

## 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 25 年 1 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、584 例であった。変異なし 473 例（129M/M, 219E/E 418 例、129M/V, 219E/E 29 例、129M/M, 219E/K 21 例、129V/V, 219E/E 3 例、24bp deletion 2 例）変異あり 111 例（P102L 5 例、P105L 3 例、V180I 67 例、E200K 21 例、M232R 14 例、96bp insertion 1 例）。

硬膜移植後 CJD の経験から、VV2 または MV2 プリオンが 129Met/Met のヒトに感染した場合、従来見られなかった MMiK(129Met/Met, intermediate type PrPres, kuru plaques)タイプのプリオンが見られるようになることが明らかとなった今、129Met/Met 遺伝子のヒトが、タイプ 2 以外の PrPres を持ちアミロイド斑陽性の症例が存在するのか文献的に検討すると、2 症例が sCJD として報告されていることが明らかとなった。今年度は、そのような報告例からの感染実験の結果、VV2 や dura-grafted CJD with MMiK と同様の感染性、ウエスタンブロットの結果を得ることになった。MMiK という診断基準は、従来 sCJD に分類されていた症例から獲得性プリオン病を見つけるのに役立ち、新しい感染経路解明に繋がることが予想される。

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】

2013 年 11 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受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。

脳材料を手に入れた症例に関しては感染実験を行った。我が国例は、2003 年に Neurology で報告された症例（文献 1）で脳外科手術後の症例であり、もう一例は米国例で、1981 年に Archives of Neurology に報告された脳外科医の発病症例である（文献 2）。脳内接種したマウスは、一定の観察期間後に発病したマウスは、組織学的に検索し、またはウエスタンブロットで異常型プリオン蛋白の存在によって発病を確認した。

## C. 研究結果

### 遺伝子解析に関して

症例 584 例である。従来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 473 例  
129M/M, 219E/E 418 例

129M/V, 219E/E 29 例  
129V/V, 219E/E 3 例  
129M/M, 219E/K 21 例  
24bp deletion 2 例

変異あり 111 例  
P102L 5 例  
P105L 3 例  
V180I 67 例  
E200K 21 例  
M232R 14 例  
96bp insertion 1 例

### 感染実験に関して

感染実験は、我が国例に関しては、2 次感染実験まで、米国例では 1 次感染実験までほぼ終了した。脳内接種した Ki-129Val/Val マウスは、最も短い潜伏期間を呈し、Ki-1129Met/Val のマウスが最も長い潜伏期間を呈した。これらの潜伏期間は、MV2、VV2 の感染と同様の結果であり、また硬膜移植後 CJD の MMiK 症例とそっくりであった。2 次感染実験に関しても、1 次感染実験に使用したヒト型ノックインマウスの遺伝子型が 129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型に関わらず VV2 プリオンの感染と潜伏期間が一致していた。

具体的な 1 次感染実験の潜伏期間は以下の通りである。

#### 本邦例

Ki-129M/M, 590 ± 81 days (4/5)  
Ki-129M/V; 699 ± 75 days (5/5)  
Ki-129V/V, 296 ± 9 days (6/6)

#### 米国例

Ki-129M/M, 663 ± 36 days (5/5)  
Ki-129M/V, 725 ± 39 days (4/5)  
Ki-129V/V, 313 ± 10 days (6/6)

## **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 129 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 3) 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 4)。

## **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**

584 例の遺伝子解析を行った。

## **[参考文献]**

[雑誌]

(1) Ishida C, Kakishima A, Okino S, Furukawa Y, Kano M, Oda Y, Nakanishi I, Makifuchi T, Kitamoto T, Yamada M. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. *Neurology*. 2003. 60:514-517.

(2) Shoene WC, Masters CL, Gibbs CL Jr, Gajdusek DC, Tyler HR, Moore FD, Dammin GJ. Transmissible spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). Atypical clinical and pathological findings. *Arch Neurol* 1981.38:473-477.

(3) 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- $\beta$  pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. 2015 Sep 10;525(7568):247-50.

(4) 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

従来では孤発性 CJD とされていた症例の中に、新しい獲得性プリオン病の存在が明らかになった。今後のサーベイランス調査にて新しい感染経路の追及が必要である。

## G. 研究発表 (2014/4/1~2016/3/31 発表)

### 1. 論文発表

1) Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, **Kitamoto T**. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP. Structure. 2014 ; 22(4) : 560-571.

2) Barria MA, Balachandran A, Morita M, **Kitamoto T**, Barron R, Manson J, Knight R, Ironside JW, Head MW. Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. Emerg Infect Dis. 2014 Jan;20(1):88-97.

3) 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. 2014 May 16;4(5):e004968. doi: 10.1136/bmjopen-2014-004968.

4) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M. Comparison of the clinical course of Japanese MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease between subacute spongiform encephalopathy and

panencephalopathic-type. Clin Neurol Neurosurg. 2014 Jun;121:59-63.

5) Iwasaki Y, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Hashizume Y, Yoshida M. Relation between clinical findings and progression of cerebral cortical pathology in MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Proposed staging of cerebral cortical pathology. J Neurol Sci. 2014 Jun 15;341(1-2):97-104.

6) 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. 2014 Mar 31;2(1):32.

7) Tajima Y, Satoh C, Mito Y, **Kitamoto T**. Creutzfeldt-Jakob disease with a codon 210 mutation: first pathological observation in a Japanese patient. Intern Med. 2014;53(5):483-7.

8) Araki K, Nakano Y, Kobayashi A, Matsudaira T, Sugiura A, Takao M, **Kitamoto T**, Murayama S, Obi T. Extensive cortical spongiform changes with cerebellar small amyloid plaques: The clinicopathological case of MV2K+C subtype in Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 2014 Dec;34(6):541-6. doi: 10.1111/neup.12133. Epub 2014 Jul 2.

9) 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.

10) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nokura K, Tatsumi S, Mimuro M, **Kitamoto T**, Yoshida M.

Gerstmann-Straeussler-Scheinker disease with P102L prion protein gene mutation presenting with rapidly progressive clinical course. *Clin Neuropathol.* 2014 Sep-Oct; 33(5):344-53. doi: 10.5414/NP300733.

11) 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.

12) 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.

13) 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]

14) 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]

15) 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.

16) 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]

17) 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.

18) 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