

厚生労働科学研究費補助金

—こころの健康科学研究事業—

プリオン病における免疫反応の解明とそれに  
基づく診断・治療法の開発

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成 20 (2008) 年 3 月

# 目次

## I. 総括研究報告

プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発  
(長崎大学・院・医歯薬総合・感染分子) 片峰 茂

----- 1

## II. 分担研究報告

1. プリオン感染成立における自然免疫機構の関与

(長崎大学・院・医歯薬総合・感染分子) 片峰 茂・西田教行

----- 7

2. 本邦プリオン病患者のデータベース化と

生化学マーカーを用いた早期診断法の検討

(長崎大学・医歯附属病院・へき地病院再生機構) 調 漸

----- 12

3. 抗プリオン蛋白抗体single chain Fvによる抗プリオン活性

(徳島大学・疾患酵素学研究センター・神経変性疾患) 坂口末廣

----- 18

4. プリオン特異的ヒト抗体の作製とプリオン特異性判定に関する研究

(鹿児島大学・工学部・生体工学科) 杉村和久

----- 26

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 31

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 35

## V. 班会議プログラム

----- 199

# 總括研究報告

プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発

総括研究者 片峰 茂 長崎大学医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

プリオン感染における自然免疫系の関与を明らかにするため、プリオン持続感染培養細胞株における自然免疫関連分子の挙動を検討した。その結果、プリオン持続感染細胞では自然免疫系の機能が低下していること、および自然免疫系のうち RIG1-IRF3 シグナル伝達系の賦活化がプリオン持続感染細胞における PrP の異常化を阻止できることが判明した。また抗体療法をめざして single chain SV 抗体の有用性を検討した。PrP<sup>Sc</sup> に特異的抗体を用いることで直接同定、検出、定量する方法を確立する目的で、遺伝子組み換えヒト全長プリオン蛋白質を用いて、βシート構造のプリオン蛋白オリゴマー、プリオン蛋白フィブリルを作製し、ヒト抗体をディスプレイしたファージライブラリを用いて、構造特異的ヒト scFv 抗体を選別することに成功した。また、より分子量の小さいマウス Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を 293T 細胞において発現することに成功した。Sh3.9scFv は、Sh3.9 と同様に、正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)に結合し、22L 及び Chandler プリオン株の感染細胞において、PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制した。これらの結果は、Sh3.9scFv がプリオン病の治療に有用である可能性を示した。

A 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病には有効な臨床治療手段がないのが現状である。世界における牛プリオン病 (狂牛病) のヒトへの伝播をめぐるパニックに加え、我が国では不幸にも硬膜移植後の CJD 患者が多発し感染性プリオン病の脅威にさらされている。プリオン病分子機構の解明に基づく診断・治療法の開発が急務である。

プリオン病はプリオン蛋白 (PrP) の正常から異常への立体構造変換に起因することが明らかになっており、したがってこの構造変換の制御が治療法開発の眼目になってきた。しかしながら早期診断法の不在もあいまって、それら薬剤の効果は限定的であり、画期的な予防・治療方策の開発が待望されている。

本研究では、これまでほとんど顧みられることのなかった免疫系を利用したプリオン病予防・治療法の確立を目指す。

具体的には本研究では以下のことを3年間の達成目的とし、自然免疫賦活物質

と抗体の臨床応用へ向けた基盤を確立する。

- (1) 干渉現象における自然免疫系の関与を解明し、インターフェロンなど自然免疫賦活物質の抗プリオン効果を検討し臨床応用につなげる (西田、片峰担当)。
- (2) 各種プリオン株や自然免疫 (とくに RIG1-IRF3 系) を賦活化する既知の RNA ウイルスの抗プリオン効果を検討し、効果のあるものに関しては弱毒化を試みる (西田、片峰担当)。
- (3) 種々の組み換え型 PrP 抗体をクローニングし、さらに異常型 PrP 立体構造特異的抗体を選別し、結合特異性を解析する (杉村担当)。
- (4) これら抗体の診断的有用性を確立するとともに治療への応用を検討する (調担当)。
- (5) ミクログリアや骨髄系培養細胞を用いて抗体の効果的脳内送達・発現法を開発する (坂口担当)。

## B 研究方法

(1) プリオン感染における自然免疫の解明：プリオン持続感染細胞はマウスに馴化した scrapie 由来の 22L、Chandler 株を感染後、クローニングした N2aL1、N2aCh 細胞および GSS 由来の Fukuoka-1 株を感染後、クローニングした N2aFK を用いた。対照としてプリオン非感染細胞 N2a および正常型プリオン蛋白 (PrP) を過剰発現させた N2a58 細胞を用いた。自然免疫関連因子 (TLR, Helicases, IRFs 等) の発現量はリアルタイム PCR 法により、IFN 産生量は ELISA により測定し、プリオン持続感染細胞に特異的な発現及び活性化の様式を示す自然免疫関連因子の探索を行った。また各自然免疫関連因子をプリオン持続感染細胞に過剰発現させ、異常型 PrP の発現をウエスタンブロット法にて検討した。

(2)  $\beta$ -PrP 及び PrP フィブリル特異的抗体の単離：20名のヒト末梢血リンパ球を用いて構築したヒト一本鎖抗体 (scFv) 抗体ライブラリを、大腸菌の発現系を用いて発現、精製した遺伝子組み換えヒトプリオン蛋白 (aa23-231) を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、 $\beta$ シート型プリオン蛋白を試験管内で作製した。このタンパク分子の立体構造は、原子間力顕微鏡、CD スペクトルを用いて解析した。作製したプリオン蛋白と抗体ファージディスプレイライブラリを直接反応後、結合したファージを溶出、回収し増幅するパンニングを実施した。

(3) 既に樹立されているミクログリア細胞株による抗プリオン抗体の脳内デリバリーシステムの開発：Myc タグを付加した Sh3.9scFv cDNA をレンチウイルス発現ベクターに挿入した construct を作製し、293T 細胞に transfection した。72 時間後に細胞溶解液と培養上清を回収し Western blotting に供し、Sh3.9scFv の発現を確認した。種々の量 (0、5、10、50、100 ng) の recombinant PrP をマイクロプレートに一晩固相化し、Sh3.9scFv 上清あるいは対照として empty vector を

293T 細胞に transfection した上清 (以下、Mock 上清) を各 100  $\mu$ l、1 時間反応させた。免疫複合体は、anti-myc Ab 及び anti-mouse IgG-HRP を用いて検出した。また PrP<sup>C</sup> 発現細胞 (HpL3-4TR)、PrP<sup>C</sup> 非発現細胞 (HpL3-4) への抗体の結合を Flow cytometry により、抗プリオン活性をウエスタンブロットを用いた PrP<sup>Sc</sup> の半定量により確認した。

### (倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、国の組換え実験指針にのっとり所属施設の許可のもとで行った。また、動物実験については、所属施設の許可のもと動物愛護に配慮して行った。プリオン感染実験は長崎大学に完備した BSL3 レベル実験室で行った。

## C 研究結果

Real time PCR 法で自然免疫関連因子の mRNA の発現を測定したところプリオン非感染細胞に比べプリオン持続感染細胞において、TLR3、RIGI だけでなく IRF3 の発現が有意に減少していた。さらに、興味深いことにプリオン感染細胞は PolyI:C による刺激後において RIGI および IRF3 の発現能が見られなかった。PolyI:C 刺激による I 型インターフェロンの発現を ELISA 法にて検討したところ、プリオン持続感染細胞では有意に低下していた。各自然免疫関連因子をプリオン持続感染細胞に過剰発現させ、異常型 PrP の発現をウエスタンブロット法にて検討したところ、TLR3 および IRF3 蛋白質の過剰発現下において、異常型 PrP の減少が見られた。これらの結果は、プリオン持続感染細胞では自然免疫系の機能が低下していること、および自然免疫系のうち RIGI-IRF3 シグナル伝達系の賦活化がプリオン持続感染細胞における PrP の異常化を阻止できることを意味している。

ヒト抗体を提示したファージディスプレイライブラリを  $\beta$ シート型プリオン蛋白に直接反応させるパイオパンニング方法で単離されたヒト scFv 抗体 (#7 scFv

抗体および#30 scFv 抗体)の特異性を詳細に解析した。組み換えヒトプリオン蛋白 (rPrP: aa23-231) を、リフォールディングを行った後ゲルろ過カラム (TSK-Gel SWXL G3000, Tosoh) を用いた HPLC を行った。その結果  $\beta$ -PrP は、高分子量のオリゴマーと単量体の 2 つのピークが認められた。これらのフラクションを分取し、CD スペクトル解析を行ったところ、オリゴマーおよび単量体のフラクションはどちらも、215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な  $\beta$ シート型の構造を有していることが明らかとなった。#7scFv 抗体および#30 scFv 抗体との反応性を解析した結果、#7scFv 抗体、#30 scFv 抗体は、分子量に関係なく、 $\beta$ シート型の構造を有するフラクションに結合活性を示した。コントロールとして用いた市販の抗プリオン蛋白抗体 (SAF32) は、どのフラクションとも結合活性を有していたことから、#7scFv 抗体、#30 scFv 抗体は、プリオン蛋白の  $\beta$ 構造を特異的に識別する抗体であることが示唆された。また、Proteinase K 処理せず、かつ  $\alpha$ -PrP および  $\beta$ -PrP を変性させない条件で分離する電気泳動法の確立を試みた。酸性の酢酸緩衝液を用いて、陰極側に泳動することで  $\alpha$ -PrP および  $\beta$ -PrP が分離された。この条件で泳動したプリオン蛋白を、私どもが確立した Immuno-Plate 法 (Hamasaki T et al. 2007) により#7scFv 抗体および#30 scFv 抗体との反応性を調べ、特異的に結合することを示した。

myc タグを付加した Sh3.9scFv cDNA を挿入した lentivirus 発現 vector を 293T 細胞に transfection することにより得た培養上清中の Sh3.9scFv が recombinant PrP に特異的に結合することを示した。Sh3.9scFv が細胞表面に発現する PrP<sup>c</sup> に特異的に結合することも確認された。また、Sh3.9scFv 上清は用量依存的プリオン株種には依存せず抗プリオン活性を発揮し、プリオン感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することが示された。

## D 考察

In vitro の系においてプリオン持続感染細胞では、1) 自然免疫関連因子 TLR3、RIGI、IRF3 の発現減少、2) ウイルス様刺激因子 Poly I:C による RIGI、IRF3 の遺伝子の発現能の低下、3) Poly I:C による Type I IFN の細胞外放出の減少、4) TLR3、IRF3 の細胞内過剰発現系における異常型 PrP の減少などの事象が確認された。以上のことより、プリオン感染の成立には、自然免疫の機構が関与することが示唆され、そのシグナル伝達機構は MyD88 依存の経路ではなく、MyD88 非依存の経路が重要であることが示唆された。このことは、MyD88 のノックアウトマウスにおけるプリオン感染実験において感染成立に有意な変化が見られない報告に同意するものである。

杉村により作製されたヒト scFv 抗体は、コンフォメーションを認識するため、病原性を発揮しているプリオンに特異的に結合するかどうかは、蟻酸処理や、オートクレーブ処理後のタンパク質を変性させた標品を使用する病理組織を染色する手法では解析できない。組み換えプリオン蛋白を用いた Native Page による PrP 分子の分離条件の検討結果より、未変性のプリオン分子を proteinase K 処理なく、電気泳動し、PRB7 および PRB30 抗体を直接反応させる Immunoblotting 法で検出・定量できる可能性が示された。

Single chain Fv 抗体は、分子量が全長抗体に比し小さく、局所へのデリバリーに適する。今回作製した Sh3.9scFv は、Sh3.9 全長抗体と同様に、PrP との特異的に結合し、プリオン感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> を減少させる効果を有していた。従って、プリオン病の治療において、Sh3.9scFv は Sh3.9 より高い有用性があると考えられる。現在我々は、Sh3.9scFv を発現させるためのレンチウイルスベクターを作製している。

## E 結論

プリオン持続感染細胞では自然免疫系の機能が低下していること、および自然

免疫系のうち RIGI-IRF3 シグナル伝達系の賦活化がプリオン持続感染細胞における PrP の異常化を阻止できることが判った。

PrP<sup>sc</sup> に特異的抗体を用いることで直接同定、検出、定量する方法を確立する目的で、遺伝子組み換えヒト全長プリオン蛋白質を用いて、βシート構造のプリオン蛋白オリゴマー、プリオン蛋白フィブリルを作製し、ヒト抗体をディスプレイしたファージライブラリを用いて、構造特異的抗体を選別した。また、Proteinase K 処理せず、かつ α-PrP および β-PrP を変性させない条件で分離する電気泳動法を確立した。

より分子量の小さい Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を 293T 細胞において作製することに成功した。Sh3.9scFv は、Sh3.9 と同様に、正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)に結合し、22L 及び Chandler プリオン株の感染細胞において、PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制した。これらの結果は、Sh3.9scFv がプリオン病の治療に有用である可能性を示した。

F 研究危険情報  
なし

G 研究発表

1 論文発表

1. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S. Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene*. 2007;386(1-2):139-46.
2. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine*. 2007 25(6):985-92.
3. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochemistry Cell Biology* 2007 127(3):291-301.
4. Yamada K, Moriuchi R, Mori T, Okazaki E, Kohno T, Nagayasu T, Matsuyama T, Katamine S. Tgat, a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor, activates NF-kappaB via physical association with IkappaB kinase complexes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 355(1):269-74.
5. Mori T, Moriuchi R, Okazaki E, Yamada K, Katamine S. Tgat oncoprotein functions as an inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 355(4):937-43.
6. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Kodama K, Nakamura HK, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(29):11921-6.
7. 新竜一郎, 片峰茂: プリオン病: 保健の科学 10月号 vol.49 杏林書院, 2007
8. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol*. 2007;Nov 2;1509-1517.
9. Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A, Tsujihata M, Matsuo H, Nakagawa M, Eguchi K. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;24;207-212.
10. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological Changes in MRI and CSF Biochemical Markers in Creutzfeldt-jakob Disease Patients.

Dement Geriatr Cogn  
Disord.2007;23;372-381.

11. 佐藤克也、調 漸、江口勝美. 孤独性プリオン病(孤発性古典型 CJD, 視床型 CJD, MM2 皮質型 CJD). 日本臨床. 2007;65(8); 1423-1432.
  12. Sakaguchi S: Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. J. Med. Invest. 2007; 54; 211-223.
  13. Kim CK, Hirose Y, Sakudo A, Takeyama N, Kang CB, Taniuchi Y, Matsumoto Y, Itoharu S, Sakaguchi S, Onodera T: Reduced response of splenocytes after mitogen-stimulation in the prion protein (PrP) gene-deficient mouse: PrPLP/Doppel production and cerebral degeneration. BBRC 2007; 358; 469-474.
  14. Dong J, Li A, Yamaguchi N, Sakaguchi S, Harris DA: Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax. Am J Pathol 2007; 171; 599-607.
  15. Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itoharu S, Onodera T: Serum withdrawal-induced apoptosis in Zrch I prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. Microbiol Immunol 2007; 51; 457-66.
  16. Sakaguchi S, Arakawa T: Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. Expert Rev Vaccines 2007; 6; 75-85.
  17. Hamasaki T, Uchida S, Yoshihara T, Hashiguchi S, Ito Y, Sugimura K: Biopanning of antibody-phage clones using immunoplates coated with gel slices of electrophoresis: immunogel-biopanning. Biol. Pharm. Bull. 30: 1361-1364, 2007
  18. 橋口周平、吉原智樹、杉村和久  
抗体医薬の現状と未来、低分子化抗体：ヒト抗体と小分子医薬品の間をつなぐ、細胞工学、26: 263-267, 2007
- 2 学会発表
1. 布施隆行、西田教行、中垣岳大、高倉由佳、山口尚宏、石橋大輔、新竜一郎、片峰 茂. 異常型プリオンタンパク質高産生感染細胞の樹立. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007. 10/21-23
  2. 石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、高倉由佳、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、片峰 茂. ウイルス感染に対して働く自然免疫機構関連因子とプリオン感染との関与. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007. 10/21-23
  3. 新竜一郎 リコンビナントプリオンタンパクを用いた異常型プリオンタンパク試験管内増幅法. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007. 10/21-23
  4. 石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、高倉由佳、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、片峰 茂. プリオン感染成立における自然免疫機構の関与. 日本免疫学会総会 東京 2007. 11/20-22
  5. 佐藤克也 他、プリオン感染腎特異的遺伝子発現とヒトプリオン病での意義 第 48 回日本神経学会総会、愛知、2007. 05. 16-18
  6. 調 漸、佐藤克也、江口勝美、志賀裕正、浜口 毅、山田正仁、三條伸夫、水澤英洋、日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討、第 48 回日本神経学会総会、愛知、2007. 05. 16-18
  7. 佐藤克也、中桶了太、西浦義博、辻野 彰、福田 卓、江口博人、福島直美、本村政勝、調 漸、江口勝美、吉村俊朗、脳ドッグにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者に対する quinacrine 投与経験、第 25 回日本神経治療学会総会、宮城、2007. 06. 21-22
  8. 佐藤克也、調 漸、江口勝美、日本におけるプリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカーと画像検査の検討 第 12 回 日本神経感染症学会総会 福岡 2007. 10. 12-13
  9. 坂口末廣 教育講演：プリオン病：その発症から治療、そして予防まで。第 18 回日本臨床微生物学会総会 長崎ブリックホール. 2007/2/17-18.
  10. 坂口末廣 特別講演：プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第 23 回中国四国ウイルス研究会 松山市道後 にぎたつ会館. 2007/6/16-17.
  11. 坂口末廣 プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第 4 回公開シンポ



ジウム 蛋白質機能制御と疾患治療戦略 長井記念ホール(徳島大学蔵本キャンパス) . 2007/11/22.

12. In vitro selection and characterization of scFvs and Fab fragments specific for the conformational structure of Prion Proteins using phage libraries. 日本免疫学会、横浜、2007年11月
13. ヒト抗体ファージライブラリによる全長ヒトプリオンタンパクの $\beta$ オリゴマーのスナップショット、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学大会合同大会、2007年12月、横浜
14. ファージディスプレイ法によるプリオン蛋白 $\beta$ オリゴマー中間体のスナップショット、プリオン研究会、新潟、2007

## H 知的財産権の出願・登録状況

1. ヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメント、PCT/JP2005/015121 (杉村和久)

# 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学）

分担研究報告書

プリオン感染成立における自然免疫機構の関与

分担研究者 片峰 茂 長崎大学医歯薬学総合研究科・教授

西田教行 長崎大学医歯薬学総合研究科・准教授

研究協力者 石橋大輔 長崎大学医歯薬学総合研究科・助教

研究要旨

プリオン病において、病原体（プリオン）の感染における詳細な機構が未だ明らかになっていない。このことは疾患の予防・治療法の開発が遅れている原因の一つとなっている。本研究では、プリオン持続感染細胞では自然免疫系の機能が低下していること、および自然免疫系のうち RIGI-IRF3 シグナル伝達系の賦活化がプリオン持続感染細胞における PrP の異常化を阻止できることを示した。

A 研究目的

プリオン病の病原体は宿主由来プリオン蛋白質 (PrP) の立体構造異性体とされ、これまでプリオン感染は宿主の免疫反応を惹起しないとされてきた。しかし、我々は、ウイルス感染でよく見られる干渉現象が病原性など個性の異なるプリオン株間の重複感染においても惹起されること、先行する弱毒株感染が強毒株の重複感染を強力に阻止することを見出した。このことは、プリオン感染には、ウイルス感染の干渉と同様に自然免疫が関与する可能性が高いことを示唆するものである。そこで本研究では、プリオン感染の機構を解明するため、プリオン感染細胞における RIGI、TLR3 や IRF3 などの自然免疫関連因子の発現およびその役割について検討した。

B 研究方法

(Cell culture) プリオン非感染細胞には N2a および正常型プリオン蛋白質 (PrP) を過剰発現させた N2a58 細胞を用いた。プリオン持続感染細胞にはマウスに馴化した scrapie 由来の 22L、Chandler 株を感染後、クローニングした N2aL1、N2aCh 細胞および GSS 由来の Fukuoka-1 株を感染後、クローニングした N2aFK を用いた。

(Reagent) 各 plasmid は、pUNO vector (InvivoGen)に各遺伝子の塩基配列を挿入したものを用いた。遺伝子の導入には Lipofectamine LTX (Invitrogen)を用い、Poly I:C (InvivoGen)導入には、Fugen 6 (Roche) を用いた。Type I INFs のリコンビナントとして Mouse IFN-alpha および Mouse IFN-beta (calbiochem)用いた。

(Real time PCR) 各条件下の細胞から RNA

を抽出し、cDNA に変換後、作製した各 primer および SYBR Green I (QIAGEN) を用いて、Light Cycler (Roche)にて各遺伝子量を測定した。

(Western blot) 細胞の Lysate を調整後、10~12% SDS-PAGE で泳動後、PVDF 膜に blot した。1 次抗体には抗 IRF3 (SantaCruz)、抗 IRF3-P (Ser396) (Cell Signaling)、抗 Beta-Actin (Sigma) 抗体、2 次抗体に抗 Mouse または Rabbit IgG-HRP (GE) を用いた。異常型 PrP の検出には Proteinase K (PK)で処理した Lysate を 15% SDS-PAGE で泳動後、抗 mouse PrP 抗体を用いて検出した。また、発色には ECL (GE)を用いた。

(ELISA) 各細胞の Conditioned medium 中の Type I IFNs 量を測定するために、Mouse IFN-alpha、-beta with ELISA kits (PBL Biomedical Labs) を使用して、450nm の吸光値を測定した。

(倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験は、長崎大学の BSL3 実験施設にて行った。

## C 研究結果

1) Real time PCR 法で自然免疫関連因子の mRNA の発現を測定したところプリオン非感染細胞に比べプリオン持続感染細胞において、TLR3、RIGI だけでなく IRF3 の発現が有意に減少していた (図 1)。さらに、興味深いことにプリオン感染細胞は PolyI:C による刺激後において RIGI および IRF3 の発現能が見られなかった (図 2)。

2) PolyI:C 刺激による I 型インターフェロンの発現を ELISA 法にて検討したところ、プリオン持続感染細胞では有意に低下していた (図 3)。

3) 各自然免疫関連因子をプリオン持続感染細胞に過剰発現させ、異常型 PrP の発現をウエスタンブロット法にて検討したところ、TLR3 および IRF3 蛋白質の過剰発現下において、異常型 PrP の減少が見られた (図 4)。

4) プリオン持続感染細胞に Type I IFN のリコンビナントを添加したところ、dose-dependent に異常型 PrP の減少が見られた (図 4)。

## D 考察

今日までプリオン病は、詳細な感染経路および病原体の特定は不明なままであり、仮説の域を出ていない。本研究により、in vitro の系においてプリオン持続感染細胞では、1) 自然免疫関連因子 TLR3、RIGI、IRF3 の発現減少、2) ウイルス様刺激因子 Poly I:C による RIGI、IRF3 の遺伝子の発現能の低下、3) Poly I:C による Type I IFN の細胞外放出の減少、4) TLR3、IRF3 の細胞内過剰発現系における異常型 PrP の減少などの事象が確認された。以上のことより、プリオン感染の成立には、自然免疫の機構が関与することが示唆され、そのシグナル伝達機構は MyD88 依存の経路ではなく、MyD88 非依存の経路が重要であることが示唆された。このことは、MyD88 のノックアウトマウスにおけるプリオン感染実験において感染成立に有意な変化が見られ

ない報告に同意するものである。現在、in vivo の系において IRF3 ノックアウトマウスにおけるプリオン感染実験について検討中である。

## E 結論

本研究により、in vitro の系においてプリオン感染の成立には、自然免疫機構の破綻が要因の一つという可能性が示唆された。プリオン病原体と自然免疫応答の関わりを証明することは、既知のウイルス感染とは異なった新たな感染現象の成立の理解を深めると考えられ、発症前診断ができなかったプリオン病の早期診断を可能にし、さらに未だ予防、治療のないプリオン病の創薬の研究分野においても大きな影響を持つことが期待される。

## F 研究危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

1. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S. Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene*. 2007,386(1-2):139-46.
2. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine*. 2007 25(6):985-92.

3. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochemistry Cell Biology* 2007 127(3) :291-301.
4. Yamada K, Moriuchi R, Mori T, Okazaki E, Kohno T, Nagayasu T, Matsuyama T, Katamine S. Tgat, a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor, activates NF-kappaB via physical association with IkappaB kinase complexes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 ,355(1):269-74.
5. Mori T, Moriuchi R, Okazaki E, Yamada K, Katamine S. Tgat oncoprotein functions as a inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 , 355(4):937-43.
6. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Kodama K, Nakamura HK, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 , 104(29):11921-6.
7. 新竜一郎、片峰茂：プリオン病：保健の科学 10 月号 vol.49 杏林書院、2007

### 1 学会発表

1. 布施隆行、西田教行、中垣岳大、高倉由佳、山口尚宏、石橋大輔、新竜一郎、片峰茂. 異常型プリオンタンパク質高産生感染細胞の樹立. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.10/21-23
2. 石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、高倉由佳、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、片峰茂. ウイルス感染に対

- して働く自然免疫機構関連因子とプリオン感染との関与. 第 55 回日本ウイルス学会 学術集会 札幌  
2007.10/21-23
3. 新竜一郎 リコンビナントプリオンタンパクを用いた異常型プリオンタンパク試験管内増幅法. 第 55 回日本ウイルス学会 学術集会 札幌  
2007.10/21-23
4. 石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、高倉由佳、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、片峰 茂. プリオン感染成立における自然免疫機構の関与. 日本免疫学会総会 東京 2007.11/20-22

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

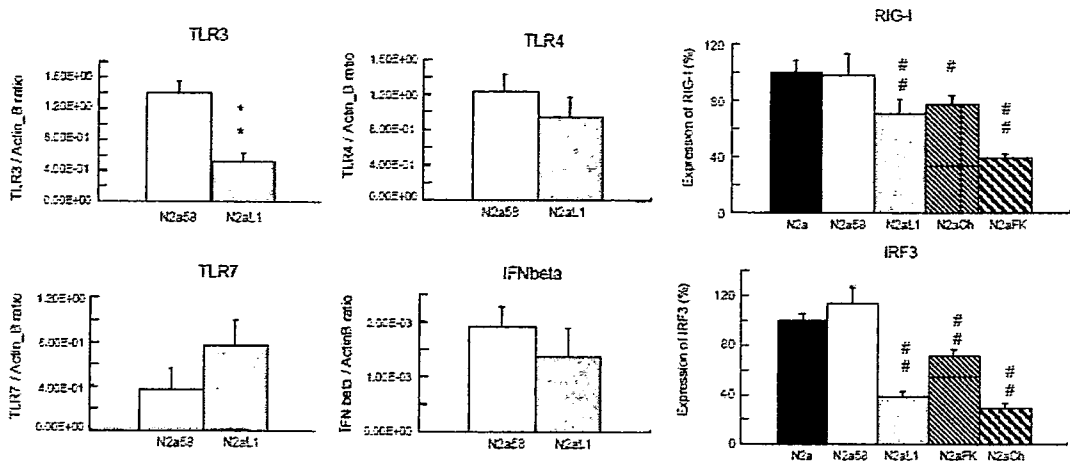


図 1. プリオン持続感染細胞における TLR 関連遺伝子の発

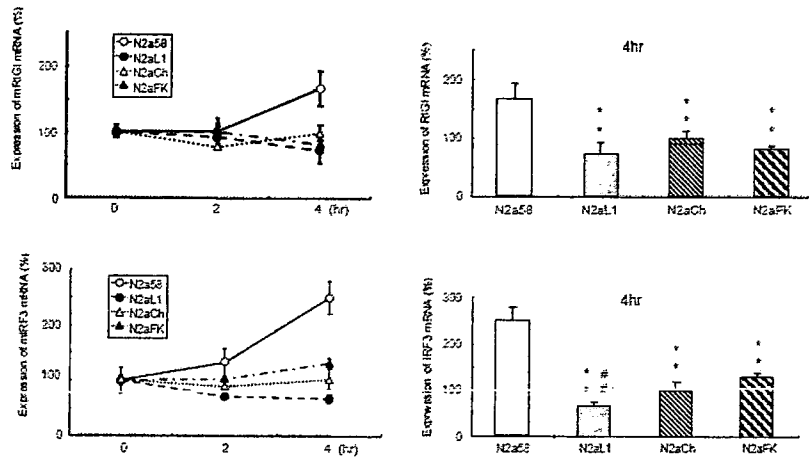


図 2. N2aL1 における Poly I:C 誘導による RIG-I および IRF3 遺伝子の発現能

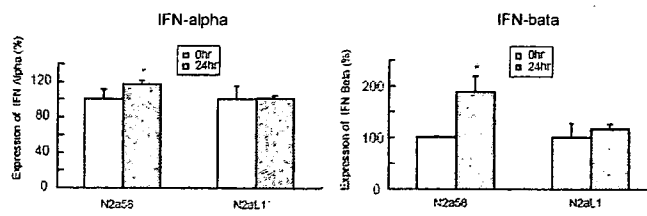


図 3. N2aL1 における Poly I:C 誘導による Type I IFNs の発現能



図 4. N2aL1 における異常型 PrP に対する自然免疫関連因子および Type I IFNs の影響

## 本邦プリオン病患者のデータベース化と生化学マーカーを用いた 早期診断法 の検討

分担研究者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院 へき地病院再生支援・教育機構  
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学医学部・歯学部附属病院 へき地病院再生支援・教育機構

### 〔研究要旨〕

本学会議ではプリオン病患者の診断法・治療法確立に向けた基礎的研究が行われており、研究成果をいち早く臨床治験へ移行できるための基盤的な臨床研究を担当している。

今回は髄液を用いてプリオン病の生化学的な異常を検討し、早期診断法の検討を行った。今回、我々は独自の手法によりデータ・患者情報・髄液検討結果をすべて長崎大学で管理し、2008年4月よりCJDサーベイランス委員会のデータを共有することが可能になった。さらに2003年より2007年までにCJD疑い症例を含め約1000症例をデータベース化し、今後の研究においても容易に利用できる体制づくりを行っている。2003年より2007年までに追跡調査判明分362症例について調査を行い、CJD症例282症例、非CJD症例80症例と判明した。

さらに髄液検査の問題点であるヨーロッパ方式の欠点を改善し、特に14-3-3蛋白の判定基準を明らかにすることを目標にした。これにより14-3-3蛋白の判定基準を明らかにし、CJD症例282症例の検査結果を明確にした。

CJD症例282症例において14-3-3蛋白は86.5%、タウ蛋白は95.5%、MRI拡散強調画像では94.1%であった。

以上の結果より多数例の検討では総タウ蛋白が最も感度がよいと考えられた。又MRI拡散強調画像はfirst screeningでは非常によいと考えられる。

### A.研究目的

CJDサーベイランスは全国10の地域ブロックに担当のサーベイランス委員を配置し、全都道府県のCJD担当専門医の協力のもとに訪問調査を行っている。

又、サーベイランス委員会が定期的開催され、報告された個々の患者のプリオン病の診断（病型、診断の確実性、他）についての評価およびサーベイランスで明らかになった問題についての討議等を行っています。CJDサーベイランス委員会の構成と担当地域ブロック、最近のサーベイランスの結果を発表している。しかしながら

CJDサーベイランス委員会はいろいろな問題点が出てきている。

我々は現在までのCJDサーベイランス委員会の問題点を明らかにし、髄液検査にて2003年より2007年までにCJD疑い症例を含め約1000症例が登録され、申し込まれている。

今回我々は独自の手法によりデータ・患者情報・髄液検討結果をすべて長崎大学で管理し、2008年4月よりCJDサーベイランス委員会のデータを共有することが可能になった。さらに2003年より2007年までにCJD疑い症例を含め約



1000 症例をデータベース化し、今後の研究においても容易に利用できる体制づくりを行っている。

本年度は 14-3-3 蛋白の検出は Western blot 法による定性的な検査であることから判定基準は明確ではない。その客観化のためには「同じサンプルを被験者の違う 2 人で行う、又は判定に利用した 2 人の研究者による 2 重判定する」など、効率が悪く、手間がかかる。この問題点をできるだけ明確に施行できるように改良することを目的とした。その結果、本年度の研究にて 14-3-3 蛋白の判定基準を明確化することが可能になり得た。

## B. 研究方法

### 1. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白 $\beta$ 及び $\gamma$ アイソフォームでの判定基準の明確化

本研究班研究協力者の飛梅実研究協力者より提供された既知濃度の 14-3-3 蛋白 $\beta$  及び $\gamma$ アイソフォームのリコンビナント蛋白を基準として CJD 患者での脳脊髄液サンプルを用いて、Western blot 法にて検出し、半定量化を試みた。CJD 患者(112 例)とその他の認知症患者(93 例)の検体を用いて 14-3-3 蛋白 $\beta$  及び $\gamma$ アイソフォームの半定量化を行い、cut-off 値を決定した。

### 2. 多数例における脳脊髄液中の生化学マーカー、画像、脳波の検討

#### 2-1. 対象

対象は CJD 患者(282 例)と対照群患者(80 例)とした。(表 1)

#### 2-2. 方法

- 対照群 (N=80)と CJD 患者(N=282)の脳脊髄液 14-3-3 蛋白(14-3-3- $\gamma$ アイソフォーム定性) (IBL) 抗体を用いて検討を行った。
- 対照群 (N=80)と CJD 患者(N=282)において脳脊髄液中の Tau 蛋白定量(Innogenetics 社)による比較検討を行った。
- 対照群 (N=80)と CJD 患者(N=282)において画像検査(拡散強調画像)による比較検討を行った。

(倫理面への配慮) 本研究は長崎大学倫理委員会の承認を経て、行っている。なお、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業・水澤班)による CJD サーベイランス事業に関わる検体は同研究班サーベイランス委員会の倫理規定に沿って取り扱われている。全ての患者検体は両倫理規定を遵守して、匿名化した上、慎重に取り扱っている。

## C. 研究結果

### 1. Western blot 法の統一プロトコールを作成した。(表 2)

1-a. 14-3-3 蛋白の $\gamma$ アイソフォームのリコンビナント蛋白にてスタンダードサンプルを Western blot 法にアッセイし、ECL 処理後 Las mini system を利用し、検出限界を検定した。 $\gamma$ アイソフォームについては 1 回ごとの結果が異なるために Western blot 法を行うたびにスタンダードサンプルを置き、半定量化を行った(図 1, 2)。CJD 患者(282 例)と認知症患者(80 例)において半定量化し、cut-off 値を決定した。

### 2. 総タウ蛋白の測定における cut off 値の結果 総タウ蛋白

Inogenetics 社製総タウ蛋白 (ELISA キット)。cut off 値 は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 1260pg/ml とした。(ヨーロッパ基準では 1300pg/m)

3. プリオン病患者 282 例中の病型別分類のプロファイリングは表で示す。又 CJD 患者 (N=282) における画像検査 (MRI 拡散強調画像)、脳脊髄液 (t-tau 蛋白、14-3-3 蛋白(14-3-3- $\beta$  定性)による比較検討の結果では古典型 CJD (248 例) において MRI 拡散強調画像 94.1% 脳脊髄液 (総 tau 蛋白 95.5% 14-3-3 蛋白 (14-3-3- $\gamma$  定性 88.7%)) であった。MM2 皮質型 7 例において MRI 拡散強調画像 100%、脳脊髄液 (総 tau 蛋白 100.00%、14-3-3 蛋白 (14-3-3- $\gamma$  定性 50%)) であった。282 例画像検査 (MRI 拡散強調画像) 94.1%、脳脊髄液 (総 tau 蛋白 95.50%、14-3-3 蛋白(14-3-3- $\gamma$  定性

86.5%)であった。(表1)

#### D. 考察

1. 脳脊髄液中の14-3-3蛋白の陽性・陰性における判定基準が明確化された。
2. 282症例における病型分類での脳脊髄液(総tau蛋白、14-3-3蛋白)、MRI拡散強調画像でのデータを示した。脳脊髄液中での総tau蛋白は14-3-3蛋白より検出率感度が高い。(総tau蛋白>14-3-3蛋白)
3. 拡散強調画像での検出率は94.1%であった。

#### E. 結論

脳脊髄液中の生化学的マーカーとして14-3-3蛋白検出が半定量的に可能となり、検出限界の設定も行えたが、このデータとの比較においても総tau蛋白最も陽性率が最も高かった。又MRI拡散強調画像はfirst screeningでは非常によい検査法と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol*. 2007;Nov 2;1509-1517.
2. Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A,

Tsujihata M, Matsuo H, Nakagawa M, Eguchi K. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;24;207-212.

3. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari O.Y, Muto H.J, Kodama K, Nakamura K.H, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, and Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *P N A S*. 2007;104(29);11921-11926.

4. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological Changes in MRI and CSF Biochemical Markers in Creutzfeldt-jakob Disease Patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23;372-381.

5. 佐藤克也、調 漸、江口勝美. 孤独性プリオン病(孤発性古典型CJD, 視床型CJD, MM2皮質型CJD). *日本臨床*. 2007;65(8); 1423-1432.

##### 2. 学会発表

1. 佐藤克也 他、プリオン感染腎特異的遺伝子発現とヒトプリオン病での意義 第48回日本神経学会総会、愛知、2007.05.16-18
2. 調 漸、佐藤克也、江口勝美、志賀裕正、浜口 毅、山田正仁、三條伸夫、水澤英洋、日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討、第48回日本神経学会総会、愛知、2007.05.16-18
3. 佐藤克也、中桶了太、西浦義博、辻野 彰、福田 卓、江口博人、福島直美、本村政勝、調 漸、江口勝美、吉村俊朗、脳ドッグにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者に対するquinacrine投与経験、第25回日本神経治療学会総会、宮城、2007.06.21-22

4.佐藤克也, 調 漸, 江口勝美, 日本における  
 プリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカー  
 と画像検査の検討 第12回 日本神経感染  
 症学会総会 福岡 2007.10.12-13

1.特許取得  
 なし  
 2.実用新案登録  
 なし  
 3.その他  
 なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

(表 1). CJD 282 症例の分類

	総数
古典型 CJD	248 例
MV 非典型	1 例
MM2 皮質型	7 例
家族性	
180	10 例
232	2 例
144 塩基対挿入	2 例
硬膜移植後 CJD	8 例
GSS	4 例
総計	282 例

(表 2) 非 CJD 患者の内訳

- 脳炎・脳症 (急性ヘルペス脳炎・非ヘルペス脳炎)
- AD or DAT
- 脳血管性認知症
- 分類不能な認知症性疾患
- てんかん発作重積
- ミトコンドリア脳筋症
- びまん性レビー小体病 (DLB)
- 低酸素脳症 (無酸素脳症)
- 傍腫瘍性症候群 (傍腫瘍性小脳変性症)

(表 3). 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の検出方法 Western blot 法の統一プロトコール (12%ゲル)

80VX10min→100VX10min→120V(70min)
● <u>トランスファー 15% MeOH X 30mA overnight</u>
● <u>ブロッキング 5% スkimミルク室温 60min</u>
● <u>1次抗体 (IBL社 <math>\beta</math> isoform) (1:1000) 4°C overnight</u>
● <u>室温で 3×10min with TTBS wash</u>
● <u>2次抗体(1:5000) 室温で1時間</u>
● <u>室温で 3×10min with TTBS wash</u>
● <u>ECL 処理</u>

(表 4) CJD 282 症例での検討

	総数	14-3-3 蛋白	総タウ蛋白	DWI
孤発性				
古典型 CJD	248 例	88.7 %	95.9 %	92.7 %
MV 非典型	1 例	0.0 %	0.0 %	100.0 %
MM2 皮質型	7 例	50.0 %	100.0 %	100.0 %
家族性				
180	10 例	50.0 %	80.0 %	100.0 %
232	2 例	0.0 %	100.0 %	100.0 %
144 塩基対挿入	2 例	0.0 %	50.0 %	不明
硬膜移植後 CJD	8 例	100.0 %	100.0 %	100.0 %
GSS	4 例	0.0 %	33.3 %	不明
総計	282 例	86.5 %	95.5 %	94.1 %