

のように構造に多形が存在することが明らかになった。また、興味深いことに、*S. cerevisiae* の Sup35NM アミロイドに見られるような、プリオンドメインのアミノ末端領域とは異なる部分にコア領域を見出した。さらに NMR を用いた解析から、この *K. lactis* の Sup35NM アミロイドのコアを形成するアミノ酸領域は、Sup35NM モノマーの状態であり、より揺らぎの顕著な領域であることが明らかになった。また、チオフラビン T の蛍光を用いた *in vitro* での解析から、*K. lactis* の、特異な構造をもつ Sup35NM アミロイドが異種間プリオン感染能を示すことを見出した。このようなアミロイド構造に依存した異種間でのプリオン感染は、蛋白質直接感染法を用いた *in vivo* におけるプリオン感染実験<sup>2)</sup>からも示唆された。

#### D. 考察

*K. lactis* の Sup35NM には少なくとも二つのアミノ酸領域がアミロイドのコアになり得るポテンシャルを有すること、Sup35NM モノマー内の局所的な揺らぎが最終的に生じるアミロイドのコア領域を決定する要因であることが示唆された。さらに、異種間におけるプリオン感染には、二つの酵母種において、Sup35NM アミロイドのコアを形成するアミノ酸組成の一致度が重要な因子となることが示唆された。

#### E. 結論

異種間プリオン感染の分子機構を酵母プリオンの系を用いて、アミノ酸レベルで詳細に調べるために、主鎖アミドプロトン由来 NMR シグナルの帰属など、様々な実験系を構築した。また、異種間プリオン感染を有する *K. lactis* Sup35NM のアミロイド構造を見出し、二種類の酵母間において、アミロイドのコアを形成する領域のアミノ酸組成の一致度が異種間プリオン感染能を決定する要因の一つであることが示唆された。

#### [参考文献]

- 1) Ohhashi Y, Ito K, Toyama BH, Weissman JS, Tanaka M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat Chem Biol* 6:225-230, 2010.
- 2) Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442:585-589, 2006.
- 3) Santoso A, Chien P, Osherovich LZ, Weissman JS. Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell* 100:277-288, 2000.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sugiyama S, Tanaka M. Self-propagating amyloid as a critical regulator for diverse cellular functions. *J Biochem* 155:345-351, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) Tanaka M, A Prion-like protein aggregate triggers host cell defense by induction of catastrophic viral mutagenesis, Prion 2014, Torieste, May 27-30, 2014.
- 2) Tanaka M, Yeast prion promotes acquired cellular adaptation to environmental stress, Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

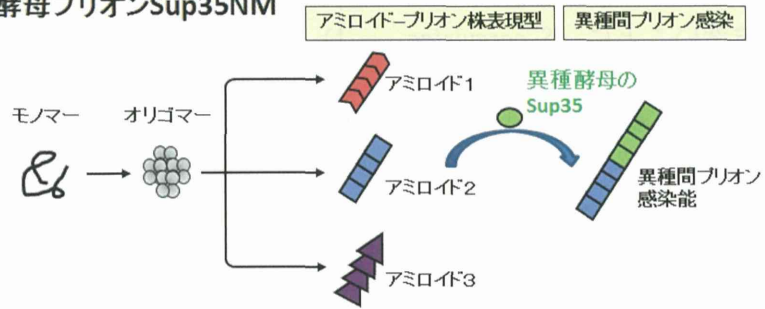
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

酵母プリオンSup35NM



- 1) SC-KL間で異種間プリオン感染を調べる実験系の確立
- 2) SC-KL間で異種間プリオン感染能を示すアミロイド構造の同定

図1 酵母を用いた異種間プリオン感染機構の解明

## 厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業

（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

## プリオン感染動物の体内におけるプリオン多様性と病態の解析

研究分担者：宮澤光太郎	農研機構動物衛生研究所	インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：舩甚賢太郎	農研機構動物衛生研究所	インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：岡田洋之	農研機構動物衛生研究所	インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：三輪律子	農研機構動物衛生研究所	インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：多辺田奈保子	農研機構動物衛生研究所	インフルエンザ・プリオン病研究センター

**研究要旨** 野生型マウスとヒツジプリオンタンパク質過発現 (TgOvPrP59) マウスの 2 系統のマウスを用いたスクレイピーの伝達試験により、スクレイピー感染ヒツジ体内のスクレイピープリオンの多様性を検証した。その結果、スクレイピー野外発症例の脳、末梢神経組織、リンパ組織に少なくとも 2 種類の性状の異なるスクレイピープリオンが共存することを明らかにした。

## A. 研究目的

これまでの報告から、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD) 患者の脳やスクレイピー感染ヒツジの体内に性状の異なる複数のプリオンが存在する可能性が示唆されている。ヒツジ体内 (脳および末梢組織) に分布するプリオンの特徴を明らかにしておくことは、同じく複数の CJD プリオンの混在が考えられるヒトでの治療や薬剤の選択にとって重要な知見を提供できる。本研究では、動物モデルを用いてスクレイピープリオンの多様性を明らかにする。

## B. 研究方法

定型スクレイピープリオンの異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) よりも PK 消化後の分子量が小さく、約 14kDa の断片を伴う PrP<sup>Sc</sup> から成る CH1641 様スクレイピープリオンは野生型マウスに伝達できない。一方で CH1641 様スクレイピープリオンは TgOvPrP59 マウスには伝達可能であり、マウスの脳に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> は CH1641 様スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> の生化学的特徴を維持している。そこで、定型スクレイピーの野外発症例の脳、坐骨神経および下顎リンパ節の 10% 乳剤を TgOvPrP59 マウスに脳内接種し、伝達率や潜伏期間などの生物学的性状と蓄積する PrP<sup>Sc</sup> の生化学的性状を調べて伝達したスクレイピープリオンを判別した。

## （倫理面への配慮）

プリオンの取り扱いについては、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針 (平成 15 年 10 月)」を遵守し、(独) 農研機構動物衛生研究所バイオセーフティ委員会承認を得た。プリオン動物実験は (独) 農研機構動物衛生研究所動物実験委員会にて承認後、同所動物実験等実施要領に則ってバイオセーフティレベル 3 実験動物飼育施設で実施した。カルタヘナ法に係る組換え DNA 実験は (独) 農研機構動物衛生研究所遺伝子組換え生物等使用安全委員会の承認の後に実施した。

## C. 研究結果

① 定型スクレイピー野外発症ヒツジの脳を接種した TgOvPrP59 マウスのうち、潜伏期間の短い個体は CH1641 様スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積し、長い個体は定型スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した (図 1)。② 定型スクレイピー野外発症ヒツジの坐骨神経を TgOvPrP59 マウスに接種した場合は、発症個体は全て定型スクレイピーの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した (表 1)。一方、下顎リンパ節を接種したマウスでは伝達率が低く、発症した個体は CH1641 様スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した (表 1)。

**D. 考察**

定型スクレイパーを発症したヒツジの脳、末梢神経組織およびリンパ組織には定型スクレイパープリオンと CH1641 様スクレイパープリオンが混在している。また、CH1641 様スクレイパープリオンは末梢神経よりもリンパ組織でより増幅しやすいことが示唆された。

**E. 結論**

ヒツジの脳やリンパ組織には複数のスクレイパープリオン株が共存している。また、スクレイパープリオン株により増幅しやすい組織が存在することが示唆される。

**[参考文献]**

- 1) Polymenidou M, Stoeck K, Glatzel M, Vey M, Bellon A, Aguzzi A. Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol* 4:805-814, 2005.
- 2) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S. Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS one* 5:e15450, 2010.

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表****1. 論文発表**

- 1) Miyazawa K, Okada H, Iwamaru Y, Masujin K, Yokoyama T. Susceptibility of GT1-7 cells to mouse-passaged field scrapie isolates with a long incubation. *Prion* 8:306-313, 2014.

**2. 学会発表**

- 1) Miyazawa K, Okada H, Masujin K, Yokoyama T. GT1-7 cells accumulate disease-associated prion protein in response to mouse-passaged field scrapie isolates with a long incubation period. 第 62 回日本ウイルス学会, 横浜, 11.10-12, 2014.

**H. 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

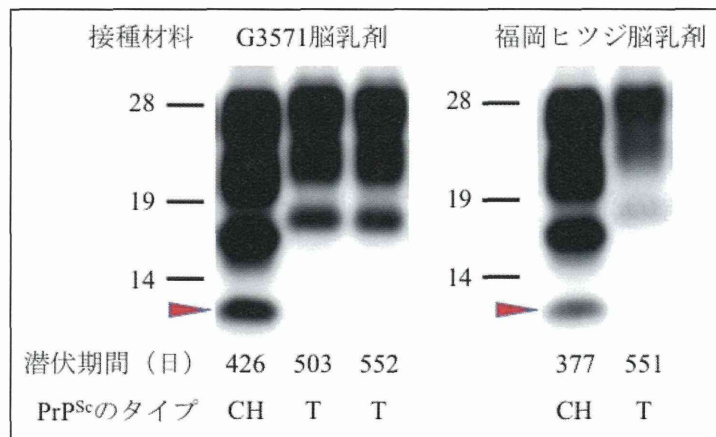


図 1 定型スクレイピー野外発症例の脳乳剤を接種した TgOvPrP59 マウスの脳に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> のバンドパターンを示す。接種材料名を図の上、各個体の潜伏期間と脳に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> のタイプを下に示す。CH は CH1641 様スクレイピープリオン、T は定型スクレイピープリオンを表す。PrP<sup>Sc</sup> の検出には mAb SAF84 を使用した。赤矢頭は CH1641 様スクレイピープリオンに特異的な~14kDa の断片を示す。

接種材料	発症マウス/接種マウス	発症マウスに蓄積した PrP <sup>Sc</sup> のタイプ	
		定型	CH1641 様
脳	11/12	5	6
坐骨神経	4/5	4	0
下顎リンパ節	1/5	0	1

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業  
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

## プリオン病の治療薬開発に向けた感染モデル動物の開発

研究分担者：毛利資郎 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野  
 研究協力者：松浦裕一 動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター  
 研究協力者：小林篤史 北海道大学大学院獣医学研究科比較病理学教室  
 研究協力者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野

**研究要旨** プリオン病における医薬品開発にはモデル動物が必要である。しかしながら、ヒト遺伝性プリオン病のうち、わが国で最も頻度の高いコドン 180 に valine から isoleucine の変異を有するクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD-V180I)の感染モデルはまだ存在しない。そこで、われわれはヒト型プリオン蛋白質を発現するノックインマウスに伝達するために、感染実験をおこなった。脳内接種の後、最大 812 日間の観察を続けた結果、接種された 3 系統のノックインマウスには、免疫組織検査とウエスタンブロッティングで、プロテアーゼ耐性の異常なプリオンたんぱく質の蓄積は認められなかった。そこで、CJD-V180I の感染を容易くする目的で、新たに V180I のヒトプリオン蛋白質遺伝子変異導入マウスを作製した。このマウスは、ヒト型プリオン蛋白質遺伝子を発言し、長期間観察により、自然発症もしくは異常なプリオンたんぱく質の蓄積は認められなかった。

### A. 研究目的

医薬品の開発には薬効試験を含めた前臨床試験が不可欠であり、プリオン病における医薬品開発にはヒトプリオンが伝達可能なモデル動物が必要である。これまで、多くのヒトプリオンについて遺伝子改変マウスの伝達(感染)モデルを作製した。しかし、遺伝的ヒトプリオン病のうち、わが国で最も頻度の高いコドン 180 に valine から isoleucine の変異を有するクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD-V180I)の感染モデルはまだ存在しない。この研究では、CJD-V180I の感染モデルを確立し、病因・病態の解明、あるいは予防・治療薬開発時の薬効試験等に供することを目的とする。

### B. 研究方法

CJD-V180I の 10%脳乳剤を、コドン 129 methionine (KiHu129M)、コドン 129 valine (KiHu129V)、コドン 129 valine+コドン 219 lysine (KiHu129M/219K)、3 系統の多型を有するヒト型遺伝子ノックインマウス(ヒト化マウス)の脳内にそれぞれ 20 $\mu$ l を接種した。接種後、何らかの症状を示したマウスは、安楽死の後、免

疫組織検査、ウエスタンブロット(WB)により、伝達の有無を確認した。また、ヒト型遺伝子 V180I の変異を有するノックインマウス (KiHu180I) を作製し、プリオン蛋白質(PrP)の発現を確認し、自然発症の有無を調べた。

### (倫理面への配慮)

この動物実験計画は「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験指針」にもとづき、(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物実験規程により、動物衛生研究所の審査を受け、承認されている。

### C. 研究結果

CJD-V180I のヒト脳乳剤を接種されたヒト化マウス 3 系統をそれぞれ最大 812 日まで観察した。免疫組織検査と WB で、それぞれプロテアーゼ(PK)抵抗性の異常なプリオンたんぱく質の蓄積は認められなかった(表 1)。

新たに作製した KiHu180I マウスは他のヒト化マウスと同程度の PrP の発現が観察された。長期間観察により、自然発症は認められず、免疫組織検査と WB でも PK 抵抗性の異常なプリ

オンたんぱく質の蓄積は認められなかった。

#### D. 考察

CJD-V180Iの実験動物への感染はこれまで報告されていないが、われわれのヒトの多型を有するヒト化マウス3系統の脳内接種による長期観察の結果でも感染は成立しなかった(表1)。CJD-V180IのPrP遺伝子に相同のV180I変異を有するKiHu180Vマウスは、長期観察後もPK抵抗性の異常なPrPの蓄積は認められなかった。したがって、このマウスでは接種後に異常なPrPの検出が認められた場合、自発性ではなく感染によるものである。よって、このマウスは感染モデルマウスの候補となり得ると考えられた。

#### E. 結論

CJD-V180Iのヒト化マウスへの感染実験ではPK抵抗性の異常なPrPの蓄積が認められなかった。

新しくヒト化マウスKiHu180Iを作製した。このマウスでPrPの発現は認められたが、異常なPrPの蓄積は認められなかった。

#### [参考文献]

- 1) Xiao X, Yuan J, Haik S, Cali I, Zhan Y, et al. Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease. *PLoS One* 8:e58786, 2013.
- 2) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, et al. Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One* 8:e60003, 2013.
- 3) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, et al. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. *Neuropathol* 31:540-548, 2011.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun* 2:32, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.
- 2) 小林篤史, 岩崎 靖, 大塚浩之, 山田正仁, 吉田眞理, 松浦裕一, 毛利資郎, 北本哲之. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 MV2 の新分類. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6.5-7, 2014.

#### H. 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

表1 遺伝性プリオン病 V180I のヒト化マウスへの感染試験成績

ヒト化マウス	KiHu129M		KiHu129V		KiHu129M・219K	
接種材料\マウスデータ	感染頭数 /接種頭数	観察日数	感染頭数 /接種頭数	観察日数	感染頭数 /接種頭数	観察日数
AkV180I	0/5	746,769, 812.812, 812	0/6	563,612,7 40,780, 812,812	0/5	546,614, 650,740, 812
MiV180I	0/4	447,725, 745,812	0/4	725,812,8 12,812	0/4	504,539, 740,752



厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業  
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 分担研究成果報告書

## プリオン感染マウスのアストロサイトの活性化状態の解析

研究分担者：堀内基広 北海道大学大学院獣医学研究科  
 研究協力者：黒田弥乃梨 北海道大学大学院獣医学研究科

**研究要旨** プリオン感染動物の脳では著しいアストロサイトの増生が認められるが、アストロサイトのプリオン病病態への関与は十分に理解されていない。そこで本研究ではプリオン病でのアストロサイトの活性化状態を解析した。免疫磁気分離法により、ACSA-2(アストロサイト細胞膜表面抗原)陽性細胞集団を分離した。分離細胞中の ACSAS-2 陽性細胞は 90%以上であり、CD11b(ミクログリアマーカー)および CD31(血管内皮細胞マーカー)の陽性率は 0.5%以下であった。また、ACSA-2 陽性細胞は GFAP 陽性および陰性細胞の両方を含んでいたが、ACSA-2 陰性細胞中に GFAP 陽性細胞は存在しなかったことから、ACSA-2 が広くアストロサイトマーカーとして使用できると考えられた。プリオン病あるいは神経変性疾患等で、アストロサイトで発現上昇が認められるサイトカイン、ケモカイン、および神経栄養因子とそれらの受容体、計 11 の遺伝子の発現を TaqMan Assay により調べたところ、*CXCL10* の発現がプリオン接種後 90 日および 120 日で有意に上昇し、病末期には非感染マウス脳由来アストロサイトと同程度まで減少した。*CXCL10* 欠損マウスにスクレイパー帯広株を接種した場合、野生型マウスと比較して潜伏期が短くなることから、*CXCL10* はプリオン病の病態進行に抑制的に働くことが示唆された。

### A. 研究目的

プリオン感染動物の脳ではグリア細胞が著しく活性化する。このうち、ミクログリアが病態の進行に関与することを示す成績は蓄積しつつあり、ミクログリアの活性化状態により病態進行を促進、あるいは抑制する方向に働くことが明らかになりつつある。一方、アストロサイトの関与は十分な理解が得られていない(Schultz et al, 2004)。そこで本研究ではプリオン病でのアストロサイトの活性化状態を解析するために、プリオン感染マウスの脳からアストロサイトを分離する方法を確立して、分離したアストロサイトの遺伝子発現を調べることにより、アストロサイトの活性化状態を解析した。

### B. 研究方法

#### 1) プリオン株およびマウス

スクレイパー帯広株および Chandler 株を用いた。これらのプリオン株を接種して病末期に陥った ICR:Jcl マウスの 2.5%脳乳剤あるいは陰

性対象として Age-match の非感染 ICR:Jcl マウスの脳乳剤を 4 週齢の ICR マウスに脳内接種した。接種後 60、90、120、および 145 日にマウスを安楽殺し、脳を回収した。

#### 2) アストロサイトの分離

脳は Neural Tissue Dissociation Kit(P)(Miltenyi Biotec)で消化した。大量に含まれるミエリンは Myelin Removal Beads II(Miltenyi Biotec)を用いて除去した。その後、ACSA-2 陽性細胞を磁性体結合抗 ACSA-2 抗体を用いて、免疫磁気分離法(MACS)により分離した。カラムに結合した画分を bound fraction、カラムに結合しない画分を flow-through fraction として回収した。

#### 3) フローサイトメーター

PE 標識抗 ACSA-2 抗体(astrocyte marker; Miltenyi Biotec), Alexa Fluor 488 標識抗 CD11b 抗体(microglia marker; Biolegend), Alexa Fluor647 標識抗 CD31(endothelial marker;

Biolegend)を用いて細胞を染色した。死細胞は Fixable Viability Dye eFluor 780(FVD; eBioscience)を用いて染色した。DRAQ5 (eBioscience)の染色により細胞と組織破片を区別した。

#### 4) 定量 RT-PCR

Total RNA は TRizol 試薬(Life Technologies)により回収した。First Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare)を用いて cDNA を合成した。TaqMan Assay による定量 PCR にて、遺伝子の定量発現解析を実施した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学動物実験委員会および北海道大学獣医学研究科動物実験委員会で承認された実験計画書に基づき実施した(承認番号: 13-0141, 13-0143)。

### C. 研究結果

#### 1) アストロサイトの分離

非感染マウス脳から磁性体標識抗ACSA-2抗体を用いてMACSによりACSA-2陽性細胞を分離した画分(bound fraction)のACSA-2陽性率は95%であり、CD11b(ミクログリアマーカー)およびCD31(血管内皮細胞マーカー)の陽性率は0.5%以下であった(図1)。GFAPの遺伝子発現がbound fractionで高くflow-through fractionで低かったことから、ACSA-2陽性細胞の選択によりGFAP発現細胞が豊富な細胞集団が選抜できたと考えられる。また、CD11bおよびCD31の発現がbound fractionで著しく低下していた(図1)。このように、抗ACSA-2抗体を用いるMACSにより、アストロサイトを95%程度の精製度で回収できる方法が確立できた。

プリオン感染マウスから同じ方法でACSA-2陽性細胞を回収した場合、陽性率は85%程度であった(図2)。しかし、FVDおよびDRAQ5染色によりACSA-2陰性画分の性状を調べた結果、ACSA-2陰性画分の60%が核を含まない組織片であった(結果は示さず)。従って、プリオン感染マウスの脳からも、95%程度の精製度でアストロサイトが分離できたと考えられる。

#### 2) アストロサイトの遺伝子発現

プリオン病あるいは神経変性疾患等で、アストロサイトで発現上昇が認められるとの報告がある神経栄養因子とそれらの受容体(*NGF*, *BDNF*, *TrakA*, *TrakB*)、サイトカインおよび炎症性因子(*IL-1 $\beta$* , *IL-1R1*, *iNOS*)、およびケモカイン(*CCL2*, *CXCL10*, *CCR2*, *CXCR3*)の計11の遺伝子の発現をTaqMan Assayにより調べた(図3)。神経栄養因子とその受容体の発現に経時的な変化は認められなかった。*TrakA*は検出限界以下であった。また、*IL-1 $\beta$* および*IL-1R1*の発現も経時的に有意な変化は認められなかった。*iNOS*の発現は帯広株を接種した病末期のマウス(145 dpi)由来アストロサイトで発現上昇が認められた。

調べた遺伝子の中で、*CXCL10*の遺伝子発現に特徴的な傾向が認められた。帯広株およびChandler株接種マウスともに、接種後90日および120日で有意に上昇し、病末期には非感染マウス脳由来アストロサイトと有意差がない程度まで減少した。*CXCL10*の受容体である*CXCR3*の発現は、調べたポイントで有意差は認められなかったが、帯広株およびChandler株接種マウスともに、接種後90日3-4倍程度の増加傾向が認められた。

### D. 考察

今回調べた遺伝子の中で、ケモカイン*CXCL10*の遺伝子が、感染中期(90 dpi)から後期(120 dpi)にかけて発現が上昇し、その後低下するという特徴的な発現変動を示した。このことは、アストロサイトの活性化状態が、病態の進行とともに、一方向性に亢進するのではなく、病態の進行とともに活性化状態がシフトすることを示唆している。我々はミクログリアでも同様の解析を進めているが、ミクログリアでも感染中期(90 dpi)に一過性に*CXCL10*の発現上昇が認められている。

*CXCL10*欠損マウスに帯広株を接種した場合、野生型マウス(WT)と比較して潜伏期が短縮することから(157.9  $\pm$  7.8 [WT] vs 152.1  $\pm$  3.6 [*CXCL10*<sup>-/-</sup>],  $p < 0.05$ )、*CXCL10*は病態進行に抑制的に作用することが示唆される。炎症性のケモカインとして知られる*CXCL10*の神経組織内での機能や役割は不明であるが、プリオン病の

病態を理解する上で、CXCL10 は興味ある分子の一つであると考えられる。

## E. 結論

プリオン感染マウスの脳からアストロサイトを分離する方法を確立した。脳から分離したアストロサイトの遺伝子発現を調べた結果、ケモカイン *CXCL10* の遺伝子発現が、感染中期から後期にかけて発現が上昇し、その後、病末期にかけて低下するという特徴的な変動パターンを示すことを見出した。

## [参考文献]

1) Schultz J, Schwarz A, Neidhold S, Burwinkel M, Riemer C, Simon D, Kopf M, Otto M, Baier M. Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am J Pathol* 165:671-678, 2004.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, Pentosan polysulfate, chlorpromazine and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One* 9:e106516, 2014.
- 2) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun* 454:125-130, 2014.
- 3) Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh TT, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.

Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J Vet Med Sci* 76:1001-1008, 2014.

4) 堀内基広. BSE の発生とその対策を振り返って. *日本獣医師会雑誌* 67:345-353, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Fujiwara A, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of prion infection in primary cortical neurons. Prion 2014, Trieste, May 27-30, 2014.
- 2) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of mechanism for PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody mAb132. Prion 2014, Trieste, May 27-30, 2014.
- 3) Hasebe R, Sakai K, Song C-H, Takahashi Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi, M. Involvement of CD14 in neuropathogenesis of prion diseases. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.
- 4) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. High throughput detection of PrPSc from prion-infected cells without PK-treatment: cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

## H. 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

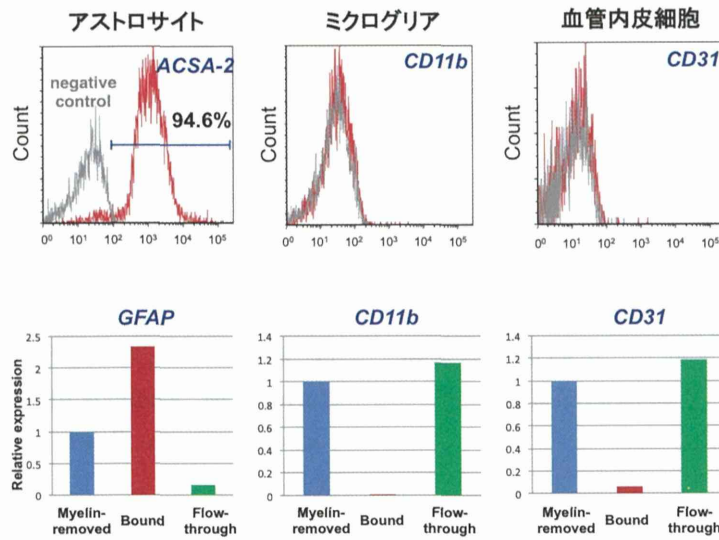


図 1. 非感染マウス脳から MACS により分離したアストロサイトの解析。上段はフローサイトメーター、下段は TaqMan Assay による遺伝子発現解析の結果を示す。

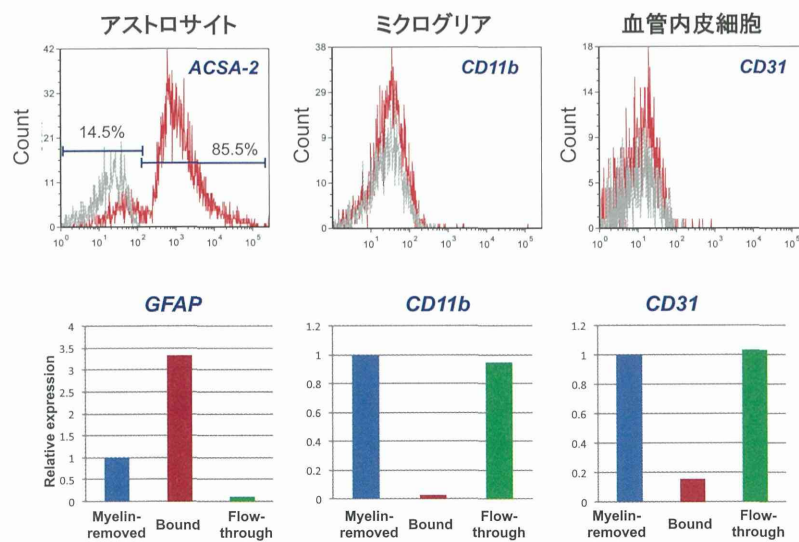


図 2. プリオン感染マウス脳から MACS により分離したアストロサイトの解析。上段はフローサイトメーター、下段は TaqMan Assay による遺伝子発現解析の結果を示す。

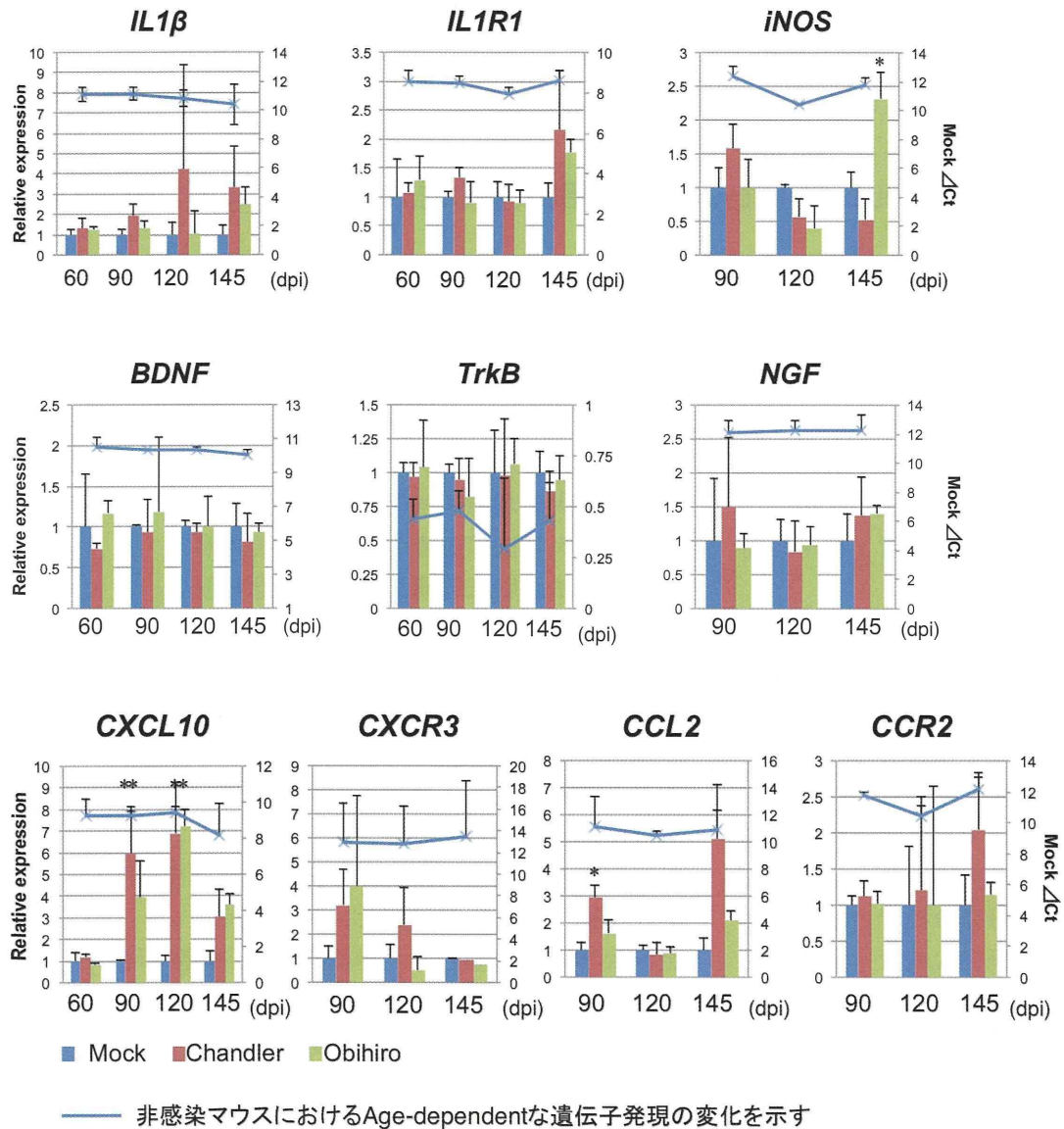


図3. アストロサイトの遺伝子発現。接種後60から145日に脳から分離したアストロサイトの遺伝子発現をTaqMan Assayによる定量RT-PCRにより調べた。青色の折れ線グラフは、非感染マウスにおける各々の遺伝子の経時的な発現変化を示す。

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業  
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

## 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病剖検脳におけるアミロイドβ蛋白の沈着

研究分担者：浜口 毅	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：谷口 優	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：坂井健二	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：北本哲之	東北大学大学院プリオン蛋白研究部門
研究協力者：岩崎 靖	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：高尾昌樹	埼玉医科大学国際医療センター神経内科 公益財団法人脳血管研究所美原記念病院
研究協力者：村山繁雄	東京都健康長寿医療センター研究所神経病理学
研究協力者：内木宏延	福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域
研究協力者：清水 宏	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：柿田明美	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：高橋 均	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：鈴木博義	国立病院機構仙台医療センター
研究協力者：三條伸夫	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学（神経内科）
研究分担者：水澤英洋	国立精神・神経医療研究センター病院
研究代表者：山田正仁	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)

**研究要旨** [目的]硬膜移植で脳βアミロイドーシスが伝播する可能性を検討する。

[方法]16 例の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) および 21 例の孤発性 CJD の剖検脳をアミロイドβ蛋白 (amyloid β: Aβ protein) に対する抗体 (4G8) を用いて免疫染色を行った。それぞれの脳の Aβ沈着面積率、脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy: CAA) の程度、Aβの軟膜下沈着の程度について硬膜移植後 CJD と孤発性 CJD の間で比較した。異常プリオン蛋白沈着程度についても両群間で比較した。

[結果]検討した症例の死亡時年齢、性別、プリオン蛋白遺伝子コドン 129 多型、CJD 罹病機関、異常プリオン蛋白沈着程度については、硬膜移植後 CJD と孤発性 CJD の両群間に有意差を認めなかった。脳への Aβ沈着面積率は、硬膜移植後 CJD (0.43 ± 0.21%)、孤発性 CJD (0.21 ± 0.13%) で、両群間に有意差を認めなかった。CAA スコアは、硬膜移植後 CJD (5.94 ± 1.57)、孤発性 CJD (2.00 ± 0.97) と硬膜移植後 CJD で有意に CAA スコアが高かった ( $p=0.027$ )。CAA スコアを脳実質、髄膜、毛細血管に分けて解析を行ったところ、髄膜 CAA のみ硬膜移植後 CJD で有意に高値を認めた ( $p=0.013$ )。軟膜下沈着の程度についても、硬膜移植後 CJD で有意に score が高値であった ( $p=0.035$ )。Aβ沈着率、CAA score、軟膜下沈着スコアは、死亡時年齢、CJD 罹病期間には有意な相関を認めなかったが、硬膜移植から死亡までの潜伏期間は、CAA スコア ( $r=0.642, p=0.025$ )、髄膜 CAA スコア ( $r=0.644, p=0.010$ ) と軟膜下沈着スコア ( $r=0.642, p=0.010$ ) と有意な正の相関を認めた。

[結論]硬膜移植後 CJD では、孤発性 CJD と比較して、髄膜 CAA や軟膜下 Aβ沈着が有意に多く、その程度は年齢や CJD 罹病期間に相関を認めず、硬膜移植から死亡までの期間と有意な正の相関を認めた。

## A. 研究目的

近年、動物実験にて、脳βアミロイドーシスもプリオン病と同様に個体間を伝播すると報告されている<sup>1</sup>。しかし、これまでに、ヒトでは、脳βアミロイドーシスが個体間を伝播したという報告はない。プリオン病では、医療行為によってヒトの個体間をプリオン病が伝播していることが報告され、わが国では硬膜移植によって伝播した硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) が多発していることが大きな社会問題となっている。今回の研究では、硬膜移植によって、プリオン病だけでなく、脳βアミロイドーシスもヒトの個体間で伝播している可能性を検討した。

## B. 研究方法

これまでに CJD サーベイランス委員会に登録されている症例で、剖検脳の未染標本を使用可能であった 16 例の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) について、異常プリオン蛋白に対する抗体(3F4)、アミロイドβ蛋白 (amyloid β: Aβ protein) に対する抗体(4G8)を用いて免疫染色を行った。対照群として、年齢、性別を合わせた 21 例の孤発性 CJD の剖検脳を同様に免疫染色を行った。各症例の臨床情報については、CJD サーベイランス委員会に登録された情報を利用した。

それぞれの脳の Aβ沈着面積率は、前頭葉、側頭葉、後頭葉の皮質を 20 倍の対物レンズを用いてそれぞれ 30 枚ずつ写真を撮影し、WinRoof<sup>®</sup>にて陽性面積を測定した。脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy: CAA) については、hybrid protocol for scoring CAA and CAA associated vasculopathy (CAA スコア)<sup>2</sup>を用いて行った。Aβの軟膜下沈着については、以前に報告した score (軟膜下沈着スコア)<sup>3</sup>を用いて行った。異常プリオン蛋白の沈着程度については、Reinigerらが以前に報告したスコア (プリオン蛋白沈着スコア)<sup>4</sup>を用いて行った。それぞれの評価は、症例の背景を隠した状態で行った。

硬膜移植後 CJD と孤発性 CJD 間の、死亡時年齢、CJD 罹病期間、プリオン蛋白沈着スコア、Aβ沈着面積率、CAA スコア、軟膜下沈着スコアについては、Mann-Whitney U test にて検討を行った。症例の性別とプリオン蛋白コドン 129 多型につい

ては、Fisher exact test にて検討を行った。死亡時年齢、CJD 罹病期間、硬膜移植から死亡までの期間と Aβ沈着面積率、CAA スコア、軟膜下沈着スコアの相関については、ピアソンの積率相関係数を検討した。

### (倫理面への配慮)

CJD サーベイランスと匿名化した収集データの研究利用については金沢大学および東京医科歯科大学の医学倫理委員会の承認を得ている。また、剖検脳を用いた免疫染色による研究については、金沢大学の医学倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

検討した症例の死亡時年齢は、硬膜移植後 CJD  $63.1 \pm 3.5$  歳 (35-81 歳)、孤発性 CJD  $63.4 \pm 2.4$  歳 (35-80 歳) で、統計学的に有意な差を認めなかった (表1)。その他、性別、プリオン蛋白遺伝子コドン129多型、CJD 罹病期間、プリオン蛋白沈着スコアについても両群間に有意差を認めなかった (表1)。

脳への Aβ沈着面積率は、硬膜移植後 CJD ( $0.43 \pm 0.21\%$ )、孤発性 CJD ( $0.21 \pm 0.13\%$ ) で、両群間に有意差を認めなかった ( $p=0.376$ )。CAA スコアは、硬膜移植後 CJD ( $5.94 \pm 1.57$ )、孤発性 CJD ( $2.00 \pm 0.97$ ) と硬膜移植後 CJD で有意に高かった ( $p=0.027$ )。CAA スコアを脳実質、髄膜、毛細血管に分けて解析を行ったところ、髄膜 CAA のみ硬膜移植後 CJD で有意に高値を認めた ( $p=0.013$ )。軟膜下沈着の程度についても、硬膜移植後 CJD で有意にスコアが高値であった ( $p=0.035$ )。Aβ沈着率、CAA スコア、軟膜下沈着スコアは、死亡時年齢、CJD 罹病期間には有意な相関を認めなかったが、硬膜移植から死亡までの潜伏期間は、CAA スコア ( $r=0.642$ ,  $p=0.025$ )、髄膜 CAA スコア ( $r=0.644$ ,  $p=0.010$ ) と軟膜下沈着スコア ( $r=0.642$ ,  $p=0.010$ ) と有意な正の相関を認めた。

## D. 考察

硬膜移植後 CJD の剖検脳への Aβ沈着面積率は、孤発性 CJD と比較して有意差はなかったが、髄膜 CAA や軟膜下 Aβ沈着が硬膜移植後 CJD でより多く認められた。このことは、硬膜移植後 CJD では、脳の表面に近い部位の Aβ沈着が、孤発性 CJD と比較して促進されていることを示唆している。髄



膜 CAA や軟膜下 A $\beta$ 沈着は、死亡時年齢や CJD 罹病期間とは相関を認めず、硬膜移植から死亡までの期間に相関していることから、この脳の表面に近い部位の A $\beta$ 沈着の促進は硬膜移植と関連している可能性がある。硬膜移植によって、脳の表面に近い部位の脳 $\beta$ アミロイドーシスが促進されたと考えると、硬膜移植によって脳 $\beta$ アミロイドーシスが伝播した可能性や脳外科手術を必要とした脳外科手術が脳 $\beta$ アミロイドーシスを促進した可能性がある。これまでに、脳外科手術が脳 $\beta$ アミロイドーシスを促進するかについての検討を行った報告はないが、今後、更に検討を進めていく必要がある。

## E. 結論

硬膜移植後 CJD では、孤発性 CJD と比較して、髄膜 CAA や軟膜下 A $\beta$ 沈着が有意に多く、その程度は年齢や CJD 罹病期間に相関を認めず、硬膜移植から死亡までの期間と有意な正の相関を認めた。

## [参考文献]

- 1) Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45-51, 2013.
- 2) Love S, Chalmers K, Ince P, et al. Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis* 3:19-32, 2014.
- 3) Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, et al. Subpial  $\beta$ /A4 peptide deposits are closely associated with amyloid angiopathy in the elderly. *Neurosci lett* 155:144-147, 1993.
- 4) Reiniger L, Lukic A, Linehan J, et al. Tau, prions and A $\beta$ : the triad of neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 121:5-20, 2011.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive

epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol* 25: 8-14, 2015.

- 2) Nakamura K, Sakai K, Samuraki M, Nozaki I, Notoya M, Yamada M. Agraphia of Kanji (Chinese characters): an early symptom of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a Japanese patient: a case report. *J Med Case Rep* 8:269, 2014.

- 3) Komatsu J, Sakai K, Hamaguchi T, Sugiyama Y, Iwasa K, Yamada M. Creutzfeldt-Jakob disease associated with a V203I homozygous mutation in the prion protein gene. *Prion* 8:336-338, 2014.

- 4) Eisele YS, Fritschi SK, Hamaguchi T, Obermüller U, Fügler P, Skodras A, Schäfer C, Odenthal J, Heikenwalder M, Staufienbiel M, Jucker M. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral  $\beta$ -amyloidosis. *J Neurosci* 34:10264-10273, 2014.

- 5) Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open* 4:e004968, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) Hamaguchi T, Yamada M. Transmission and propagation of human prion disease. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Symposium 35, Disease propagation and transmission in prion disease and other protein-misfolding disorders, Tokyo, May 21-25, 2014.

- 2) Hamaguchi T, Sakai K, Nozaki I, Noguchi-Shinohara M, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Murayama S, Satoh K, Harada M, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features of MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

- 3) 浜口 毅, 山田正仁. 脳 $\beta$ アミロイドーシスの伝播について. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6.5-7, 2014.

- 4) 浜口 毅, 坂井健二, 野崎一朗, 篠原もえ子, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 村山繁雄, 佐藤克也, 原田雅史, 水澤英洋, 山田正仁. MM2 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床的特徴と診断基準



案の提案, 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.21-24, 2014.

5) 浜口 毅, 坂井健二, 野崎一朗, 篠原もえ子, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 村山繁雄, 佐藤克也, 原田雅史, 水澤英洋, 山田正仁. MM2 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床的特徴について. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

H. 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

表 1.対象症例

	硬膜移植後 CJD	孤発性 CJD	<i>p</i>
症例数	16	21	
死亡時年齢; 歳 (範囲)	63.1 ± 3.5 (35-81)	63.4 ± 2.4 (35-80)	0.941
性別; 女性/男性	9/7	13/8	0.729
CJD 罹病期間; 月	18.1 ± 2.3	22.7 ± 3.0	0.234
プリオン蛋白コドン 129 多型; MM/MV	14/0	20/1	0.407
プリオン蛋白沈着スコア	6.0 ± 0.4	5.9 ± 0.5	0.938

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業  
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

## 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病剖検脳におけるリン酸化タウ、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン、リン酸化 TDP-43 の沈着について

研究分担者：山田正仁	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究分担者：浜口 毅	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：谷口 優	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：坂井健二	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：北本哲之	東北大学大学院プリオン蛋白研究部門
研究協力者：岩崎 靖	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：高尾昌樹	埼玉医科大学国際医療センター神経内科 公益財団法人脳血管研究所美原記念病院
研究協力者：村山繁雄	東京都健康長寿医療センター研究所神経病理学
研究協力者：内木宏延	福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域
研究協力者：清水 宏	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：柿田明美	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：高橋 均	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：鈴木博義	国立病院機構仙台医療センター
研究協力者：三條伸夫	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学（神経内科）
研究分担者：水澤英洋	国立精神・神経医療研究センター病院

**研究要旨** [目的]硬膜移植でタウ蛋白、 $\alpha$ -シヌクレイン、TDP-43 の脳への沈着が、異常プリオン蛋白と同様に個体間を伝播する可能性を検討する。

[方法]16 例の硬膜移植後 CJD の剖検脳をリン酸化タウ、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン、リン酸化 TDP-43 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

[結果]検討した 16 例のうち、死亡時 35 歳、41 歳、55 歳の 3 例以外の 13 例で、何らかのリン酸化タウの沈着を認めた。リン酸化タウの沈着は、threads, pretangle, tangle, thorn-shaped astrocyte と様々であった。更に、プラーク型の硬膜移植後 CJD では、プリオン蛋白プラークおよびその近傍にリン酸化タウの沈着を認めた。リン酸化 $\alpha$ -シヌクレインの沈着は、死亡時 70 歳、81 歳の 2 例で認めた。リン酸化 TDP-43 沈着を認めた症例はなかった。

[結論]16 例中 13 例でリン酸化タウの沈着、2 例でリン酸化 $\alpha$ -シヌクレインの沈着を認めたが、いずれも若年者では沈着を認めないことが多かった。加齢やプリオン蛋白沈着の影響など、これらの蛋白の沈着に影響を与えている可能性があり、今後年齢を合わせた孤発性 CJD 剖検脳と比較する予定である。

### A. 研究目的

プリオン病は同種間あるいは異種間で伝播するという特徴を有し、変異型 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) や医原性 CJD といった症例の出現は、しばしば大きな社会問

題となっている。近年、プリオン病以外の神経変性疾患でも、タウ蛋白、 $\alpha$ -シヌクレイン、TDP-43 といった蛋白の脳への沈着が、異常プリオン蛋白と同様に個体間を伝播するという動物実験が報告されているが<sup>1</sup>、ヒトではまだ

検討されていない。わが国では、医原性 CJD の 1 つである硬膜移植後 CJD が多発していることが大きな社会問題となっており<sup>2</sup>、今回の研究では、硬膜移植によって、異常プリオン蛋白だけでなく、タウ蛋白、 $\alpha$ -シヌクレイン、TDP-43 の脳への沈着が伝播する可能性を検討する。

## B. 研究方法

これまでに CJD サーベイランス委員会に登録されている症例で、剖検脳の未染標本を使用可能であった 16 例の硬膜移植後 CJD について、剖検脳を異常プリオン蛋白、リン酸化タウ、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン、リン酸化 TDP-43 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。各症例の臨床情報については、CJD サーベイランス委員会に登録された情報を利用した。

### (倫理面への配慮)

CJD サーベイランスと匿名化した収集データの研究利用については金沢大学および東京医科歯科大学の医学倫理委員会の承認を得ている。また、剖検脳を用いた免疫染色による研究については、金沢大学の医学倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

検討した症例の死亡時年齢は  $63.1 \pm 3.5$  歳 (35-81 歳) で、9 例が女性であった。検討した 16 例全例のプリオン蛋白コドン 129 多型は MM で、6 例がプラーク型であった。CJD 罹病期間は、 $63.1 \pm 3.5$  ヶ月 (7-41 ヶ月) であった。死亡時 35 歳、41 歳、55 歳の 3 例以外の 13 例で、何らかのリン酸化タウの沈着を認めた。リン酸化タウの沈着は、大脳皮質、海馬、基底核、視床に threads, pretangle, tangle, 側脳室下角では thorn-shaped astrocyte を認めた。更に、プラーク型の硬膜移植後 CJD では、プリオン蛋白プラークおよびその近傍にリン酸化タウの沈着を認めた。リン酸化 $\alpha$ -シヌクレインの沈着は、死亡時 70 歳の男性 (非プラーク型) の橋の青斑核、基底核、視床、側頭葉皮質、死亡時 81 歳の女性 (プラーク型) のマイネルト基底核で認めた。リン酸化 TDP-43 沈着を認めた症例はなかった。

## D. 考察

今回検討した硬膜移植後 CJD の多くに、リン酸化タウの沈着を認めた。しかし、死亡時 39 歳の男性の海馬に thorn-shaped astrocyte を認めた以外には、55 歳以下の若年齢ではリン酸化タウの沈着を認めておらず、今回の検討症例におけるリン酸化タウの沈着には、加齢による影響が大きいことが考えられた。また、プリオン蛋白プラークおよびその周囲にリン酸化タウ蛋白の沈着を認めたが、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病でもプリオン蛋白プラークおよびその周囲にタウ蛋白の沈着を認めることが報告されており、硬膜移植後 CJD のプラークでも同様のことが起こっている可能性を考えた。 $\alpha$ -シヌクレインの沈着は、比較的高齢の 2 例にのみであり、これについても加齢の影響が大きいと考える。リン酸化 TDP-43 の沈着は認めておらず、今回の研究では、硬膜移植によって TDP-43 沈着が促進される可能性が低いと考えた。

## E. 結論

16 例中 13 例でリン酸化タウの沈着、2 例でリン酸化 $\alpha$ -シヌクレインの沈着を認めたが、いずれも若年者では沈着を認めないことが多かった。加齢やプリオン蛋白沈着の影響など、これらの蛋白の沈着に影響を与えている可能性があり、今後年齢を合わせた孤発性 CJD 剖検脳と比較する予定である。

## [参考文献]

- 1) Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45-51, 2013.
- 2) 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.

## F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol* 25:8-14, 2015.
- 2) Nakamura K, Sakai K, Samuraki M, Nozaki I, Notoya M, Yamada M. Agraphia of Kanji (Chinese characters): an early symptom of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a Japanese patient: a case report. *J Med Case Rep* 8:269, 2014.
- 3) Komatsu J, Sakai K, Hamaguchi T, Sugiyama Y, Iwasa K, Yamada M. Creutzfeldt-Jakob disease associated with a V203I homozygous mutation in the prion protein gene. *Prion* 8:336-338, 2014.
- 4) Eisele YS, Fritschi SK, Hamaguchi T, Obermüller U, Fügler P, Skodras A, Schäfer C, Odenthal J, Heikenwalder M, Staufenbiel M, Jucker M. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral  $\beta$ -amyloidosis. *J Neurosci* 34:10264-10273, 2014.
- 5) Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open* 4:e004968, 2014.

2. 学会発表

- 1) Hamaguchi T, Yamada M. Transmission and propagation of human prion disease. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology,

Tokyo, May 21-25, 2014.

- 2) Hamaguchi T, Sakai K, Nozaki I, Noguchi-Shinohara M, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Murayama S, Satoh K, Harada M, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features of MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.
- 3) 浜口 毅, 山田正仁. 脳 $\beta$ アミロイドーシスの伝播について. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6.5-7, 2014.
- 4) 浜口 毅, 坂井健二, 野崎一朗, 篠原もえ子, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 村山繁雄, 佐藤克也, 原田雅史, 水澤英洋, 山田正仁. MM2 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床的特徴と診断基準案の提案. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.21-24, 2014.
- 5) 浜口 毅, 坂井健二, 野崎一朗, 篠原もえ子, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 村山繁雄, 佐藤克也, 原田雅史, 水澤英洋, 山田正仁. MM2 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床的特徴について. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

H. 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