

14-3-3 蛋白の ELISA の開発とそのヒトプリオン病の髄液生化学診断における意義

研究分担者： 調 漸 長崎大学保健・医療推進センター

研究協力者： 佐藤 克也 長崎大学医歯薬学総合研究科 感染分子

研究協力者： 松井 佑貴 福岡大学薬学部大学院 薬学疾患管理学

研究協力者： 宮崎 敏昭 サイケリックス

研究要旨

CJD 患者における脳脊髄液を用いた生化学的補助診断法として 14-3-3 蛋白などの幾つかのマーカーの意義が報告されている。我々は本研究班でこれまでに 112 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。今回、我々は 14-3-3 蛋白の γ アイソフォームの ELISA 法による測定系を開発したので報告する。この ELISA 法を用いた CJD の診断精度は感度 98.6%特異度 84.4%であり、現在までの生化学的マーカーと比較して最も優れていると考えられる。

A. 研究目的

これまでに CJD 患者における脳脊髄液を用いた生化学的補助診断法としてウエスタンブロット法による 14-3-3 蛋白の検出などの幾つかのマーカーとして報告されている。我々は 14-3-3 蛋白陰性例での総 tau 蛋白の定量の診断的意義、CJD 患者での特異性・感度を報告してきた。また平成 19 年度の研究にて 14-3-3 蛋白のウエスタンブロット半定量系の開発によって判定基準を明確化することが可能になった。

さらにサーベイランス委員会に寄せられた検体 112 症例における臨床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、孤発例での総 tau 蛋白測定の有用性を示したが、14-3-3 蛋白の標準化のみで十分ではないと思われた。今回、我々は 14-3-3 蛋白の γ アイソフォームの ELISA 法による測定系を開発したので報告する。

B. 研究方法

- 1) 現在までに 14-3-3 蛋白の γ アイソフォームに対するモノクローナル抗体 3 種類とポリクローナル抗体 3 種類、計 6 種類の 14-3-3 蛋白に対する抗体を作成した。これらの 6 種類の抗体を捕獲抗体と標識抗体として全ての組み合わせを検討し、サイドウィッチ ELISA に利用可能な感度と特異性の高い 2 つの抗体の組み合わせを見だし、高感度 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームの ELISA 法を作成した。
- 2) 現在まで長崎大学第一内科が検体解析の依頼を受けた 112 症例(表 1-a,b)について 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームに対する ELISA 法を用いて 14-3-3 蛋白の定量的な解析を行い、ROC 曲線を作成し、cut-off 値を決定した。
- 3) これまでに報告した 14-3-3 蛋白ウエスタンブロット法による半定量系、総タウ蛋白、NSE、S-100 蛋白について感度・特異度を指標として比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いられた患者検体(髄液)はサーベイランス委員会の事業の一環として提供され、長崎大学の倫理審査を経て承認された上、長崎大学の倫理規定に基づいて厳重に匿名化された上で研究に供した。

C. 研究結果

- 1) 14-3-3 蛋白のγアイソフォームに対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を6種類作成した。
- 2) プリオン病と診断された症例の内容は表1-a、対照疾患群についても表1-bに示す。
- 3) 現在まで長崎大学第一内科の検体の依頼が受けた112症例についての検討ではγアイソフォームに対するウエスタンブロット法では90.3%であったが、今回開発したELISA法では感度98.6%特異度84.4%であった。又総タウ蛋白は87.5%、NSEは72.3%、S-100b蛋白は34.7%であった。(図1)

表1-a. CJDの112症例のプロフィール (N=112cases)

		definite cases	probable cases	possible cases	total cases
孤発例	male	4	48	0	52
N=99	female	3	44	0	47
家族性	male	0	2	2	4
N=8	female	3	0	1	4
医原性	male	0	3	0	3
N=5	female	1	1	0	2

CJDと診断された112例について解析した。WHOの診断基準に従って分類した。医原性CJDは全て硬膜移植によるCJD症例である。

表1-b. 疾患対照群のプロフィール (N=100 cases)

disease	male	female	total cases
Alzheimer型認知症	33 cases	21 cases	54 cases
脳血管障害	5 cases	2 cases	7 cases
Pick病	1 case	0 case	1 case
Parkinson病	4 cases	1 case	5 cases
皮質基底核変性症	2 cases	0 case	2 cases
Huntington病	1 case	0 case	1 case
前頭側頭型認知症	1 case	0 case	1 case
進行性核上性麻痺	2 case	1 case	3 cases
軽度認知障害	1 case	2 cases	3 cases
筋萎縮性側索硬化症	2 cases	1 case	3 cases
てんかん	3 cases	2 cases	5 cases
辺縁系脳炎	2 cases	1 case	3 cases
ミトコンドリア脳筋症	1 case	1 case	2 cases
PCD/LEMS	1 case	1 case	2 cases

表2. 14-3-3蛋白の全アイソフォームの抗体を用いたCJD群と疾患対照群髄液に対する反応性の比較検討

pattern	number	the isoform of 14-3-3 protein					
		β	γ	η	ε	ζ	υ
classical and typical CJD patients (N=20)							
1	15	+	+	+	-	-	-
2	2	-	+	+	-	-	-
3	2	+	+	-	+	-	-
4	1	+	+	+	+	-	-
other disease patients (N=20)							
5	16	-	-	+	-	-	-
6	1	-	-	-	-	-	-
7	1	+	+	+	-	-	-
8	1	+	+	+	+	-	-
9	1	+	+	+	-	-	-

+ : 14-3-3蛋白陽性 - : 14-3-3蛋白陰性

1-4のCJD症例は全例古典的CJDであった。129番の遺伝子多型は全例メチオニンのホモザイゴート、219番の遺伝子多型は全例グルタミンのホモザイゴート。PCD/LEMS: PCDは傍腫瘍性小脳変性症、LEMSはLambert-Eaton筋無力症候群を示す。

図 1-a. 14-3-3 蛋白の ROC 曲線

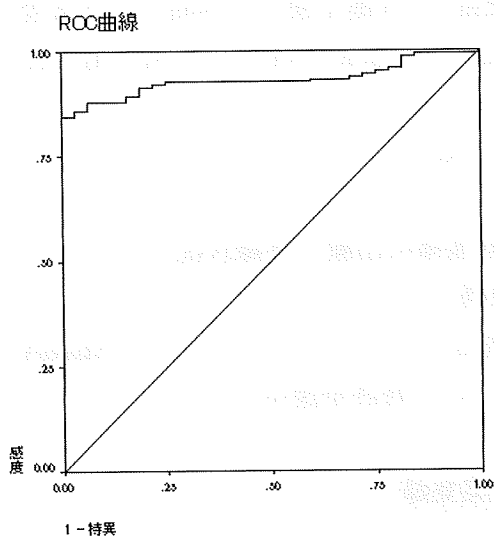


図 1-b. 14-3-3 蛋白の検査結果

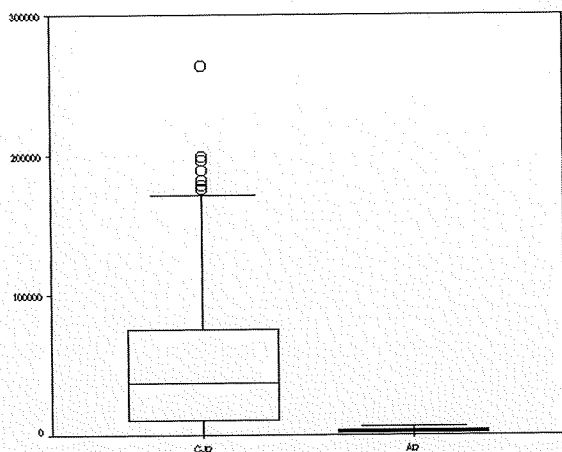
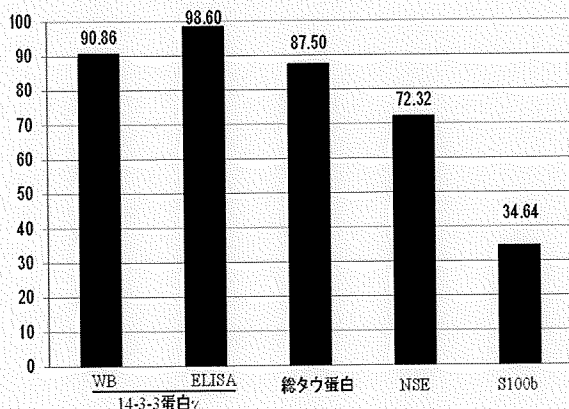


図 2. CJD 患者における髄液中の生化学マーカーの検出感度の比較



D. 考察

これまでのプリオン病患者での脳脊髄液の生化学マーカー中の比較検討では 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームのウエスタンブロット法を用いた半定量系が最も高かったが、今回開発した ELISA 法による定量系ではこれまで検討した生化学マーカーの中で最も高い感度が得られており、十分に有用であることが明らかになった。

現在までサンドウィッチ ELISA 法による報告が 3 報あるが、いずれも 14-3-3 蛋白の γ アイソフォームではなく total フォームに対する抗体で検討されており、現時点では国内で入手ができないが今後これらとのキットとの比較検討が必要であると考えられた。

E. 結論

14-3-3 蛋白の γ アイソフォームに対する ELISA 法は CJD の髄液診断法として有効であると考えられる。

[参考文献]

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Mutsukura K, Satoh K, Shirabe S et al. Familial Creutzfeldt-Jakob Disease with a V180I Mutation: Comparative Analysis with Pathological Findings and Diffusion-Weighted Images. Dement Geriatr Cogn Disord. 28: 550-557, 2009
- 2) Satoh K, Kawakami A, Shirabe S et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian. Acta Neurol

Scand. 2009; E-pub ahead of print

2. 学会発表

- 1) 六倉和生, 佐藤克也, 江口勝美, 調 漸, 長郷国彦, 岸田日帯, 黒岩義之, 三條伸夫, 水澤英洋. クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) における血液脳関門 (BBB) についての検討. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009.5.20-5.22
- 2) 佐藤克也, 調 漸, 六倉和生, 江口勝美, 新 竜一郎, 西田教行. CJD 患者における髄液中の異常プリオン蛋白の検出. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009.5.20-5.22
- 3) 六倉和生, 佐藤克也, 福田 卓, 辻野 彰, 吉村俊朗, 中村龍文, 本村政勝, 今西大介,

波多智子, 江口勝美. 進行性の認知機能障害で発症し, 骨髄生検にて診断した血管内悪性リンパ腫症 (IVL) の 1 例. 第 285 回日本内科学会九州地方会, 北九州, 2009.5.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

14-3-3 蛋白 γ アイソフォームによる ELIZA キットについて特許申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床経過についての検討

研究分担者：岩崎 靖 小山田記念温泉病院 神経内科
研究協力者：三室 マヤ 愛知医科大学 加齢医科学研究所
研究協力者：吉田 眞理 愛知医科大学 加齢医科学研究所
研究協力者：橋詰 良夫 愛知医科大学 加齢医科学研究所

研究要旨

典型的な臨床病理学所見を呈する MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床経過について自験 29 剖検例を対象に後方視的に検討した。発症年齢は平均 67.1 歳、ミオクローヌスと周期性同期性放電(PSD)はいずれも発症後平均 2.0 ヶ月で出現し、欧米例と明らかな差はなかった。無動性無言状態に至ったのは発症後平均 2.9 ヶ月で、その後の死亡までの期間は平均 9.0 ヶ月であった。全経過は平均 11.9 ヶ月で欧米例の約 3 倍長かった。亜急性海綿状脳症と全脳型に分けて検討すると、発症年齢はそれぞれ平均 68.8 歳と 65.4 歳、ミオクローヌスの出現は平均 2.1 ヶ月と 1.9 ヶ月、PSD の出現は平均 1.9 ヶ月と 2.0 ヶ月、無動性無言状態の出現は平均 2.6 ヶ月と 3.2 ヶ月で、両型間で有意差はなかったが、無動性無言状態に至ってから死亡までの期間は平均 1.3 ヶ月と 17.2 ヶ月、全経過は平均 4.0 ヶ月と 20.5 ヶ月であり、全脳型が有意に長期間だった。全経過が長い症例は無動性無言状態に至ってから死亡までの期間が長いことが示唆されたが、経過の短い症例と長い症例の間で治療法や発症年度、出所病院の差は明らかでなく、どのような症例が長期延命するのかは明らかでなかった。

A. 研究目的

本邦のプリオン病症例の臨床経過は欧米症例に比べて長いと言われている。しかしながら、両者の臨床経過の差について検討した報告はみられない。そこで、臨床病理学的に最も典型的な所見を呈する MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(sCJD)の臨床経過について検討を試みた。

B. 研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所において神経病理学的検索が行われた症例で、プリオン蛋白(PrP)遺伝子とプロテアーゼ抵抗性 PrP の Western blot 解析がともに施行され、MM1 型 sCJD(PrP 遺伝子コドン 129 多型が

Met/Met で、Western blot 解析結果が Type I PrP)と診断された 29 症例を対象とした。剖検記録を参考に、発症年齢、ミオクローヌスと周期性同期性放電(PSD)の出現時期、無動性無言状態に至った時期とその後の死亡までの期間、全経過について後方視的に検討した。それらの結果を Parchi らの検討した欧米 MM1 型 sCJD 203 例の所見と対比した。また病理学的に亜急性海綿状脳症と全脳型に分けて両者の臨床経過についても検討した。

(倫理面への配慮)

剖検にあたって家族による文書同意が全例で得られている。また本研究は後方視的な検討であって介入研究ではなく、臨床データは

全て匿名化して検討しており倫理上の問題は
ない。

C. 研究結果

1. 欧米症例との比較(表 1)

発症年齢は平均 67.1 ± 6.9 歳(57~82 歳)であ
った。全例でミオクロオヌス、無動性無言
状態が認められ、2 例でのみ PSD が認められ
なかった。ミオクロオヌスと PSD は発症後、
それぞれ平均 2.0 ± 0.7 ヶ月(2 週間~4 ヶ月)、
平均 2.0 ± 1.1 ヶ月(3 週間~4 ヶ月)で出現し、
無動性無言状態に至ったのは発症後平均
 2.9 ± 1.1 ヶ月(1~6 ヶ月)であった。無動性無
言状態に至ってから死亡までの期間は平均
 9.0 ± 9.0 ヶ月(0~27 ヶ月)で、全経過は平均
 11.9 ± 9.4 ヶ月(2~32 ヶ月)であった。

欧米 MM1 型 sCJD 症例の発症年齢は平均
 65.5 歳、ミオクロオヌスと PSD の出現時期
は、それぞれ平均 1.8 ヶ月と 2 ヶ月であり、
本検討とほぼ同時期であった。一方で欧米症
例の全経過は平均 3.9 ヶ月であり、本検討の
平均は約 3 倍長かった。

2. 亜急性海綿状脳症と全脳型の比較(表 2)

病理学的に自験 MM1 型 sCJD 29 例を分類
すると、大脳白質がよく保たれる亜急性海綿
状脳症は 15 例、広範な大脳白質の変性像が
みられる全脳型は 14 例あった(視床型、Kuru
斑型はなかった)。亜急性海綿状脳症と全脳型
の発症年齢はそれぞれ平均 68.8 ± 8.3 歳(57~
82 歳)と平均 65.4 ± 4.6 歳(58~74 歳)、ミオ
クロオヌスの出現時期は平均 2.1 ± 0.9 ヶ月(2
週間~4 ヶ月)と平均 1.9 ± 0.5 ヶ月(1~3 ヶ月)、
PSD の出現時期は平均 1.9 ± 1.2 ヶ月(3 週間~
4 ヶ月)と平均 2.0 ± 1.0 ヶ月(1~4 ヶ月)、無動
性無言状態の出現時期は平均 2.6 ± 0.9 ヶ月(1
~4 ヶ月)と平均 3.2 ± 1.3 ヶ月(2~6 ヶ月)で、
両型間で有意差はなかったが、無動性無言状
態に至ってから死亡までの期間は平均
 1.3 ± 1.1 ヶ月(0~3 ヶ月)と平均 17.2 ± 5.6 ヶ月
(9~27 ヶ月)、全経過は平均 4.0 ± 1.5 ヶ月(2

~6 ヶ月)と平均 20.5 ± 6.2 ヶ月(11~32 ヶ月)
であり、全脳型が有意に長期間だった。

D. 考察

欧米症例の全経過に比べ、本検討の全経過
が長い理由として無動性無言状態に至ってか
ら死亡までの期間が長いことが示唆された。
欧米症例は無動性無言状態に至る時期の検討
はされておらず、これは無動性無言状態に至
ると間もなく死亡するためと推定された。自
験症例の無動性無言状態に至ってからの期間
が長い理由は、経管栄養や中心静脈栄養など
の栄養管理、抗生剤投与などの対症療法や合
併症対策によると推定された。亜急性海綿状
脳症の症例は全例が無動性無言状態に至っ
てから 3 ヶ月以内に死亡しており、長期生存し
た症例はすべて全脳型を呈していた。

A. 追加検討 1(表 3)

発症年によって全経過に差があるか検討し
たが、亜急性海綿状脳症と全脳型で明らかな
差はなく、医療水準の進歩によって全経過が
長くなっている傾向は明らかでなかった。

B. 追加検討 2(表 4)

出所病院によって全経過に差があるか検討
したが、亜急性海綿状脳症と全脳型で明らかな
差はなく、治療する病院によって経過が長
くなる傾向は明らかでなかった。

E. 結論

本邦 sCJD 症例の全経過が長い症例は無動
性無言状態に至ってから死亡までの期間が長
いことが示唆されたが、経過の短い症例と長
い症例の間で治療法や発症年度、出所病院の
差は明らかでなく、どのような症例が長期延
命するのかは明らかでなかった。

[参考文献]

- 1) Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, et
al. Clinicopathologic characteristics of
sporadic Japanese Creutzfeldt-Jakob

disease classified according to prion protein gene polymorphism and prion protein type. *Acta Neuropathol (Berl)*. 112: 561-571, 2006

- 2) Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Neuropathologic characteristics of spinal cord lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 110: 490-500, 2005
- 3) Iwasaki Y, Hashizume Y, Yoshida M, et al. Neuropathologic characteristics of brainstem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 109: 557-566, 2005
- 4) Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224-233, 1999

F. 健康危険情報

本研究は剖検記録を元におこなった検討であり、健康危険に関する情報はない。

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, et al. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: Accuracy based on analysis of autopsy-confirmed cases. *J Neurol Sci* 277: 119-123, 2009
- 2) Iwasaki Y, Kizawa M, Hori N, et al. A case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the P105L prion protein gene mutation presenting with ataxia and extrapyramidal signs without spastic paraparesis. *Clin Neurol Neurosurg* 111: 606-609, 2009

- 3) 岩崎 靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 他. 剖検例からみた孤発性Creutzfeldt-Jakob病の疫学的検討. *臨床神経* 49: 463-467, 2009
- 4) Hama T, Iwasaki Y, Niwa H, et al. An autopsied case of panencephalopathic-type Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene at codon 232 and type 1 prion protein. *Neuropathology* 29: 727-734, 2009

2. 学会発表

- 1) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美, 他. 孤発性 Creutzfeld-Jakob 病の臨床経過に関する検討. 第106回日本内科学会総会. 東京, 2009.4.11
- 2) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美, 他. MM1型孤発性 Creutzfeld-Jakob 病における大脳新皮質病変の検討. 第50回日本神経学会総会. 仙台. 2009.5.22
- 3) 岩崎 靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 他. MM2型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床病理学的スペクトラム. 第50回日本神経病理学会総会. 高松. 2009.6.6
- 4) 酒井竜一郎, 出井里佳, 岩井克成, 空野謙次, 吉田眞理, 橋詰良夫, 岩崎 靖. 病理解剖により移植硬膜を同定しえたプリオン病の剖検例. 第124回日本神経学会東海北陸地方会. 名古屋. 2009.6.27
- 5) 岩崎 靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 他. MM2型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床病理学的スペクトラム. 2009 プリオン研究会. 蔵王. 2009.8.29
- 6) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美, 他. 全脳型を呈した全経過約2年のMM1型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の1剖検例. 第1回日本神経病理学会東海北陸地方会. 金沢. 2009.10.3
- 7) 岩崎 靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 他. MM1型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病剖検例における亜急性海綿状脳症と全脳型の臨床

経過についての検討, 第 14 回神経感染症
学会学術集会, 宇都宮, 2009.10.17

2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

1. 特許取得
なし

なし

表 1. 欧米例との比較

	本検討		欧米例	
	1. 発症年齢	67.1 ± 6.9歳	57~82歳	65.5歳
2. ミオクロームスの出現時期	2.0 ± 0.7ヶ月	0.5~4ヶ月	1.8ヶ月	N.D.
3. 周期性同期性放電の出現時期	2.0 ± 1.1ヶ月	0.75~4ヶ月	2ヶ月	N.D.
4. 無動性無言状態の出現時期	2.9 ± 1.1ヶ月	1~6ヶ月	N.D.	N.D.
5. 無動性無言状態から死亡までの期間	9.0 ± 9.0ヶ月	0~27ヶ月	N.D.	N.D.
6. 全経過	11.9 ± 9.4ヶ月	2~32ヶ月	3.9ヶ月	1~18ヶ月

(N.D.: 記載なし)

表2. 亜急性海綿状脳症と全脳型での比較

	亜急性海綿状脳症		全脳型	
	1. 発症年齢	68.8 ± 8.3歳	57~82歳	65.4 ± 4.6歳
2. ミオクロームスの出現時期	2.1 ± 0.9ヶ月	0.5~4ヶ月	1.9 ± 0.5ヶ月	1.0~3ヶ月
3. 周期性同期性放電の出現時期	1.9 ± 1.2ヶ月	0.75~4ヶ月	2.0 ± 1.0ヶ月	1.0~4ヶ月
4. 無動性無言状態の出現時期	2.6 ± 0.9ヶ月	1.0~4ヶ月	3.2 ± 1.3ヶ月	2.0~6ヶ月
5. 無動性無言状態から死亡までの期間	1.3 ± 1.1ヶ月	0~3ヶ月	17.2 ± 5.6ヶ月*	9~27ヶ月
6. 全経過	4.0 ± 1.5ヶ月	2~6ヶ月	20.5 ± 6.2ヶ月*	11~32ヶ月

(*P<0.01)

表3. 追加検討 1 -発症年によって全経過に差があるか?-

	亜急性海綿状脳症	全脳型
1996年		1例
1997年	2例	1例
1998年	2例	1例
1999年		2例
2000年		
2001年	1例	1例
2002年	2例	2例
2003年	2例	
2004年		1例
2005年		1例
2006年	4例	3例
2007年	2例	1例

表4. 追加検討 2 -出所病院によって全経過に差があるか?-

	亜急性海綿状脳症	全脳型
大学病院	2例	2例
公立病院 (国立病院、県立病院、市立病院等)	6例	4例
准公立病院 (日赤病院、更生病院等)	4例	6例
一般病院	3例	2例

Real-time QUIC 法 (QUaking-Induced Conversion) による クロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP^{Sc} の検出

研究分担者: 新 竜一郎	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 佐藤 克也	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 佐野 和憲	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 布施 隆行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 山中 仁木	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 山口 尚宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 石橋 大輔	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 松原 岳大	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 中垣 岳大	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究分担者: 山田 正仁	金沢大学大学院医学系研究科	脳病態医学講座脳老化・神経病態学(神経内科学)	
研究代表者: 水澤 英洋	東京医科歯科大学大学院医歯薬学総合研究科	脳行動病態学	脳神経機能病態学分野
研究協力者: 北本 哲之	東北大学大学院 医学系研究科附属創生応用医学研究センター	プリオン蛋白研究部門	
研究分担者: 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: 片峰 茂	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 西田 教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野

研究要旨

現在我々は、試験管内で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を増幅する方法が開発され、新たなプリオン病の診断法への応用が摸索しており、その過程で大腸菌から精製したりコンビナント PrP (*rPrP-sen*) を試験管内で異常型 (*rPrP-res*) に、高い効率で変換する方法を開発した。この方法は、多量の *rPrP-sen* とごく少量の感染動物由来の PrP^{Sc} を混合し、間欠的に攪拌を繰り返しことにより、*rPrP-sen* から *rPrP-res* への変換反応を試験管内で劇的に促進させることができるというものである (Quaking-Induced Conversion; QUIC 法)。さらに我々は、この QUIC 法をプログラム可能な攪拌機能のついた蛍光プレートリーダーとアミロイドフィブリル生成のモニターに使用されるチオフラビン T (ThT) を組み合わせることにより、ほぼ real-time で *rPrP-res* の増幅過程を測定可能な系を確立した (real-time QUIC 法)。この real-time QUIC 法を用いることにより、CJD 患者由来髄液中の異常型 PrP を増幅し検出することに成功し、CJD の生前確定診断の可能性を大きく高めた。

A. 研究目的

試験管内で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を増幅する方法の一つに PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification)

があり、すでにマウス、ハムスターなどのげっ歯類を用いたプリオン病感染モデル系でごく微量の PrP^{Sc} を増幅・検出することに成功している。しかし、いまだ CJD を始めとす

るヒトのプリオン病での高感度な PrP^{Sc} 検出は達成されていない。また PMCA 法の増幅効率は種やプリオン株に依存し、さらに① Brain homogenate を大量に必要とする、② 超音波処理が煩雑、③ 検出は PMCA 反応後に Western blot 等の方法を行う必要がある、などの短所がある。我々は、上記問題点を克服し、CJD の診断へ応用するため大腸菌から精製した、*rPrP(rPrP-sen)* を試験管内で異常型 (*rPrP-res*) に、高い効率で変換する方法を開発することを目的として今研究を行った。

B. 研究方法

大腸菌からヒト配列の *rPrP-sen* をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、変換反応の基質として用いた。CJD 患者由来の brain homogenate をシードとして QUIC 反応の条件検討を行った。変性剤(グアニジン塩酸、尿素)の濃度、塩濃度、pH, *rPrP-sen* の濃度などを中心として行い、最適条件を決定した。攪拌機能のついた蛍光プレートリーダー(テカン社製)を用いて間欠的に振動を行うことにより反応溶液を攪拌し、10分おきに ThT の蛍光値を測定することにより *rPrP-res* の形成過程を監視した。

(倫理面への配慮)

本研究課題ではプリオン感染試料、特に CJD 感染試料を用いるのですべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等のない様細心の注意を払って行った。患者検体は長崎大学医学部付属病院その他の共同研究グループにより患者・家族のインフォームドコンセントの下、採取され、供給された。

C. 研究結果

real-time QUIC 法を用いて、確定診断された弧発性 CJD、医原性 CJD 由来髄液 18 症例の反応を行ったところ、15 症例で陽性で

あった。一方、陰性コントロールとして用いた CJD 以外の疾患由来の髄液 39 症例はすべて陰性であった。

D. 考察

以上の結果は、real-time QUIC 法は CJD の生前確定診断の可能性を非常に高めるものであると考えられる。また早期に診断ができるようになれば治療の可能性もより高まることが期待できる。今後、症例数を増やし、この Real-time QUIC 法でのプリオン病(CJD) 診断における感度、特異度を決定し、その有用性を証明したいと考えている。

E. 結論

[参考文献]

Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. Nature Methods. 5(3): 211-2, 2008.5

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Smirnovas V, Kim JI, Lu X, Atarashi R, Caughey B, Surewicz WK. Distinct structures of scrapie prion protein (PrP^{Sc})-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange. J Biol Chem. 284(36): 24233-41, 2009
- 2) Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N.

Hyperefficient PrP^{Sc} amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique. FEBS J. 276(10): 2841-8, 2009

3) Atarashi R. Recent advances in cell-free PrP^{Sc} amplification technique. Protein Pept Lett. 16(3): 256-9, 2009, Review.

2. 学会発表

1) 新竜一郎. 「Real-time QUIC (QUaking-Induced Conversion)によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP^{Sc} の検出」. 2009年プリオン研究会, ラフォーレ蔵王・宮城県刈田郡, 2009.8.30

2) 新竜一郎. 「正常型から異常型へのプリオ

ンタンパク構造変換プロセスの解析」. 第82回日本生化学会(シンポジウム:プリオンの感染と進化-プリオンはどこまで分かったか?-), 2009.10.22

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

培養細胞におけるプリオン感染に関する研究

研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：清水 善久 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：河西 和雄 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究要旨

プリオンの複製には宿主の PrP^C が必須であることは知られているが、その機構は明らかではない。N2a 細胞に、スクレイピー感染マウス脳乳剤を暴露し、PrPres の推移を観察した。感染した PrPres は時間とともに減衰したが、感受性細胞では 2~3 日後に de novo に合成された PrPres が検出された。蛍光標識した PrPres を細胞に感染させたところ、細胞表面に結合した蛍光は、24~72 時間後に分散して細胞に内に侵入後、核周囲に再凝集した。これは食作用で取り込まれた PrPres の一部がリソソームへ運ばれたものと考えられた。

A. 研究目的

一部の培養細胞でプリオンが増殖することが知られているが、その感受性を規定するメカニズムについては明らかではない。プリオンの感染細胞内における動態およびその挙動について解析し、プリオン感染の分子機構を解明する。具体的には、スクレイピー感受性および抵抗性細胞の選別とその性状解析により、細胞内におけるプリオン増幅のメカニズムを明らかにする。プリオンが感染できる細胞または、プリオンが感染するに必須な細胞側の条件を明らかにすることは、BSE におけるプリオンの増幅部位(特定危険部位)の定義、範囲に科学的な論拠を加えることにつながる。

B. 研究方法

- (1) 細胞の感受性とプリオン株の関連から、プリオンまたは異常プリオン蛋白質の性状解明を目指す。
- (2) プリオン Chandler 株に対する感受性を指標として分類した細胞を用いて、感染後の PrPres の動態を解析する。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル(BSL)2(スクレイピープリオン)または3(その他のプリオン)実験施設にて行い、汚染物は135℃、30分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

- (1) N2a 細胞の各ラインから Chandler 株に対して感受性、非感受性の N2a 細胞を選択した。
- (2) 両細胞にプリオンを感染させると、感受性細胞では 2~3 日後に、de novo に合成された PrPres が検出される。
- (3) 一方で、感染した PrPres は、感受性細胞、非感受性細胞で同様に減衰が認められた。
- (4) 細胞内での PrPres の減衰の程度にはプリオン株による差が認められた。

- (5) 蛍光標識した PrPres (Chandler 株) を感染させると、細胞表面に付着した蛍光は、分散して細胞内に侵入後、核周囲に再凝集することが示された。
- (6) PrPres の細胞内の動態にはプリオン株による差が認められた。

D. 考察

細胞内で合成された PrPres が検出されるのは、プリオン感染後 2~3 日であった。細胞内に侵入した PrPres は時間と共に減衰していくが、この速度はプリオン株による差が認められた。Chandler 株由来 PrPres は細胞膜表面に付着後、分散して細胞内に取り込まれた後、核周囲に再凝集することが示された。これは食作用で取り込まれた PrPres の少なくとも一部がリソソームへ運ばれると考えられた。PrPres の細胞内の動態にはプリオン株による差が認められた。

E. 結論

PrPres の感染細胞内での動態には、プリオン株による差が認められる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) S. Fukuda, Y. Iwamaru, M. Imamura, K. Masujin, Y. Shimizu, Y. Matsuura, Y. Shu, M. Kurachi, Y. Murayama, S. Onoe, K. Hagiwara, T. Sata, S. Mohri, T. Yokoyama H. Okada: (2009) Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol.* 53: 704-707
- 2) K. Masujin, Yujing Shu, H. Okada, Y. Matsuura, Y. Iwamaru, M. Imamura, S.

Mohri, T. Yokoyama: (2009) Two distinct prion strains were isolated from a scrapie sheep. *Arch. Virol.* 154: 1929-1932

- 3) K. Hasegawa, S. Mohri, T. Yokoyama: Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein. *Prion* (in press).
- 4) H. Gomi, T. Yokoyama, S. Itoharu: Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. *Brain Research* (in press).
- 5) Y. Shimizu, Y. Ushiki-Kaku, Y. Iwamaru, T. Muramoto, T. Kitamoto, T. Yokoyama, S. Mohri, Y. Tagawa: A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol. Immunol.* (in press).
- 6) T. Yokoyama, K. Masujin, Y. Iwamaru, M. Imamura, S. Mohri: Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. *J. Gen. Virol.* 2009. 90: 261-268.
- 7) S.S.A. An, K.T. Lim, H.J. Oh, B.S. Lee, E. Zukic, Y.R. Ju, T. Yokoyama, S.Y. Kim, E. Welker. Differentiating scrapie-infected blood by detecting disease-associated prion proteins by multimer detection system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010 (in press).

2. 学会発表

- 1) 横山隆. 牛海綿状脳症の現状－BSE と非定型 BSE－. 第 20 回日本臨床寄生虫学会, 大阪
- 2) 横山隆ら. 同じ PrP 遺伝子型を持つ羊への伝達で生じたスクレイピープリオンの性状変化. プリオン研究会, 2009.8, 蔵王
- 3) 横山隆. ニホンジカのプリオン病 (CWD) サーベイランスについて. 第 15 回野生生物保護学会, 2009.11, 東京
- 4) 清水善久ら. 抗プリオン蛋白質アプタマー 60-3 と異常プリオン蛋白質の特異的結合. 第 147 回日本獣医学会, 2009.4, 宇都宮
- 5) 舒宇静ら. スクレイピー罹患ヒツジ個体から分離された 2 種類のプリオン株. 第 147 回日本獣医学会, 2009.4, 宇都宮
- 6) 横山 隆. BSE 研究 感染経路・診断法開発. 市民講座, 2009.10, 名古屋
- 7) T.Yokoyama, Y. Shu, K. Masujin, H. Okada, Y. Iwamaru, M. Imamura, Y. Matsuura, S. Mohri. BSE in hamsters:

An animal model lacking PrPSc accumulation in lymphoid tissues. Prion 2009, 2009.9. Greece

- 8) T. Yokoyama, Current status of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Japan. International symposium on "strategies for technology development for ensuring agro-food safety" 2009.7. Seoul, ROK

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト脳型 FABP (B-FABP, FABP7) 特異的モノクローナル抗体作製の試み

研究分担者：松田 治男 広島大学大学院 生物圏科学研究科免疫生物学

研究要旨

昨年度の研究において作製した H-FABP 検出 ELISA 系に用いたキャプチャー抗体としての抗 H-FABP マウスモノクローナル抗体の特異性確認のために各種 FABP アイソタイプを用いたウエスタンブロットを実施し、抗体の有効性を確認した。一方、B-FABP 検出系構築のために B-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製を試み、ニワトリ型の B-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製に成功したが、シグナルの弱いものであった。

A. 研究目的

昨年度の研究において、CJD の有用な髄液マーカーとなることが予想される H-FABP(1,2) の検出系を構築した。その検出系の精度を急性心筋梗塞診断用の市販 H-FABP 検出キットと比較したところ、私たちが構築した検出キットは市販キットよりもはるかに高精度であり、調べた限りにおいて CJD を 100% 診断することが出来た。

一方、FABP はそのアイソタイプが 9 種類見つかっており、それらをコードする遺伝子は *FABP1*~*FABP9* まで区別されている(3)。これらのうち脳に発現が認められるアイソタイプは H-FABP (FABP3)、E-FABP (FABP5)、B-FABP (FABP7) および M-FABP (FABP8) が明らかとなっている。そのため先に構築した H-FABP 検出キットで使用する抗体の中で、特に固相化マウス抗体 3E9 の交差反応性を調べるとともに、主要な脳の FABP (B-FABP) に特異的なモノクローナル抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

1. 抗体作製

大腸菌で作製した組換えヒト B-FABP を高度免疫した BALB/C 純系マウス及び

HB-15 純系ニワトリの脾細胞を出発材料として、抗 B-FABP モノクローナル抗体を作製した。マウス抗体は細胞融合法により、ニワトリ抗体はファージディスプレイ法で作製した。なお、ニワトリ抗体は最終的に真核系細胞で発現させた二価抗体 (IgY 型抗体) を構築した。

2. H-FABP の交差反応性の検証

昨年度に作製した H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体 3E9 の交差反応性を組換え FABP (H-FABP、A-FABP、B-FABP、M-FABP および L-FABP) を用いたウエスタンブロットにより検証した。なお、A-FABP、M-FABP および L-FABP の 3 種の FABP は市販の組換え体を用いた。

(倫理面での配慮)

動物は、広島大学実験動物取扱規定に遵守して取り扱った。

C. 研究結果

1. H-FABP の交差反応性の検証

マウスモノクローナル抗体 3E9 は、昨年度の研究において、H-FABP に反応し B-FABP には交差反応しないことが確かめられている

抗体である。今回は、B-FABP を含め計 5 種の組換え FABP (H-FABP、A-FABP、B-FABP、M-FABP および L-FABP) を用いて交差反応性をウエスタンブロットで調べた。その結果、マウス抗体 3E9 は H-FABP を除く 4 種の FABP とは全く反応せず、H-FABP 特異的であった (図 1)。

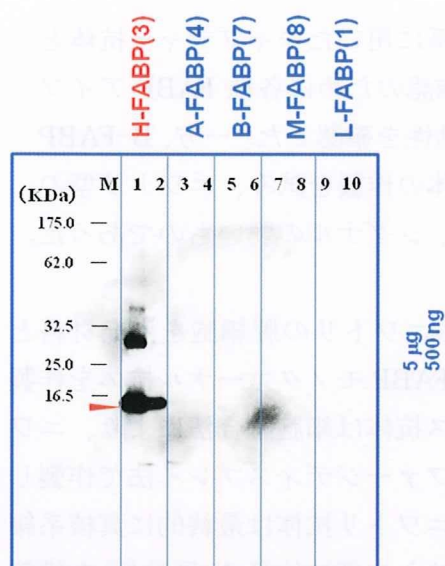


図 1. マウスモノクローナル抗体 3E9 のウエスタンブロットによる交差反応性
赤矢印は H-FABP の位置を示す。

2. B-FABP 特異的にモノクローナル抗体の作製

組換え B-FABP を高度免疫したマウスおよびニワトリ脾細胞を用いて細胞融合やファージディスプレイ法によって特異抗体の作製を試みた。何度かの実験を行い、最終的にマウス抗体 3 種およびニワトリ抗体 7 種を得た。これらの抗体について、B-FABP と H-FABP を用いた ELISA により特異性を調べたところニワトリ抗体 1 種が B-FABP 特異的であった (図 2)。

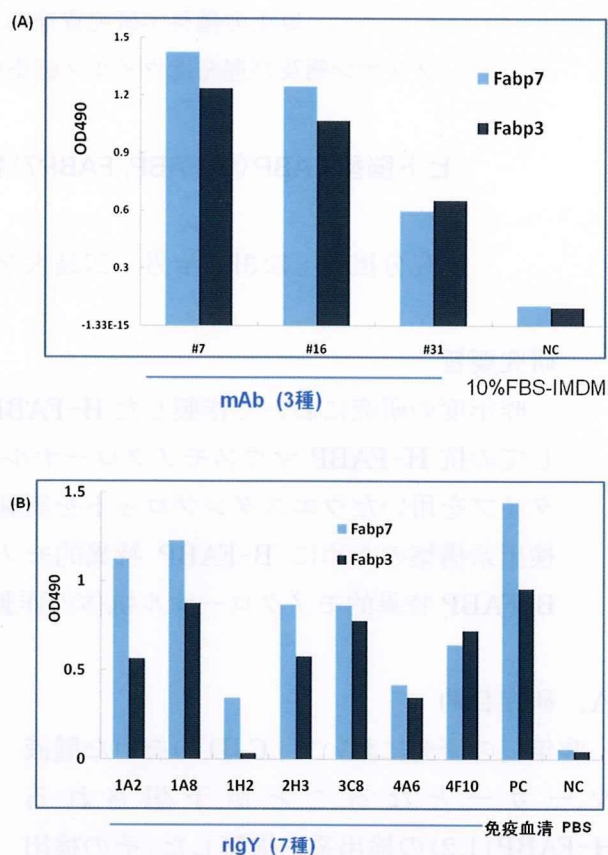


図 2. B-FABP 特異抗体の作製結果 (ELISA)
(A) マウスモノクローナル抗体
(B) ニワトリモノクローナル抗体

D. 考察

これまでの成果を考えると、髄液検査による CJD の診断価値は有るものと判断できる。特に髄液中のタウタンパク質や 14-3-3 タンパク質の検出は sCJD を高い精度で診断できるとされているが、H-FABP についてもその有用性が高いことは昨年度の研究で明らかにした。

一方、脳にかかわる FABP には、H-FABP のみならず B-FABP、E-FABP そして M-FABP の 4 種があり、将来的に CJD との関連を精査していく必要があると思われる。本年度の研究では、完成させた H-FABP 検出系の固相化抗体として用いた抗 H-FABP マウス抗体 (3E9) の交差反応性を複数の FABP を用いて調べ、調べた限りにおいて H-FABP 特異的であると判断した。今回用い

た FABP の中には脳に存在が確認されている E-FABP が含まれていないことから、最終的な判断はこの E-FABP と反応しないことを確認しなければならない。

一方、本研究では B-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製を試み、マウス型として 3 種、ニワトリ型として 7 種の抗体を樹立したが、B-FABP 特異的抗体はニワトリ抗体の 1 種のみであった。この原因は、ヒト B-FABP とマウスやニワトリの FABP が極めて酷似したアミノ酸配列をもつためである。B-FABP 特異的抗体としては市販のポリクローナル抗体が 1 種存在する。従って、なお根気よく実施に努めれば特異的モノクローナル抗体の作製は不可能ではないと考えられる。

E. 結論

作製に成功している H-FABP 検出に使用する固相化マウス抗体 3E9 が交差反応性のない極めて優れた抗体であることを確認した。B-FABP 特異抗体の作製は 1 種のみ成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

文献

- 1) Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard P R, Hochstrasser D F, Sanchez J-C. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*. 3: 1495-1499, 2003
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewezuk P, Poser S, Kretzschmar H A, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 370: 36-39, 2004
- 3) Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*. 47: 39-48, 2006

正常型プリオン蛋白質の細胞内輸送機構の解明と生理的分解酵素の同定に関する研究

研究分担者：金子 清俊 東京医科大学・神経生理学講座

研究協力者：八谷 如美 東京医科大学・神経生理学講座

研究要旨

正常型プリオンタンパク質(PrP^C)が正規の細胞内輸送経路を外れることで、ミトコンドリア依存性の神経細胞死を起こす現象を見出し、そこにかかわる因子群を同定した。これらは細胞内のプロテアソーム活性が低下することで ERAD システムが働き、分泌蛋白質の輸送系を外れた PrP^Cがいったん細胞質に漏出、一部リン酸化を受けたのち 14-3-3 蛋白質によってミトコンドリアへ移行、結果的に細胞死に至る、というものである。加えて、PrP^Cの細胞内切断には、カルシウム依存性のプロテアーゼであるカルパインが生理的切断酵素として直接関与し、しかもこの過程はゴルジ以降の分泌過程で起こっていることをあわせて明らかにした。

A. 研究目的

タンパク質が本来の機能を発揮するためには、正しい立体構造をとり、かつ、正しい場所に輸送される必要がある。分泌タンパク質は分泌系の輸送システムへ、ミトコンドリアタンパク質はミトコンドリアの輸送システムへと振り分けられ運ばれていく{1-3}。正常型プリオンタンパク質(PrP^C)は典型的な分泌タンパク質で、ミトコンドリアへの輸送系と接点はないと考えられてきたが、プリオン病やトランスジェニックマウスに見られる PrP^Cの過剰発現症候群での神経細胞死、さらにはプリオン感染にも、ミトコンドリアが関与することを推測させる報告が認められてきている{4,5}ことから、この過程にかかわる様々な因子を同定し、その機序を解明することを目的とした研究を行った。加えて、正常型プリオン蛋白質の生理的な分子内切断にかかわるプロテアーゼについても、生細胞および新規に作出した蛍光蛋白質融合 PrP^Cの安定発現培養細胞株を用いたアッセイ系を構築し検討した。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞に PrP^Cを過剰発現させたのち、プロテアソーム阻害剤(ラクタシスチン)を添加、ERAD を誘発させ、神経細胞死を解析する系を構築した。この系に、溶連菌毒素のストレプトリジン O(SLO)を作用させ細胞膜に微小な穴をあけセミインタクトセルを作成、小麦胚芽抽出液合成の PrP^Cとマウス脳由来サイトソルを添加して PrP^Cのミトコンドリア移行をライブイメージングで観察した。このセミインタクトセルを用いて、我々が独自に作成した、蛍光タンパク質を単離可能なレーザーマイクロダイセクションシステムにより、PrP^Cが標的化したミトコンドリアのみを単離回収し、構成成分を同定した。さらに、PrP^Cの両端に DsRed および GFP の 2 つの蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを作成し N2a 細胞に発現させることにより、この分子の切断による蛍光変化を追うことで、ライブイメージングの手法を用いて PrP^Cの細胞内での生理的な切断にかかわるプロテアーゼの同定を

行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者や動物を対象としていないため、特段の配慮は必要がないものである。

C. 研究結果

PrP^Cの細胞質からミトコンドリアへの移行にかかわる細胞質因子として 14-3-3 蛋白質のなかでも二つの特異的アイソフォームを同定した。これらは、PrP^Cの 122-139 番目の領域に結合し、ミトコンドリアへの移行を積極的に行うことが明らかになった。さらに、PrP^Cのミトコンドリアへの移行には、PrP^Cの 43 番目のセリンのリン酸化により促進がかかることが認められた。この過程において、一部の PrP^Cはミトコンドリアへの標的化ののち、内膜にまで輸入され、呼吸鎖複合体 IV を直接阻害することで細胞の呼吸活性を失わせ、細胞死へと大きく導くことを明らかにした。なお、PrP^Cのミトコンドリアへの輸入にはミトコンドリア蛋白質の輸入に関わるインポートチャンネルである Tom40 は関与しておらず、新たな受容体の存在が示唆された。また、PrP^Cのミトコンドリア内膜への標的化には PrP^Cのオクタペプチドリピート領域が必須であることも判明した。

さらに、PrP^Cの細胞内切断にはカルシウム依存性のプロテアーゼであるカルパインが直接関与し、この過程はゴルジ以降の分泌過程で起こっていることが明らかになった。

D. 考察

プリオン病 PrP^Cとミトコンドリアとの関連についての新しい知見を提示するのみならず、「オルガネラごとに正確に振り分けられる細胞内輸送系」という従来の概念に対し、新しい視点を提示するものであると考えられる。

E. 結論

ミトコンドリアが関与する PrP^C依存性の神経細胞死を再構成し、この過程にかかわる様々な因子を同定し、さらにタンパク質分解酵素を生細胞でスクリーニングする新しい系を構築した。

[参考文献]

- 1) Hachiya N, Alam R, Sakasegawa Y, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J.* 12(4): 1579-86, 1993
- 2) Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *Embo J.* 13(21): 5146-54, 1994
- 3) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature.* 376(6542): 705-9, 1995
- 4) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci Lett.* 374(2): 98-103, 2005
- 5) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro.

Biochem Biophys Res Commun. 327(3):
894-9, 2005

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 八谷如美. プリオン蛋白質とアルツハイマー病の接点~相互作用と毒性~. 岩波書店 科学 79: 716~718, 2009
- 2) 金子清俊. Stanley B. Prusiner Clinical neuroscience 別冊 79: 830, 2009

2. 学会発表

- 1) 金子清俊. 血液製剤におけるプリオン感染. CSL ベーリング学術講演会. 横浜, 3.10, 2009
- 2) 金子清俊. プリオン病研究の最近の進歩. 東京医科大学大学院特別講義. 東京, 6.1, 2009
- 3) 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の輸送異常と細胞死. 蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御. 大阪, 7.13-14, 2009
- 4) 金子清俊. プリオン病について. 第5回小山脳卒中と神経疾患セミナー. 栃木, 7.14, 2009

5) Harguem S, 小俣結子, 今川美登里, 八谷如美, 金子清俊. PrPC の分子内プロセッシングにはカルパイン様のプロテアーゼが関与している. 2009年プリオン研究会. 蔵王, 8.29-30,

6) 西島佳奈, 八谷如美, 金子清俊. 細胞質/ミトコンドリア PrPC 依存性の神経細胞死機構. 2009年プリオン研究会. 蔵王, 8.29-30, 2009.

7) 西島佳奈, 今川文, 八谷如美, 金子清俊. 蛋白質解きほぐし活性を持つ Aip2p 多量体・Unfoldin の多量体形成機構について. 第82回日本生化学会合同大会. 神戸

8) 八谷如美・西島佳奈・金子清俊. 細胞質/ミトコンドリア型 PrPC による神経細胞死のメカニズムの解明. 第82回日本生化学会合同大会シンポジウム招待講演. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

生細胞、生細胞内の構造物等の単離及び採取方法特願 2008-159272

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし