

ヒトプリオン病の遺伝子解析とVV2 プリオンの滅菌法開発

研究分担者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科病態神経学

研究要旨

平成 26 年 10 月 1 日から平成 27 年 9 月 30 日までの遺伝子検査の結果を報告する。遺伝子検査の症例数は、307 例であった。変異無し 251 例（129M/M, 219E/E 218 例、129M/V, 219E/E 20 例、129M/M, 219E/K 9 例、129V/V, 219E/E 2 例、24bp deletion 2 例）変異あり 56 例（P102L 2 例、P105L 2 例、V180I 35 例、E200K 10 例、M232R 6 例、96bp insertion 1 例）。

硬膜移植後 CJD は直接頭蓋内にプリオンが投与された症例と考えられるが、成長ホルモン製剤は皮下投与で、kuru は経口投与でプリオンが伝播した所謂末梢ルートによる感染であると考えられる。頭蓋内投与と比較して、末梢投与の感染では V2 プリオンの感染である可能性が高く、M1 プリオンが末梢投与で発病しにくいという可能性が出てきた。

A. 研究目的

我が国のヒトのプリオン蛋白多型性には、以下のような遺伝子型が存在する。コドン 129 に関しては、129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型があり、コドン 219 に関しては、219E/E, 219E/K, 219K/K がある。これらの多型性に加えて、プリオン蛋白変異も存在しそれらをサーベイランスに上がってくる症例で検討するのが本研究の主な目的である。

さらに、平成 25 年度より新しい研究目的として、VV2 プリオンに対する滅菌法を開発することを研究目的に加えた。

B. 研究方法

【材料】

2014 年 10 月 1 日から 2015 年 9 月 30 日までの解析結果を報告する。

【方法】

CJD サーベイランスの同意のもとに遺伝

子解析の依頼をうけた末梢血白血球から DNA を採取し、遺伝子解析を行った。プリオン蛋白遺伝子の ORF を全て網羅するように PCR を行い、PCR ダイレクトシーケンスによってアミノ酸配列を決定した。ただ、octapeptide repeats の部位に関しては、ORF の全てを増幅する PCR では repeats 数を見誤るということが過去の解析で経験したため、repeats 数に特化した PCR を行った。さらに、ヘテロで変異あるいは多型性が 2 つ以上存在した症例は、PCR products を TA cloning によって分離し、最低でも 20 個のクローンからそれぞれの変異あるいは多型性がどのアレルに存在するのかを同定した。

C. 研究結果

遺伝子解析に関して

症例 307 例である。前年度の報告と同様であるが、この症例数は CJD と確定した症例数ではなく、CJD 疑い例としてサーベイラン

スの許可を得た症例数である。もちろん、最終的に CJD を否定された症例も含まれている。

変異なし	251 例
129M/M, 219E/E	218 例
129M/V, 219E/E	20 例
129V/V, 219E/E	2 例
129M/M, 219E/K	9 例
24bp deletion	2 例

変異あり	56 例
P102L	2 例
P105L	2 例
V180I	35 例
E200K	10 例
M232R	6 例
96bp insertion	1 例

VV2 プリオンの滅菌法開発に関連して

昨年度の報告書で MMiK (コドン 1 2 9 Met/Met の遺伝子型で、intermediate type の異常プリオン蛋白の分子量を示し、クル斑を有する) 症例が獲得性プリオン病の指標となることを明らかとした。それではこの MMiK という指標が他の獲得性プリオン病で存在するのかを検討すると hGH 投与後の CJD と kuru で MMiK が存在することが明らかとなった。

そして驚いたことに MMiK の感染源である V2 プリオン感染が hGH-CJD 患者や kuru 患者で大多数を占めるという事実気づいた。硬膜移植後 CJD (dCJD) ではヨーロッパの sCJD の比率に良く相関して M1 プリオン由来の dCJD が 70%、V2 プリオン由来の dCJD が 30% の頻度である。一方同じヨーロッパの sCJD を感染源とする hGH-CJD の大多数が V2 プリオン由来なのである。実際にフランスの hGH-CJD を 5 例解析したとこ

ろ 2 例が MV2 であり、3 例が MMiK 症例であろうという中間結果が出ている。また、最近報告された英国の hGH-CJD でも 8 例中 7 例が kuru 斑を有することが報告されており(文献 1) 我々が予測したように hGH-CJD のほとんどは VV2 プリオンの感染である。

加えて、末梢ルート感染の典型例である kuru の症例の報告例を検討したところ、1998 年の報告の 9 例全例で VV2 プリオンの感染であろうことが明らかとなった(文献 2)。

D. 考察

基本的に、遺伝子検索は例年通りの結果であった。

昨年度報告した獲得性プリオン病の指標である MMiK という表現型が獲得性プリオン病の同定に役立つだけでなく、獲得性プリオン病の解析から末梢ルートと頭蓋内へ直接投与されるルートによって伝播するプリオン病の種類に差があることが明らかになりつつある。

E. 結論

307 例の遺伝子解析を行った。

[参考文献]

[雑誌]

(1) Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth JD, Nicoll AJ, Kenny J, Launchbury F, Linehan J, Richard-Loendt A, Walker AS, Rudge P, Collinge J, Brandner S. Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. 2015 Sep 10;525(7568):247-50.

(2) Cervenáková L, Goldfarb LG, Garruto R, Lee HS, Gajdusek DC, Brown P.

Phenotype-genotype studies in kuru:
implications for new variant
Creutzfeldt-Jakob disease.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1998** Oct
27;95(22):13239-41.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2015/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**. Neuropathological and biochemical criteria to identify acquired Creutzfeldt-Jakob disease among presumed sporadic cases. *Neuropathology*. 2015 Dec 15. doi: 10.1111/neup.12270. [Epub ahead of print] Review.

2) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, **Kitamoto T**, Yoshida M, Inuzuka T. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis of (99m)Tc-ECD-SPECT images in a case of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci*. 2015 Nov 15;358(1-2):447-52. doi: 10.1016/j.jns.2015.09.356. Epub 2015 Sep 25.

3) Oshita M, Yokoyama T, Takei Y, Takeuchi A, Ironside JW, **Kitamoto T**, Morita M. Efficient propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease prion protein using the cell-protein misfolding cyclic

amplification technique with samples containing plasma and heparin. *Transfusion*. 2015 Sep 8. doi: 10.1111/trf.13279. [Epub ahead of print]

4) Iwasaki Y, Akagi A, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Factors influencing the survival period in Japanese patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci*. 2015 Jun 30. pii: S0022-510X(15)00416-5. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.065. [Epub ahead of print]

5) Kobayashi A, Teruya K, Matsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, **Kitamoto T**. The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol*. 2015 Aug;130(2):159-70. doi: 10.1007/s00401-015-1447-7. Epub 2015 May 29.

6) Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, **Kitamoto T**. Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 are Identical in Transmission Properties. *Brain Pathol*. 2015 Apr 8. doi: 10.1111/bpa.12264. [Epub ahead of print]

7) Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, **Kitamoto T**.

Transmission properties of atypical
Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease
etiology? J Virol. 2015 Apr;89(7):3939-46.
doi: 10.1128/JVI.03183-14. Epub 2015 Jan
21.

8) 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.
2015;25(1):8-14.
doi: 10.2188/jea.JE20140022. Epub 2014
Oct 4.

9) Kon T, Miki Y, Arai A, Funamizu Y,
Ueno T, Haga R, Nishijima H, Suzuki C,
Nunomura J, Baba M, Oyama Y, Shiga Y,
Kitamoto T, Tomiyama M.
Creutzfeldt-Jakob disease with
homozygous M232R mutation: A case
report. J Neurol Sci. 2015 May
15;352(1-2):108-9.
doi: 10.1016/j.jns.2015.03.017. Epub 2015
Mar 19. No abstract available.

2. 学会発表

なし

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