

RT-QuIC 法を利用した prion seeding activity の定量系の確立と ヒトプリオン病の各臓器における prion seeding activity の検討

研究分担者：西田教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野
研究協力者：佐藤克也	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動リハビリテーション学分野
研究協力者：高月英恵	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野
研究協力者：新竜一郎	宮崎大学医学部微生物学教室
研究協力者：布施隆行	宮崎大学医学部微生物学教室
研究分担者：岩崎 靖	愛知医科大学加齢医科学研究所
研究協力者：吉田真理	愛知医科大学 加齢医科学研究所
研究分担者：高尾昌樹	脳血管研究所附属美原記念病院
研究協力者：美原 盤	脳血管研究所附属美原記念病院
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

研究要旨 プリオンの感染性の評価は、マウスを用いた感染実験が主体であるが、6 か月以上の日数を要する。2011 年我々は試験管内で微量の異常型プリオン蛋白質を増幅する方法、Real-time quaking induced conversion (RT-QUIC) 法の開発に成功し¹⁾、2014 年までにその方法の確立を行ってきた。その後 RT-QUIC 法の問題点として、RT-QUIC 法の評価は定性である点と RT-QUIC 法の定量法と動物実験の感染性と関連性との問題などが挙げられる。その問題点を解決するために 2015 年より我々は End-point dilution 法と RT-QUIC 法を組み合わせることで、プリオンのアミロイド形成能（シード活性）を 50% seeding dose (SD₅₀)として定量的に評価することが可能となった²⁾。我々はこの方法をヒトサンプルにて評価することに成功した。本研究では、孤発性 CJD 患者より剖検時に採取した臓器（脳・脾臓・肝臓・腎臓・肺・副腎・消化管）の SD₅₀を測定したところ、非神経系組織においても 10⁴-10⁷/g tissue のシード活性が存在することが明らかとなった。さらにプリオンヒト化マウス（ヒト型プリオン蛋白質発現マウス）を利用し、脳組織の異常プリオン蛋白質とその脳組織の SD₅₀ と潜伏期間との関連について検討した。3 つともに統計学的に優位な相関関係があることが示された。

A. 研究目的

RT-QUIC 法の問題点として、RT-QUIC 法の評価は定性である点と RT-QUIC 法の定量法と動物実験の感染性と関連性との問題などが挙げられる。その問題点を解決することを研究の目的とした。

B. 研究方法

1) 孤発性 CJD 患者より剖検時に採取した臓器（脳・脾臓・肝臓・腎臓・肺・副腎・消化管）の乳剤を段階希釈し RT-QUIC を行った。プリオンのシード活性の欠失する境界を定め、定量性を明確化するために Spearman-Kärber 法を用い

て SD₅₀を算出した。

2) プリオンヒト化マウス（ヒト型プリオン蛋白質発現マウス）を作成した。そのマウスに対し、ヒトプリオン病患者（MM1）の脳組織の乳剤を段階希釈し、発症までの潜伏期間について検討を行った。

（倫理面への配慮）

研究環境・生命倫理・安全対策に関わる全般を所掌する部門があり、人に関わる研究・動物実験を伴う研究・遺伝子組換え実験を伴う研究のすべてが、機関長への申請の手続きを必要とする。機関長から付託された全学的メンバーで

構成される各種実験審査委員会(倫理審査委員会、動物実験委員会、組換え DNA 実験委員会)において研究内容が審査され、研究環境・生命倫理・安全対策に問題がなく法律規則を順守していることが確認されたのちに、機関長から許可される体制が取られている。研究開始後は、人に関わる研究では毎年、動物実験を伴う研究及び遺伝子組換え実験を伴う研究では各機関が定める時期毎に、研究状況を機関長に報告することになっている。

C. 研究結果

- 1) 脳組織におけるSD₅₀は10⁹-10¹⁰/g tissue であった。非中枢神経系組織においてもシード活性が10⁴-10⁷/g tissueの範囲で検出された。同一臓器でも、症例によって陽性・陰性が分かれたが、全症例とも多臓器で陽性となった。
- 2) プリオンヒト化マウス(ヒト型プリオン蛋白質発現マウス)の作成に成功した。
- 3) 脳組織の異常プリオン蛋白とSD₅₀とは明らかに相関関係が認められた。(R²=0.72)
- 4) 脳組織の乳剤10⁻¹~10⁻⁴を段階希釈し、その納入剤をプリオンヒト化マウスに脳内接種し、発症までの潜伏期間について検討した。脳組織の脳乳剤の10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴の潜伏期間は150±5日,193±7日,197±6日,243±23日であった。

D. 考察

- 1) ヒトの孤発性CJD患者の各末梢臓器におのSD₅₀は動物試験によるLD₅₀に相関し、かつ検出能は100倍ほど高いと考えられ、孤発性CJD患者の臓器には微量ではあるが、感染性プリオンが存在する可能性が示唆された。
- 2) プリオンヒト化マウスの潜伏期間と脳組織の異常プリオン蛋白とSD₅₀と3つには明らかな相関があり、SD₅₀を測定することには感染価の指標になりえる。

E. 結論

孤発性CJDの場合、感染性プリオンは中枢系に限局すると推定されてきたが、シード活性は末梢臓器にも存在する。感染性については今後さらなる慎重な検討を要す。

[参考文献]

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17:175-178, 2011.
- 2) Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. Rapid and quantitative assay of amyloid-seeding activity in human brains affected with prion diseases. *PLoS One* 10:e0126930, 2015.
- 3) Wilham J M, et al. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 10:e1001217, 2010.
- 4) Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-seeding activity is widely distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *EBioMedicine* 12:150-155, 2016.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep* 4:6006, 2014.
- 2) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep* 4:4504, 2014.
- 3) Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant

- prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol* 88:11791-11801, 2014.
- 4) Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R. Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein. *Prion* 8:314-318, 2014.
- 5) Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. Rapid and quantitative assay of amyloid-seeding activity in human brains affected with prion diseases. *PLoS One* 10: e0126930, 2015.
- 6) Hayashi Y, Iwasaki Y, Takekoshi A, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of FTL-D-TDP type A with upper motor neuron-predominant motor neuron disease mimicking MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion* 10:492-501, 2016.
- 7) Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-seeding activity is widely distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *EBioMedicine* 12:150-155, 2016.
- 8) Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A, Yamada M, Asano T, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Inuzuka T. Preserved regional cerebral blood flow in the occipital cortices, brainstem, and cerebellum of patients with V180I-129M genetic Creutzfeldt-Jakob disease in serial SPECT studies. *J Neurol Sci* 370:145-151, 2016.
- 9) Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Müller-Cramm D, Collins S, Atarashi R, Satoh K, Orrù CD, Groveman BR, Zafar S, Schulz-Schaeffer WJ, Caughey B, Zerr I. The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat Protoc* 11:2233-2242, 2016.
- 10) Nakano Y, Akamatsu N, Mori T, Sano K, Satoh K, Nagayasu T, Miyoshi Y, Sugio T, Sakai H, Sakae E, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Fujita Y, Yanagihara K, Nishida N. Sequential washing with electrolyzed alkaline and acidic water effectively removes pathogens from metal surfaces. *PLoS One* 11:e0156058, 2016.
- 11) McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M, Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haik S, Parchi P, Pocchiari M, Green A. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: An international study. *Ann Neurol* 80:160-165, 2016.
- 12) Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Nakagaki T, Ishibashi D, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Nishida N. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Sci Rep* 26:24993, 2016.
- 13) Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Schroeder B, Raeber A, Varges D, Kim YS, Satoh K, Collins S, Zerr I. Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol Neurobiol* 53:1896-1904, 2016.
- 14) Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL, Golanska E, Baldeiras I, Satoh K, Sanchez-Valle R, Ladogana A, Skinningsrud A, Hammarin AL, Mitrova E, Llorens F, Kim YS, Green A, Zerr I. Validation of 14-3-3 protein as a marker in Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. *Mol Neurobiol* 53:2189-2199, 2016.
- 15) Ishibashi D, Nakagaki T, Ishikawa T, Atarashi R, Watanabe K, Cruz FA, Hamada T, Nishida N. Structure-based drug discovery for prion disease using a novel binding simulation. *EBioMedicine* 9:238-249, 2016.
- 16) Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *Bioorg Med Chem* 25:1085-1093, 2017.

17) 佐藤克也. プリオン病の Case approach. 高尾昌樹(編) 神経内科 Clinical Questions & pearls, 中外医学社, 東京 pp151-154, 2016.

2. 学会発表

1) Satoh K, Takatsuki H, Atarashi R, Sano K, Nishida N. "CSF analysis of patients with human prion disease." Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

2) Takatsuki H, Satoh K, Atarashi R, Sano K, Nishida N. "Wide distribution of seeding activity in sporadic CJD patients" Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

3) Satoh K, Takatsuki H, Atarashi R, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Nishida N. Prion seeding activity is widely

distributed in tissues of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. PRION 2016, Tokyo, May 10-13, 2016.

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