

ヒトプリオン病の遺伝子解析とV2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

研究要旨

平成 27 年 10 月 1 日から平成 28 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、306 例であった。変異なし 243 例（129M/M, 219E/E 227 例、129M/V, 219E/E 7 例、129M/M, 219E/K 8 例、129V/V, 219E/E 1 例）変異あり 63 例（P102L 2 例、P105L 2 例、V180I 39 例、E200K 7 例、M232R 13 例）。また、フランスの成長ホルモン症例の解析では 5 例全てで V2 プリオン由来であることが、そして英国の成長ホルモン症例では 21 例中 20 例が V2 プリオン由来であることが明らかとなった。この結果から、M1 プリオンが末梢ルート感染では感染しにくい可能性が高いことが明らかとなった。

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、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加えた。

B. 研究方法

【材料】

平成 27 年 10 月 1 日から平成 28 年 9 月 30 日までの遺伝子検査の結果を報告する。さらに、医原性プリオン病の代表として硬膜移植後 CJD と比較するため、サルペトリエ

ール病院から成長ホルモン製剤投与後 CJD を 5 例検索した。さらにフランスの成長ホルモンのみでなく、英国の成長ホルモン製剤投与後の CJD と硬膜例を比較した。

【方法】

同意書のある遺伝子検査希望例を調査した。遺伝子変異は、すべて PCR で増幅後ダイレクトシーケンスを行い確認した。変異のあった症例は、その確認のため全て制限酵素で切断し、その変異を確認した。変異や多型性が 2 つ以上ある症例では、PCR 産物をプラスミドに入れてクローニングし、それぞれのアレルを確認した。フランスの成長ホルモン製剤投与後 CJD に関しては、遺伝子解析、ウエスタンブロットによる異常型プリオン蛋白の解析、PMCA 法によるプリオン蛋白の増幅効率、そして現時点は潜伏期間中であるが、感染実験を行っている。

(倫理面への配慮)

遺伝子検査に関しては、所属施設の倫理審査の許可を得て行っている。

C. 研究結果

(結果) 症例 306 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。

平成 27 年 10 月 1 日から平成 28 年 9 月 30 日までの遺伝子解析は以下のとおりであった。

プリオン蛋白遺伝子変異なし 243 例

129M/M, 219E/E 227 例

129M/V, 219E/E 7 例

129M/M, 219E/K 8 例

129M/V, 219E/K 1 例

プリオン蛋白遺伝子変異あり 63 例

P102L 2 例

P105L 2 例

V180I 39 例

E200K 7 例

M232R 13 例

サルペトリエール病院からの成長ホルモン症例は、5 例である。遺伝子型は、129Met/Met が 3 例、129Met/Val が 2 例であった。プリオン蛋白遺伝子に変異なく、コドン 219Glu/Glu であった。凍結脳からホルマリン固定を行い、アミロイド斑の有無を確認したところ、5 症例すべてでアミロイド斑を確認できた。また、ウエスタンブロットの

結果は、intermediate 型が 3 例(つまり MMiK ということになる)、MV2 に相当するのが 2 例であった。PMCA 法による解析では、5 症例すべてで 129Val PrP を基質とすることで効率的な増幅を認めた。今回、我々が検索したフランスの成長ホルモン症例は、5 症例すべてが V2 プリオン感染であることが明らかとなった。

また、英国の CJD サーベイランスユニットから英国の成長ホルモン症例の脳を用いた感染実験の依頼があった。この依頼のうちに成長ホルモン症例のプリオンのタイプを確認したところ、以下のような結果であることが明らかとなった。

VV2 7 例

MV2 12 例

MMiK 1 例

MM1 1 例

で、合計 21 例中 V2 プリオン感染に相当するのは 20 例(95%以上)という結果であった(文献 1)

D. 考察

基本的に、遺伝子検索は例年通りの結果であった。

昨年度の班会議で、私は硬膜移植例と成長ホルモン症例で感染したプリオン病のタイプが異なる可能性があることを報告したが、今年度は、実際にフランス症例で検索した 5 症例すべてが、英国症例では報告された 21 症例中 20 症例で V2 プリオン病由来の感染であることが明らかとなった。我が国の硬膜移植例は、その感染源が同じヨーロッパの sCJD である。それにも関わらず、硬膜例では MM1 由来の硬膜例が 70%、V2 プリオン由来の硬膜例が 30%とヨーロッパの sCJD の MM1 プリオンと V2 プリオンの頻度とよ

く相関する。しかしながら、成長ホルモン症例はこの比率と全く異なり、90%以上がV2プリオン由来であることが明確に示された。また、成長ホルモン製剤はその作成過程で40万人分の下垂体から抽出されるといわれている。この中に、V2プリオンのみでMM1プリオンが存在しないというのはいかなる頻度でもありえない頻度である。

これらの結果から、M1プリオンは末梢ルートでは感染しがたいという可能性が高くなった。

E. 結論

306例の遺伝子解析を行った。

【参考文献】

1) Ritchie DL, Barria MA, Peden AH, Yull HM, Kirkpatrick J, Adlard P, Ironside JW, Head MW. UK Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: investigating human prion transmission across genotypic barriers using human tissue-based and molecular approaches. *Acta Neuropathol.* 2016 Nov 3. [Epub ahead of print]

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H,

Yamada M. Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2016 Aug;132(2):313-5. doi: 10.1007/s00401-016-1588-3. Epub 2016 Jun 17. No abstract available.

2) Cescatti M, Saverioni D, Capellari S, Tagliavini F, Kitamoto T, Ironside J, Giese A, Parchi P. Analysis of Conformational Stability of Abnormal Prion Protein Aggregates across the Spectrum of Creutzfeldt-Jakob Disease Prions. *J Virol.* 2016 Jun 24;90(14):6244-54. doi: 10.1128/JVI.00144-16. Print 2016 Jul 15.

3) Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, Kitamoto T. Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. *Lab Invest.* 2016 May;96(5):581-7. doi: 10.1038/labinvest.2016.27. Epub 2016 Feb 15.

4) 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.* 2016 Jan;56(1):223-30. doi: 10.1111/trf.13279. Epub 2015 Sep 8.

5) Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF,

- McLean CY, Tung JY, Yu LP, Gambetti P, Blevins J, Zhang S, Cohen Y, Chen W, Yamada M, Hamaguchi T, Sanjo N, Mizusawa H, Nakamura Y, Kitamoto T, Collins SJ, Boyd A, Will RG, Knight R, Ponto C, Zerr I, Kraus TF, Eigenbrod S, Giese A, Calero M, de Pedro-Cuesta J, Haik S, Laplanche JL, Bouaziz- Amar E, Brandel JP, Capellari S, Parchi P, Pologgi A, Ladogana A, O'Donnell-Luria AH, Karczewski KJ, Marshall JL, Boehnke M, Laakso M, Mohlke KL, Kähler A, Chambert K, McCarroll S, Sullivan PF, Hultman CM, Purcell SM, Sklar P, van der Lee SJ, Rozemuller A, Jansen C, Hofman A, Kraaij R, van Rooij JG, Ikram MA, Uitterlinden AG, van Duijn CM; Exome Aggregation Consortium (ExAC), Daly MJ, MacArthur DG. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med.* 2016 Jan 20;8(322):322ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.aad5169.
- 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.* 2016 Jan;26(1):95-101. doi: 10.1111/bpa.12264. Epub 2015 Jun 4.
- 7) 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 FTLTDP type A with upper motor neuron-predominant motor neuron disease mimicking MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion.* 2016 Nov;10(6):492-501.
- 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.* 2016 Nov 15;370:145-151. doi: 10.1016/j.jns.2016.09.043.
- 9) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of MM1 + MM2-cortical with thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with hyperintensities on diffusion-weighted MRI before clinical onset. *Neuropathology.* 2016 Jul 20. doi: 10.1111/neup.12327. [Epub ahead of print]
- 10) Nakatani E, Kanatani Y, Kaneda H, Nagai Y, Teramukai S, Nishimura T, Zhou B, Kojima S, Kono H, Fukushima M, Kitamoto T, Mizusawa H. Specific clinical signs and symptoms are predictive of clinical course in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Neurol.* 2016 Sep;23(9):1455-62. doi:10.1111/ene.13057.

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

