

のセリンプロテアーゼを利用するなど新たな滅菌法、および V2 型プリオンに対する滅菌法の開発研究を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、①我が国におけるプリオン病発生状況や、新たな医原性プリオン病の出現を監視し、②早期診断に必要な診断方法の開発や患者等に対する心理カウンセリング等の支援を提供することにより、この超難病に対し診断のみならず、社会的側面もサポートし、③プリオン蛋白対応の滅菌法を含め、感染予防対策を研究し周知することで、プリオン病患者の外科手術を安全に施行できるような指針を提示し、④手術後にプリオン病であることが判明した事例を調査して、器具等を介したプリオン病の二次感染対策を講じるとともにリスク保有可能性者のフォローアップを行い、⑤現在開発中のプリオン病治療薬・予防薬の全国規模の治験体制をサポートすることである。

B. 研究方法

1) 全国サーベイランスの推進と疫学的・臨床的研究ならびに診断・ケア体制の充実

(1) 患者(家族)からの都道府県に対する特定疾患治療研究事業(難病医療費の公費負担制度)への申請、(2) 主治医からのプリオンタンパク遺伝子検索(東北大学)や髄液マーカー検査(長崎大学)依頼、(3) 感染症法に基づく5類感染症としての主治医からの届け出、などからプリオン病患者の存在を把握し、サーベイランス委員や都道府県担当専門医による情報収集を行い、全国を10ブロックに分けそれぞれに地区サーベイランス委員を置き、各都道府県のCJD担当専門医と協力して全国レベルのサーベイランスを行い、年2回のサーベイランス委員会で検討し、本邦の疫学的・臨床的特徴を明らかにする。MRI画像の標準化と読影実験を行うことで診断率を向上させ、髄液中の14-3-3蛋白と異常プリオン蛋白(real-time QUIC法)、遺伝子、病理解剖脳の解析などの各検査の診断支援を行うと共に新しい検査法の開発も進める。必要に応じて患者、および家族に対してカウンセリングを行う。

2) 医療行為を介した二次感染予防対策

プリオン病インシデント委員会として、主に

脳神経外科領域の手術後にプリオン病と判明した患者に使用した器具を用いて手術を受けたりリスク保有可能性者発生の実態状況の把握と、定期的な神経学的異常の確認、心理的苦痛のフォローアップをおこなうことである。各事例の調査を行い、リスク保因可能性者の登録と各施設の調査、および指導を行う。必要に応じてカウンセリングを行う。

3) 安全で効果的なプリオン蛋白滅菌法の開発

プリオン病の感染因子と言われる異常プリオン蛋白質、特にV2プリオンは、洗浄や滅菌に対して抵抗性があることから、超好熱菌由来の酵素によるプリオン蛋白分解法を、プリオン蛋白を用いたin vitro系とモデルマウスを用いたin vivoの系を用いて研究・開発する。

4) プリオン病治療法の開発

既存薬物による臨床試験とともに新規治療薬候補の開発を進める。新規に開発されつつあるプリオン病治療薬を早期に臨床応用するために、国内の複数の施設が参加する形のコンソーシアムの設立に貢献するとともに協力を進める。

(倫理面への配慮)

疫学的・臨床研究に際しては、それぞれの疾患の患者や家族からインフォームドコンセントを得て個人情報の守秘を計るとともに、実験動物を使用する研究においてもそれぞれの施設の定める手続きに従って動物愛護に十分留意して実施する。サーベイランス、およびインシデントについては委員長の所属施設にて倫理審査を受け承認されている。

C. 研究結果

1) 全国サーベイランスの推進と疫学的・臨床的研究ならびに診断・ケア体制の充実

全国サーベイランスにて1999年4月1日から2013年10月までに4281件を調査し、本邦患者の約90%に達すると思われる2162人(男:922人、女:1240人)をプリオン病と認定し詳細な検討を行った。調査症例数は、2011年、2012年、2013

年でそれぞれ年間1136、523、617例であった。調査の迅速性と悉皆性は感染症届け出情報や遺伝子・髄液検査依頼の情報を組み入れることで飛躍的に向上している。人口100万人対の罹患率は1.01人で欧米の罹患率と同等で、発病時の平均年齢は68.0歳である。孤発性CJD：1655人、遺伝性CJD(gCJD)：325人、硬膜移植歴を有するCJD：84人、変異型CJD(vCJD)：1人、GSS：85人、FFI：4人であった。最近では遺伝性CJDが増加する傾向が認められるが、これは、本邦においては家族歴を伴わない遺伝性CJDが多いことと、そのことが広く知られるようになり、遺伝子検索が広く行われるようになったためと思われる。追跡の結果、患者の44%が発病後1年以内に死亡していた。本邦では硬膜移植歴を有するCJD患者が多発しており、今日まで世界各国から報告されている220例の約3分の2を占める147例がわが国の症例である。硬膜移植によるCJD症例は2011年1例、2012年2例、2013年3例確認されており、長期潜伏期間後の発症が続いていることより、注意深い監視が必要である。

診断については、2011年、2012年は多施設共同研究の形でプリオン病患者画像の読影実験を行い、拡散強調画像のROCのAUC値は0.84と高く、FLAIRでのAUC値は0.68と低値であった。近年急速に導入する医療施設が増えている3テスラのMRIと、従来からの1.5テスラのMRIで、同一症例を撮影した画像の比較読影実験を行った。3テスラのMRIで撮影した拡散強調画像は1.5テスラの画像と比較して、大脳皮質の感度は低かったが総合診断能では差を認めなかった。平成22年度から24年度10月の時点で、614例のプリオン蛋白遺伝子解析を行い、そのうち136例の患者でプリオン蛋白遺伝子の変異を同定した。内訳はコドン180が55.1%と最も多く、102が14.7%、232が13.3%、200が11.8%であった。平成25年度は297例のプリオン蛋白遺伝子解析を行い、そのうち51例の患者でプリオン蛋白遺伝子の変異を同定した。内訳はコドン180が36例と最も多く、232が8例、102が2例、200が2例、120bp insertionが3例であった。平成23年4月1日から平成24年10月6日まで646症の髄液を解析し、孤発性CJDにおいて14-3-3蛋白の感度は76.2%、遺伝性プリオンでは65.9%、獲得性プ

リオン病では66.7%であった。髄液中異常プリオン蛋白試験管内増幅法(RT-QUIC法)の感度は孤発性プリオン病では80%、遺伝性プリオン病では69.1%、獲得性プリオン病では66.7%、特異度は97.1%であった。髄液中の14-3-3蛋白、総タウ蛋白、異常プリオン蛋白の検出(RT-QUIC法)に関しては、国際共同研究として、診断確実例109例(日本45例、オーストラリア16例、韓国4例、ドイツ8例、スペイン36例)の解析をおこない、非プリオン病患者240例との比較により、感度はそれぞれ88.9%、85.3%、78.9%であった。

プリオン病剖検促進のため、パンフレット作成、病理学会・神経病理学会でのシンポジウム、情報宣伝活動などを行った。多施設での死亡例の受入体制も整備している。剖検実施率は2013年度の時点でsCJDが14%(177/1285)、vCJDが100%(1/1)、dCJDが44%(35/79)、gCJDが21%(43/208)、GSSが23%(9/40)、FFIが100%(3/3)と横ばいであり、今後の更なる改善が必要である。我が国に特有の遺伝性プリオン病であるV180I変異による遺伝性プリオン病の剖検脳解析を行い、MM2型孤発性CJDと共通の病理学的所見を有する症例が存在することを確認した。

国の疾病登録データベースを基本に、研究班としてのプリオン病データベースの構築に際し、新たなアルゴリズムの開発を行った。本研究班を中心に2011年に設立されたアジア大平洋プリオン病研究会(APSPR)とその学術集会であるアジア大平洋プリオンシンポジウム(APPS)を3年間継続して後援し、国際学会であるPRION2011~13への参加にも協力して、国際化を進めた。

新たなプリオン病診断マニュアルの作成に協力した。

2) 医療行為を介した二次感染予防対策

医療行為を介した二次感染の可能性のある事例に対して、個々の事例への対応を行った。2011年、2012年は、新規インシデント可能性事案がそれぞれ1件、2件あり、2013年は1件は対象外、1件は現時点では対象症例の診断がプリオン病でない可能性が高いと考えられている。これまでに13件のインシデント事案があり、二次感染発症者はいない。プリオン病対応の滅菌

が可能となるように、脳外科用手術器具の改良を行った。

3) 安全で効果的なプリオン蛋白滅菌法の開発

超高熱菌由来のセリンプロテアーゼ、Tk-サチライシンをプリオン病モデルモデルマウスの脳ホモジュネートに添加・インキュベートした分解物には感染性があり、更なる改良を加えている。医療用洗剤に含まれるEDTAによりTk-サチライシンが不活化されることが判明し、金属要求性の低い酵素の実用性を検証している。

V2プリオン蛋白は現行の滅菌法に対する耐性が強く、感染性も強いため、新たな滅菌法の開発に取り組んでいる。

4) プリオン病治療法の開発

構造解析から開発された化合物GN8を修飾したP092がプリオン蛋白へ結合し、その構造変換を抑制することにより、プリオン病の治療・予防薬としての臨床応用への期待が高まっており、ファースト・イン・ヒューマンの治験を行うために、全国規模での自然歴調査体制を確立すべく、コンソーシアム(JACOP)が設立されたことを受け、サーベイランスを通じて患者や家族への登録の呼びかけと、各医療機関への協力要請のサポートを行っている。

D. 考察

海外のデータではプリオン病の罹患率は人口100万人あたり年間1人で、わが国における罹患率もこれと同様であることが明らかになった。わが国における問題点として硬膜移植歴を有するCJD患者が多発しており、今日まで世界各国から報告されている例の約3分の2がわが国の症例であり、未だに新規発症例が続いていることより、外科治療における二次感染リスク保有可能性者と共に、今後も注意深く監視する必要がある。獲得性プリオン病以外の病型では、わが国では家族歴のない遺伝性プリオン病、特にPRNP V180I変異が多いことが特徴的であり、地域的、あるいは人種的な特異性の有無に関して調査を進めている。わが国では発病から死亡までの期間が諸外国の例と比較して長い傾向があり、皆保険制度や難病医療費公費負担制度による患者の医療へのアクセシビリティが良いこと、経管栄養などによる延命治療に対す

る国民性などが背景にあることが推察され、発生数同様観察してゆく必要がある。

サーベイランス調査票の回収率は2013年は60.7%であり、地域によるばらつきもあるが、必ずしも高いとは言えないことより、都市部でのサーベイランス委員の増員や、ブロックの細分化、またはより効率的なシステムへ改善する必要がある。

検査体制に関しては、拡散強調画像の標準化における読影実験の結果、FLAIR画像に比べ拡散強調画像が優れていることが他施設読影実験で証明された。MRI画像では今後更に増加する3テスラのMRIにより撮影された画像の診断率向上のために、読影実験等による検証を行う。

我が国のプリオン病の数から考えると遺伝子解析の症例数をさらに増やす工夫が必要である。髄液検査では国際共同研究を更に推進し、各バイオマーカー検出の感度・特異度を上げるべく、検査法の改良を続けてゆく。

インシデント事例の調査で判明したバイポーラー摂子など、一部の器具がプリオン対応となっていない点に関しては、ディスプレイ器機の使用で解決できると思われる。また、手術中の脳刺激電極も分解式とすることで滅菌が可能となった。インシデント事例は2013年は発生せず、プリオン病感染予防対策の周知がなされつつあると思われる。

剖検率の向上のため続き関連学会への働きかけや移送手段の整備を引き続き進めてゆく。耐熱性酵素による有効な滅菌法の開発を進め、V2プリオンに対する滅菌法の開発、新たなプリオン病の治療・予防薬の臨床応用へ向けて着実に準備を進めている。

E. 結論

サーベイランスのデータを元に、わが国におけるプリオン病の疫学像の一端を明らかにし、早期診断に必要な診断方法の提供や心理カウンセリング等の支援を提供した。プリオン蛋白対応の滅菌法を含め、感染予防対策を研究・開発を続けた。インシデント事例の調査、施設への指導と保因可能性者をフォローした。治療については、プリオン病で新規化合物の臨床応用へ向けて治験体制を整えるため、新たに設立されたコンソーシアム(JACOP)をサポートする

ため、サーベイランス対象症例やその家族に対する登録の勧誘と全国の医療施設への協力要請をしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagoshi K, Sadakane Y, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H. Illness duration of prion diseases in Japan is longer than that in other countries. *J Epidemiol* 21:255-262, 2011.
- 2) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamanaka H, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, McGlade A, Collins SJ, Shirabe S, Katamine S, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17:175-178, 2011.
- 3) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre, multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open* 2:e000649, 2012.
- 4) Yoshikawa Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Kadohira M, Kai S, Mizusawa H, Nagata C, Onodera T, Sata T, Tsutsui T, Yamada M, Yamamoto S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J Vet Med Sci* 74:959-968, 2012.
- 5) Hori T, Sanjo N, Tomita M, Mizusawa H. Visual reproduction on the wechsler memory scale-revised as a predictor of Alzheimer's disease in Japanese patients with mild cognitive impairments. *Dement Geriatr Cogn Disord* 35:165-176, 2013.
- 6) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion

diseases. *PLoS One* 8:e60003, 2013.

- 7) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. *PLoS One* 8:e54915, 2013.
- 8) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1171-1175, 2013.
- 9) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. *BMJ Open* 3:e003400, 2013.
- 10) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *J Neurol Sci* 324:190-194, 2013.
- 11) 三條伸夫, 日熊麻耶, 北本哲之, 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行, 山田正仁, 水澤英洋. プリオン病の最近の進歩 遺伝性プリオン病における病型と髄液所見. *Neuroinfection* 18:35-40, 2013.

2. 学会発表

- 1) Yamada M, Sanjo N, Murayama S, Takeda M, Kuzuhara S, Abe K, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nozaki I, Mizusawa H, Hamaguchi T, Sadakane A, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Kuroda S, Murai H, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S, Harada M. Human prion disease in Japan: analysis of 1552 patients in a prospective 11-year surveillance. Alzheimer's

- Association International Conference 2011, Paris, July 16-21 2011.
- 2) Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T, Mizusawa H, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Yamada M. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11 2011.
- 3) Yamada M, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Mizusawa H. Prion disease in Japan. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11 2011.
- 4) Mizusawa H. Prion diseases in Japan. National for Viral Disease Control and Prevention, Beijing, November 5, 2011.
- 5) Mizusawa H. Prion diseases in Japan. The 13th Ilsong International Symposium CJD Surveillance in Asia, Ilsong, February 13, 2012.
- 6) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-jakob disease. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 7) Sanjo N, Ohara M, Satoh K, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic prion disease and cerebrospinal fluid findings in Japanese patients. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 8) Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Abe K, Murai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Saito N, Takumi I, Mizusawa H. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 9) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 10) Mizusawa H, Nakamura Y, Takumi I, Yamada M. CJD Surveillance in Japan. European CJD Surveillance Network, Oslo, June 6-7, 2013.
- 11) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Comparison of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease between Japan and Other countries. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 12) Hizume M, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Abe K, Murai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Saito N, Takumi I, Mizusawa H. Human prion disease in Japan a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 13) Fujita K, Harada M, Uyama N, Sasaki M, Iwasaki Y, Satoh K, Sanjo N, Takao M, Hamaguchi T, Mizusawa H, Yamada M. Thin-slice diffusion-weighted imaging and arterial spin labeling for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 14) Sanjo N, Higuma M, Hizume M, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Abe K, Murai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Saito N, Takumi I, Sakai K, Nozaki I, Noguchi-Shinohara M, Koyano S, Yokoseki A, Yoshiyama K, Takao M, Hayashi Y, Mizusawa H, Prion disease Surveillance Committee, Japan. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. XXI World Congress of Neurology, Vienna, September 21-26, 2013.
- 15) 山田正仁, 中村好一, 北本哲之, 水澤英洋. プリオン病の最近の発症動向. 第 28 回日本医

学会総会，東京，4.8-10 2011.

16) 坂井健二，野崎一朗，濱口 毅，篠原もえ子，中村好一，北本哲之，水澤英洋，森若文雄，志賀裕正，三條伸夫，黒岩義之，西澤正豊，武田雅俊，犬塚 貴，阿部康二，村井弘之，村山繁雄，太組一朗，調 漸，立石 潤，原田雅史，山田正仁. CJD サーベイランスにおけるプリオン病発症と加齢の関連についての検討. 第 52 回日本神経学会学術大会，名古屋，5.18-20, 2011.

17) 原田雅史，森田奈緒美，音見暢一，大塚秀樹，久保 均 藤田浩司，梶 龍兒，山田正仁，三條伸夫，水澤英洋，CJD サーベイランス症例における DWI 及び FLAIR 画像の診断有用性の多施設読影実験による検討. 日本磁気共鳴医学会，北九州，9.29-10.1, 2011.

18) 日詰正樹，関口輝彦，三條伸夫，水澤英洋. 長期間にわたって緩徐進行性の認知機能障害のみを呈する孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD) の 1 例. 第 16 回日本感染症学会学術集会，東京，11.4-5, 2011.

19) 濱口 毅，坂井健二，篠原もえ子，野崎一朗，太組一朗，三條伸夫，中村好一，北本哲之，齊藤延人，水澤英洋，山田正仁：わが国の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の特徴：海外例との比較. 第 54 回日本神経学会学術大会，東京，5.29-6.1, 2013.

20) 古川迪子，三條伸夫，工藤俊介，中道一生，西條政幸，鈴木忠樹，吉岡光太郎，石橋賢士，

石原正一郎，石橋哲，大久保卓哉，森尾友宏，江石義信，横田隆徳，水澤英洋. BK ウイルス感染による後根神経節炎が疑われた原発性無ガンマグロブリン血症の 30 歳男性. 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会，10.11-12, 宮崎 2013.

21) 濱口 毅，坂井健二，野崎一朗，篠原もえ子，太組一朗，三條伸夫，中村好一，北本哲之，齊藤延人，水澤英洋，山田正仁. わが国と海外の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の比較. 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会，10.11-12, 宮崎, 2013.

22) 工藤俊介，三條伸夫，古川迪子，吉岡耕太郎，一條真彦，石原正一郎，石橋 哲，横田隆徳，北川昌伸，水澤英洋. 後根神経節に CD8 陽性 T リンパ球浸潤を伴った原発性無ガンマグロブリン血症の 30 歳男性. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会，山口，11.27-29, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

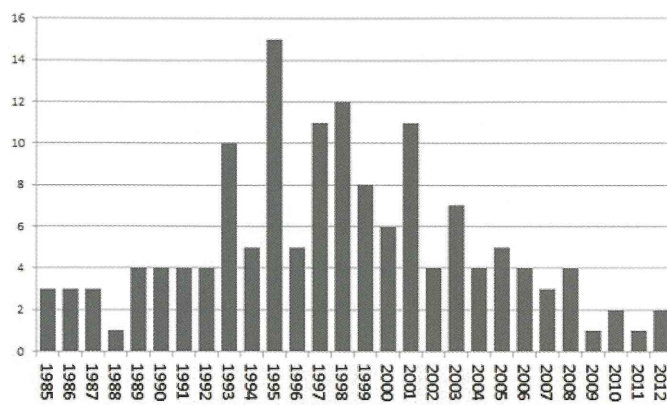
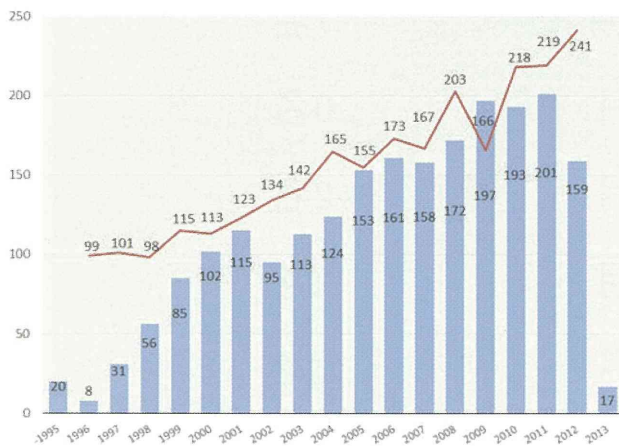
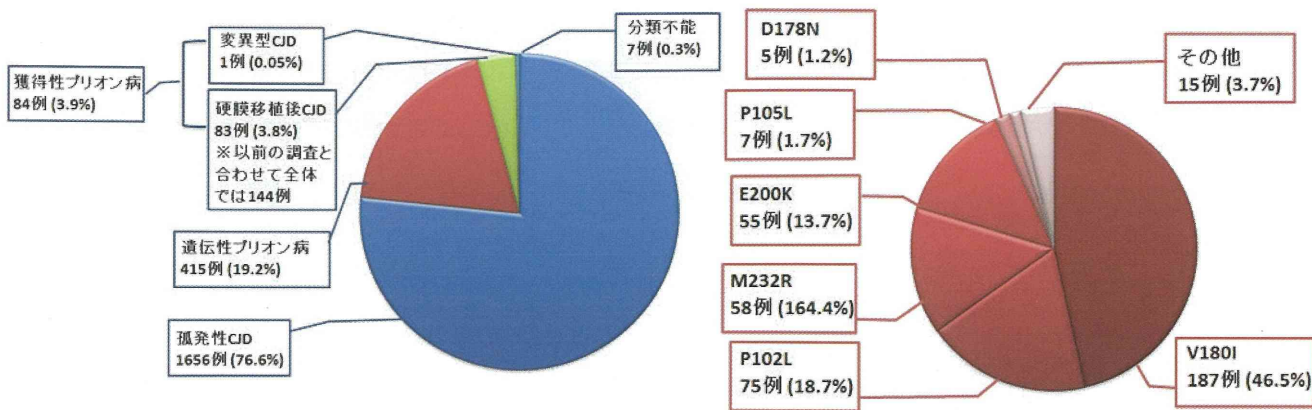
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



左上：サーベイランス委員会は1999年4月から2013年9月までに2162例のプリオン病を同定した。病型、および変異遺伝子ごとの頻度を図示した。病型別の割合は孤発性CJDが1,656例(76.6%)、遺伝性プリオン病が415例(19.2%)、硬膜移植後CJDが83例(3.8%)であった。新たな変異型CJDの発症はなかった。

右上：遺伝性プリオン病の遺伝子変異ごとの頻度はV180I、P102L、M232Rの順であり、本邦に特有とも言えるV180Iが最多であった。

左下：プリオン病患者数は近年増加しているように見え、今後も注意深いサーベイランス調査が必要である。

右下：硬膜移植例は2012年9月から3例増えて147例となった。獲得性プリオン病の新規発症例は減少傾向にある。

インシデント事例フォロー状況

事例	CJD診断時期	告知対象者
1	平成16年6月	11名
2	平成16年8月	10名
3	平成17年10月	12名
4	平成18年10月	7名
5	平成18年9月	0名
6	平成13年6月	2名
7	平成15年3月	22名
8	平成18年3月	21名
9	平成20年1月	5名
10	平成21年7月 (H23新規)	50
11	平成23年9月 (H24新規)	60名
12	平成24年2月 (H24新規)	58名
13	平成24年5月 (H24新規)	5名

インシデント事例のフォロー状況：平成 25 年度は 2 事例の現地調査を行ったが、新たな事例は確認されなかった。

正常プリオンタンパク質依存性神経細胞死機構の解析

研究分担者：八谷如美 東京医科大学神経生理学講座
研究分担者：金子清俊 東京医科大学神経生理学講座

研究要旨 プリオン病における神経細胞死を防ぐ手段を検討することは、病気の進行を遅らせる手法の開発につながるものである。本研究では、老化による細胞内プロテアソーム活性の低下により、本来の輸送経路を逸脱した PrP^C がミトコンドリアに局在したのち、膜電位を低下させ、ミトコンドリアを凝集させ、神経細胞死を引き起こす経路において、14-3-3 蛋白質、ミトコンドリア外膜蛋白質 Tom70、細胞質蛋白質 Miro1、が関与することを明らかにした。

A. 研究目的

PrP^C は、プリオン病における神経変性に関与すると示唆されているが、詳細は不明である [1,2]。本研究では、培養細胞を用い、PrP^C が関与する神経変性および神経細胞死をおこす条件下において、かかる分子群を同定し、プリオン病における神経変性の分子機構を解明することで、それらの経路を阻害する薬剤を用いて、将来的に、神経変性を遅延させる手段を見いだすことを目的とするものである。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞（以下、N2a 細胞）を用いて、PrP^C 依存性神経細胞死における関与分子群を同定した。方法は以下のとおりである。

1. PrP^C 過剰発現下でのプロテアソーム阻害剤添加などにより PrP^C 依存性に神経細胞死状態を生細胞で再構築した。
2. タイムラプス観察、共焦点顕微鏡および電子顕微鏡による微細構造観察を行った。
3. ウェスタンブロットによる生化学的解析を行った。

（倫理面への配慮）

培養細胞での研究のため該当しない。

C. 研究結果

上述の方法により、PrP^C 依存性神経細胞死はミトコンドリア（以下、Mt）を介して起こること、関連分子は 14-3-3 η 、14-3-3 γ 、Tom70、14-3-3 ζ 、

Miro1 の 5 分子であること、を明らかにした。各分子の役割は次のとおりである。

1. 14-3-3 蛋白質 η 、 γ 、は PrP (132-135) に結合し複合体となって PrP^C を Mt へ移行させる。
2. 3 種の Mt 外膜蛋白質 [3] のうち (Tom20,22,70)、Tom70 は PrP^C/14-3-3 複合体の受容体である。
3. PrP^C が局在した Mt（以下、Mt/PrP）は微小管依存性に核近傍に凝集する。凝集 Mt/PrP の形成には 14-3-3 ζ およびキネシン関連分子 Miro1 [4] が関与する。

D. 考察

核近傍での凝集 Mt/PrP の形成は、神経という特異な構造を持つ細胞にとっては致命的である。なぜなら、エネルギーの供給が神経細胞全体に行き渡らず、軸索輸送は滞り、シナプス機能不全および神経ネットワークの破綻がおこり、細胞死に至るからである。このような現象は Mt 分裂に関わる Drp1 機能不全でも見られ、本研究結果と同様に、神経変性・神経細胞死が起きる [5]。また、14-3-3 蛋白質は本来のミトコンドリア蛋白質の輸送にも関与するが [6]、一方で、PrP^C のミトコンドリア移行にも関与することが明らかになった、したがって、14-3-3 蛋白質、Tom70、Miro1 の制御により、凝集 Mt/PrP の形成を押さえることは、プリオン病における神経変性の進行を遅らせる手段となりうることを示唆している。

E. 結論

本研究により、PrPC 依存性の神経細胞死は Mt を介し、その過程には 14-3-3 蛋白質、ミトコンドリア外膜蛋白質 Tom70、Miro1 が関与することが明らかになった

[参考文献]

- 1) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, et al. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett* 374:98-103, 2005.
- 2) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, et al. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 327:894-899, 2005.
- 3) Rehling P, Brandner K, Pfanner N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 519-530, 2004.
- 4) Brickley K, Smith MJ, Beck M, Stephenson FA GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* 280:14723-14732, 2005.
- 5) Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation. *Nat Cell Biol* 11:958-956, 2009.
- 6) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, et al. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* 376:705-709, 1995.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirakawa T, Nakano K, Hachiya N, Kato N, Kaneko K. The involvement of P2X₁ receptor in pyramidal cell degeneration in the rat hippocampus

after trimethyltin administration. *Neurosci Res* 71:396-404, 2011.

- 2) Hachiya N, Komata Y, Harguem S, Nishijima K, Kaneko K. Possible involvement of calpain-like activity in normal processing of cellular prion protein. *Neurosci Lett* 490:150-155, 2011.

- 3) Nishijima K, O'hara K, Kaneko K, Hachiya N. Calmodulin-like skin protein (CLSP) is a novel biomarker candidate for Pick's disease by Unfoldin-modified proteomic analysis. *J Neurol neurophysiol* S11-003, 2012.

- 4) Ichimura T, Taoka M, Shoji I, Kato H, Hatakeyama S, Isobe T, Hachiya N. 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM 32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation. *J Cell Sci* 126:2014-2026, 2013.

- 5) Kato H, Nishijima K, Hachiya N. Motor switch from KIF4 to KIF5 induces a selective reduction in anterograde velocity of fluorescence cellular prion protein in neurites. *J Neurol Neurophysiol* S11:005, 2013.

- 6) Leszek J, Trypka E, Kato H, Hachiya N. Break down of insulin system in brain; Link from Alzheimer's disease to type 3 diabetes. *J Alzheimer Dis*, in press.

- 7) Kato H, Hachiya N. Mitochondrial physiology and cerebro-spinal protection. In: Uchino H, Ushijima I, Ikeda Y eds. Neuroanesthesia and Cerebro-Spinal Protection, Springer, Tokyo, in press.

- 8) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (下): 変異型 Creutzfeldt-Jakob 病. *日本臨床* 69:419-422, 2011.

- 9) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (下): プリオン病の疫学と概論. *日本臨床* 69:405-410, 2011.

- 10) 八谷如美, 金子清俊. 認知症学 (上): プリオン蛋白. *日本臨床* 69:119-123, 2011.

- 11) 八谷如美, 金子清俊. プリオン感染のリスクファクターとしての慢性炎症. *実験医学* 29:174-179, 2011.

- 12) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. 樋口輝彦, 市川宏伸, 神庭重信, 朝田 隆, 中込和幸・編

今日の精神疾患治療指針, 医学書院, 東京, pp412-422, 2012.

13) 加藤大樹, 八谷如美. 正常プリオン蛋白の構造と機能. *Clin neurosci* 31:1012-1014, 2013.

14) 八谷如美. クールー. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:412-422, 2013.

15) 八谷如美. プリオン病の基礎. *東京医科大学雑誌*, in press.

2. 学会発表

1) Kato H, Hachiya N, Kaneko K. 14-3-3 dependent molecular interaction and mitochondrial aggregation of PrPC. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

2) Nishijima K, Kato H, Hachiya N, Kaneko K. The contents of PrP-targeted mitochondrial aggregate. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

3) Hachiya N, Harguem S, Komata Y, Kaneko K. Intracellular processing of PrPC and PrPSc. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

4) Hachiya N. Possible involvement of calpain-like activity in normal processing of cellular prion protein. The Montreal International Translational Medicine Conference. Montreal, November 3-4, 2011.

5) Hachiya N. Diagnostic and therapeutic use of a novel protein-unfolding activity, oligomeric actin interacting protein 2 (Aip2p) for neurodegenerative disease. Neuro 2012, Las Vegas, May 14-16, 2012.

6) Kato H, Kaneko K, Hachiya N. Molecular interaction between 14-3-3 ζ and mitochondrial trafficking factors plays an important role in aggregation of PrP^C-targeted mitochondria. Asian Pacific Prion symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

7) Hachiya N, Leszek J. Possible nuclear transport-related biomarkers for the neurodegenerative disease. Keystone symposia, Tokyo, October 23, 2012.

8) Hachiya N. More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p. 12th World Congress

of Biological Psychiatry. Kyoto, June 23-27, 2013.

9) Miyashita K, Fukushima M, Kato H, Hachiya N. Possible involvement of a novel mitochondrial quality control system for the PrPC-dependent neuronal cell death. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

10) Kato H, Hachiya N. Identification of the cyptic mitochondrial targeting sequence for PrPC/mitochondria-dependent neuronal cell death. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

11) Hachiya N. A novel methodology for the analysis of protein inclusions. The 1st Conference of Neurodegenerative Disorders-Present and past-Wroclaw, Poland, November 6-7, 2013.

12) 八谷如美. 新規レーザーマイクロダイセクターによる疾患由来凝集体の解析. 大阪大学たんぱく質研究所セミナータンパク質異常凝集の原理と制御, 大阪, 4.27-28, 2011.

13) 加藤大樹, 八谷如美, 金子清俊. ミトコンドリア分裂因子 Drp1 はシナプス形成に必須である. 第 167 回東京医科大学医学会総会, 東京, 6.4, 2011.

14) 西島佳奈, 八谷如美, 金子清俊. ライブイメージ下に標的物を単離する新規レーザーマイクロダイセクション(LMD)システム. 第 167 回東京医科大学医学会総会, 東京, 6.4, 2011.

15) 加藤大樹, 八谷如美, 金子清俊. 分裂因子 Drp1 はシナプス形成に必須である. 第 167 回東京医科大学医学会総会, 東京, 6.4, 2011.

16) 八谷如美. 医学研究の発展と推進に向けて. 第 12 回運動器科学研究会, 高知, 9.2-3, 2011.

17) 八谷如美. レーザーマイクロダイセクションによる疾患由来細胞内凝集体の直接解析. 第 12 回運動器科学研究会, 高知, 9.2-3, 2011.

18) 八谷如美. 神経変性疾患におけるタンパク質異常凝集の関与と制御. 医科学フォーラム, 東京, 10.26, 2011.

19) 加藤大樹, 八谷如美, 金子清俊. 14-3-3 zeta is involved in mitochondrial aggregation evoked by PrPC. 第 168 回東京医科大学医学会総会, 東京, 11.5, 2011.

20) 西島佳奈, 八谷如美, 加藤大樹, 金子清俊. Analysis of the contents of PrP-targeted mitochondrial aggregate. 第 168 回東京医科大学

医学会総会，東京，11.5，2011.

21) 八谷如美. 蛋白質可溶化のための画期的手法の開発. 第4回京大原子炉研セミナー，大阪，11.10-11，2011.

22) 八谷如美. プリオン病発症機構の解明に向けて. 第1回広域脳連合研究会，東京，3.9，2012.

23) 八谷如美. 蛋白質不溶化問題における画期的手法の開発. バイオテックフォーラム，東京4.25-27，2012.

24) 西島佳奈，八谷如美，加藤大樹，金子清俊. 安定な Unfoldin(Aip2p/Dld2p 多量体)を形成する変異体の作出，第169回東京医科大学医学会総会，東京，6.2，2012.

25) 八谷如美. 神経変性疾患における封入体解析手法. 第5回京大原子炉研セミナー，11.1-2，2012.

26) 八谷如美. プリオン病発症および神経細胞死機構. 第2回広域脳連合研究会，西宮，11.8，2012.

27) 八谷如美. タンパク質不溶化問題解決のための画期的手法の開発. 第55回北摂循環器研究会，大阪，11.12，2012.

28) 森岡博美，西島佳奈，Dekker T，積知輝，玉城博章，八谷如美，金子清俊 Calumodulin-like skin protein (CLSP)は Pick 病の新しいバイオマーカーである. 第170回東京医科大学医学会総会，東京，11.17，2012.

29) 平昭吉野，加藤大樹，八谷如美，金子清俊. Clusterin は正常型プリオン蛋白質が引き起こす神経細胞死に関与する. 第170回東京医科大学医学会総会，東京，11.17，2012.

30) 市村 徹，八谷如美，勝二郁夫. 14-3-3タン

パク質はTRIM32ユビキチンリガーゼの機能性プールを維持する. 第35回日本分子生物学会年会，福岡，12.11-14，2012.

31) 鈴木森香，加藤大樹，八谷如美，内野博之. 全身麻酔薬 Propofol によるミトコンドリア分裂抑制作用の発見. 第171回東京医科大学医学会総会，東京，6.1，2013.

32) 加藤大樹，八谷如美. Tom70 は PINK1 のミトコンドリア局在に必須である. 第171回東京医科大学医学会総会，東京，6.1，2013.

33) 内田千晴，西島佳奈，加藤大樹，八谷如美. レーザーマイクロダイセクション(LMD)および(TEM)を用いた新しい超微細構造観察手法の開発. 第171回東京医科大学医学会総会，東京，6.1，2013.

34) 河口佑樹，市村徹，加藤大樹，西島佳奈，八谷如美. 14-3-3 と Hsp70/90 による TRIM タンパク質の安定化. 第86回日本生化学会大会，横浜，9.11-13，2013.

35) 八谷如美. Advanced LMD(ALMD)による凝集体の微細構造観察における新手法. 第6回京大原子炉研セミナー，大阪，11.14-15，2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

プリオン病発症およびプリオン蛋白質機能発現メカニズムの解析

研究分担者：作道章一 琉球大学医学部保健学科生体代謝学
研究協力者：小野寺節 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター

研究要旨 プリオン感染時の脳内では異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の増加と正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の減少が生じていることが示されつつあり、これにより脳内の酸化ストレス動態が変化することが考えられることから、マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態の解析を行った。その結果、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)などのDNA酸化損傷マーカー、尿中イソプラタンなどの脂質酸化損傷マーカーがプリオン感染により増加していることが明らかとなった。さらに、superoxide anion(O₂·⁻)を産生するNADPH oxidase(NOX)-2やNOを産生するinducible NO synthase(iNOS)の発現がプリオン感染マウス脳において上昇していることが分かった。これらのことから、プリオン感染時には脳内でDNAや脂質の酸化ストレス損傷とNOX-2やiNOSの発現誘導が起っていることが示唆された。さらに、プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を用いた解析で、PrP遺伝子発現と抗酸化ストレス活性が相関することが分かり、ボルナ病ウイルス(BDV)の持続感染状態下においても、PrP^CのN型糖鎖構造に変化に起きることで抗酸化ストレス活性が低下することが明らかとなった。さらに、PrP^C欠乏状態で酸化ストレスが発生するとDNA損傷マーカーであるCheckpoint kinase1のリン酸化が起こったため、PrP^C発現はDNA損傷を抑制するのに寄与しているものと考えられた。

A. 研究目的

これまでに我々はプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を樹立し、PrP遺伝子発現と抗酸化ストレス活性が相関することを示してきた(参考文献1, 2)。さらに、プリオン感染時の脳内では異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の増加と正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の減少が生じていることが示されつつあり、PrP^C欠乏による抗酸化能低下とPrP^{Sc}蓄積による酸化ストレス増大が起きている可能性が考えられた。そこで、本研究では、プリオン感染マウス脳の酸化ストレス動態や酸化ストレス発生因子の解析およびPrP^C欠損状態やウイルス感染や酸化ストレス発生条件におけるPrP^Cの機能的関与について検討を行った。

B. 研究方法

Chandler および Obihiro プリオン脳内接種マウス脳について、Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)による8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)の解析と、

ウエスタンブロッティングによるinducible NO synthase(iNOS)とニトロチロシンの解析、およびreverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)によるNADPH oxidase(NOX)の発現解析を行った。また、継時的に採取した尿について尿中イソプラタン量の測定をELISAにより行った。

ラットC6グリオーマ細胞のボルナ病ウイルス(BDV)持続感染細胞と非感染細胞のPrPをSodium dodecyl sulfate(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、抗PrP抗体SAF32およびSAF83を用いたウエスタンブロッティングにより比較を行った。また、細胞密度がPrPおよびBDV複製に与える影響についても検討した。PrPのN型糖鎖付加に関わることが知られているN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)転移酵素(GnT)I, II, III, IVa, IVb, VおよびGnTV発現を制御する転写因子Ets-1発現をRT-PCRおよびウエスタンブロッティングにより解析した。さらに、BDV持続感染細胞と非感染細胞のsuperoxide dismutase(SOD)活性の比較を行った。

空ベクター導入 HpL 細胞 (HpL-EM) および PrP 遺伝子を再導入した HpL 細胞 (HpL-PrP) について、血清除去を行った。回収した細胞ライゼートを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、抗リン酸化 checkpoint kinase1 (chk1) (Ser345) 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析を行った。

(倫理面への配慮)

琉球大学医学部病原体等安全管理委員会、動物実験委員会の規定に従い、感染動物実験およびウイルス感染実験を行った。DNA 実験は遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法) および琉球大学遺伝子組換え生物等使用安全管理規則に従い行った。

C. 研究結果

プリオン接種後初期の 40 日頃から、脳内の DNA 酸化損傷を示す 8-OHdG 量が増加していることが分かった。また、尿中イソプラタン量も接種後 20 日から徐々に増加していた。NOX 関連遺伝子群の中では、NOX-2 発現がプリオン感染により誘導され、非感染マウスに比べて発症マウスにおいて高い発現が見られた。また、接種後 40 日より、ニトロチロシンの増加が観察された。iNOS の発現誘導は発症したマウスに観察された。

ラット C6 グリオーマ細胞において、細胞密度の増加により PrP は低分子量へと移行した。BDV 複製および PrP 発現量は細胞密度により大きな変化を受けなかったが、細胞密度上昇に伴い BDV 持続感染細胞の PrP は大きく低分子量へと移行した。GnTI, II, III, IVa, IVb は BDV 持続感染により発現量に大きな変化が見られなかった。一方、GnTV 発現および Ets-1 発現は BDV 持続感染により低下した。BDV 感染により GnTV, Ets-1 発現が低下したことから、BDV 持続感染による PrP の N 型糖鎖構造変化が Ets-1 発現低下に伴う GnTV 発現低下により生じていることが考えられた。細胞密度の上昇と共に SOD 活性は低下し、その低下の程度は BDV 持続感染細胞の方が非感染細胞よりも顕著であった。

プリオン感染時の脳内では PrP^{Sc} の増加と

PrP^C の減少が起きていることが知られており、PrP^{Sc} 蓄積による酸化ストレス発生と PrP^C 減少に伴う抗酸化ストレス活性低下が DNA などの酸化損傷を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、PrP^C 欠乏状態で酸化ストレスが発生すると DNA 損傷が起こるのかについて解析するため、PrP^C 欠乏状態である HpL を血清除去することにより DNA 損傷が起きるのかと PrP 再導入によりそれが抑制されるのかについて、代表的な DNA 損傷マーカーである chk1 のリン酸化を指標に解析を行った。Ser345 がリン酸化した chk1 を認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析したところ、血清存在下において HpL-EM のリン酸化 chk1 は検出限界以下であったが血清除去 18 時間より検出され、血清除去 24 時間でピークとなった。一方、HpL-PrP では血清存在下と非存在下のいずれにおいても検出限界以下であった。これらことから、血清除去が DNA 損傷を誘導するとともに、PrP^C 発現は DNA 損傷抑制に関連しているものと考えられた。

D. 考察

プリオン感染脳において DNA 損傷マーカーの 8-OHdG と尿中において脂質過酸化のマーカーである尿中イソプラタンの増加が早期に観察されたことから、酸化ストレス損傷がプリオン病の発症に役割を果たしていることが考えられた。また、HpL を用いた解析から、PrP^C 発現が間接的に DNA 損傷を抑制する可能性が示されたため、プリオン病発症時にみられるマウス脳内の DNA 損傷が PrP^C 減少によるものかについて、さらなる解析が必要である。

BDV は神経親和性のモノネガウイルスであり、細胞増殖に影響を与えることなく中枢神経系細胞へ持続感染を成立させることが知られている。また、BDV 持続感染グリア系培養細胞が Heat shock, 過酸化水素付加, 血清除去などの酸化ストレスに対して脆弱性を示すことが報告されている(参考文献 3)。今回の結果より、BDV が持続感染した細胞では抗酸化ストレス能が低下しており、さらに GnTV 発現低下に伴う PrP の N 型糖鎖構造変化が見られることが分かった。我々は PrP^C が抗酸化ストレス活性制御に関与することをこれまでに明らかにしてお

り、BDV 持続感染による抗酸化ストレス能低下は、PrP^C の N 型糖鎖構造変化と関連があるのではないかと考えられた。

E. 結論

プリオン感染時には酸化ストレス動態に変化がおこり、発症時には脳内において DNA などの生体分子の酸化的損傷が生じていることが示唆された。PrP^C 発現は間接的に DNA 損傷を抑制する働きを持つことが明らかとなり、プリオン感染時には PrP^C の減少が起きることでその働きが減弱するものと考えられた。また、PrP^C の機能低下は、プリオン感染以外にも BDV 持続感染により誘導される PrP^C の糖鎖構造を変化でも引き起こすことができることが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226, 1999.
- 2) Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6:589-601, 2006.
- 3) Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Lee BJ, Tsuji S, Ikuta K, Tomonaga K. Persistent borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress. *J Virol* 79:2033-2041, 2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uraki R, Sakudo A, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Zanusso G, Toniolo A, Onodera T. Penetration of infectious prion protein in the intestine during the lactation period. *Mini-Rev Org Chem* 9:27-30, 2011.
- 2) Uraki R, Sakudo A, Michibata K, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Onodera T. Blocking of FcR suppresses the intestinal invasion of scrapie agents.

PLoS One 6:e17928, 2011.

- 3) Sakudo A, Ano Y, Onodera T, Nitta K, Shintani H, Ikuta K, Tanaka Y. Fundamentals of prions and their inactivation. *Int J Mol Med* 27:483-489, 2011.
- 4) Sakudo A, Onodera T. Tissue- and cell type-specific modification of prion protein (PrP)-like protein Doppel, which affects PrP endoproteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 404:523-527, 2011.
- 5) Ano Y, Sakudo A, Onodera T. The role of microglia in oxidative toxicity associated with encephalomyocarditis virus infection in the central nervous system. *Int J Mol Sci* 13:7365-7374, 2012.
- 6) Xue G, Aida Y, Onodera T, Sakudo A. The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS ONE* 7:e32870, 2012.
- 7) Sakudo A. Bioorganic chemistry for medicine and health sciences. *Mini-Rev Org Chem* 9:2, 2012.
- 8) Uraki R, Sakudo A, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Zanusso G, Toniolo A, Onodera T. Penetration of Infectious Prion Protein in the Intestine During the Lactation Period. *Mini-Rev Org Chem* 9:27-30, 2012.
- 9) Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Kono J, Yukawa M, Onodera T. Intestinal transmission of prion proteins and role of exosomes in enterocytes. *Food Safety* 1:2013005, 2013.
- 10) Hirata A, Hori Y, Koga Y, Okada J, Sakudo A, Ikuta K, Kanaya S, Takano K. Enzymatic activity of a subtilisin homolog, TK-SP, from thermococcus kodakarensis in detergents and its ability to degrade the abnormal prion protein. *BMC biotechnol* 13:19, 2013.
- 11) Onodera T, Sakudo A. Introduction. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, Norfolk, pp1-3, 2013.
- 12) Sakudo A. Prion protein and the family members, Doppel and Shadoo. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, Norfolk, pp5-10, 2013.

- 13) Onodera T, Sugiura K, Matsuda S, Sakudo A. Function of cellular prion protein. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, Norfolk, pp11-29, 2013.
- 14) Sakudo A. CWD and other prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, Norfolk, pp111-118, 2013.
- 15) Sakudo A, Onodera T. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). In: Liu D Ed. Manual of security sensitive microbes and toxins, CRC Press, New York, pp611-624, 2013.
- 16) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from thermococcus kodakarensis KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press.
- 17) 作道章一、田中康春. プリオン蛋白質 (PrP) と PrP ファミリー蛋白質. *防菌防黴* 39:77-81, 2011.
- 18) 小野寺節, 作道章一. 遅発性感染症に関する研究とフランス国立ヒト遺伝研究所訪問. *日仏生物学会誌 (Bulletin de la Societe Franco-Japonaise de Biologie)* 52:73-80, 2012.
- 19) 作道章一. はじめに. 作道章一・編 食・健康の高安全化 ―殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp1, 2012.
- 20) 高山正彦, 作道章一. 殺菌, 滅菌, 消毒, 不活技術に関する基礎用語の意味. 作道章一・編 食・健康の高安全化 ―殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp27-33, 2012.
- 21) 作道章一, 松田 盛. 滅菌処理の評価法と無菌性保証. 作道章一・編 食・健康の高安全化 ―殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp34-41, 2012.
- 22) 作道章一. ウイルス. 作道章一・編 食・健康の高安全化 ―殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp233-243, 2012.
- 23) 作道章一. プリオン. 作道章一・編 食・健康の高安全化 ―殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京, pp263-271, 2012.
- 24) 作道章一. プリオン. 小林典裕, 上田 宏, 三宅司郎, 荒川秀俊・編 免疫測定法の基礎と応用, 講談社サイエンティフィク, 東京, in press.

2. 学会発表

- 1) Sakudo A, Uraki R, Onodera T. Establishment of prion protein gene-deficient macrophage-like cell lines. Asian Pacific prion Symposium 2011, Karuizawa, July 7-9, 2011.
- 2) Koga Y, Tanaka S, Sakudo A, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of PrP^{Sc} with a thermostable protease and the analysis of its infectivity. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 3) Hori Y, Hirata A, Koga Y, Sakudo A, Ikuta K, Kanaya S, Takano K. Degradation of abnormal prion protein by a hyper-stable protease. Amsterdam, Prion 2012, May 9-12, 2012.
- 4) 作道章一, 浦木隆太, 田中康春, 小野寺節. プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞株を用いた正常型プリオン蛋白質の機能解析: マクロファージ様細胞の作製と性状解析. 第95回琉球大学保健科学研究会, 沖縄, 4.8, 2011.
- 5) 平田あずみ, 古賀雄一, 田中俊一, 作道章一, 生田和良, 金谷茂則, 高野和文. Tk-subtilisinによる異常型プリオンタンパク質分解効果の生物学的検討. 第23回日本生体防御学会学術集会 第23回日本生体防御学会学術集会, 東京, 7.9-11, 2012.
- 6) 松田 盛, 花城日向子, 作道章一. プリオン蛋白質ファミリーShadooの組織局在解析. 第23回日本生体防御学会学術集会, 東京, 7.9-11, 2012.
- 7) 花城日向子, 松田 盛, 小野寺節, 作道章一. プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損株を用いたプリオン関連蛋白質 Shadooの発現解析. 第60回日本ウイルス学会, 大阪, 11.13-15, 2012.
- 8) 作道章一. プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損細胞株を用いたPrPの機能解析. 第155回日本獣医学会学術集会, 東京, 3.28-30, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン病における細胞機能障害の解析

研究分担者：坂口末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門
研究協力者：森 剛志 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門
研究協力者：内山圭司 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門
研究協力者：宮田博規 産業医科大学教育研究支援施設動物研究センター

研究要旨 プリオン病の神経変性のメカニズムは不明である。我々は、正常プリオン蛋白質 (PrP^C) を培養細胞 HEK293T に過剰発現させると、オートファジーが活性化し、細胞死を誘導することを見出した。このオートファジーの活性化は、Src ファミリーの Fyn を介していた。また、PrP 結合分子として同定した Lrp11 (low density lipoprotein receptor-related protein 11) も同様にオートファジーを活性化させた。これらの結果は、過剰な PrP^C が Lrp11 と結合し、Fyn の活性化を介してオートファジーを活性化させる可能性を示した。また我々は、プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が選択的に障害され、ある種の細胞膜蛋白質の細胞膜発現が低下していることを見出した。異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は小胞輸送に重要なエンドソーム分画、特にリサイクリングエンドソームに蓄積していた。これらの結果は、プリオンがポストゴルジ小胞輸送を障害し、神経細胞死を起こす可能性を示した。

A. 研究目的

プリオン病の治療法開発には、プリオンによる神経変性のメカニズムを解明することが重要である。しかし、プリオン病の神経変性のメカニズムは不明である。本研究では、プリオン病の神経変性メカニズムを解明することを目指し、PrP^C を過剰発現した時の細胞機能異常、またプリオンが感染した時の細胞機能異常について解析することにした。その結果、PrP^C が過剰発現するとオートファジーが活性化されること、またプリオンが感染するポストゴルジ小胞輸送が障害されることを見出した¹⁾。

B. 研究方法

PrP^C の過剰発現: 全長 PrP をコードする cDNA を哺乳動物発現ベクター pcDNA3.1 (-) に挿入した。これら発現ベクターは HEK293T 細胞にリポフェクション法を用いて導入した。

ウェスタンブロット (WB) 解析: トランスフェクション 48 時間後の細胞、またはマウス脳を乳剤化し、それぞれの抗体を用いて WB を行なった。

プリオン感染細胞: N2aC24 細胞はマウス神

経芽細胞腫 N2a 細胞にマウス PrP^C 過剰発現させたクローン細胞、N2aC24L1-3 細胞はマウス馴化 22L スクレーピープリオンを感染させクローン化したプリオン感染細胞、cured N2aC24L1-3 細胞は N2aC24L1-3 細胞を SAF32 抗プリオン抗体にて治療した細胞である。

マウスへのプリオン感染: ICR マウスの脳内にマウス馴化 RML 及び 22L プリオンを接種した。

細胞膜蛋白質のビオチン化: 細胞及びスライスしたマウス脳を、ビオチン化し、その後アビジンビーズでビオチン化蛋白質を精製し WB に供した。

細胞内小胞輸送アッセイ: GFP 融合温度感受性変異体 vesicular stomatitis virus G 蛋白質 (VSV-G (ts045)-GFP) をのプラスミドを細胞に非許容温度下でトランスフェクションし、16 時間後に許容温度に戻し、経時的に細胞を抗 GFP 抗体とゴルジマーカ GM130 に対する抗体を用いて免疫染色した。細胞全体の蛍光強度に対するゴルジ装置に局在する GFP の蛍光強度の比を求めた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験や動物実験については、徳島大学及び産業医科大学の遺伝子組み換え安全委員会や動物実験委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

PrP^CはLrp11と結合し、Fynを介してオートファジーを活性化する：我々は、HEK293T細胞にPrP^Cを過剰発現させると、オートファジーが活性化され、細胞死を誘導することを報告した。また我々は、酵母 two hybrid 法により、Lrp11をPrP結合分子として同定した。その結合は、GST pull-down法により確認した。Lrp11をHEK293T細胞に過剰発現させたところ、PrP^Cと同様に顕著なオートファジーが誘導された。

プリオン感染 N2a 細胞では、非感染の N2a と比較してオートファジーが増強しており、また、Lrp11 の転写レベルが上昇していた。プリオン感染 N2a 細胞に Lrp11 を過剰発現させると、オートファジーがさらに強くなった。

さらに我々は、Src ファミリーである Fyn が、PrP^C により誘導されるオートファジーに関与していることを見出した。Fyn の活性化型 CA-Fyn を PrP と同時に HEK293T 細胞に導入したところ、オートファジーが増強された。逆に DN-fyn を導入すると PrP^C 過剰発現によるオートファジーが抑えられた。

プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が障害される¹⁾：VSV-G(ts045)-GFP を用いた細胞内小胞輸送アッセイを行なったところ、N2aC24L1-3 細胞では、ゴルジ装置から細胞膜までの小胞輸送が遅延していた。また N2aC24L1-3 細胞では、細胞膜蛋白質である PrP^C、インスリン受容体、アトラクチンの細胞膜発現が低下していた。一方で、PrP^C とインスリン受容体はゴルジ装置に蓄積していた。

次に、RML 及び 22L プリオン感染マウス脳における細胞膜蛋白質の細胞膜発現について解析した。その結果、PrP^C、インスリン受容体、Thy-1 の細胞膜発現が低下していた。しかし、グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR3 や NR1 の細胞膜発現は低下していなかった。この結果は、プリオンによるポストゴルジ

小胞輸送障害が選択的であることを示唆した。

さらに、RML プリオン感染後、2 日、62-68 日、80-87 日、及び末期にマウス脳を摘出し、PrP^C とインスリン受容体の細胞膜発現を解析した。PrP^{Sc} は感染後 68 日から検出でき、病気の進行とともに増加した。PrP^C とインスリン受容体の細胞膜発現は感染後 62-68 日から低下が始まり、病気が進行するとともに低下した。これらの結果は、PrP^{Sc} の蓄積がポストゴルジ小胞輸送障害を引き起こし、その結果神経変性を起こしている可能性を示した。

最後に、PrP^{Sc} の細胞内局在を、mAb132 を用いて検索した。その結果、PrP^{Sc} はエンドソーム分画に検出でき、特にリサイクリングエンドソームに多く検出された。

D. 考察

我々は、HEK293T 細胞に PrP^C を過剰発現させると、オートファジーが活性化され、細胞死を誘導することを見出した。また、このオートファジーの活性化が Fyn を介したものであることも見出した。さらに我々は、HEK293T 細胞に PrP 結合分子である Lrp11 を過剰発現させると、オートファジーが活性化されることも見出した。プリオン感染細胞でも、Lrp11 の発現が上昇しており、オートファジーが活性化されていた。プリオン感染細胞では、PrP^{Sc} が過剰に蓄積する。従って、これらの結果から、過剰な PrP^C または PrP^{Sc} が Lrp11 と結合し、Fyn の活性化を介してオートファジーを活性化させ、細胞死を誘導する可能性が考えられた。

また我々は、プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が選択的に障害され、ある種の細胞膜蛋白質の細胞膜発現が低下することを見出した¹⁾。PrP^{Sc} はエンドソーム分画、特にリサイクリングエンドソームに蓄積することも見出した¹⁾。以上の結果は、プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリングエンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、その結果神経細胞死が引き起こされる可能性を示した。

E. 結論

PrP^C が過剰発現すると、Lrp11 と結合し、Src ファミリーである Fyn を介してオートファジー

を誘導する可能性が示された(図 1)。また、プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリングエンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、それによって神経障害をきたす可能性が考えられた(図 2)。

[参考文献]

1) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat Commun* 4:1846, 2013.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine* 29:9321-9328, 2011.

2) Fujita K, Yamaguchi Y, Mori T, Muramatsu N, Miyamoto T, Yano M, Miyata H, Ootsuyama A, Sawada M, Matsuda H, Kaji R, Sakaguchi S. Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. *Cell Mol Neurobiol* 31:999-1008, 2011.

3) Yamaguchi Y, Miyata H, Uchiyama K, Ootsuyama A, Inubushi S, Mori T, Muramatsu N, Katamine S, Sakaguchi S. Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions. *PLoS ONE* 7:e43540, 2012.

4) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing β -form but not α -form of prion protein. *J Biol Chem* 287:14023-14039, 2012.

5) Uchiyama K, Miyata H, Sakaguchi S. Disturbed vesicular trafficking of membrane proteins in prion disease. *Prion* 7:1-5, 2013.

6) Kimura T, Sako T, Siqin, Hosokawa-Muto J, Cui YL, Wada Y, Kataoka Y, Doi H, Sakaguchi S, Suzuki M, Watanabe Y, Kuwata K. Synthesis of an (11) C-labeled antiprion GN8 derivative and evaluation of its brain uptake by positron emission tomography. *Chem Med Chem* 8:1035-1039, 2013.

7) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat Commun* 4:1846, 2013.

8) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. *PLoS ONE* 8:e60627, 2013.

9) Uchiyama K, Sakaguchi S. Immunological strategies for the prevention and treatment of prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in Advanced Research. Caister Academic Press, Norfolk, pp75-92, 2013.

10) 坂口末廣. 44 章スローウイルスとプリオン. 吉開泰信, 西山幸廣・編, レビンソン微生物学・免疫学 [原書 11 版], 丸善出版, 東京, pp321-325, 2012.

11) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン病における神経変性のメカニズム. *Clin Neurosci* 31:1022-1024, 2013.

2. 学会発表

1) Sakaguchi S. Roles of a prion protein family in neurodegeneration. Enzyme Research Forum 2011 in Nantong University, Nantong, March 15-17, 2011.

2) Sakaguchi S. The role of the N-terminal region of prion protein in prion disease. 8th IBRO World Congress of Neuroscience International Brain Research Organization, Florence, July 14-18, 2011.

3) Sakaguchi S, Uchiyama K. Prions impair post-Golgi trafficking of membrane proteins. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

4) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染細胞における細胞内小胞輸送の抑制. 第 26 回中国四国ウイルス研究会, 徳島, 6.18-19, 2011.

5) 坂口末廣, 宮田博規, 山口仁孝, 村松直美,