

14083-14087, 2010

- 4) 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) : 24233-24241, 2009
- 5) 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) : 2841-2848, 2009
- 6) Atarashi R. Recent advances in cell-free PrP^{Sc} amplification technique. *Protein Pept Lett.* 16(3) : 256-259, 2009 Review
- 7) 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) : 211-212, 2008

2. 学会発表

- 1) 新竜一郎. 第 15 回日本神経感染症学会 (招待講演: シンポジウム I 「プリオン病の疫学から治療まで」), 福島, 2010.10.8

- 2) 新竜一郎. Prion2010 Diagnosis, therapy and decontamination : Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion, オーストリア, ザルツブルグ, 2010.9.9
- 3) 新竜一郎. Asia-Oceania Symposium on Prion diseases 2010 Hot topics : Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion, 札幌, 2010.7.25
- 4) 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
- 5) 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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 日本の症例(CJD18例、非CJD症例35例)でのRT-QUIC法と
髄液マーカー14-3-3タンパクとの感度・特異度の比較

CSF samples in Japan [Pilot study]		
	RT-QUIC	14-3-3 (γ -isoform)
Sensitivity	83.3% (15/18)	72.2% (13/18)
Specificity	100% (0/35)	85.7% (5/35)

表2 Blind条件により行ったオーストラリアの症例(30例)でのRT-QUIC法と
髄液マーカー14-3-3タンパクとの感度・特異度の比較

CSF samples from Australia [Blind study]		
	RT-QUIC	14-3-3 (all isoforms)
Sensitivity	87.5% (14/16)	87.5% (14/16)
Specificity	100% (0/14)	71.4% (4/14)

異常型プリオン蛋白の細胞内輸送機構に関する研究

分担研究者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究協力者：山崎 剛士 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究要旨

PrP 分子のアミロイド原性の高い領域(aa112-119)の近傍を認識する抗 PrP モノクローナル抗体(monoclonal antibody, mAb) 132 を用いて間接蛍光抗体法を行うと、プリオン持続感染細胞に存在する異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を再現性良く検出できることから、mAb132 を用いてプリオン持続感染細胞に存在する PrP^{Sc} の細胞内局在を詳細に解析した。PrP^{Sc} は初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、後期エンドソーム/多胞体、リソソーム、およびトランスゴルジネットワーク周囲に存在していた。これらは細胞の膜輸送に関係する細胞内小器官であり、細胞を 18°C で培養し、エンドソームからトランスゴルジネットワークへの膜輸送を遅延させる実験から、PrP^{Sc} は細胞の膜輸送機構に付随して細胞膜、初期/リサイクリングエンドソーム、トランスゴルジネットワーク周囲をダイナミックに移動していることを明らかにした。PrP^{Sc} のエンドソームからトランスゴルジネットワーク周囲の輸送系路の一つとして、Clint1 依存性のクラスリン被覆小胞を介する輸送機構が関与することを発見した。また、PrP^{Sc} の産生を阻害することが知られているクロルプロマジン処理により、PrP^{Sc} は後期エンドソームおよびリソソームに輸送されて分解されることを見出した。これらの結果は、プリオンの細胞内増殖機構の解明、および増殖機構を標的としたプリオン病治療薬の開発に重要な知見となる。

A. 研究目的

プリオンの増殖機構の解明は、プリオン増殖を標的としたプリオン病の予防・治療法を確立するために重要である。プリオンの主要構成要素である PrP^{Sc} の細胞内局在を明らかにすることは、プリオンの増殖機構を解明する一助となる。

PrP 分子のアミロイド原性の高い領域の近傍を認識する抗 PrP モノクローナル抗体(monoclonal antibody, mAb) 132 を用いることで、PrP^{Sc} を再現性良く検出できる。そこで本研究では、mAb 132 を用いてプリオン持続感染細胞における PrP^{Sc} の細胞内局在を詳細に解析することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 蛍光抗体法：プリオン 22L 株および Chandler 株が持続感染したマウス神経芽腫細胞サブクローン(ScN2a3-22L および ScN2a3-Ch)を用いた。細胞を 4% sucrose を含む 4% paraformaldehyde-PBS を用いて 37°C で 10 分間固定した。0.1 M glycine-PBS を用いて残存する paraformaldehyde を中和した後、0.1% saponin-PBS を用いて細胞膜の透過処理を行った後、免疫染色を実施した。PrP^{Sc} の特異的検出のために、固定後の細胞を 5M GdnSCN で 10 分間処理した。抗 PrP 抗体として mAb 132 を用いた¹⁾。

2) siRNA による Clint1 遺伝子の発現抑制：
細胞に Clint1 に対する siRNA を
Lipofectoamine 2000 を用いて導入した。
60 時間後、mRNA 発現解析および WB 解
析のためにサンプリングした。

(倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験計画は、
北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて
承認されている。

C. 研究結果

各種オルガネラマーカー分子との蛍光二重
染色により、PrP^{Sc} は初期エンドソーム (EE)、
リサイクリングエンドソーム (RE)、後期エン
ドソーム/多胞体 (LE/MVB)、リソソーム (LS)、
およびトランスゴルジネットワーク (TGN) 周
囲に存在することを確認した (結果は示さず)。
細胞を 20°C で培養して EE から TGN への膜
輸送を遅延させると、TGN 周囲に存在してい
た PrP^{Sc} は数時間で細胞膜近傍を含め、細胞
内に分散した。培養温度を 37°C に戻すと、30
分後には PrP^{Sc} は再び TGN 周囲で検出される
ようになったことから (結果は示さず)、PrP^{Sc}
は細胞の膜輸送機構に付随して細胞膜、初期/
リサイクリングエンドソーム、トランスゴル
ジネットワーク周囲をダイナミックに移動し
ていることが明らかとなった。

Clint1 はエンドソームから TGN への輸送
に関わるクラスリン被覆小胞のアダプター分
子である。蛍光抗体法で、Clint1 と核周囲の
PrP^{Sc} が一部共局在したことから (結果は示
さず)、Clint1 が PrP^{Sc} の細胞内輸送に関与
するかについて検討した。Clint1 に対する
siRNA を ScN2a3-22L に導入した場合、
Clint1 の発現が低下した細胞では、PrP^{Sc} が
顆粒状に細胞内に広く分散する像が認められ
た (図 1)。Clint1 の siRNA の導入により、エン
ドソームから TGN への輸送が障害される
ことは、Clint1 の発現抑制により細胞に添加

した志賀毒素 β サブユニットが、TGN へ輸送
されずに細胞内に顆粒状に散在したことから
確認できた (結果は示さず)。また、プリオン
感染細胞のマイクロソーム画分を抗 CHC 抗体
で免疫沈降した場合、PrP^{Sc} および Clint1 が
共沈降した (結果は示さず)。従って、PrP^{Sc}
の細胞内輸送に Clint1 をアダプター分子と
して持つクラスリン被覆小胞が関与すること
が示唆された。

クロルプロマジン はプリオン持続感染細胞
における PrP^{Sc} の産生を阻害するが、その機
構は不明である。クロルプロマジン処理した
細胞での PrP^{Sc} の細胞内局在を経時的に調べ
たところ、処理後 2 時間ころから PrP^{Sc} の局
在が変化し、1 日後には PrP^{Sc} の顆粒状染色像
が減少するとともに、特徴的な所見として
Lamp1 陽性の小胞と PrP^{Sc} の共局在が顕著に
なった (図 2)。従って、クロルプロマジンは、
PrP^{Sc} の細胞内輸送系路を変えることで、細胞
内の PrP^{Sc} 分解を促進させると考えられた。

D. 考 察

プリオン感染細胞で、PrP^{Sc} は細胞内膜輸
送に関連する細胞内小器官に存在しており、
細胞内膜輸送機構に付随して細胞内をダイナ
ミックに移動していた。また、Clint1 をアダ
プター分子として持つクラスリン被覆小胞が
関与することがエンドソームから TGN 周囲
への PrP^{Sc} の輸送に関与することから、PrP^{Sc}
細胞内膜輸送機構に付随してリサイクルされ
ることが PrP^{Sc} の産生に必要であると考えら
れる。

感染細胞をクロルプロマジンで処理した場
合、早期から PrP^{Sc} の局在が変化して、
LE/MVB に移行して消失することを示唆す
る結果が得られた。クロルプロマジン処理開
始してから 1 日後に、細胞内小胞の酸性化を
阻害する Bafilomycin A1 を作用させたところ、
LE/MVB に存在する PrP^{Sc} が消失しない
傾向が認められたことから (結果は示さず)、

LE/MVBおよびリソソームはPrP^{Sc}産生や蓄積の場ではなく、分解の場であることが示唆される。

E. 結 論

本研究では、mAb132と細胞内小器官マーカー分子に対する抗体の蛍光二重染色により、PrP^{Sc}は細胞内膜輸送に関連するオルガネラに存在すること、細胞内膜輸送機構に付随して細胞内をダイナミックに移動することを明らかにした。また、クロロプロマジン[®]はPrP^{Sc}を後期エンドソーム/多胞体に移行させて、PrP^{Sc}分解を促進することを明らかにした。このように、MAb132を用いる細胞内局在の解析は、プリオンの増殖機構や、プリオン増殖阻害剤の作用機序の解析に有用であることから、プリオン増殖機構を標的としたプリオン病治療薬の開発に重要な知見を提供すると思われる。

[参考文献]

1) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* 91 : 563-569, 2010

F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Song C-H, Furuoka H, Kim C-L, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Intraventricular infusion of anti-PrP mAb antagonized PrP^{Sc} accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice. *J. Gen. Virol* 89 : 1533-1544, 2008

2) Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Tran

Thi Hanh TT, and Tamura Y. Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE. *Zoonoses Public Health* 55 : 267-273, 2008

3) Takada N, Horiuchi M, Sata T, and Sawada Y. Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting. *J. Vet. Med. Sci* 70 : 1225-1230, 2008

4) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J Virol* 83 : 3852-3860, 2009

5) Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions *J Virol* 83 : 5918-5927, 2009

6) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology* 394 : 200-207, 2009

7) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* 91 : 563-569, 2010

8) Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I,

and Kinjo M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol* 11 : 87-95, 2010

- 9) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N. ImmunoAT method : an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods* 165 : 261-267, 2010
 - 10) Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, Inanami O. A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 394 : 522-528, 2010
 - 11) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N. The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol. Immunol* 54 : 763-768, 2010
2. 学会発表
- 1) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Migration of mesenchymal stem cells to brain lesions of prion disease. *Prion2008*, Madrid, Spain, 2008.9.26-28
 - 2) Furuoka H, Horiuchi M, Sata T. Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. *Prion2008*, Madrid, Spain, 2008.9.26-28
 - 3) Shindo R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. *Prion2008*, Madrid, Spain, 2008.9.26-28
 - 4) Yamasaki T, Uryu M, Nakamitsu S, Horiuchi M. Localization of disease-specific prion protein in prion-infected cells. *Asian-African Research forum on Emerging and Reemerging Infection*, Sapporo, Japan, 2008.12.15-16
 - 5) Horiuchi M, Yamazaki T. Intracellular Localization of Disease-Specific Prion Protein. *Symposium on emerging and reemerging infectious diseases*, Tokyo, Japan, 2009.2.17
 - 6) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. *Prion2009*, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 7) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *Prion2009*, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 8) Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. *Prion2009*, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 9) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N. PrPSc degradation pathway in macrophages. *Prion2009*, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 10) Horiuchi M. Intracellular localization of

- abnormal isoform of prion protein. “Prion and Virus Infections” BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, 2009.10.30
- 11) 堀内基広. 異常型プリオン蛋白の細胞内局在. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 2009「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, 2009.7.13-14
- 12) 堀内基広. 遺伝子を持たないプリオンは変異し得るか? 第12回日本進化学会, 札幌, 2009.9.2-4
- 13) Sakai K, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of pathobiology of prion infection in Cd14 gene deficient mice. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, Japan, 2010.7.24-25
- 14) Yamasaki T, Suzuki A, Horiuchi M. Clint-1 mediated clathrin-dependent retrograde transport is involved in PrP^{Sc} trafficking in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2010 Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 15) Hasebe R, Horiuchi M, Caughey B. Reaction of complement factors differs with prion strains in vitro and in vivo. Prion2010 Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 16) Sakaguchi S, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T, Furuoka H. Temporal kinetics of prion protein accumulation and its effect on neurotransmitters in the cerebellum of guinea pigs infected with BSE prion Prion2010 Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 17) Horiuchi M. Application of anti-PrP antibody recognizing the most amyloidogenic region for the detection of PrP^{Sc} in immunocyto- and immunohistochemistry. Prion Japan & Canada, Tokyo, Japan, 2010.11.11-12

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

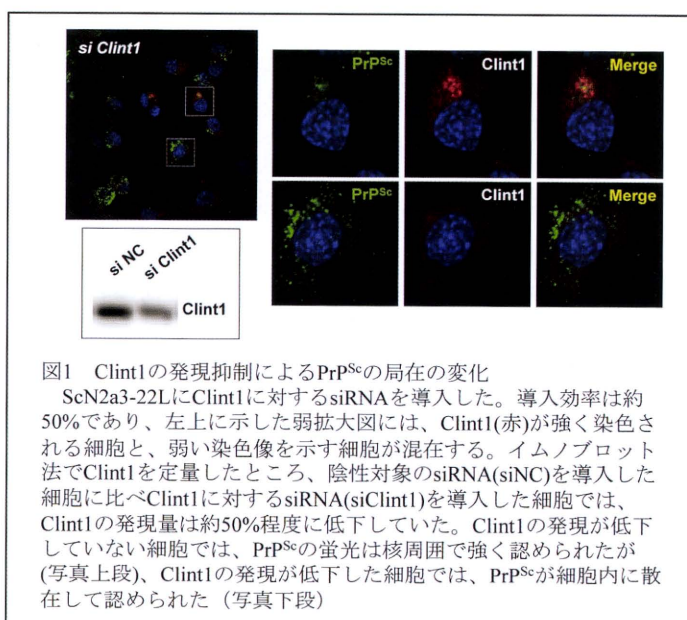
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



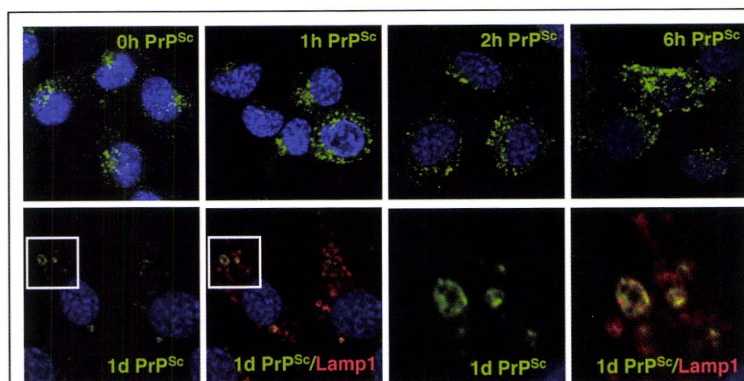


図2 クロルプロマジン処理によるPrPSc細胞内局在の変化

処理後0時間から1日までの変化を示した。1日後は、PrP^{Sc}とLamp1の二重染色像も示した(下段)。下段左2枚の拡大像を右側に示した。

PrP^{Sc}の局在の変化は処理後2時間目から認められ、1日後にはPrP^{Sc}の蛍光は著しく減少した。残存しているPrP^{Sc}はLamp1陽性の小胞と共局在した。

プリオン病の治療予防開発に関する基礎研究

研究分担者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：照屋 健太 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：濱中 大一 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：木村 朋寛 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：西澤 桂子 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：河田 真樹 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

プリオン病の治療予防薬開発に役立つ基礎研究を行った。抗プリオン活性を持つ各種化合物について、それらの作用メカニズムを細胞・組換え型プリオン蛋白・疾患モデル動物で解析した。硫酸多糖体ではその荷電と高分子鎖が重要であること、アミロイド親和性化合物ではA β 形成阻害活性も併せ持つ化合物には一定の共通構造が見られること、臨床薬クレスチンでは高分子タンパク質性成分が抗プリオン活性を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、抗プリオン活性をもつ化合物群の作用メカニズム解明を行った。

オン活性を解析し、その活性には、10糖程度の鎖長と、ヘパリナーゼIに認識・切断を受ける二糖構造が必須であることを明らかにした(図1)。この二糖構造はプリオン蛋白のN末側部分と相互作用した。

B. 研究方法

抗プリオン活性を持つ各種化合物の作用を、プリオン感染細胞、組換え型プリオン蛋白やA β 蛋白を用いて生化学的に解析した。さらに、プリオンを感染させた疾患モデルマウスにおいて、作用メカニズムに関わる生化学的、免疫学的な解析を行った。

各種のアミロイド親和性化合物について、プリオン感染細胞で抗プリオン活性についての構造活性相関研究を行い、抗プリオン活性に特異的構造を抽出できなかったが、A β アミロイド形成阻害能を併せ持つ高活性の化合物にはフェニルオキサゾール環やピリジンメタンイミンのいずれかの構造が共通して認められた。また、アミロイド親和性化合物には異常型プリオン蛋白の複合体形成を促進するものがあることを発見した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験審査委員会の審査を受けた上で、動物愛護に配慮して実施した。

一方、既製薬の中で抗プリオン活性を持つものを感染細胞で探索し、クレスチンを発見した。抗プリオン活性は高分子タンパク質性成分にあり、免疫賦活や抗腫瘍に関わる活性

C. 研究結果

硫酸多糖体の代表としてヘパリンの抗プリ

成分とは異なっていた(図 2)。疾患モデルマウスでは有意ではあるものの効果は高くなく、投与マウスで薬効を中和する抗体の産生が確認された。

D. 考 察

化学構造や物性が全く異なる 3 系統の抗プリオン活性化化合物の作用メカニズム解明から、プリオン病の治療予防開発に役立つ新たな発見があった。特に、異常型プリオン蛋白複合体形成促進のメカニズムや抗プリオン活性を持つタンパク性因子の解析研究は、今後のプリオンの構造解明や治療予防開発に展開を与える可能性がある。

E. 結 論

抗プリオン活性をもつ 3 系統の化合物群の作用メカニズム解析から、プリオン病の治療予防開発に役立つ発見があった。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, in press
- 2) Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K. Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells. *Protein J* 29(7) : 493-500, 2010.10
- 3) Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y,

Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K. GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 584(6) : 1193-1198, 2010.3.19

- 4) Doh-ura K. [Innovation of therapeutics and prophylaxis for prion diseases]. *Rinsho Shinkeigaku* 49(11) : 946-948, 2009.11, Japanese
- 5) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(5) : 934-941, 2010.5
- 6) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand* 121(2) : 127-130, 2010.2
- 7) Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate : clinical trial against prion diseases. *Neuropathology* 29(5) : 632-636, 2009.10
- 8) Nomura S, Miyasho T, Maeda N, Doh-ura K, Yokota H. Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Proteomics* 9(16) : 4029-4035, 2009.8
- 9) Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Amyloidophilic compounds for prion

- diseases. *Infect Disord Drug Targets* 9(1) : 15-22, 2009.2
- 10) Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML. Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine. *Bioorg Med Chem* 15 ; 16(14) : 6737-6746, 2008.7
2. 学会発表
- 国際学会
- 1) Sakasegawa Y, Nakabayashi S, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. CC chemokines are upregulated in prion-infected neuroblastoma cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases*, Sapporo, 2010.7.24-25
- 2) Kimura T, Nishizawa K, Doh-ura K. Search for endogenous factors involved in the abnormal PrP formation in prion-infected cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases*, Sapporo, 2010.7.24-25
- 3) Teruya K, Doh-ura K. A thioflavin derivative facilitates cross-linking of abnormal PrP but not normal PrP. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases*, Sapporo, 2010.7.24-25
- 4) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Oguma A, Nishizawa K, Doh-ura K. Anti-prion activities of PSK in vitro and in vivo -further evaluation of its function-. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases*, Sapporo, 2010.7.24-25
- 5) Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. *Prion* 2009, Thessaloniki, 2009.9.23-25
- 6) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K : Heat shock protein 90 (Hsp90) stimulates polymerization of a copper-loaded prion protein. *Prion2008*, Madrid, 2008.10.8-10
- 7) Teruya K, Wakao T, Nishimura T, Kimura Y, Sakasegawa Y, Suda Y, Doh-ura K. Binding of mouse prion protein to heparin. *Meeting of 17th Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008)*, Sapporo, 2008, 8.26-29
- 国内学会
- 1) 堂浦克美:ヤコブ病の克服研究. 第4回プリオン病の市民講座 食と医療の安全, 東京, 2010.11.23
- 2) 逆瀬川裕二, 堂浦克美. 熱ショック蛋白質 Hsp90 のリコンビナントプリオン蛋白質に対する部分変性活性は低濃度 Cu(II)イオンによって可逆的に制御される. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010.12.7-10
- 3) 堂浦克美. プリオン病治療薬開発の現状. 第28回日本認知症学会学術集会, 仙台, 2009.11.21
- 4) 堂浦克美. ヤコブ病研究 治療・発症機序. 第3回食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座, 名古屋, 2009.10.31
- 5) Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. 2009年プリオン研究会, 宮城, 2009.8.29-30
- 6) 逆瀬川裕二, 西澤桂子, 高橋智子, 小熊歩, 木村朋寛, 堂浦克美. プリオン持続感染に関与する宿主内因子の探索. 2009年プリオン研究会, 宮城, 2009.8.29-30
- 7) 堂浦克美. プリオン病への治療予防開発. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 2009.5.22
- 8) 堂浦克美. ヤコブ病克服プロジェクトの成果と課題-治療・発症機序研究. 食と医

療の安全に関する市民講座「プリオンから見た食と医療の安全：プリオンはもう怖くないの？ ウシ海綿状脳症(BSE)とヤコブ病(CJD)」, 札幌, 2008.9.14

- 9) 木村朋寛, 西村有起, 堂浦克美. プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白産生に關与する内因性因子. 2008年プリオン研究会, 新得, 北海道, 2008.8.29-30
- 10) 逆瀬川裕二, 堂浦克美. 持続性プリオン感染細胞における PrPres の産生を抑制する新規ヒートショック蛋白質 90 阻害剤. 2008年プリオン研究会, 新得, 北海道, 2008.8.29-30
- 11) 濱中大一, 川越敬一, 陳 忠正, 照屋健太, 堂浦克美. 抗プリオン活性を有するアミロイド親和性化合物の構造的特徴. 2008年プリオン研究会, 新得, 北海道, 2008.8.29-30
- 12) 坪井義夫, 田中美紀, 岡村信行, 志賀裕正, 堂浦克美, 本田裕之, 佐々木健介, 山田達夫. BF-227 を用いたプリオンアミロイド

イメージング-Gerstmann-Straussler-Scheinker 病における画像と病理の対比. 2008年プリオン研究会, 新得, 北海道, 2008.8.29-30

- 13) 戸邊美智子, 宮庄 拓, 野村幸子, 伊藤暁史, 松田一哉, 川崎ゆり, 堂浦克美, 毛利資郎, 横田 博. スクレイピーマウス血清中における疾患特異的蛋白質の検出. 2008年プリオン研究会, 新得, 北海道, 2008.8.29-30
- 14) 坪井義夫, 山田達夫, 堂浦克美. プリオン病ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法. 第49回日本神経病理学会総会シンポジウムII, 東京, 2008.5.20-22

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得・実用新案登録

なし

2. その他

なし

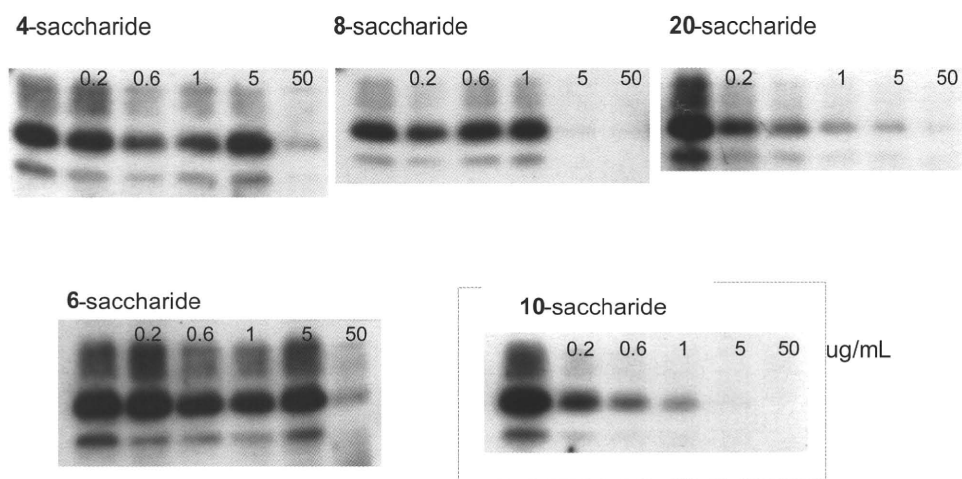


図1

ScN2a 細胞におけるへパリンの抗プリオン活性。NaIO₄/alkali 処理(へパリナーゼ I で切断される二糖構造は保たれる)より得られた低分子化へパリンの抗プリオン活性。抗プリオン活性は糖鎖長に依存する。

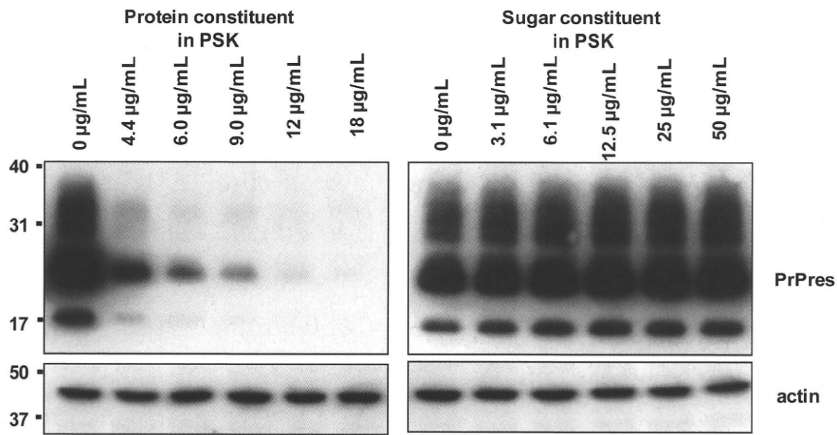
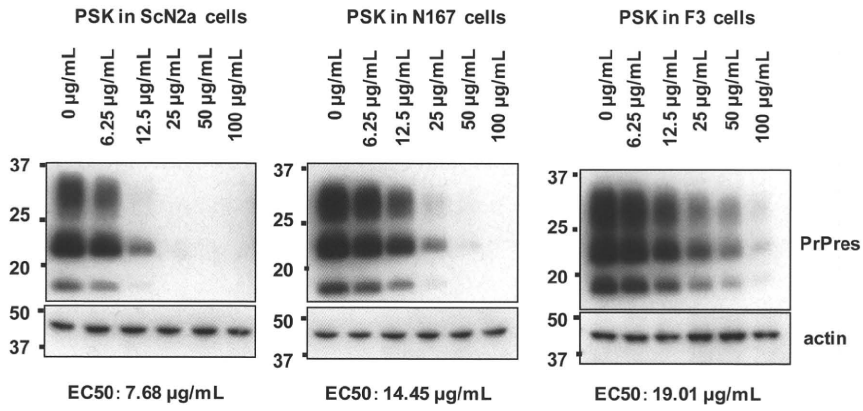


図 2

各種プリオン株持続感染細胞におけるクレスチン(PSK)の抗プリオン活性(上段)と、クレスチンの構成成分(タンパク質と糖鎖)の抗プリオン活性(下段)。PSKの抗プリオン活性はタンパク質成分に存在する。

CJD 早期診断における拡散強調画像の機種間差異の検討

分担協力者：佐々木真理 岩手医科大学先端医療研究センター

研究要旨

拡散強調画像の画質やコントラストは装置に依存した種々の要因の影響を受ける。そこで、同一対象を種々の装置で撮像し、装置・企業・磁場強度による差異について検討した。一部の企業の特徴は他と異なっており、CJD 早期病変と類似したアーティファクトを生じていた。磁場強度が強いほど灰白質のコントラストは明瞭化し、特に島皮質などで顕著であった。これらの装置間差異は、CJD 早期診断の pitfall となりうると考えられた。また、定量値である apparent diffusion coefficient (ADC) 値も機種・企業・磁場強度などで異なっており、慎重な利用が望ましいと考えられた。

A. 研究目的

拡散強調画像(diffusion-weighted image, DWI)はCJDの早期診断に有効と考えられているが、表示条件が装置・施設・担当者毎に異なり、病変の診断精度の低下につながっていた。そこで我々は ASIST-Japan による DWI 表示条件標準化手法を CJD に応用し、診断精度が向上することを明らかにしてきた。

しかしながら、DWI の画質やコントラストは磁場強度・ハードウェア・ソフトウェアにも大きく依存し、CJD 早期診断における pitfall となる危険性がある。そこで、種々の企業・磁場強度における DWI のコントラスト特性や apparent diffusion coefficient (ADC) 値を定性的・定量的に相互比較して機種間差異を明らかにすることで、CJD 早期診断における DWI の精度向上を試みた。

B. 研究方法

12 人の健常ボランティア(27-44 歳、男性 7 名・女性 5 名)を対象に、5 社 12 機種の MRI(1.5T, 4 社 x2 ; 3.0T, 1 社 x2 ; 0.4T, 1 社 x2)を用い、AC-PC 線に平行な水平断 DWI(single-shot EPI, 6mm 厚, 128×80-128,

b=1000 s/mm²)を撮像した。

装置固有の仕様として、傾斜磁場極性やコイルシステムなどについて調査した。また、種々の灰白質の前頭葉白質に対するコントラスト比、および視床・前頭葉白質の ADC 値を計測した。得られた値を機種間、企業間、磁場強度間、コイルシステム間で比較検討した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会の承認を得、書面によるインフォームドコンセントを取得した。画像データの匿名化を行った後に解析した。

C. 研究結果

傾斜磁場の逆極性や多チャンネルコイルの感度補正不良が一部の機種で認められ、CJD 早期病変と類似のアーティファクトの原因となっていた。

灰白質の白質に対するコントラストは、1.5T では内側側頭葉(1.42)や島皮質(1.45)で他の皮質(1.25)や視床(1.18)に比し有意に高かったが、企業間では有意差を認めなかった。磁場強度では、高磁場なほど皮髄コントラストが上昇する傾向にあった(0.4T, 1.14 ;

1.5T, 1.32 ; 3.0T, 1.38)。

ADC 値の同一企業装置における機種間差異は最大 8.8%、企業間差異は最大 18.4%、コイルシステム間差異は最大 7.0%であり、被験者内差異 (5.4%) や計測者内差異 (2.2%) に比し有意に大きかった。磁場強度間差異は 1.5T と 3.0T では 4.2% だったが、0.4T では 29.5% であった。

D. 考察

DWI の画質は装置特性や磁場強度に大きく左右されるため、早期 CJD における軽微な異常信号の判定に難渋する場合が少なくない。

今回の検討では、一部の装置において、装置特性に起因する CJD 早期病変と類似したアーティファクトが生じやすいことが明らかとなった。また、灰白質のコントラストは内側前頭葉・島皮質で有意に高く、さらに磁場強度が高いほど上昇することが明らかとなった。これらの特徴を CJD 早期病変と誤認しないよう注意が必要と考えられた。

より客観的な判定には ADC 値が有望と考えられるが、今回の検討では ADC 値の機種間差異が無視できないほど大きいことが明らかとなり、CJD への応用は慎重を期す必要があると考えられた。

E. 結論

DWI のコントラストなどの特性や定量値は機種・企業・磁場強度などによって少なからず異なっていた。これらの差異は CJD 早期診断の際の pitfall となる可能性があり、それぞれの装置の特性を熟知した上で、標準化手法を用いて、慎重な判定をすることが必要と考えられた。

[参考文献]

1) Hirai T, Sasaki M, Maeda M, et al.

Diffusion-weighted imaging of ischemic stroke : effect of display method on observers' diagnostic performance. Acad Radiol 16 : 305-312, 2009

2) Sasaki M, Yamada K, Watanabe Y, et al. Variability in apparent diffusion coefficient absolute values across different platforms may be substantial : a multi-vendor, multi-institutional comparison study. Radiology 249 : 624-630, 2008

F. 健康危険情報

MRI 撮像は体内・体外金属が無いことを確認の上、1.5T 以下は通常操作モード、3T は第一水準管理操作モードで行われており、安全性に問題はない。

G. 研究発表 (2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Fujita K, Harada M, Yuasa T, Sasaki M, Izumi Y, Kaji R. Temporal evolution of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease monitored by 3-Tesla MR spectroscopy. J Neurol (in press)

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

プリオン病臨床研究と感染予防ガイドライン

研究分担者：黒岩 義之 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究協力者：岸田 日帯 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究協力者：児矢 野繁 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究要旨

プリオン病患者の ^{123}I -iomazenil SPECT 検査 (iSPECT) や FDG-PET 検査は脳機能の客観的評価法として有用と考えられた。家族性 CJD (V180I 変異) 患者では FDG-PET 検査で孤発性 CJD や他の家族性 CJD と比べ、両側後頭葉内側面の脳代謝が保持されていた。また、プリオン病の進行に伴って血中ノルアドレナリン値が上昇し、交感神経優位となる傾向があった。

多数の専門医に協力いただき、二次感染予防を主眼としたプリオン病感染予防ガイドライン(2008年版)を作成した。

A. 研究目的

私達の研究室は一貫してプリオン病患者の臨床研究を通じて、プリオン病の病態解明と、早期診断法や治療評価のための surrogate marker となり得る検査法を確立することを目的とした研究をおこなっている。

また臨床上の問題となり得る二次感染予防のための感染予防ガイドライン作成の事務局を努めた。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

現在脳 MRI 拡散強調画像 (MRI-DWI) がプリオン病の早期診断に最も有用とされている¹⁾。MRI-DWI 検査に加えて、 ^{123}I -iomazenil SPECT 検査 (iSPECT) や FDG-PET 検査を施行した。また、CJD 患者の自律神経障害について評価を行った。本研究は当院倫理委員会の承認を得ており、患者またはその家族に対して研究について説明をおこない、全例で同意が得られている。

C. 研究結果

孤発性 CJD 患者全 6 名とも通常の脳血流 ECD-SPECT よりも広域で iSPECT では集積低下が認められた(図 1)。また 3 例の家族性 CJD (V180I) の脳 MRI-DWI 検査で既出の報告のとおり²⁾異常信号域を認めない両側後頭葉内側面には、FDG-PET 検査の検討でも核種の集積がそのほかの皮質に比べて保たれており、機能的にも保持されていることが判明した(図 2)。複数例の CJD でこれらの画像検査の報告は過去にみられない。

またプリオン病では進行に伴って、血中ノルアドレナリン高値となる自律神経障害が認められることが判明した(図 3)。

D. 考察

iSPECT 検査や FDG-PET 検査ではプリオン病患者の客観的な脳機能の surrogate marker となり得る。また診断に苦慮する場合もこれらの検査は有用であろう。ただし汎用される検査法ではなく、早期診断には脳 MRI-DWI が優っていると考えられる。

プリオン病患者における自律神経障害の機序は不明であり、今後の課題である。

今回の感染予防ガイドラインは二次感染予防に主眼を置いており、神経内科だけでなく各学会に周知していく必要がある。

E. 結論

私達の研究室では、プリオン病患者の臨床研究を通じて病態解明に努めている。プリオン病の医原性感染の予防のため、感染予防ガイドラインの周知に努めていく必要がある。

[参考文献]

- 1) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, et al. Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 63 : 443-449, 2004
- 2) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, et al. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62 : 502-505, 2004

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 岸田日帯, 黒岩義之. 感染予防. In: 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版, 200-212, 2010

2. 学会発表

- 1) Kishida H, Koyano S, Baba Y, Suzuki Y, Kuroiwa Y. Neuroendocrinologic change in Creutzfeldt-Jakob disease., 19th International Symposium on the

Autonomic Nervous System, Kauai, Hawaii, 2008.10

- 2) 岸田日帯, 西山毅彦, 波木井靖人, 馬場泰尚, 木村活生, 鈴木ゆめ, 児矢野繁, 黒岩義之. 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病における 123I-Iomazanil SPECT の検討. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 2008.5
- 3) 岸田日帯, 児矢野繁, 宮地洋輔, 杉山美紀子, 鈴木ゆめ, 黒岩義之. クロイツフェルト・ヤコブ病患者でのカテコラミン. 第 61 回日本自律神経学会総会(シンポジウム), 横浜, 2008.11
- 4) 杉山美紀子, 岸田日帯, 鈴木ゆめ, 黒岩義之, 大脳皮質基底核変性症様の経過をたどったクロイツフェルト・ヤコブ病の 74 歳男性例. 第 187 回日本神経学会関東地方会, 東京, 2008.11
- 5) 岸田日帯, 植松絵理, 仲野 達, 三富睦美, 上田直久, 児矢野繁, 黒岩義之. 失語症で発症し比較的緩徐に進行する Creutzfeldt-Jakob 病が疑われる 61 歳男性例. プリオン研究会 2009, 蔵王, 2009.8
- 6) 根路銘千尋, 岸田日帯, 植松絵里, 仲野達, 三富睦美, 上田直久, 児矢野繁, 黒岩義之. 失語症で発症し比較的緩徐に進行する Creutzfeldt-Jakob 病が疑われる 61 歳男性例. 第 14 回日本神経感染症学会総会学術集会, 宇都宮, 2009.10
- 7) 岸田日帯, 児矢野繁, 黒岩義之, 認知症のスクリーニング検査としてクロイツフェルト・ヤコブ病鑑別のための脳 MRI 拡散強調画像は重要である. 第 28 回日本認知症学会学術総会, 仙台, 2009.11
- 8) 岸田日帯, 黒岩義之. プリオン病の感染予防. 第 15 回日本神経感染症学会(シンポジウム), 福島, 2010.10

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

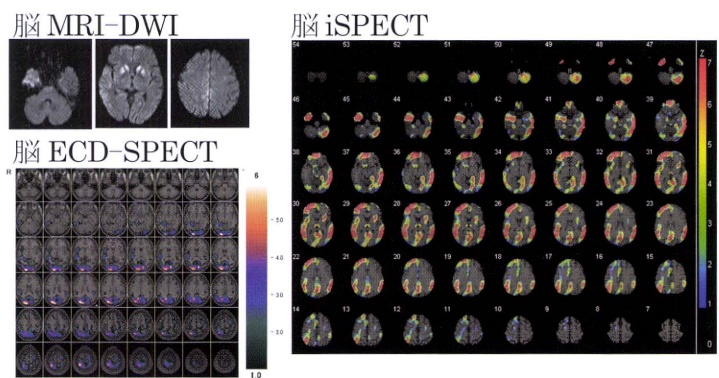


図 1

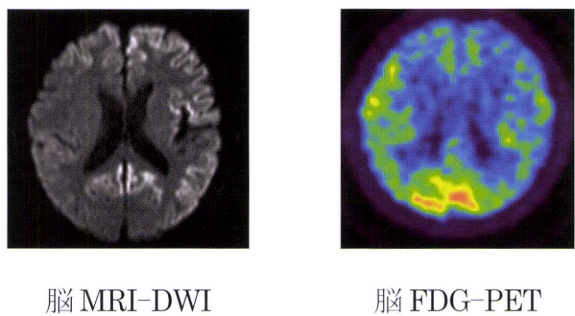
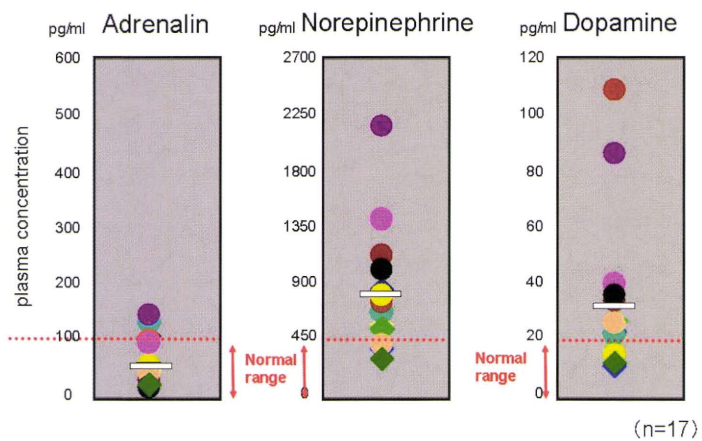


図 2

プリオン病患者では安静時血清ノルアドレナリン、
ドーパミンの高値を認める



(n=17)

図 3

クロイツフェルト・ヤコブ病の臨床病理学的研究

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 福祉村病院 神経病理研究所

研究要旨

(1) CJD の臨床診断は典型例では容易であるが、非典型例では各種検査所見を合わせても困難であり、病理学的検索が必須である。(2) 本邦 CJD 典型例における特徴的な臨床症候の出現時期は欧米例と差はないが、全経過は約 3 倍長く、これは無動性無言状態での長期経過による。(3) V180I CJD では高齢発症、家族歴がない、緩徐進行性、MRI・T2 強調像での大脳皮質腫脹像や拡散強調像での大脳皮質高信号、周期性同期性放電がない、Western blot 解析で特徴的な所見、神経細胞脱落や PrP 沈着が軽い等の臨床病理学的特徴が認められた。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の臨床病理所見について剖検例を用いて検討する。またプリオン蛋白(PrP)遺伝子変異および多型、プロテアーゼ抵抗性 PrP の Western blot 解析所見(PrP 型)との関連についても対比して、ヒトプリオン病の病態を解明する。

B. 研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所において検索された CJD 剖検例を用いて以下の検討を行った。(1) CJD の臨床診断および臨床症状について(平成 20 年度)、(2) 典型的な臨床病理所見を呈する MM1 型孤発性 CJD の臨床所見について(平成 21 年度)、(3) 本邦の遺伝性 CJD で最も頻度の高い PrP 遺伝子コドン 180 に点変異を伴う V180I CJD の臨床病理所見について(平成 22 年度)。

(倫理面への配慮)

剖検にあたって全例で家族による文書同意

が取得されている。剖検組織および各種所見は匿名化して検討し倫理上の配慮を行った。PrP の感染性は、厚生労働科学研究費補助金特別研究事業「医療機関におけるクロイツフェルト・ヤコブ病保因者(疑い含む)に対する医療行為についてのガイドライン策定に関する研究」のクロイツフェルト・ヤコブ病感染予防ガイドラインに従い取り扱った。

C. 研究結果

(1) CJD と臨床診断され剖検が施行された 60 例中 53 例は CJD と確定診断され、他は CJD が否定された。一方で、病理学的に CJD と確定診断された 56 例中には臨床的に CJD が疑われていなかった 3 例があった。CJD の確定診断が得られた 56 例では経過中に進行性認知機能障害が全例で認められ、視覚症状は 27 例(48.2%)、小脳症状は 30 例(53.6%)、錐体路/錐体外路徴候は 52 例(92.9%)、ミオクローヌスは 53 例(94.6%)、周期性同

期性放電(PSD)は49例(87.5%)、無動性無言状態は52例(92.9%)で認められた。

- (2) MM1型孤発性CJD例の発症年齢は平均67.1歳、ミオクローヌスとPSDは発症後平均2.0ヶ月で出現し、欧米例(1.8ヶ月と2ヶ月[1])と差はなかった。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(3.9ヶ月[1])の約3倍長かった。病理学的に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。
- (3) V180I CJDは、高齢発症、家族歴がない、緩徐進行性で全経過が長い、ミオクローヌスを認める、パーキンソニズムを呈する例が多い、視覚症状・小脳症状はみられない等の臨床所見が認められた。検査所見では、MRI・T2強調像で大脳皮質腫脹像や拡散強調像で大脳皮質高信号がみられる、髄液NSEや14-3-3および総タウ蛋白が陽性、PSDは認めない、コドン129はMet/Val多型を呈する例が多い、PrPのWestern blot解析で特徴的なバンドを呈する等が認められた。病理所見では、長期経過に比し神経細胞脱落やグリオーシスが軽い、小脳・脳幹病変は軽度である、弱いシナプス型・一部斑状のPrP沈着を認める等が認められた。

D. 考察

- (1) CJDの臨床診断は典型例では容易であ

るが、非典型例では各種検査所見を合わせても臨床診断は困難であり、今後も病理学的検索は必須である。

- (2) 本邦CJD症例の全経過が長いの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による。しかしながら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かった。
- (3) V180I CJDは臨床病理学的所見が特徴的であるだけでなく、遺伝子的、蛋白解析結果も興味ある所見を呈する。V180I CJDには病態の進展に対してprotectiveに作用するfactorが存在するのではないかと推定された。

E. 結論

本邦CJD例は臨床経過が長く、中枢神経病変が高度であることが特徴であり、遺伝子変異や多型の頻度にも欧米例と大きな差がある。今後も非典型例を含めたCJD例の臨床病理学的な検討の蓄積が重要であると思われた。

[参考文献]

- 1) 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(2008/4/1~2011/3/31発表)

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-