト化トランスジェニックマウスへの伝播に成功する。一方、タイプ1・fragmented PrP(-)の症例の伝播は、成功率が低く、また長期間の観察が必要である。このように、同じタイプ1でも、fragmented PrP の有無によって明らかにヒト化マウスへの伝播性に違いが認められる。

#### 〔結論〕

硬膜移植後 CJD の classic type と variant type を分類するのに有効であった fragmented PrP は、ある種のプリオン病に共通してみとめられ、プリオン病の異常プリオン蛋白の構造解析にとって有用な情報であるとともに、プリオン病の病型・感染性にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

#### 〔研究発表〕

##### 1.論文発表

1) Konaka K, Kaido M, Okuda Y, Aoike F, Abe K, Kitamoto T, Yanagihara T:

Proton magnetic resonance spectroscopy of a patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease.  
*Neuroradiology*. 42(9):662-5, 2000

- 2) Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, Sato T:  
Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. *Epidemiol Infect*. 125(1):201-5, 2000
- 3) Kitamoto T: Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 20 Suppl:S52-4, 2000
- 4) Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T:  
Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neurosci Lett*. 288(3):179-82, 2000

# 追加研究報告

# プリオン蛋白遺伝子コドン200の変異を有する クロイツフェルト・ヤコブ病の臨床的特徴

研究協力者：戸田 宏幸（横浜市大・医・神経内科）

研究協力者：黒岩 義之（横浜市大・医・神経内科）

班 員：佐藤 猛（国立精神・神経センター国府台病院）

班 員：中村 好一（自治医大・公衆衛生）

班 長：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

## 〔研究要旨〕

これまで施行された2回にわたる全国調査と山梨、静岡県の医療機関に対するアンケート調査によりコドン200番に変異を有する家族性CJD(CJD<sup>200</sup>)の疫学、および経過、臨床像などについて詳細に検討した。孤発性CJD患者の罹病率は両県とも人口100万人当たり0.61、0.63で全国の0.76と同様であった。CJD<sup>200</sup>の患者は全国で14名、その内両県では10名把握され、一部に罹病率が高い地域がみられた。また罹病期間は孤発性CJDの全国平均が17.5±18.4ヶ月であったが、両県のCJD<sup>200</sup>患者では7.5±2.9ヶ月と短かった。

Familiar Creutzfeldt-Jakob Disease associated with a Prion Protein Gene Mutation at Codon 200.

<sup>1</sup>Hiroyuki TODA, <sup>1</sup>Yoshiyuki KUROIWA, <sup>2</sup>Takeshi SATO,

<sup>3</sup>Yoshikazu Nakamura, <sup>4</sup>Tetsuyuki KITAMOTO

<sup>1</sup>Department of Neurology, Yokohama City University School of Medicine,

<sup>2</sup>Kohnodai Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry,

<sup>3</sup>Department of Public Medicine, Jichi Medical School,

<sup>4</sup>Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

## ABSTRACT

The first and second nationwide survey and recent information documented 49 cases of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in Yamanashi and Sizuoka Prefectures between 1991 and 2000. Of these 49 patients, 35 cases were sporadic CJD, 10 with prion protein (PrP) gene mutation at the codon 200, one at the codon 230 and one associated with cadaveric dura mater transplantation. Mean duration of symptoms in the 10 patients with the PrP gene mutation at codon 200 was shorter (7.5±2.9 months) than that in 35 patients with sporadic CJD (10.4±5.2 months).

## 〔はじめに〕

プリオン蛋白遺伝子におけるコドン200番の1塩基置換によるグルタミン酸→リジンのアミノ酸の変異を有するクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD<sup>200</sup>)では臨床経過の早い症例の存在や、地域集積性の高いことなどが指摘されている。感染防止対策を立てる上にもその実態を明らかにする必要があるの

で、詳細な疫学、および臨床的調査を行った。

#### 〔目的〕

山梨、静岡両県ではコドン 200 番の変異を有する家族性 CJD が認められることが、これまでに報告されてきた<sup>1,2,3,4)</sup>。検査などの医療行為や献血などにおける感染防止対策を立てる上でもこれらの両県における孤発性や家族性 CJD の発症率を正確に把握する必要がある。そのためこれまで 2 回にわたる CJD の全国調査の成績や報告された文献からの症例の収集、さらにあらたに両県の医療機関にアンケート調査を行い、出来るだけ詳細に症例を把握し、罹病率を明らかにすることを目的とした。

また CJD<sup>200</sup> について、症状、経過などの特徴を明らかにしたので報告する。

#### 〔方法〕

1985 年 1 月から 1996 年 5 月までの 11 年 5 か月の間における CJD 患者の全国疫学調査<sup>5)</sup> (回答率 78.2%)、および山梨、静岡県の医療機関 36 施設に 1990 年 1 月から 1999 年 12 月までの 10 年間における CJD の症例についてのアンケート調査 (回答 26 施設、回答率 72.2%) で把握された CJD 患者、文献例、および 1999 年 4 月から 2000 年 8 月までに特定疾患として届け出のあった CJD 患者について調査した。直接診察、あるいは病歴調査した数例を除いて、大部分の症例は回答された調査表に基づいて発症年齢、症状、経過などについて調査した。

プリオン蛋白の遺伝子解析は東北大学 北本 哲之、および九州大学 堂浦 克美、立石 潤博士により行われた。

罹病率は 10 年間の罹病率を 1 年平均に換算し、人/100 万人/年とした。統計的解析はポアソン分析にて検討した。

#### （倫理面への配慮）

本調査にあたっては関係医療機関宛の依頼状に患者、家族、および医療機関のプライバシーについては十分配慮する旨を約束した。また発表内容の表現や開示の方法については本研究班のサーベイランス委員会、現地の医療機関の医師などの意見を数回にわたってうかがい、その意見を尊重した。

#### 〔結果〕

1991 年から 2000 年までの 10 年間に把握された山梨、静岡県における CJD 患者の総数は 49 名、その中、孤発性 CJD は 35 名、家族性 CJD は 13 名、硬膜移植歴を有する CJD が 1 例であった。

家族性 CJD の中でコドン 200 番の変異を有する症例は本研究班のこれまでの調査では全国で 14 名認められたが、山梨、静岡県では 10 名、230 番の変異が 1 名、家族歴はあるが、変異が認められなかったものが 1 名であった。

孤発性 CJD の罹病率は山梨県が人口 100 万人当たり 0.61、静岡県が 0.63 であった (表 1)。地域別の罹病率は 0.25 から 1.45 であり、全国平均の 0.76 (0.38 ~ 1.85) とほぼ同様のレベルであった。発症年齢は平均 63±9 歳であり、全国調査での孤発性 CJD の発症年齢 63.0±10.4 歳と同様であった。しかし、罹病期間は全国平均 17.4±18.4 ヶ月に比し、山梨、静岡両県における孤発性 CJD では 10.4±5.2 ヶ月と短かった。

家族性 CJD の罹病率を地域別に検討した (表 2)。山梨県の罹病率は県全体では 0.41、A 地域では 0.25、B 地域 4.29 であり、B 地域において高かった。静岡県では県全体では 0.21、A 地域 1.25、C 地域 0.28 であった。

CJD<sup>200</sup> の症例について臨床と経過をまとめた。全国 14 例の発症年齢は平均 57±11 (44 ~ 78) 歳であ

り、孤発性 CJD の平均  $63.0 \pm 10.4$  と比較するとやや若年発症の傾向がみられた。

発症から死亡までの期間は CJD<sup>200</sup> では平均  $14 \pm 0.8$  (3 ~ 36) であり、孤発性 CJD の罹病期間  $17.5 \pm 18.4$ 、ピークは 10 ~ 24 ヶ月と比較すると短かった。特に山梨、静岡県の CJD<sup>200</sup> は罹病期間が  $7.5 \pm 2.9$  ヶ月と短かった。

CJD<sup>200</sup> の症例における初発症状は不安 2 例、不眠 2 例、記憶障害 4 例、幻覚 1 例、行動異常 3 例、ミオクローヌス 4 例、失調 2 例、感覚異常 2 例、視覚障害・眼球運動障害 2 例であった。無動性無言に陥る時期は 3 ヶ月以内 2 例、6 ヶ月以内 5 例であった。6 ヶ月以内に 14 例中、7 例(50%)が無動性無言になり、孤発性 CJD の 34.0%と比較すると、重症になるまでの経過が早かった。脳波上の PSD は 14 例全例に認められ、9 例は 6 ヶ月以内に出現していた。

神経病理所見では剖検された 7 例全例に神経細胞の脱落、グリオシス、海綿状変性が認められたが、クールー斑は見出されなかった。1 例では免疫組織化学的検討がされているが、シナプス型のプリオン蛋白沈着であった。

#### 〔考察〕

山梨、静岡県における孤発性 CJD の罹病率は全国と同じであり、特に高い傾向は認められなかった。しかし、CJD<sup>200</sup> の患者はこれまでに全国で 14 例把握されているが、両県においては 10 例と多い傾向が認められた。特に山梨県の B 地域では高かった。

罹病期間は孤発性 CJD において全国平均  $17.4 \pm 18.4$  ヶ月に比し、山梨、静岡両県では  $10.4 \pm 5.2$  ヶ月とやや短かった。さらに CJD<sup>200</sup> の症例は両県の患者では  $7.5 \pm 2.9$  ヶ月とさらに短かった。無動性無言に陥る期間も CJD<sup>200</sup> の患者では孤発性 CJD より早かったが、罹病期間が短いこととよく合致している。CJD<sup>200</sup> の患者の臨床症状は孤発性 CJD と同様であったが、病気の進展が早いことが特徴である。患者、および家族への告知の問題については本研究班で十分検討を重ねてから、各医療機関に説明する予定であるが、今回の調査で判明した CJD<sup>200</sup> の病態がその際の参考資料となるであろう。

#### 〔結論〕

山梨、静岡県では孤発性 CJD の罹病率は人口 100 万人当たり 0.61, 0.74 であり、全国平均 0.76 と同様であった。

CJD<sup>200</sup> の症例は全国で把握された症例数は 14 名、その中、山梨、静岡県では 10 名であった。経過は孤発性 CJD と比較して、CJD<sup>200</sup> の患者では短かい傾向が認められた。

#### 〔文献〕

- 1) 赤井淳一郎、熊谷 紀元ら：Creutzfeldt-Jakob 病 失調型 (Brownell-Oppenheimer) の 1 例。臨床経 16:124-1371, 196
- 2) 川井 充、高津 成美他：Creutzfeldt-Jakob 病の従兄弟例。神経進歩 23:472-283, 1979
- 3) 赤井淳一郎：クロイツフェルト・ヤコブ病。星野書店、東京、1984
- 4) 岩淵 潔、遠藤 青磁ら：コドン 200 の変異(Glu → Lys)をもつプリオン病の 2 家系。脳神経 46: 349-446, 1994
- 5) 厚生省特定疾患研究「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究」報告書。1997 年 3 月 (班長 佐藤 猛)

#### 〔研究発表〕

2. 学会発表
- 1) 戸田 宏幸、波木井靖人、谷川 明代ら：富士川流域における Creutzfeldt-Jakob 病の疫学的検討。

表1 山梨、静岡県 の孤発性CJD

	人口(千人)	91	92	93	94	95	96	97	98	99	20	計	100万当たり
「山梨」	984											6	0.61
A地域	403						1					1	0.25
B地域	69					1						1	1.45
山梨、市町村不明		1			1	1				1		4	
		1			1	2	1			1		6	0.61
「静岡」	3,764											24	
A地域	399		1							3		4	1
B地域	493	1				1			2	2		6	1.22
C地域	710	1							1	2		4	0.56
D地域	567	1	1		3	2						7	1.22
静岡、市町村不明					1	1		1				3	
		3	2	1	5	5	2	3	3	8	1	24	0.63
出身地記載無し			2		1	1			1			5	
総計	4,748											35	0.74

表2 山梨、静岡県 の家族性CJD

	人口(千人)	91	92	93	94	95	96	97	98	99	20	計	100万当たり
「山梨」	983											4	
A地域	403					1						1	0.25
B地域	69		1							1	1	3	4.29
山梨、市町村不明													
			1			1				1	1	4	0.41
「静岡」	3,764											8	
A地域	399				1			2		1	1	5	1.25
B地域	492												
C地域	710			1			1					2	0.28
D地域	567												
静岡、市町村不明							1					1	
					1	1	2	2		1	1	8	0.21
出身地記載無し				1								1	
総計	4,748											13	0.27



# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文題名	雑誌名	巻：頁、西暦年号
Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, <u>Nagashima K</u> , Stoner GL	Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: Splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly	J. Virol	74 : 1840-1853, 2000
Suzuki S, Tobiume M, Kameoka M, Sato K, Takahashi TA, Mukai T, Ikuta K	Exposure of normal monocyte-derived dendritic cells to human immunodeficiency virus type-1 particles leads to the induction of apoptosis in co-cultured CD4 <sup>+</sup> as well as CD8 <sup>+</sup> T cells	Microbiol Immunol	44 : 111-121, 2000
Furukawa H, Suzuki T, Jin MB, Yamashita K, Taniguchi M, Magata S, Ishikawa H, Ogata K, Masuko H, Shimamura T, Fukai M, Hayashi T, Fujita M, <u>Nagashima K</u> , Omura T, Kishida A, Toda S	Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720	Transplantation	69 : 235-241, 2000
Kawano N, Ohba Y, <u>Nagashima K</u>	Eosinophilic inclusions in ependymoma represent microlumina: a light and electron microscopic study	Acta Neuropathol	99 : 214-218, 2000
Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Ishida Y, <u>Nagashima K</u>	Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT)	Mod Pathol	13 : 152-157, 2000
Nagashima T, Kato H, Kase M, Maguchi S, Mizutani Y, Matsuda K, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Minami N, Nonaka I, <u>Nagashima K</u>	Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG) <sub>11</sub> in <i>PABP2</i> gene	Neuromuscul Disord	10 : 173-177, 2000

著者名	論文題名	雑誌名	巻：頁、西暦年号
Nagashima T, Maguchi S, Terayama Y, Horimoto M, Nemoto M, Nunomura M, Mori M, Seki T, Matsukawa S, Itoh T, Nagashima K	P-ANCA-positive Wegener's granulomatosis presenting with hypertrophic pachymeningitis and multiple cranial neuropathies: Case report and review of literature	Neuropathology	1 : 23-30, 2000
Nakamura N, Iwasaki Y, Hida K, Abe H, Fujioka Y, Nagashima K	Dural band pathology in syringomyelia with Chiari type I malformation	Neuropathology	1 : 38-43, 2000
Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, Hall WW, Nagashima K	Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines	J Biol Chem	275 : 17016-17023, 2000
Furuta Y, Ohtani F, Fukuda S, Inuyama Y, Nagashima K	Reactivation of varicella-zoster virus in delayed facial palsy after dental treatment and oro-facial surgery	J Med Virol	62 : 42-45, 2000
Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M	Ca/DAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1	J Biol Chem	275 : 25488-25493, 2000
Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M	Regulatory Proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3	J Biol Chem	275 : 20020-20026, 2000
Miyazaki H, Ono T, Okuma Y, Nagashima K, Nomura Y	Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates ischemia-induced tyrosine hydroxylase expression in rat hippocampus	Eur J Neurosci	12 : 2032-2038, 2000

著者名	論文題名	雑誌名	巻：頁、西暦年号
Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, <u>Nagashima K</u> , Nagai R, Yazaki Y, Medof ME, Komuro I	Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAAI	Am J Physiol Cell Physiol	279 : C205-C212, 2000
Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, <u>Nagashima K</u> , Matsuda M	Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade	Mol Cell Biol	20 : 6074-6083, 2000
Nakazato Y, <u>Nagashima K</u>	Japanese contribution to neuropathology. Encephalomyelitis, brain tumors, neuromuscular diseases and miscellaneous disorders	Neuropathology	20 : S8-S13, 2000
Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Shoya Y, Takahashi RH, <u>Nagashima K</u> , Kurata T	Monoclonal antibodies against topoisomerase I suppressed DNA relaxation and HIV-1 cDNA synthesis	Hybridoma	19 : 331-334, 2000
Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, <u>Nagashima K</u> , Tamura M, <u>Yasui K</u> , Nishihara J	Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain	Biochim Biophys Acta	1517 : 100-106, 2000
Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, <u>Nagashima K</u>	Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy	J Neuropathol Exp Neurol	59 : 921-929, 2000
Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Nakamura H, Sawa H, <u>Nagashima K</u> , Koizumi H	Membrane expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes	Arch Dermatol Res	292 : 496-499, 2000
Hara T, Yamashita S, Aiba H, Nihei K, Koide N, RA Good, Takeshita K	Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis	J Neurovirology	6 : 121-126, 2000