

abnormalities, and absence of 14–3–3 protein in the CSF [10,16,17].

Thus, a useful diagnostic tool is needed, particularly for patients without a known family history of CJD. The presence of 14–3–3 protein in the CSF has been recognized to have good sensitivity and specificity as an indicator of sporadic CJD [5–7,18]. However, no studies have been published on the sensitivity and specificity of CSF abnormalities in familial CJD, and as many as 25% of patients with familial CJD may have normal 14–3–3 protein and NSE concentrations in the CSF [5,6].

Magnetic resonance imaging (MRI) has been reported to be a useful tool for early diagnosis of sporadic CJD. For example, MRI with diffusion-weighted images (DWI) shows increased signals in the basal ganglia and cerebral cortex of patients with sporadic CJD [19–28]. Whether MRI is equally useful in the diagnosis of familial CJD remains unclear, although several MRI studies have been reported in familial CJD with various mutations in the prion protein gene [29–32].

To further investigate whether MRI might be useful in the diagnosis of familial CJD, we examined the brain of a patient with familial CJD in whom the codon 200 mutation was confirmed by molecular genetic analysis. DWI, fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) imaging, and T1-weighted imaging (T1WI) were performed, and the results were compared with findings in the literature on patients with sporadic CJD.

## 2. Case report

### 2.1. Clinical description

A 64-year-old right-handed woman born in southern Japan was admitted to our hospital because of forgetfulness, dysarthria, and impaired balance. She had noticed the forgetfulness and insomnia 3 months before admission. Fatigue, motor slowness, and dysarthria had developed 2 months before admission. The frequency of spontaneous speech had gradually decreased, and she had increasingly experienced loss of balance, leading to falls. The patient's mother died at age 55 of a progressive dementing disorder, and her younger sister had received a diagnosis of familial CJD at another hospital.

At admission to our hospital, the patient was alert and cooperative, but inattentive. She was able to follow simple commands, and her Mini-Mental State Examination (MMSE) score at that time was 23 of 30 possible points. Her speech was slurred, and scanning speech was occasionally evident. Her pupils were normal in size and reacted to light stimulation. Extraocular movement was normal. Cerebellar ataxia was detected, including dysmetria and decomposition in all extremities. Her gait was also ataxic and wide based. No involuntary movements were observed. She did not smoke or consume alcohol and had no history of toxic exposure. Results of extensive laboratory evaluations of serum, urine, and CSF were normal, except for positive

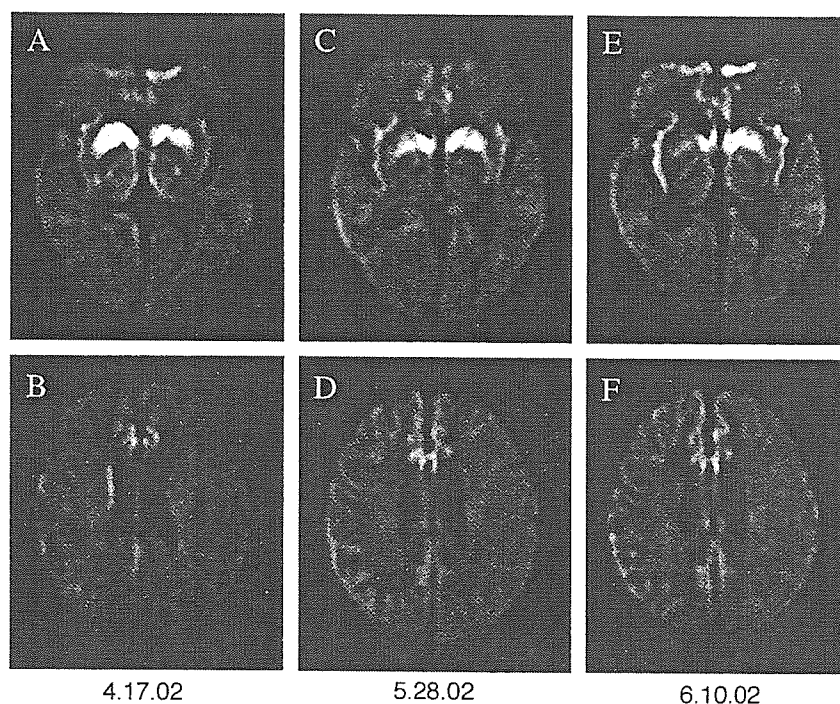


Fig. 1. Magnetic resonance imaging of the brain of a patient with familial Creutzfeldt–Jakob disease, performed with serial diffusion-weighted images (DWI). (A) and (B) were performed at admission to hospital, (C) and (D) at approximately 1 month, and (E) and (F) at 2 months after admission. (A) and (B) High signal intensity bilaterally in the basal ganglia, insula, and cingulate gyrus. (C) and (D) Slightly decreased hyperintense bilateral signals in the basal ganglia; extension of signals in the cortex into left temporoparietal cortex and cingulate gyrus. (C) Increased signal intensity in areas of hyperintensity in insular cortex. (E) and (F) Slight decrease in hyperintense signals in cingulate gyrus, insular cortex, left temporoparietal cortex, and basal ganglia.

14–3–3 protein (+; normal, negative) and elevated NSE (77 ng/mL; normal, <35 ng/mL) in the CSF. At that time, EEG showed diffuse slow waves without periodic sharp waves.

A diagnosis of familial CJD was made, and treatment with quinacrine was started at 300 mg/day. Despite treatment, the patient's speech and gait deteriorated rapidly. Her cognitive decline also progressed rapidly in association with myoclonic jerks in the upper extremities. Subsequently, both spontaneous and stimulus-induced episodes of myoclonus were seen in all extremities. Rigidity, Babinski signs, snout reflex, and bilateral grasping reflex also developed. One month after admission (4 months after the onset of symptoms), EEG showed diffuse slow and periodic sharp-wave complex discharges.

Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes. The coding sequence of the prion protein gene was amplified by using polymerase chain reaction. Genetic study confirmed the point mutation at codon 200 (GAG→AAG) resulting in the substitution of lysine for glutamate.

## 2.2. Magnetic resonance imaging studies

MRI of the brain was performed with DWI, FLAIR imaging, and T1WI at admission, as well as approximately 1 and 2 months later.

At admission, DWI demonstrated high signal intensity bilaterally in the basal ganglia, insula, and cingulate gyrus

(Fig. 1A and B). FLAIR imaging also showed high signal intensity bilaterally in the basal ganglia (Fig. 2A). Apparent diffusion coefficient (ADC) mapping of these regions revealed decreased signal intensity, indicating cytotoxic edema. T1-weighted imaging (T1WI) showed normal results (Fig. 2B).

DWI performed approximately 1 month after admission showed that the hyperintense signals in the basal ganglia had decreased slightly and those in the cortex had extended into the left temporoparietal cortex and the cingulate gyrus (Fig. 1C and D). DWI also showed that the hyperintensity in the insular cortex had increased in signal intensity (Fig. 1C). On T1WI, spotty hyperintense signals had appeared bilaterally in the globus pallidus (Fig. 2D).

On DWI performed 2 months after admission, the degree of hyperintensity in regions involving the cingulate gyrus, insular cortex, left temporoparietal cortex, and basal ganglia had decreased slightly (Fig. 1E and F). On T1WI, the increased signal intensity in the globus pallidus was more apparent than it had been 1 month after admission (Fig. 2F).

## 3. Discussion

The case we describe helps to clarify the role of MRI as a diagnostic tool in patients with familial CJD. Familial CJD with the codon 200 mutation was confirmed by genetic

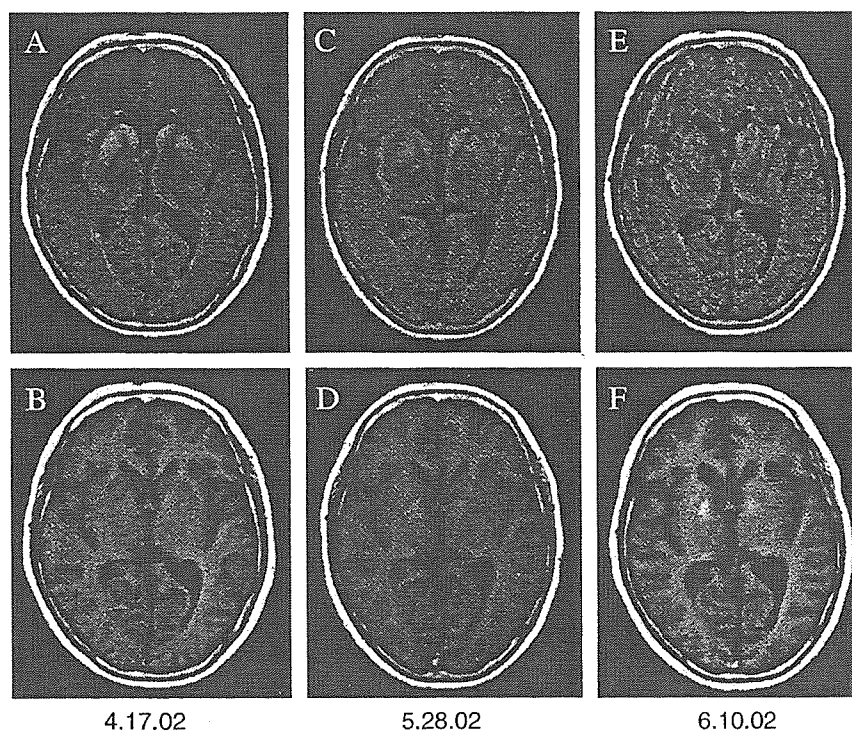


Fig. 2. Magnetic resonance imaging of the brain with serial fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) and T1-weighted imaging (T1WI). (A) and (B) were performed at admission, (C) and (D) at approximately 1 month, and (E) and (F) at 2 months after admission. (A) Hyperintense signals in the bilateral basal ganglia on FLAIR image. (B) Normal T1WI. (C) Slightly decreased hyperintense signals in the bilateral basal ganglia on FLAIR image. (D) Bilateral spotty hyperintense signals in the globus pallidus on T1WI. (E) No significant signal change in FLAIR (compared with FLAIR image at 1 month), but artifact prevented precise evaluation. (F) Increased signal intensity in the globus pallidus on T1WI (more apparent than at 1 month).

study in our patient. As has also been reported for other patients with this mutation [10,12–17], progression was more aggressive in our patient than in those with sporadic CJD. However, most clinical features of our case were similar to those of sporadic CJD, including rapidly progressive ataxia, severe mental deterioration, myoclonus, and typical periodic sharp-wave activity on EEG approximately 4 months after the onset of symptoms.

DWI abnormalities in our patient were observed as areas of high signal intensity in the putamen and caudate nucleus and as ribbon-like areas of hyperintensity in the cortical areas, predominantly in the insula, cingulate gyrus, and temporoparietal lobe. Although corresponding FLAIR images showed some hyperintensity in the basal ganglia, ADC mapping performed at the same time showed reduced signals in the corresponding regions, indicating that T2 shine-through contributed to the hyperintensity in the DWI only to a slight degree. The abnormalities found in our patient resemble those observed in sporadic CJD [19–28], demonstrating that similar MRI abnormalities can be found in both forms of the disease.

DWI appears to be a valuable tool that should be included in the diagnostic criteria for CJD [33]. Marked DWI changes can be observed in the early stages of symptomatic onset and are sustained over several months, although the high signal intensity seen on DWI may disappear over time in patients with advanced sporadic CJD (unpublished data). Shiga et al. [33] concluded that DWI was a more sensitive test for the early clinical diagnosis of CJD than periodic sharp wave complexes on EEG, detection of CSF 14–3–3 protein, or increase of NSE in the CSF. DWI may detect areas of increased signal intensity in the basal ganglia and cerebral cortex with greater sensitivity than that of routine MRI sequences such as T1WI, T2WI, or FLAIR images [18,34].

The pathogenesis of DWI abnormalities in the basal ganglia and cerebral cortex in CJD is not well understood. Spongiform neuronal degeneration and microglial activation might contribute to the changes demonstrated on DWI [35,36]. Cambier et al. [37] have suggested that high signal intensity on DWI may be related to periodic sharp-wave complex discharges on EEG. The EEG did not show specific changes corresponding to the DWI abnormalities in our case. Although our patient showed positive 14–3–3 protein and increased NSE in the CSF, as in sporadic CJD, it is unclear whether these findings are also related to the DWI abnormalities.

T1WI signals in the globus pallidus were initially normal in our patient and increased in intensity bilaterally during the early stages. This phenomenon might represent rapid pathologic changes in the basal ganglia during the course of the illness, corresponding to the hyperintensities shown on DWI. Such changes have previously been reported in only 1 patient with sporadic CJD, who showed typical clinical characteristics [38]. Although the high T1WI signal intensity in the globus pallidus may have been due to

accumulation of prion protein in the brain [38], increased metal concentration can also cause high signal intensity on T1WI [39]. It remains doubtful whether T1WI abnormalities are pathognomonic for either sporadic or familial CJD.

To our knowledge, this is the first report to of MRI showing DWI and T1WI abnormalities in familial CJD with a point mutation at codon 200. Despite the clinical diversity and atypical laboratory findings seen in familial CJD with the codon 200 mutation, these neuroimaging studies suggest that common regional distributions and a common pathogenesis might underlie the clinical progression in both sporadic and familial CJD with the codon 200 mutation in the prion protein gene. Thus, DWI abnormalities may be characteristic features that should be considered in the diagnosis of familial as well as of sporadic CJD.

## References

- [1] Brown P, Cathala F, Castaigne P, Gajdusek DC. Creutzfeldt–Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases. *Ann Neurol* 1986;20:597–602.
- [2] Johnson RT, Gibbs CJ. Creutzfeldt–Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1998;339:1994–2004.
- [3] Richardson EP, Masters CL. The nosology of Creutzfeldt–Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrP<sup>CJD</sup> in the nervous system. *Brain Pathol* 1995;5:33–41.
- [4] Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs Jr CJ, Bernoulli C, Asher DM. Creutzfeldt–Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 1979;5:177–88.
- [5] Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RS, et al. Analysis of EEG and CSF 14–3–3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 2000;55:811–5.
- [6] Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, et al. Detection of 14–3–3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease. *Ann Neurol* 1998;43:32–40.
- [7] Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14–3–3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996;335:924–30.
- [8] Aksamit Jr AJ, Preissner CM, Homburger HA. Quantitation of 14–3–3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 2001;57:728–30.
- [9] Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL, Hauw JJ, Alperovitch A. Diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease: effect of clinical criteria on incidence estimates. *Neurology* 2000;54:1095–9.
- [10] Seno H, Tashiro H, Ishino H, Inagaki T, Nagasaki M, Morikawa S. New haplotype of familial Creutzfeldt–Jakob disease with a codon 200 mutation and a codon 219 polymorphism of the prion protein gene in a Japanese family. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;99:125–30.
- [11] Hauw JJ, Sazdovitch V, Laplanche JL, Peoc'h K, Kopp N, Kemeny J, et al. Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* 2000;54:1641–6.
- [12] Meiner Z, Gabizon R, Prusiner SB. Familial Creutzfeldt–Jakob disease. Codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:227–37.
- [13] Iwabuchi K, Endoh S, Hagimoto H, Okamoto K, Miyakawa T, Yamaguchi T, et al. Three patients from two families with familial Creutzfeldt–Jakob disease having a point mutation in the prion protein gene at codon 200 (Glu→Lys). *No To Shinkei* 1994;46:349–54.
- [14] Kawauchi Y, Okada M, Kuroiwa Y, Ishihara O, Akai J. Familial Creutzfeldt–Jakob disease with the heterozygous point mutation at

- codon 200 of the prion protein gene (Glu→Lys)—report of CJD200 brothers of Yamanashi Prefecture origin. *No To Shinkei* 1997;49:460–4.
- [15] Salvatore M, Pocchiari M, Cardone F, Petraroli R, D'Alessandro M, Galvez S, et al. Codon 200 mutation in a new family of Chilean origin with Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:111–2.
- [16] Chapman J, Arlazoroff A, Goldfarb LG, Cervenakova L, Neufeld MY, Werber E, et al. Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt–Jakob disease with the codon 200 (Lys) mutation. *Neurology* 1996; 46:758–61.
- [17] Antoine JC, Laplanche JL, Mosnier JF, Beaudry P, Chatelain J, Michel D. Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt–Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology* 1996;46:1123–7.
- [18] Mendez OE, Shang J, Jungreis CA, Kaufer DI. Diffusion-weighted MRI in Creutzfeldt–Jakob disease: a better diagnostic marker than CSF protein 14–3–3? *J Neuroimaging* 2003;13:147–51.
- [19] Bahn MM, Kido DK, Lin W, Pearlman AL. Brain magnetic resonance diffusion abnormalities in Creutzfeldt–Jakob disease. *Arch Neurol* 1997;54:1411–5.
- [20] Bahn MM, Parchi P. Abnormal diffusion-weighted magnetic resonance images in Creutzfeldt–Jakob disease. *Arch Neurol* 1999;56:577–83.
- [21] Demaerel P, Baert AL, Vanopdenbosch L, Robberecht W, Dom R. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in Creutzfeldt–Jakob disease. *Lancet* 1997;349:847–8.
- [22] Demaerel P, Heiner L, Robberecht W, Sciot R, Wilms G. Diffusion-weighted MRI in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1999;52:205–8.
- [23] Demaerel P, Sciot R, Robberecht W, Dom R, Vandermeulen D, Maes F, et al. Accuracy of diffusion-weighted MR imaging in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neurol* 2003;250:222–5.
- [24] Matoba M, Tonami H, Miyaji H, Yokota H, Yamamoto I. Creutzfeldt–Jakob disease: serial changes on diffusion-weighted MRI. *J Comput Assist Tomogr* 2001;25:274–7.
- [25] Na DL, Suh CK, Choi SH, Moon HS, Seo DW, Kim SE, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in probable Creutzfeldt–Jakob disease: a clinical–anatomic correlation. *Arch Neurol* 1999;56:951–7.
- [26] Nagaoka U, Kurita K, Hosoya T, Kitamoto T, Kato T. Diffusion images on brain MRI in Creutzfeldt–Jakob disease. *Clin Neurol* 1999;39:468–70.
- [27] Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 2000;217:331–45.
- [28] Yee AS, Simon JH, Anderson CA, Sze CI, Filley CM. Diffusion-weighted MRI of right-hemisphere dysfunction in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1999;52:1514–5.
- [29] Nitrini R, Mendonca RA, Huang N, LeBlanc A, Livramento JA, Marie SK. Diffusion-weighted MRI in two cases of familial Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neurol Sci* 2001;184:163–7.
- [30] Ishida S, Sugino M, Koizumi N, Shinoda K, Ohsawa N, Ohta T, et al. Serial MRI in early Creutzfeldt–Jakob disease with a point mutation of prion protein at codon 180. *Neuroradiology* 1995;37:531–4.
- [31] Huang N, Marie SK, Kok F, Nitrini R. Familial Creutzfeldt–Jakob disease associated with a point mutation at codon 210 of the prion protein gene. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:932–5.
- [32] Satoh A, Goto H, Satoh H, Tomita I, Seto M, Furukawa H, et al. A case of Creutzfeldt–Jakob disease with a point mutation at codon 232: correlation of MRI and neurologic findings. *Neurology* 1997;49:1469–70.
- [33] Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, et al. Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 2004;6:443–9.
- [34] Mendez OE, Shang J, Jungreis CA, Kaufer DI. Accuracy of diffusion-weighted MR imaging in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neurol* 2003;250:222–5.
- [35] Bergui M, Bradac GB, Rossi G, Orsi L. Extensive cortical damage in a case of Creutzfeldt–Jakob disease: clinicoradiological correlations. *Neuroradiology* 2003;45:304–7.
- [36] Mittal S, Farmer P, Kalina P, Kingsley PB, Halperin J. Correlation of diffusion-weighted magnetic resonance imaging with neuropathology in Creutzfeldt–Jakob disease. *Arch Neurol* 2002;59:128–34.
- [37] Cambier DM, Kantarci K, Worrell GA, Westmoreland BF, Aksamit AJ. Lateralized and focal clinical, EEG, and FLAIR MRI abnormalities in Creutzfeldt–Jakob disease. *Clin Neurophysiol* 2003;114:1724–8.
- [38] de Priester JA, Jansen GH, de Kruijk JR, Wilmink JT. New MRI findings in Creutzfeldt–Jakob disease: high signal in the globus pallidus on T1-weighted images. *Neuroradiology* 1999;41:265–8.
- [39] Maeda H, Sato M, Yoshikawa A, Kimura M, Sonomura T, Terada M, et al. Brain MR imaging in patients with hepatic cirrhosis: relationship between high intensity signal in basal ganglia on T1-weighted images and elemental concentrations in brain. *Neuroradiology* 1997;39:546–50.

# Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study

K. Sasaki\*, K. Doh-ura\*, Y. Wakisaka\*, H. Tomodat and T. Iwaki\*

\*Department of Neuropathology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, and †Department of Neurology, Imazu Red Cross Hospital, Imazu, Fukuoka, Japan

K. Sasaki, K. Doh-ura, Y. Wakisaka, H. Tomoda and T. Iwaki (2005) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 31, 80–87

## Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study

We recently performed a *post-mortem* examination on a Japanese patient who had a prion protein gene mutation responsible for fatal familial insomnia (FFI). The patient initially developed cerebellar ataxia, but finally demonstrated insomnia, hyperkinetic delirium, autonomic signs and myoclonus in the late stage of the illness. Histological examination revealed marked neuronal loss in the thalamus and inferior olivary nucleus; however, prion protein (PrP) deposition was not proved in these lesions by immunohistochemistry. Instead, PrP deposition and spongiform change were both conspicuous within the cerebral cortex, whereas particular PrP deposition was also observed within the cerebellar cortex. The abnormal protease-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) molecules in the cerebral cor-

tex of this case revealed PrP<sup>res</sup> type 2 pattern and were compatible with those of FFI cases, but the transmission study demonstrated that a pathogen in this case was different from that in a case with classical FFI. By inoculation with homogenate made from the cerebral cortex, the disease was transmitted to mice, and neuropathological features that were distinguishable from those previously reported were noted. These findings indicate the possibility that a discrete pathogen was involved in the disease in this case. We suggest that not only the genotype of the PrP gene and some other as yet unknown genetic factors, but also the variation in pathogen strains might be responsible for the varying clinical and pathological features of this disease.

Keywords: Creutzfeldt-Jakob disease, NZW mouse, prion disease, thalamic form, transmissible spongiform encephalopathy

### Introduction

Fatal familial insomnia (FFI) is one of the disease entities of prion disease or transmissible spongiform encephalopathy (TSE) and it is linked to a mutation at codon 178 of the prion protein gene (PRNP), aspartic acid to asparagine substitution (D178N), in conjunction with methionine at the polymorphic position 129 of the mutant allele [1]. The

neuropathological hallmark of FFI is the predominance of lesions within the thalamus [2]. Clinically this disorder is characterized by progressive insomnia, dysautonomia and motor signs [3]. The D178N mutation is also associated with familial Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). The disease phenotypes have been considered to depend on the polymorphism at codon 129 of the mutant allele, methionine (129Met) in FFI and valine (129Val) in CJD [4]. However, the FFI genotype reveals diverse clinical expression including cerebellar ataxia, dementia and autonomic abnormalities with or without insomnia [5,6]. In Japan, one FFI case [7] and some cases of the 'sporadic'

Correspondence: Kensuke Sasaki, Department of Neuropathology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel: +81-92-6425539; Fax: +81-92-6425540; E-mail: ksasaki@np.med.kyushu-u.ac.jp

thalamic form of CJD [8,9] have been reported, and these have indicated a discrepancy between PRNP genotype and the disease phenotype.

We recently performed a *post-mortem* examination on a Japanese patient with a 27-month history of familial prion disease with PRNP D178N-129Met mutation. The clinical data on this patient and his family have been published in part [10]. Here we report additional clinical data and *post-mortem* neuropathological findings, as well as findings in mice infected with the patient's material.

### Case report

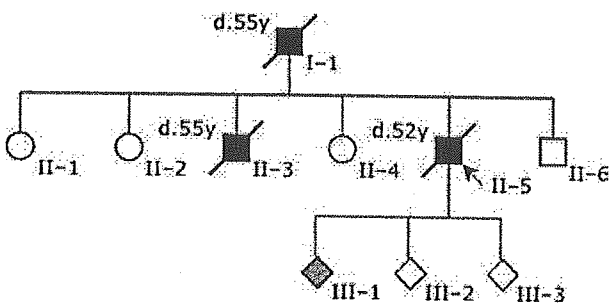
The pedigree is presented in Figure 1. In October 1997, a 50-year-old Japanese man (Patient II-5) developed an unsteady gait, followed within a month by difficulty in speech. Although these symptoms worsened rapidly, he did not immediately develop either dementia or insomnia. He was admitted to a hospital for neurological evaluation in February 1998, and PRNP D178N-129Met mutation (heterozygous for 129Met/Val) was revealed as previously reported [10]. From October 1998, either insomnia or delirium was clearly apparent. Hyperthermia without any signs indicative of infection or inflammation, thus suggesting an autonomic sign, was also observed. He often showed reality disturbance and restlessness. He became progressively demented, developed trismus, myoclonus and horizontal nystagmus, and demonstrated increased muscle tone. Finally he became bedridden with flexion contracture. Brain computed tomography revealed mild atrophy of the cerebellum and brainstem. Electroencephalograms showed a background of 9 Hz diffuse  $\alpha$  activities, but periodic synchronous discharges were not

detected during the clinical course. Sleep activities with rapid eye movements were not recorded in sleep electroencephalograms. In January 2000, he died of pneumonia at the age of 52 years, about 27 months after the onset of disease.

Patient II-3, one of the brothers of Patient II-5, also showed rapidly progressive cerebellar ataxia. He developed an ataxic gait, forgetfulness and dysarthria at the age of 55 years. Brain computed tomography demonstrated moderate cerebellar atrophy, and electroencephalograms showed diffuse intermittent slow activities without periodic synchronous discharges. He developed myoclonic jerks, akinetic mutism with a decorticate posture, and died 7 months after the onset. Patient I-1, the father of Patients II-5 and II-3, had also developed an ataxic gait and dementia at the age of 55 years. He died of unknown causes after a clinical course of 12 months. Neither autopsy nor PRNP analysis was carried out in either Patient I-1 or Patient II-3. One of the children of Patient II-5 was revealed to have PRNP D178N-129Met mutation (homozygous for 129Met).

### Materials and methods

Autopsy was performed 6 h *post-mortem*. A frontal tip of the right cerebral hemisphere and a cerebellar tip were sampled and frozen for Western blot analysis. The remaining brain was immersion-fixed in 10% formalin for 2 weeks. Tissue blocks were immersed in 98% formic acid for 1 h and paraffin-embedded. Hematoxylin and eosin (HE) stain, Klüver-Barrera stain and Bodian's method were performed on 7- $\mu$ m-thick sections. Immunohistochemical analyses were performed by a standard indirect method for glial fibrillary acidic protein (GFAP) (polyclonal, Dako, Denmark, or monoclonal, clone G-A-5, Roche, Switzerland), ferritin (polyclonal, Dako),  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) (monoclonal, clone LN27, Zymed, USA), SNAP-25 (monoclonal, clone MAB331, Chemicon, USA) and prion protein (PrP) (monoclonal, clone 3F4, Senetek, USA). For anti-PrP immunohistochemistry, sections were pretreated with hydrolytic autoclaving as previously reported [11]. Western blot analysis for protease-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) was performed using frontal cortical and cerebellar tissue tips from this case, applying phosphotungstic acid precipitation of PrP<sup>res</sup> as described previously [12] with 50  $\mu$ g/ml proteinase K (PK) digestion, along with a control case with sporadic



**Figure 1.** Family tree of the present pedigree. Patients who developed rapidly progressive cerebellar ataxia are depicted by closed symbols, along with their age at death (years old). One of the children of the present case has fatal familial insomnia genotype D178N-129Met/Met (grey symbol).

CJD (77-year-old man, duration of illness was 9 months, 129Met/Met). Transmission study was performed as described previously [13]. Briefly, frontal cortical tissue tips were aseptically homogenized with nine volumes of saline, and after removal of debris by low-speed centrifugation the supernatant was used as 10% homogenate. Twenty microliters of 10% homogenate were injected intracerebrally into female NZW mice or female Tg7 mice expressing hamster PrP but not endogenous murine PrP. Sections of infected mice were analysed by HE stain and also by immunohistochemistry for PrP (polyclonal, PrP-C, IBL, Japan) and GFAP (clone G-A-5, Roche). Permission for the animal experiments was obtained from the Animal Experiment Committee of Kyushu University.

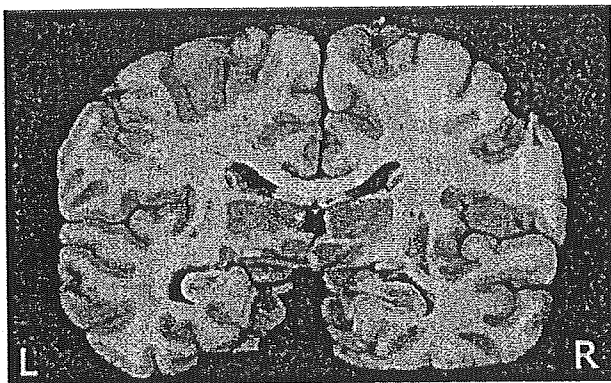


Figure 2. Coronal section at the thalamic level. The medial part of the thalamus is atrophic and the third ventricle is dilated.

## Results

The brain weighed 1350 g before fixation. The cerebellum showed slight atrophy, whereas the volume of the fore-brain was preserved. Coronal sections showed atrophy of the medial part of the thalamus and symmetrical dilatation of the third ventricle (Figure 2).

The summary of histological examination is shown in Figure 3. Marked neuronal loss and moderate astrogliosis in the thalamus were observed, most prominently in its centromedial nucleus and dorsomedial nucleus. However, spongiform change was imperceptible (Figure 4A,B). Neuronal loss and gliosis in the medial portion of the inferior olivary nucleus were also apparent (Figure 4C,D). In the cerebellum there was mild loss of granular cells, and the molecular layer was slightly atrophic. There were localized lesions of spongiosis in the cerebellar molecular layer. Purkinje's cells appeared not to be decreased in number, but they often demonstrated shrunken features. The cerebellar white matter showed diffuse myelin pallor. The cerebral cortex showed uneven distribution of spongiform change and neuronal loss (Figure 4E). There was no apparent difference in the intensities of the cortical lesions among the lobes of the cerebrum except that the lesions are more prominent in the entorhinal cortex and less in the occipital lobe. Moderate astrogliosis was associated with the spongiform lesions (Figure 4F).

Immunohistochemistry for PrP revealed that there was no punctate or plaque-type immunoreactivity in the thal-

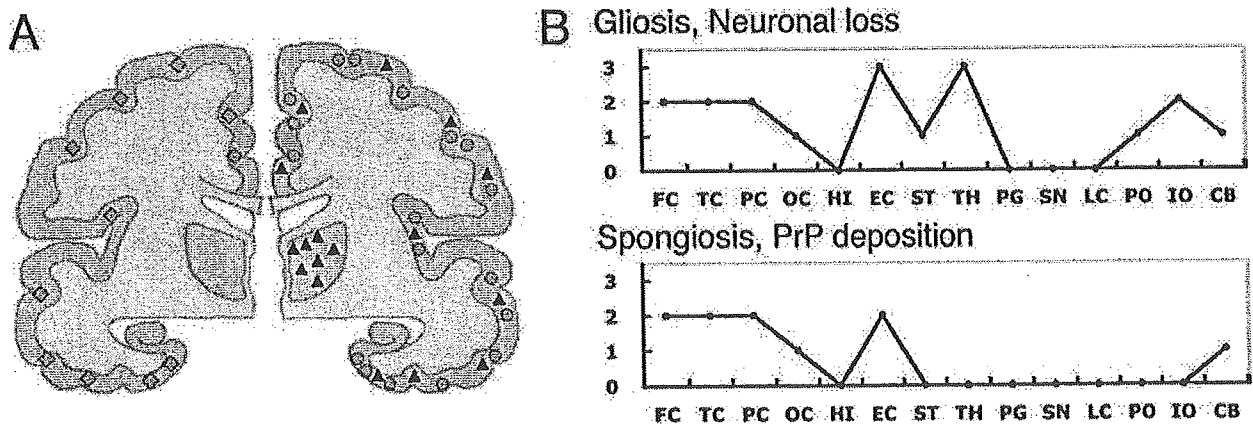
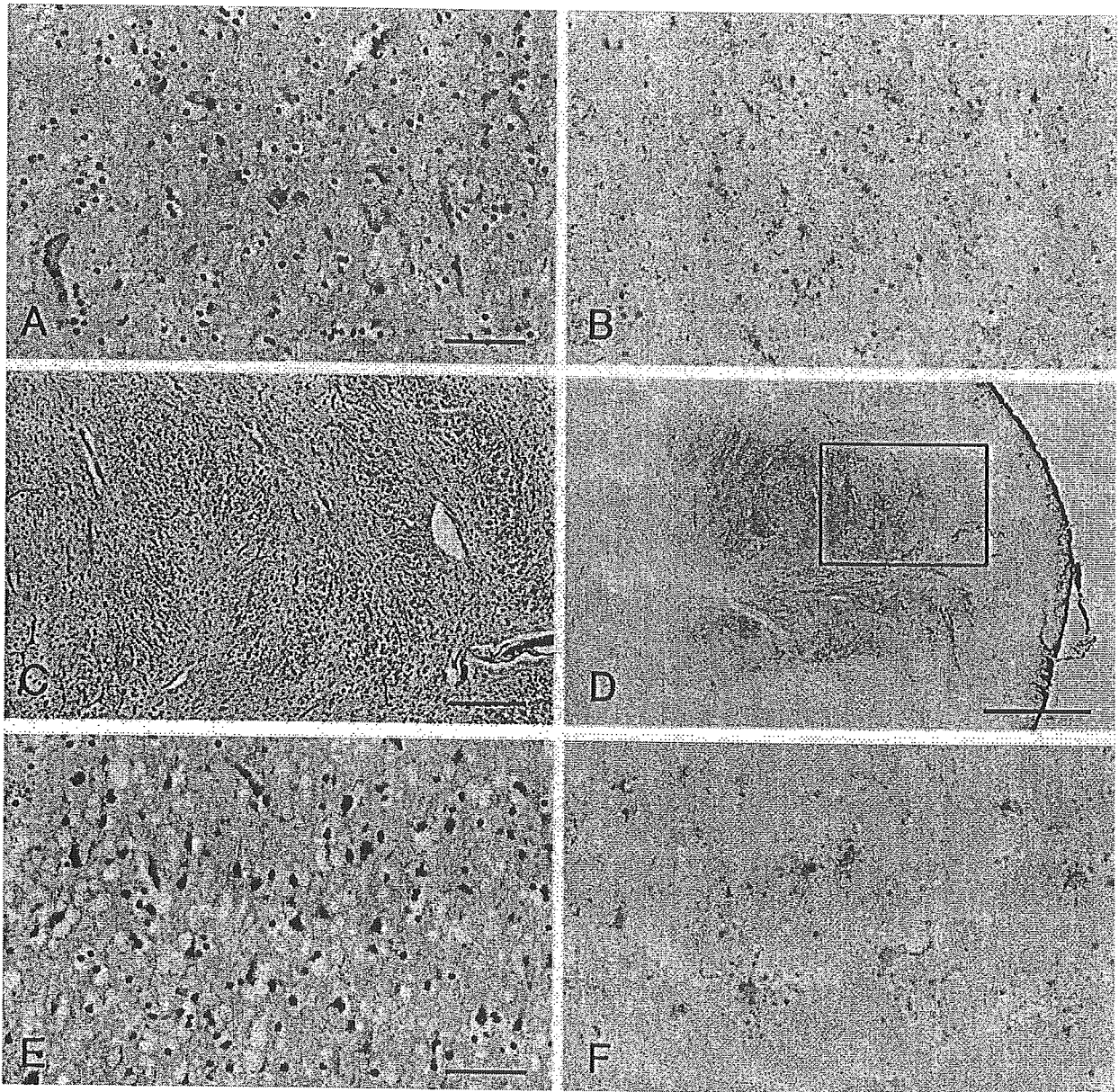


Figure 3. Lesion profiles of the present case. A: schematic drawing of the distribution of prion protein (PrP) deposition (diamonds), spongiosis (circles) and neuronal loss (triangles) in this case, which can be compared to that of fatal familial insomnia (FFI) and 178CJD shown in ref. [19]. B: lesion profiles in respect to gliosis/neuronal loss and spongiosis/PrP deposition. Brain regions studied were: frontal cortex (FC), temporal cortex (TC), parietal cortex (PC), occipital lobe (OC), hippocampus (HI), entorhinal cortex (EC), striatum (ST), thalamus (TH), substantia nigra (SN), periaqueductal grey (PG), pons (PO), locus ceruleus (LC), medulla oblongata (ME), cerebellum (CB). The vertical axis is the degree of lesion graded as follows. 0: not detectable; 1: mild; 2: moderate; 3: severe.

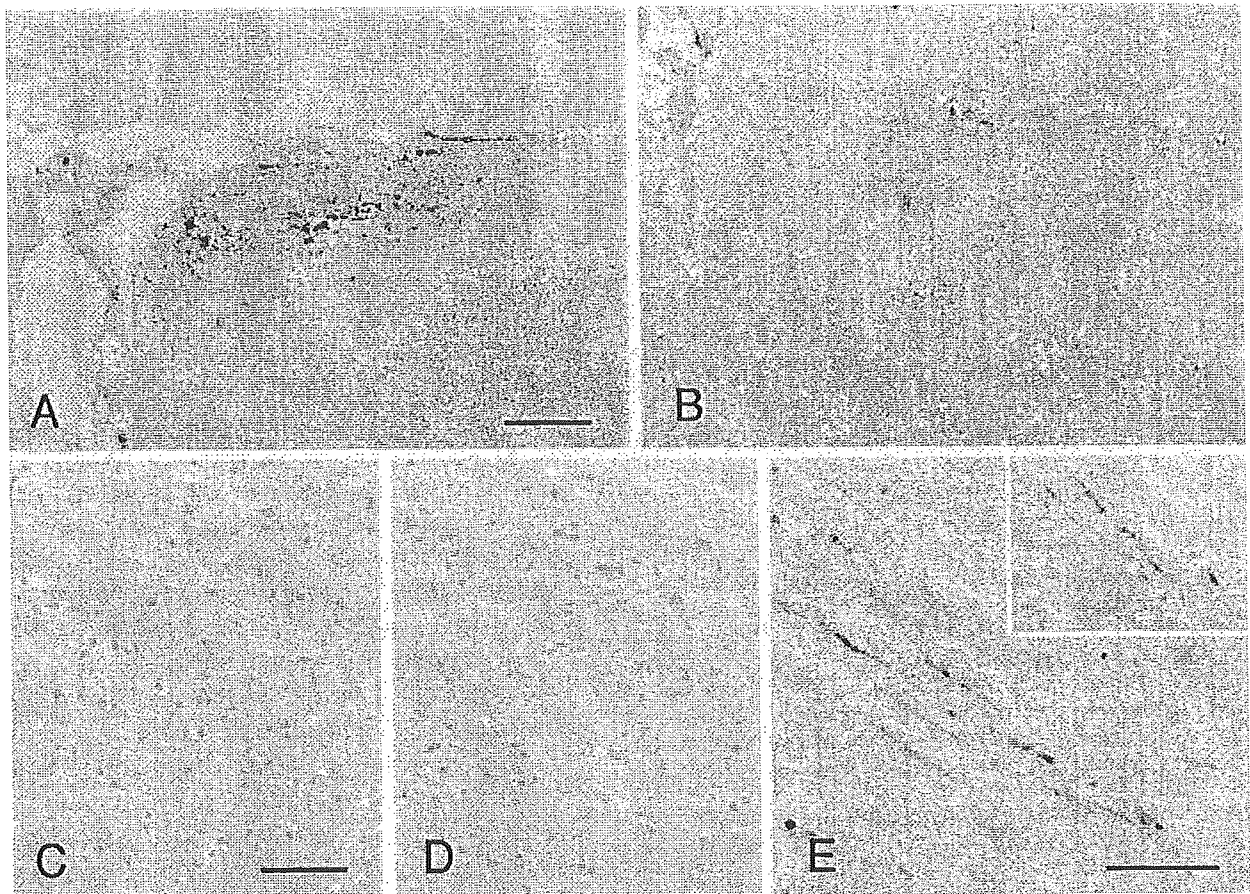


**Figure 4.** Neuronal loss and gliosis revealed by haematoxylin and eosin stain (A, E), Bodian's stain (C) or immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) (B, D, F). A, B: centromedial nucleus of the thalamus. C, D: inferior olivary nucleus. Neuronal loss is more evident in the medial part (left side of panel C, which represents the rectangular area depicted in panel D). E, F: cerebral cortex (frontal lobe). Both spongiform change and gliosis are remarkable. Bars: 50  $\mu$ m (A, B, E, F), 200  $\mu$ m (C), 1 mm (D).

amus or inferior olivary nucleus (Figure 5C,D). In the cerebellar molecular layer, punctate deposits of PrP were focally observed (Figure 5A), and the regions with these deposits were coincident with the extent of spongiform change. Likewise, fine granular deposition of PrP was also detected together with spongiform degeneration in the cerebral cortex (Figure 5B). The distribution of PrP deposits appeared to be more broad and noticeable in the cere-

bral cortex than in the cerebellum. As a unique finding, the anti-PrP antibody revealed swollen and/or frizzled axons in the deeper parts of the cerebral white matter, in the corpus callosum, or at the borders of the thalamus and caudate nucleus (Figure 5E). Axonal transported substances, APP (Figure 5E, inset) and SNAP-25 (data not shown) were also detected immunohistochemically in those axons.





**Figure 5.** Immunohistochemistry for prion protein (PrP) deposition. A: cerebellum. B: frontal cortex. C: centromedial nucleus of the thalamus. D: inferior olivary nucleus. PrP deposition can not be detected in the thalamus or the inferior olivary nucleus, but coarse or fine granular PrP deposition is visible within the cerebral cortex and the cerebellar molecular layer. E: axons with swollen and/or frizzled features can be detected in the white matter at the border of the thalamus. These axons are also immunostained with anti-APP (amyloid precursor protein) antibody (inset). Bars: 50  $\mu\text{m}$  (A, B, E), 100  $\mu\text{m}$  (C, D).

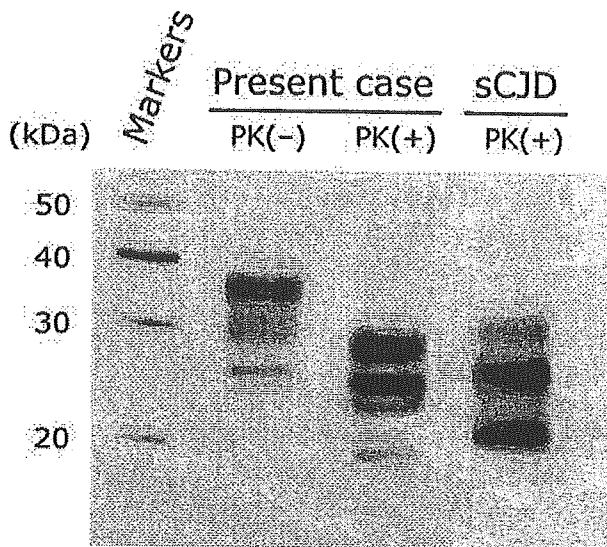
Although the conventional method of Western blot analysis for PrP<sup>res</sup> failed to detect any particular signal (data not shown), by application of phosphotungstic acid precipitation that preferably concentrates PrP<sup>res</sup> but not cellular PrP [12], Western blot analysis of the extract from the frontal cortex of this case revealed a detectable amount of PrP<sup>res</sup> (Figure 6). The molecular weight of non-glycosylated form of PrP was about 19 kDa (PrP<sup>res</sup> type 2 pattern) and also the PrP<sup>res</sup> glycoform ratio was compatible with that of FFI, which has been previously reported [14]. The extract from the cerebellum showed no significant signal in Western blot analysis even with phosphotungstic acid precipitation (data not shown).

The disease of this case was successfully transmitted to some of the mice inoculated with tissue homogenate from the frontal cortex. The incubation time was  $571.6 \pm 61.1$

days (5/7 of the inoculated mice developed TSE) in the NZW mice and  $736 \pm 64.4$  (5/8) in the Tg7 mice, respectively. Although not all the mice developed TSE, diseased mice demonstrated lethargy in the terminal stage rather than excitability. In the TSE-developed mice pathological examination of the brain showed that spongiform change and gliosis were prominent in the cerebral cortex in addition to the thalamus (Figure 7). Immunohistochemistry for PrP revealed that diffuse granular PrP deposition was present within the deep layer of the cerebral cortex as well as in the lateral portion of the thalamus (Figure 7B,E).

## Discussion

It is established that there is an overlapping spectrum between classical FFI and CJD in association with PRNP



**Figure 6.** Western blot analysis for protease-resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>). Brain homogenate of the frontal cortex of this case is treated with or without proteinase K (PK), and then PK-digested sample is followed by the 40-times concentration with phosphotungstic acid precipitation for PrP<sup>res</sup>. The abnormal PrP molecules in the frontal cortex of this case migrate as PrP<sup>res</sup> type 2. PrP molecules in the lane sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) are also shown as a standard type 1 PrP (MM1). Molecular sizes (kDa) are indicated on the left.

D178N [6]; however, this case adds to our knowledge about this disease. Although the present case had FFI genotype, the clinical features were initially characterized by prominent cerebellar ataxia, and the neuropathological findings were also atypical in the following respects. First, PrP deposition and spongiform change in the cerebral cortex were more conspicuous than in the thalamus or inferior olivary nucleus, both of which are extremely vulnerable sites for FFI. It has been previously reported that heterozygotes Met/Val at codon 129 result in a longer clinical course than homozygotes [4], and it is therefore possible that the lesions seen in the cerebral cortex were more prominent simply because of the longer course of illness in this patient. However, a further noteworthy point about this case is rather that there was no PrP deposition either in the thalamus or in the inferior olivary nucleus.

Second, immunohistochemical examination detected a peculiar deposition of PrP within the molecular layer of the cerebellum. The localized lesions of granular deposits of PrP and spongiform change in the cerebellar molecular layer seemed to be similar to those reported in a patient from an Austrian FFI family [15]. The cerebellar ataxia of this case could have attributed to the loss of granular neu-

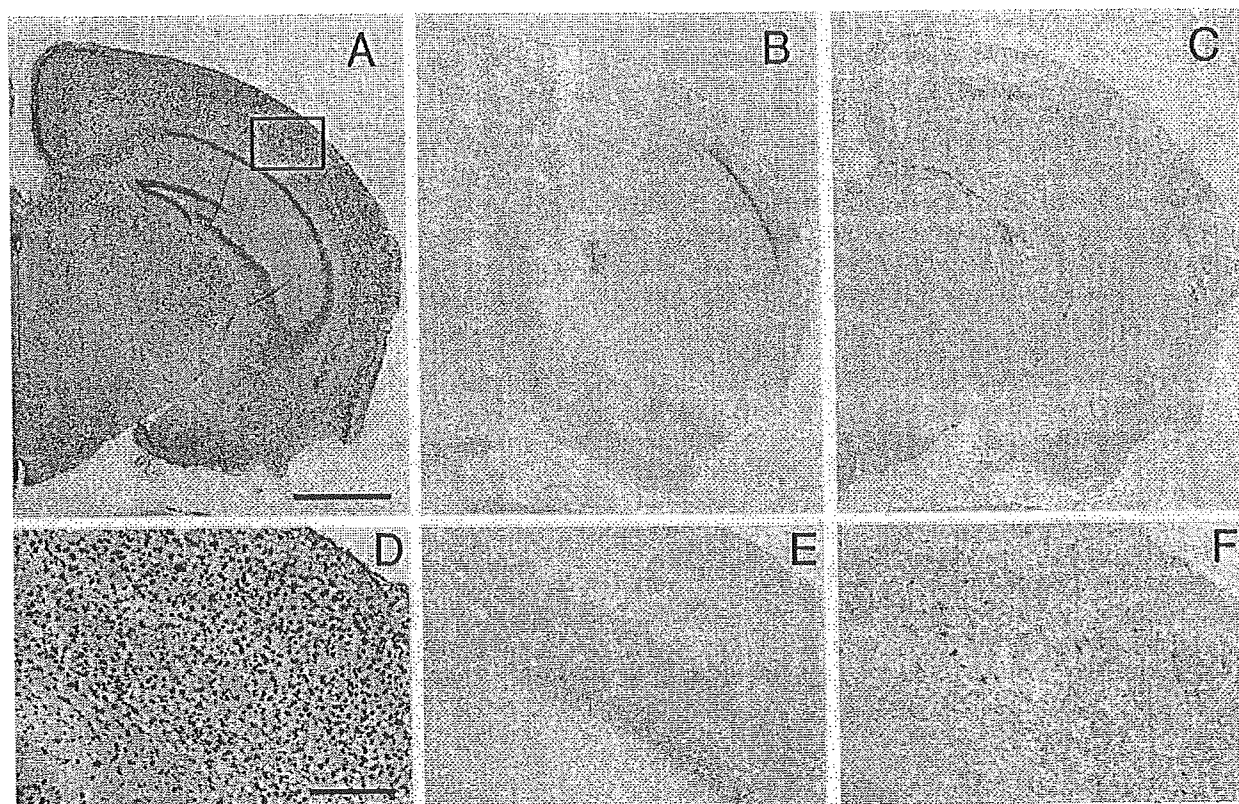
rones and degeneration of Purkinje's cells, in addition to the lesions of the inferior olivary nucleus, although the pathology related to PrP deposition could have also been responsible.

A third atypical feature is that the neuronal loss in the thalamus was most noticeable in the centromedial nucleus. A previous study revealed that severe atrophy of the anterior ventral and dorsomedial thalamic nuclei was consistently observed, whereas that of other thalamic nuclei was less severe and they were inconsistently affected [2]. In this case, the medial portion of the thalamus was indeed damaged crucially, but the principal lesion was different from the typical pathology of FFI.

In addition, an interruption of axonal transport was suggested. Some of the axons were swollen and associated with PrP accumulation, and both APP and SNAP-25 were also accumulated in those axons. APP and SNAP-25 are presynaptic protein and APP is considered as the most effective marker for axonal injury [16]. Aberration in recruitment of PrP might be involved in the pathogenesis of TSE, as described previously [17,18].

This case showed a small amount of specific PrP<sup>res</sup> in the cerebral cortex but not in the cerebellum as detected by Western blotting. The ratio of PrP<sup>res</sup> quantity in those regions was visually correlated with that of immunohistochemical reactivity for PrP. Although fresh frozen samples from the thalamus or the inferior olivary nucleus were not obtained for Western blot analyses, we suspect that PrP<sup>res</sup> in such regions would be too sparse to be detected by Western blotting even in combination with phosphotungstic acid precipitation. The type 2 migration pattern and the glycoform ratio of PrP<sup>res</sup> in this case were compatible with those in the typical FFI [14]; however, it remains to be elucidated whether these abnormal proteins that can be classified in the same PrP<sup>res</sup> type may have different influences on the neurodegeneration processes.

Finally, the transmission study revealed that a pathogen in the frontal cortex of this case might be different from that of an FFI case previously reported by Dr Tateishi and his colleagues [13]. NZW mice infected with a thalamic tissue sample of a typical FFI case exhibited excitability as the principal clinical sign and demonstrated PrP deposition predominantly localized within the thalamus. On the other hand, NZW mice infected with a frontal cortical tissue sample from the present case showed lethargy as a clinical sign, and demonstrated diffuse PrP deposition within the deep layer of the cerebral cortex, as well as in the lateral portion of the thalamus. The PrP deposition



**Figure 7.** Histological profiles of the mice inoculated with the patient's brain material. A, D: hematoxylin and eosin stain. B, E: prion protein (PrP). C, F: glial fibrillary acidic protein. Spongiform change, PrP deposition and astrocytic gliosis can be observed within the deep layer of the cerebral cortex as well as in the lateral portion of the thalamus. D–F: high power magnifications of the cortical lesions represent the rectangular area depicted in panel A. Bars: 1 mm (A–C), 150  $\mu$ m (D–E).

pattern of this mouse was distinctive against that of mouse models with other scrapie strains, thus refuting the possibility of contamination. It is not clear whether there were more than two pathogen strains in the brain and whether the strains were dependent on the brain areas. Because we have not examined transmissibility of this case systematically and not obtained frozen materials for Western blot analysis, this aspect still awaits further clarification.

In conclusion, the present case which had FFI genotype showed atypical features, especially with regard to the PrP deposition pattern; there was no deposition within the thalamus or inferior olivary nucleus. Diversity in disease phenotype among patients with the same genotype suggests that some other unidentified factors as well as abnormal PrP deposits or other as yet unknown genetic factors may be responsible for the pathogenesis of the disease. In this study we have shown that variation in pathogen strains may also be one such factor and this factor could have greatly affected the pathogenesis in the present case of FFI.

### Acknowledgements

We thank Ms K. Hatanaka for her excellent technical assistance. This study was supported partly by a grant to K. Doh-ura from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Part of this study was carried out at the Morphology Core, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University. The English used in this manuscript was revised by Miss K. Miller (Royal English Language Centre, Fukuoka, Japan).

### References

- 1 Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Wills PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Gambetti LA, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; 258: 806–8

- 2 Manetto V, Medori R, Cortelli P, Montagna P, Tinuper P, Baruzzi A, Rancurel G, Hauw JJ, Vanderhaeghen JJ, Mailloux P, Bugiani O, Tagliavini F, Bouras C, Rizzuto N, Lugaresi E, Gambetti P. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 1992; 42: 312-9
- 3 Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986; 315: 997-1003
- 4 Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Autilio-Gambetti L, Capellari S, Monari L, Cortelli P, Montagna P, Lugaresi E, Gambetti P. Molecular pathology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 1998; 8: 539-48
- 5 McLean CA, Storey E, Gardner RJ, Tannenberg AE, Cervenakova L, Brown P. The D178N (cis-129M) 'fatal familial insomnia' mutation associated with diverse clinicopathologic phenotypes in an Australian kindred. *Neurology* 1997; 49: 552-8
- 6 Zerr I, Giese A, Windl O, Kropp S, Schulz-Schaeffer W, Riedemann C, Skworc K, Bodemer M, Kretzschmar HA, Poser S. Phenotypic variability in fatal familial insomnia (D178N-129M) genotype. *Neurology* 1998; 51: 1398-405
- 7 Nagayama M, Shinohara Y, Furukawa H, Kitamoto T. Fatal familial insomnia with a mutation at codon 178 of the prion protein gene: first report from Japan. *Neurology* 1996; 47: 1313-6
- 8 Kawasaki K, Wakabayashi K, Kawakami A, Higuchi M, Kitamoto T, Tsuji S, Takahashi H. Thalamic form of Creutzfeldt-Jakob disease or fatal insomnia? Report of a sporadic case with normal prion protein genotype. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 93: 317-22
- 9 Mizusawa H, Ohkoshi N, Sasaki H, Kanazawa I, Nakanishi T. Degeneration of the thalamus and inferior olives associated with spongiform encephalopathy of the cerebral cortex. *Clin Neuropathol* 1988; 7: 81-6
- 10 Taniwaki Y, Hara H, Doh-Ura K, Murakami I, Tashiro H, Yamasaki T, Shigeto H, Arakawa K, Araki E, Yamada T, Iwaki T, Kira J. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with D178N-129M mutation of PRNP presenting as cerebellar ataxia without insomnia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 388
- 11 Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T. Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002; 103: 199-208
- 12 Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP (Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4: 1157-65
- 13 Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R, Cervenakova L, Gajdusek DC. First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 1995; 376: 434-5
- 14 Parchi P, Capellari S, Gambetti P. Intracerebral distribution of the abnormal isoform of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal insomnia. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 16-25
- 15 Almer G, Hainfellner JA, Brucke T, Jellinger K, Kleinert R, Bayer G, Windl O, Kretzschmar HA, Hill A, Sidle K, Collinge J, Budka H. Fatal familial insomnia: a new Austrian family. *Brain* 1999; 122: 5-16
- 16 Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 88: 433-9
- 17 Ferrer I, Puig B, Blanco R, Marti E. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience* 2000; 97: 715-26
- 18 Liberski PP, Budka H. Neuroaxonal pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97: 329-34
- 19 Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E. Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* 2003; 2: 167-76

Received 4 February 2004

Accepted after revision 26 April 2004

# プリオンイメージングの試み

石川 謙介 堂浦 克美

## ■ はじめに

近年の我が国や世界各国での BSE 発生により、感染牛由来品の摂取を原因とする変異型 CJD の勃発が危惧されている。多発している汚染脳硬膜移植による医原性 CJD を加えると、潜在的なハイリスク群が少なからず想定され、プリオン病の予防・治療法の確立が急務となっている。現在、臨床研究が加速しており、ペントサン硫酸の脳室内持続投与など、日本発のプリオン病治療法の有効性が日本や海外で検討されている<sup>1,2)</sup>。

プリオン病治療の臨床試験では、2つの大きな問題に直面する。まず画像検査や生化学的検査による発症前診断が不可能であるため、治療的介入は症状出現後の進行した状態となりやすいこと、さらに、その効果については比較できる客観的な評価に至りがたいことである。治療を早期から開始し患者の生命予後改善を目指すには、現在よりも特異的かつ迅速な診断法の開発が不可欠である。そこで、我々は、プリオン病に特異的である異常なプリオン蛋白の脳組織への沈着を画像化する方法(プリオンイメージング)の開発研究を行っている。

## プリオンイメージングの試み

プリオン病の画像診断に関しては、頭部 MRI 拡散強調画像(DWI)が早期から異常信号を捉えることが可能で、臨床的に有用であると近年報告されている<sup>3)</sup>。その所見は特異的ではあるものの、病勢の進行とともに信号域や強度が変化し、対応する病理所見は海綿状変化やグリオーシスなどとされるが、定説には至っていない。病勢診断には、プリオン病共通の病理所見である異常プリオン蛋白沈着を反映するイメージングが望まれる。

いしかわ けんすけ 東北大学/大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野  
 どううら かつみ 同 教授

プリオン病のみならず神経変性疾患の治療や診断については展望が開けつつあり、非侵襲的な画像診断に PET (ポジトロン断層撮影) や SPECT (シングルフォトン断層撮影) などの核医学的検査を用いて、脳内の循環代謝や神経伝達機能、神経病理学的変化に関する情報を得ることが有用とされている。特にアルツハイマー病患者の脳内アミロイド沈着(老人斑および神経原線維変化)をモニターする診断用プローブの報告が相次いでいる。プリオン仮説に従えば、プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白は宿主に存在する正常型プリオン蛋白の異性体で、プリオン蛋白内の  $\alpha$  ヘリックス構造が  $\beta$  シート構造に高次構造変換されたものである。この異常型プリオン蛋白はアミロイド様線維として存在するため、我々は既存の  $\beta$  アミロイド画像化プローブをプリオン病へ応用し検討を行った<sup>4)</sup>。

アルツハイマー病脳に特徴的な病理所見、特に  $\beta$  アミロイドからなる老人斑を標的としたプローブ候補として報告されている化合物は主に、以前からアミロイド染料として使用されてきたチオフラビン T やコンゴレッドに由来する。我々はまず、チオフラビン T 類似化合物 BTA-1 (2-[4-(methylamino)phenyl] benzothiazole)、およびコンゴレッド類似化合物 BSB [(trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene] に注目した(図 1)。BTA-1 はチオフラビン T からメチル基を除き、電荷を中性化して脳内移行性を改善したもので、他方の BSB はコンゴレッドのジアゾ結合による発癌性などの問題をクリアしたうえで、分子量を小さくして脳に入りやすくしたものである。両化合物は患者脳病理組織中のアミロイド病変や、アルツハイマー病モデルマウスの脳内アミロイド病変と結合し、蛍光顕微鏡下ではシグナルを発することが知られている<sup>5,6)</sup>。特に BTA-1 誘導体を標識した化合物は Pittsburgh Compound-B として既に海外で PET 臨床試験が行われ、アルツハイマー病患者群では病変

部位にプローブが集積することが報告されている<sup>7)</sup>。特異的なプリオン病診断法が未だ存在しない中で、他の脳アミロイドシスのために開発されたプローブ化合物をプリオン病モデルに応用することは重要であり、治験過程においてクリアすべき安全性試験などを考慮すると臨床研究に直結しやすいといえる。

まず、化合物溶解液を様々な種類のヒトプリオン病の脳病理組織にふりかけて、病変が描出されるかを検討した。比較検討のために同一標本において抗プリオン蛋白抗体による免疫染色を行った。遺伝性プリオン病である Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 病、変異型 CJD (vCJD) の標本において、プラーク型の異常プリオン蛋白沈着(大型のアミロイド斑)を蛍光染色した(図 2, BSB による描出)。一方、散发性 CJD (sCJD) 脳においては、約 10% の症例に認められるアミロイド斑は染色されたが、多くを占めるびまん性の微細顆粒状沈着(いわゆるシナプス型分布)は描出されなかった。また、硬膜移植後 CJD 症例における空胞周囲の異常プリオン沈着も蛍光染色されなかった。いずれの化合物による組織染色も約 1 時間で終了し、免疫染色に比べると大幅な簡略化が可能であった。

検討したプローブ化合物は、プリオン病モデルマウス脳組織標本においてもプラーク型の異常プリオン蛋白沈着を検出したことから、次に *in vivo* での有用性を検討した。モデルマウスはプリオン蛋白を過剰発現した遺伝子改変マウスにプリオン感染脳乳剤を脳内接種したもので、ほぼ一定期間内に失調などの神経症状を発症し死亡する。実験には、明らかな臨床症状は呈さないが、免疫染色で脳内病変が確認されている時期(接種して約 6 週後)のマウスを用いて、化合物溶解液を尾静脈より投与した。一定時間後に取り出した脳の凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察したところ、脳室に沿った白質にプラーク型の異常プリオン蛋白沈着を示す蛍光シグナルが検出され、抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色で特異性を確認した(図 3)。化合物投与後の様々な経過時間でシグナルを観察すると、直後には髄膜血管などへの非特異的な沈着が強く認められ、18 時間後ま

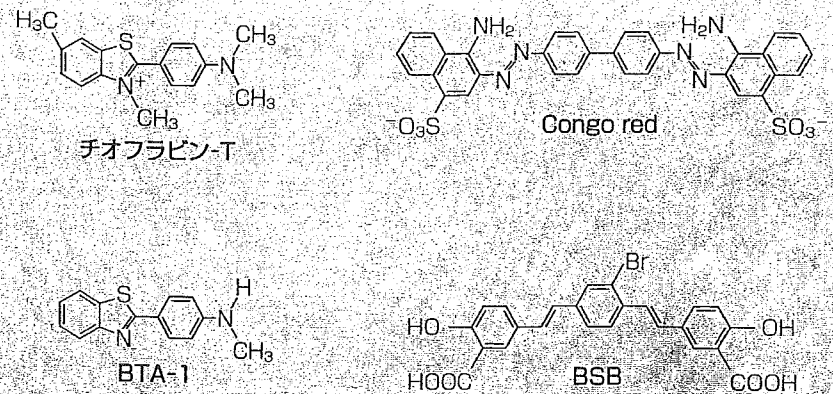


図 1 チオフラビン-T 類似化合物 BTA-1 および Congo red 類似化合物 BSB

することは困難であった。以降は非特異的背景を認めず、化合物のシグナルは投与 42 時間後においても確認された。さらに我々は検出感度の問題を考慮して、類似のプローブ候補化合物を放射性標識し、病理組織標本およびモデルマウス生体を用いて同様の検討を行ったが、非特異的な結合によるノイズが問題となっている。アミロイド親和的な化合物は脂質にも親和性を有するため、脳白質線維や血管内の沈着物(アテローム動脈硬化や脳血管アミロイドシスなど)に結合してしまう可能性が大きい。組織染色では分別(染色液の洗浄)条件、マウス実験では化合物投与量と経時的な条件の更なる検討が必要である。

### プリオンイメージングの現状および展望

本研究では、*in vitro* および *in vivo* のレベルで  $\beta$  アミロイドプローブ化合物がプリオン病脳のプラーク型異常プリオン蛋白沈着を描出可能であることが明らかになった。しかしプリオン病の多くを占めているのは sCJD であり、その病理所見の中心となるシナプス型のプリオン蛋白沈着を検出することが今後の大きな課題である。プリオンイメージングについては、我々の他には主に UCLA の研究グループからの報告があるが、病理組織標本におけるプラーク型病変の検出に留まっている<sup>8)</sup>。今後は脳内移行性のみならず、細胞内への移行性も高い化合物をみつける必要がある。

上述の化合物 BSB では、他のコンフォメーション病の病理組織標本におけるアミロイド染色も報告されてい

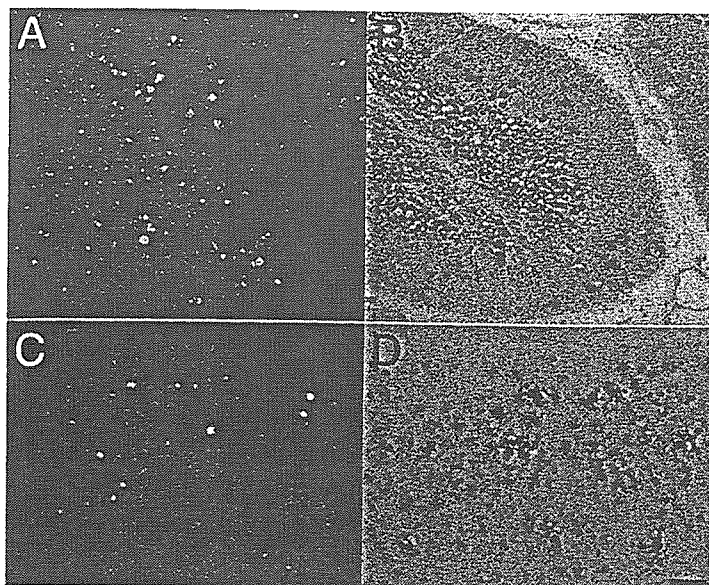


図2 ヒトプリオン病剖検脳組織標本における異常プリオン蛋白沈着のイメージング

ブラク型プリオン蛋白沈着がBSB溶解液により蛍光染色され(A, C), 続いて免疫染色で比較検討した(B, D). 上段A, BはGSS病患者の小脳, 下段C, DはvCJD患者の大脳皮質. スケールバーは100ミクロン.

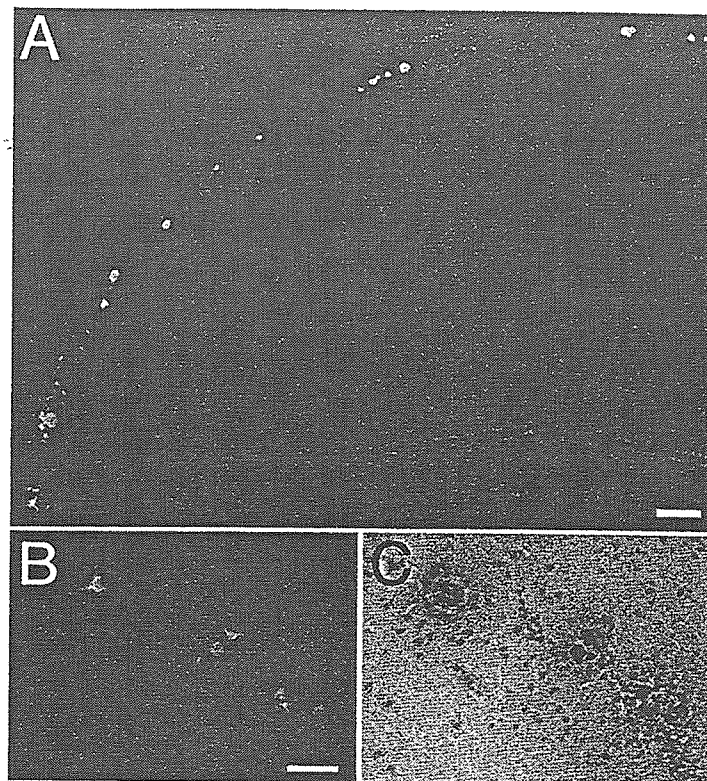


図3 プリオン病モデルマウス脳における病変の生体イメージング (文献4より一部改変)

発症前の罹患マウスにBSB溶解液を静脈内投与し, 24時間後に取り出した脳組織においてブラク型病変が蛍光顕微鏡下で観察された(A, 冠状断). BTA-1においても同様に大脳皮質と海馬間の大脳白質におけるシグナルを認め(B), 免疫染色で特異性を確認した(C). スケールバーは100ミクロン(A)と25ミクロン(B, C).

る<sup>9,10</sup>. アルツハイマー病の老人斑や神経原線維変化に加えて, ピック病のピック小体, 進行性核上性麻痺のcoiled bodyなども描出され, 多種類の脳アミロイド蛋白に結合する. イメージングに際しては疾患特異性も今後の課題であるが, 検出された病変の分布によって, 診断に有意義な情報が得られるものと期待される. また, プリオン病治療の評価においても, 病変の縮小など客観的な効果判定には一助となるであろう.

高次脳機能を解明する核医学的画像検査の中心的役割を果たしてきたPETは, 半減期が短いポジトロン標識化合物を使用するために, プロープの安定的供給とサイクロトロン併設が不可欠である. 汎用性や医療経済的な障壁は存在するが, 今後あらかじめ症例を絞り込んだ研究ベースで治験対象の適否や治療効果判定には使用されていくであろう. 近年, プリオン病モデルマウスに対し9.4テスラの超高磁場MRI装置を用いたイメージング<sup>11</sup>)や, アルツハイマー病モデルマウスに対しフッ素による核磁気共鳴に着目したMRI画像化が報告されている<sup>12</sup>). PET画像検査での成果は, 着実にSPECTそしてMRIに移行しつつあるが, 微細な構造物の検出や疾患特異性を高めるには, 異常プリオン蛋白沈着を直接の標的としたプロープ化合物の開

発がやはり不可欠となる. 現在, アミロイドイメージングに関しては複数の研究グループから報告が相次いでいるが, コンゴレド類似化合物は分子量が大きく脳移行性の問題があるため, プロープ候補化合物開発はチオフラビン類似化合物, もしくはまったく新しい骨格を有するものがリードしている.

### プロープ化合物のさらなる可能性

ところで, いくつかのアミロイド結合化合物は, 基礎実験レベルにおいてアミロイド凝集を阻害することが以前から知られている. 我々はプリオン病モデル培養細胞を用いて, アミロイドプロープ化合物が異常型プリオン蛋白の産生を阻害することを明らかにし, モデルマウスでも有意な治療効果(延命効果)を確認した<sup>4</sup>). イメージングの結果と合わせると, 異常なプリオン蛋白凝集と直接結合すること

による抗プリオン作用が推定される。プローブ化合物はプリオン病の診断薬のみならず、治療薬としても応用可能であり、その適性は脳内移行性や滞留時間によって検討される。つまり、診断プローブは脳からのクリアランスは短い方が臨床的に望ましいが、治療薬の場合は脳内滞留が長いほど異常なプリオン蛋白凝集との結合による効果が期待される。

現在におけるプリオン病治療戦略の中心は、異常型プリオン蛋白の産生阻害である。先述のプリオン仮説は未だ直接の実証には至っていないが、病変における異常なプリオン蛋白沈着に注目して、病勢や薬物治療効果を評価することは今後も優先されるであろう。我々は新たな構造をもつ

プローブ候補化合物で同様の検討を行っており、マウス体重当りの投与量はこれまでの1/100以下でプリオンイメージングが可能となった。これらはアルツハイマー病脳組織標本では、老人斑のみならず微細な細胞内アミロイドである神経原線維変化を描出していることから、シナプス型の異常プリオン蛋白沈着の検出も十分に期待される。また、神経系における異常なプリオン蛋白凝集のイメージングのみならず、体液などを用いた体外診断への応用も考えられる。さらに、このプリオンイメージングの試みにより、感染の成立機序などプリオン病の病態に関わる新たな手掛りが得られる可能性も期待される。

## 文 献

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, et al. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol.* 2004; 78: 4999-5006.
- 2) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, et al. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect.* 2005; 50: 394-6.
- 3) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, et al. Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 2004; 63: 443-9.
- 4) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, et al. Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol.* 2004; 85: 1785-90.
- 5) Mathis CA, Bacskai BJ, Kajdasz ST, et al. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002; 12: 295-8.
- 6) Skovronsky DM, Zhang B, Kung MP, et al. In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 7609-14.
- 7) Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 2004; 55: 306-19.
- 8) Bresjanac M, Smid LM, Vovko TD, et al. Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl) (methyl) amino]-2-naphthyl] ethylidene) malonitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci.* 2003; 23: 8029-33.
- 9) Schmidt ML, Schuck T, Sheridan S, et al. The fluorescent Congo red derivative, (trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB), labels diverse beta-pleated sheet structures in postmortem human neurodegenerative disease brains. *Am J Pathol.* 2001; 159: 937-43.
- 10) Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, et al. A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest.* 2003; 83: 1751-9.
- 11) Sadowski M, Tang CY, Aguinaldo JG, et al. In vivo micro magnetic resonance imaging signal changes in scrapie infected mice. *Neurosci Lett.* 2003; 345: 1-4.
- 12) Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, et al. 19 F and 1 H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 527-33.



## プリオン病の治療法の現状

The latest progress in prion therapeutics



逆瀬川裕二(写真) 堂浦克美

Yuji SAKASEGAWA and Katsumi DOH-URA

東北大学大学院医学系研究科附属創生医学応用研究所プリオン蛋白研究部門プリオン蛋白分子解析分野

◎プリオン病はいまだ有効な治療法がない、発症すると確実に死に至る進行性の変性神経疾患である。プリオン病を引き起こす感染体プリオンはわれわれの身体に豊富に存在するプリオン蛋白質の構造変異体であるため、強い免疫寛容により免疫系に認識されない。むしろ、一部の免疫系はプリオンの増殖の場となっている。感染によって抗体の産生が認められず、長い潜伏期に続く発症後の急速な神経変性の進展は、プリオン病の治療を非常に困難なものにしている。現在、プリオンおよび感染のメカニズムについて急速に理解が進み、また、いくつかの薬剤は臨床にて一定の効果が確認されている。今後は治療薬の開発だけでなく、早期発見を可能にする技術や検査法の開発が求められる。

**Key word** : プリオン病, 治療, 薬物, 免疫療法

プリオン病(伝達性海綿状脳症)は進行性の神経変性疾患であり、有効な治療法が確立されていない現在、治療不能の致死性の難病となっている。孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(孤発性 CJD)を代表とするヒトプリオン病は、年間 100 万人に 1 人の割合で発症し、数週間から数カ月で急激に症状が進行し、死に至る(一部の遺伝性プリオン病には数年にわたって症状が進行するものもある)。発症すると脳内に海綿状の神経変性ととも、プリオンとよばれる感染性をもつ蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積を生じる。プリオンが実験動物へと感染しうることは以前から知られていたが、現実にプリオンに汚染した飼料を介してウシ海綿状脳症(BSE)がイギリスを中心とするヨーロッパに蔓延し、さらにその BSE からヒトへの感染と考えられる変異型 CJD が発生した 1996 年には世界を巻き込む大きなパニックとなった。アメリカや日本ではプリオンに感染した硬膜などの生体材料の移植によって医原性 CJD が発生し、とくに日本では対策の遅れもあり、100 人を超える症例が報告され、薬害ヤコブ

病として大きな社会問題となっている。

現在、プリオン病に対する理解が進み、また感

サイド  
メモ  
1

### プリオン病の免疫療法

プリオンは生体内に豊富に存在する PrP<sup>C</sup>の立体構造異性体であるため、たとえ感染しても強い免疫寛容によって抗体産生や炎症などの免疫応答は起こらない。一方、プリオン蛋白質に対する抗体を腹腔内投与することによって、すでにリンパ内系にプリオンの感染が成立しているマウスにおいてプリオンの末梢から中枢神経への感染を抑制し、発症を遅延させることが報告されている。抗体の脳室内投与は脳内の神経細胞死を誘発するが、末梢での抗体の曝露においては顕著な副作用は認められておらず、ワクチン療法や持続的な末梢への抗体投与といった免疫療法は、経口あるいは末梢からのプリオンの感染に対する予防あるいは感染初期の治療法として期待される。ただしワクチン療法については、免疫寛容を回避するための理論的および技術的なブレイクスルーが必要と思われる。

染防止対策がうまく機能していることもあり、BSE や変異型 CJD の発生は小康状態あるいは減少に転じている。しかし、発症していないにもかかわらず感染性を有する、いわゆるキャリアの存在が動物実験や変異型 CJD の症例から示唆されており、また輸血による変異型 CJD の症例が報告されるなど、今後、変異型 CJD のキャリアが発症する可能性、またそのキャリアから輸血などの医療行為によって感染が拡大する可能性が出てきた。一刻も早い有効な予防薬や治療薬の開発が待たれる。近年、プリオン病の基礎研究や治療薬のスクリーニング・検出技術に大きな進展があり、いくつかの薬剤についてはすでに臨床で研究が行われその有効性が検討されている。

## プリオン病とは

プリオン病は通常のウイルスや細菌の感染と異なり、プリオンとよばれる蛋白質によって感染が引き起こされる<sup>1)</sup>。プリオンはプロテアーゼや高熱に耐性をもつ不溶性の蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)であるが、生体にはまったく同じアミノ酸配列をもつ正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)とよばれる膜蛋白質が存在する。これらの蛋白質の高次構造(コンフォメーション)は大きく異なり、前者はβシートに富み、

サイド  
メモ  
2

### プリオンの株(strain)

プリオンには性質の異なる“株”という個性があることが知られている。ウシ海綿状脳症(BSE)は非典型的なものを除くと単一の株と考えられているが、ヒツジのスクレイピーには20種類以上のプリオン株が知られており、ヒトプリオン病も複数の株に分けることができる。株によってプリオンの脳内での蓄積部位や生じる神経症状、プロテアーゼや熱への耐性などが異なっており、その違いはプリオンの蛋白質高次構造の違いによって生じると考えられている。薬剤によっては株の違いによって治療成績が大きく異なるものが知られており、そのような薬剤にアンフォテリシン B、分岐ポリアミン、キナクリンなどがある。プリオン病の根本的な治療には、このような株の違いを考慮した薬剤の選択や、場合によっては複数の治療薬によるカクテル療法が必要かもしれない。

アミロイドとよばれる不溶性の多量体を形成し、後者はαヘリックスに富む可溶性の単量体として存在している。正常プリオン蛋白質の機能は不明であるが、プリオン病の感染には必須で、この蛋白質をもっていないノックアウトマウスはプリオンを摂取されてもプリオン病に感染しない。ヒト PrP<sup>C</sup>は第20染色体短腕の PRNP 遺伝子にコードされており、遺伝型プリオン病を引き起こす多数の変異が知られている。

## 治療薬スクリーニングの開発

プリオン病の治療薬の開発には、プリオン持続感染培養細胞を用いて PrP<sup>Sc</sup>の産生量を測定するアッセイ法と、プリオンを摂取したハムスターやマウスの潜伏期の長さを指標にしたアッセイ法がおもに用いられている。

前者は簡便であり、多数の検体を迅速に処理することが可能で、後にメンブレンフィルターに転写することで、さらに迅速に検体を扱えるように工夫されている。しかし、PrP<sup>Sc</sup>の産生量とプリオンの感染価はかならずしも一致するわけではなく(たとえばプロテアーゼ感受性のプリオンは測定できない)、また、培養細胞で治療効果があっても動物実験では毒性があったり治療効果が認められないことがあるなどの欠点がある。

後者は感染価と潜伏期の長さが比例関係にあることを利用して感染価を測定する方法である。これまで開発されたプリオン検出系のなかでもっとも感度がよいことが知られているが、確定するのに時間と費用がかかることが欠点である。これまではハムスターを用いた動物実験がもっとも早くプリオンを検出できる実験法であったが、マウスにおいても PrP<sup>C</sup>を過剰発現したトランスジェニックマウスを用いることで潜伏期を短縮することに成功しており、種の異なるプリオン蛋白質のキメラ蛋白質のノックインマウスを利用することによって種の壁による影響を小さくすることや、腹腔内にプリオンを摂取後、脾に蓄積する PrP<sup>Sc</sup>を測定することによって感染を30日で検出することも可能になった<sup>2)</sup>。

またその他に、[PSI+]や[URE3]という酵母プリオンを用いたスクリーニング系や<sup>3)</sup>、PrP<sup>C</sup>と

表 1 試験管, 培養細胞あるいは動物を用いた実験で抗プリオン活性が認められたおもな薬剤, 化合物

カテゴリー	薬剤・化合物	根拠	予想されるメカニズム	欠点
アミロイド結合性試薬	Congo red	PrP アミロイドへの結合	PrP <sup>Sc</sup> への結合と安定化	脳血液関門の非透過性, 予防のみ
アミロイド吸収	ヨードドキシソルピシン	PrP アミロイドの構造弛緩	PrP <sup>Sc</sup> への結合	脳血液関門の非透過性, 毒性
ヨードドキシソルピシン構造類似体	テトラサイクリン	ヨードドキシソルピシンとの構造の類似性	PrP <sup>Sc</sup> への結合	
ポリエン系抗生物質	アンホテリシン B*	抗真菌薬	コレステロールへの結合と PrP <sup>C</sup> のエンドサイトーシス阻害	プリオン株依存性, 毒性
ポリアニオン誘導体	ペントサンポリサルフェート*	抗ウイルス薬	PrP <sup>C</sup> への結合と PrP <sup>C</sup> のエンドサイトーシス阻害	脳血液関門の非透過性, 予防のみ
$\beta$ シート破壊ペプチド	プリオン蛋白質由来ペプチド	PrP <sup>Sc</sup> の構造破壊	PrP <sup>Sc</sup> との相互作用	易分解性, 免疫, 脳血液関門の非透過性
テトラピロール	ポルフィリン	蛋白質との結合	PrP <sup>C</sup> あるいは PrP <sup>Sc</sup> への結合	脳血液関門の非透過性, 予防のみ, 毒性
分岐ポリアミン	分岐ポリアミン	トランスフェクション実験からの知見	リソソームでの PrP <sup>Sc</sup> の不安定化	脳血液関門の非透過性, プリオン株依存
アクリジンとフェノキアジン誘導体	キナクリン*, クロロプロマジン	脳血液関門易透過性	リソソームでの PrP <sup>Sc</sup> の不安定化	毒性, プリオン株依存性
抗プリオン蛋白質抗体	D-18, 6H4	PrP <sup>C</sup> あるいは PrP <sup>Sc</sup> への結合	PrP <sup>C</sup> あるいは PrP <sup>Sc</sup> への結合	脳血液関門の非透過性, 免疫寛容, 神経細胞死
NMDA 受容体アンタゴニスト	メマンチン, フルピルチン*	神経細胞死抑制	神経細胞死抑制	

\*: 臨床で検討.

PrP<sup>Sc</sup>の相互作用を蛍光相関分光法を用いて測定するハイスループットスクリーニング法<sup>4)</sup>があらたに開発されている.

### プリオン検出法の開発

PrP<sup>Sc</sup>の検出法には, 従来使用されてきたプロテアーゼ処理によって混在する PrP<sup>C</sup>を除去し, プロテアーゼ耐性の PrP<sup>Sc</sup>をメンブレンあるいはプレート上で免疫化学的に測定する Western blot 法や ELISA 法以外に, あらたに, PrP<sup>Sc</sup>に特異性をもつポリマーでコーティングしたプレートを用いる ELISA 法や, コンフォーメーションを認識する抗体を用いた ELISA 法(CDI 法)<sup>5)</sup>などプロテアーゼ処理を省略した検出法も開発されている. また, PrP<sup>Sc</sup>との相互作用によってコンフォーメーション変化を起こし, 蛍光を発するよう工夫されたペプチドを用いた高感度検出法や, DNA の増幅に使われている PCR 法によく似た方法によって PrP<sup>Sc</sup>を増幅するという検出法(PMCA 法)など, まったく新しい原理による検出法も開発されている. PMCA 法は, PrP<sup>Sc</sup>からなる凝集体がある条件下で

PrP<sup>C</sup>を重合してより大きな PrP<sup>Sc</sup>凝集体を形成することを利用している. 一定時間ごとに超音波処理と重合反応を繰り返すことにより PrP<sup>Sc</sup>を増幅するという方法で, これまでもっとも感度のよかつたバイオアッセイと同等以上の感度を有しており, 血液中のごく低濃度の PrP<sup>Sc</sup>の検出などにおいて現在もっとも高感度の測定法となっている<sup>6)</sup>. すでに自動化されており, 血液や尿など低濃度のプリオンを含む試料の高感度検出とプリオン病の早期発見への応用に期待されている.

### プリオン病の治療薬候補

プリオン病の治療薬候補として多くの薬剤, 化合物が報告されている<sup>7)</sup>. ①アミロイドに結合することが知られている Congo red や抗癌薬ヨードドキシソルピシン, その構造類似体のテトラサイクリン, ②抗真菌薬からアンフォテリシン B などのポリエン系抗生物質, ③ペントサンポリサルフェートなどのポリアニオン誘導体, ④蛋白質の高次構造に影響を与える  $\beta$ シート破壊ペプチドやポルフィリンなどのテトラピロール類, ⑤抗プリオン

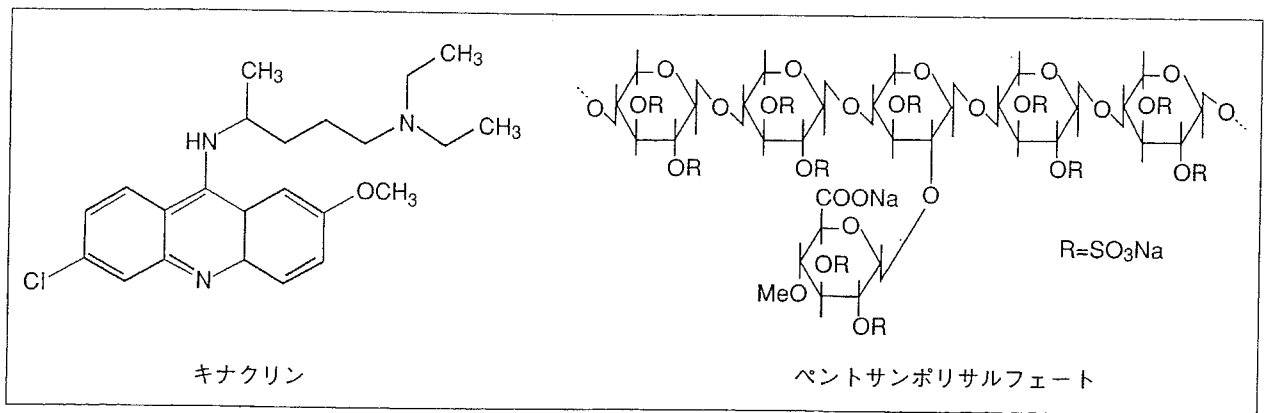


図 1 キナクリンとペントサンポリサルフェートの構造図

活性を示すトランスフェクション試薬から見出された分岐性ポリアミン、⑥抗プリオン蛋白質抗体、⑦脳血液関門(BBB)を透過する既存の治療薬からのスクリーニングよりみつかった抗マラリア薬キナクリンや抗精神薬フェノチアジンなど、⑧神経細胞死を抑制する薬剤から NMDA 受容体拮抗薬メマンチンや中枢性鎮痛薬フルピルチンなどがある(表 1)。これらのなかで患者に実際に応用されている薬剤および化合物には、アンフォテリシン B、ペントサンポリサルフェート、キナクリン、フルピルチン、などがある。

本稿では、日本で臨床研究が進行しているキナクリン、ペントサンポリサルフェートについて解説する(図 1)。

キナクリンは長年にわたって抗マラリア薬として広く使用されている薬剤であり、安全性も高いことから、アメリカおよびイギリスにて臨床研究が進められている。日本においても孤発性 CJD 22 例、医原性 CJD 5 例、遺伝性プリオン病 4 例の計 31 例の症例に対し、300 mg/day を経口あるいは経管投与にて 12 週間の連続投与というプロトコルで臨床研究が行われた。その結果、12 例で覚醒度や自発語、注視など臨床症状に一過的な改善が認められたが(効果が認められた例：孤発性 9 例、医原性 2 例、遺伝性 1 例)、16 例に肝機能障害や溶血性貧血などの重大な副作用が認められ、より毒性の低い塩酸キニーネに変更されたものの、持続的な薬効を保つことと副作用を抑えることが困難であることが判明している<sup>8)</sup>。

ペントサンポリサルフェート(PPS)は脳血液関門を透過しないため、微量注入器具を用いて脳室

内へ連続投与することが検討され、動物実験では脳内接種後 10 日からの投与で 173%、30 日からの投与で 93%の潜伏期の延長が認められた<sup>9)</sup>。本薬剤は、2003 年、イギリスにて 1 例の変異型 CJD 患者で臨床研究が開始されたが、脳の萎縮の進行は止まらなかったものの副作用は認められず、臨床症状は落ち着いており、現在まだ経過を観察中である。日本でも福岡大学で孤発性 CJD 患者の臨床研究が開始されており、これまでに明らかな臨床症状の改善は認められないものの、副作用は認められず、経過が観察されている<sup>10)</sup>。PPS を用いた脳室内持続投与療法はイギリスや日本以外の国でも開始され、全世界で 20 例近い患者に実施されており、現在最も効果的な治療法のひとつと考えられている。今後、最適の治療プロトコルの完成と臨床症状の改善が判断できる症例での検討が求められる。

## おわりに

プリオン病は通常の細菌やウイルスなどを介した感染症と異なり、感染してからの潜伏期が長く、発症直前まで感染の有無を知ることができないうえ、急速に進む神経変性を治療していくことは非常に難解な問題となっている。末梢から中枢神経への感染を予防することは現在開発されているいくつかの薬剤でも可能と思われるが、それには発症前に治療を開始することが必須であり、現在のところ、医原性プリオン病や遺伝性プリオン病などを将来発症する可能性のあるヒトには応用することができないもの実際的ではない。MRI 拡散強調画像や脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質などが神経変