

## サーベイランス遺伝子解析

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 28 年 10 月 1 日から平成 29 年 9 月 30 日までの遺伝子解析の結果を報告する。プリオン蛋白遺伝子を解析した症例数は、290 例であった。変異なしの症例は、214 例（129M/M, 219E/E 189 例、129M/V, 219E/E 13 例、129M/M, 219E/K 10 例、129V/V, 219E/E 1 例、129M/M, 219K/K 1 例）であった。変異ありの症例は、76 例（P102L 10 例、D178N 2 例、V180I 45 例、E200K 7 例、M232R 9 例、T188K 1 例、96bp 挿入 1 例、180/232 1 例）であった。さらに、この研究期間中、VPSP<sub>r</sub> 症例を初めて経験したのでその診断方法を報告する。

### A. 研究目的

わ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、Met/Met, Met/Val, Val/Val という 3 種類が、コドン 219 に関しても、Glu/Glu, Glu/Lys, Lys/Lys という 3 種類が存在する。これらの多型性に加えて、プリオン蛋白変異も存在し、サーベイランスで取り上げられる症例に関して多型性と遺伝子変異を解析するのが本研究の主な目的である。

さらに、剖検された症例に関しては、ウェスタンブロットによる異常プリオン蛋白のタイプを決定することも本研究の目的に入っている。

### B. 研究方法

#### 【方法】

各施設から送られてきた認知症などを示す症例 290 例のプリオン蛋白領域の遺伝子解析を行った。プリオン蛋白遺伝子領域を

PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスにより正常多型や変異を確認した。変異と正常多型がヘテロである症例などでは、fidelity の高い polymerase を用いて増幅した PCR 産物をクローニングし、どのアレルに変異が存在するのかを同定した。

Western blot に関しては、部分精製した分画を proteinase K によって処理を行い、3F4 抗体、タイプ 1 特異的抗体、タイプ 2 特異的抗体、TNT 抗体（フラグメント解析）の 4 種類の抗体によって最終的なタイプを決定している。

#### （倫理面への配慮）

遺伝子検査に関しては、所属施設の倫理委員会にてすでに許可を得ている。

### C. 研究結果

#### （結果 1）

平成 28 年 10 月 1 日から平成 29 年 9 月 30 日までの遺伝子解析数は、290 例であった。

プリオン蛋白遺伝子変異なし 214 例

129M/M, 219E/E 189 例

129M/V, 219E/E 13 例

129M/M, 219E/K 10 例

129V/V, 219E/E 1 例

129M/M, 219K/K 1 例

プリオン蛋白遺伝子変異あり 76 例

P102L 10 例 (うち 129M/V 1 例)

D178N 2 例

V180I 45 例 (うち 129M/V 12 例)

E200K 7 例

M232R 9 例

T188K 1 例

96bp 1 例

180/232 1 例

依然として、プリオン蛋白変異では、圧倒的に V180I 変異が多いことがわかる。

また、V180I 症例では、圧倒的に 129M/V の多型性をもつ症例も正常人に比較して比率が多い。

今回は T188K 変異と、新しい E200K 変異 (219K allele) の症例を認めた。

(結果 2)

Variably protease sensitive prionopathy (129Met/Met) の診断。

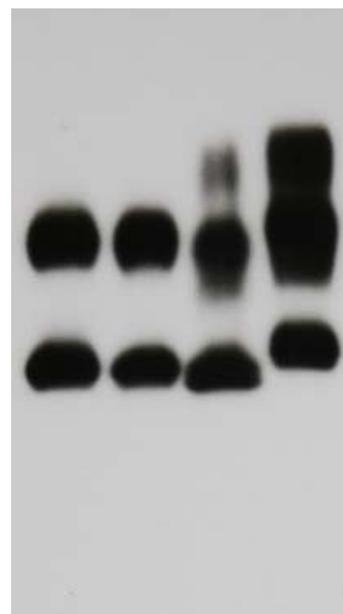
我が国では、コドン 129 の多型性に関して圧倒的に MM の頻度が高いので VPSPr の出現はないだろうと想像していた。サーベイランス開始から 18 年目にして本邦 1 例目を診断する機会を得た。

我々の経験から効率よく VPSPr の確定診断の進め方を紹介したい。 まず何よりも

診断の端緒は、ウエスタンブロットのパターンである。 基本的には V180I 変異症例のウエスタンブロットのパターンを呈する。つまり 1) タイプ 2 の異常プリオン蛋白の分子量を示し、2) 2 糖鎖型のプリオン蛋白を認めず、1 糖鎖型と無糖鎖型のプリオン蛋白のみで構成される。V180I 変異例との違いは、もちろん V180I 変異はなく、異常型プリオン蛋白の量が明らかに多いことである。これらの情報をもとに、臨床病理に VPSPr の可能性が高い旨の報告を行ったが、病理形態学的にも VPSPr であることが証明された。少なくとも、我が国に多い、129Met/Met 遺伝子型の VPSPr では、ウエスタンブロットの詳細な検討さえしていれば、見逃すことはないようである。また、VPSPr でも 129Val/Val や Val/Met の遺伝子型の症例に比較して、129Met/Met の遺伝子型の症例では異常プリオン蛋白のプロテアーゼ抵抗性が高いことも診断の助けにはなっていると思われる。

図を入れる。

1 2 3 4



3F4 抗体によるウエスタンブロットの結果

Lane1 : VPSPr と診断した症例

Lane2:V180I 症例

Lane3:MM2C 症例

Lane4:MM1 症例

VPSPr 症例は、V180I 症例と同様に 2 糖鎖型のプリオン蛋白が見られず、1 糖鎖型と無糖鎖型のみで構成され、タイプ 2 の異常プリオン蛋白と同様の分子量を示す。

#### D. 考察

基本的に遺伝子検索は例年通りであった。また、今年度は、特異なプリオン病である VPSPr を経験したが、codon 129Met/Met 症例の VPSPr の場合は、従来から行ってきたウエスタンブロット法で十分診断可能であった。ただ、codon 129Val という遺伝子型の VPSPr が将来出てきたときに現時点での Proteinase K 濃度で十分検出できるのかどうかは今後の課題である。それでも VPSPr の場合は、免疫組織学的に異常型プリオン蛋白が検出できる濃度で存在するのでウエスタンブロットで見逃したとしても、病理学的検索で十分対応可能であると判断できる。

#### E. 結論

290 例の遺伝子解析を行った。

また、サーベイランスが始まって以来初めての VPSPr を経験した。

[参考文献]

なし

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Kato H, Ando T, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with 1-month total disease duration and early pathologic indicators. *Neuropathology*. 37(5): 420-425, 2017
- 2) Iwasaki Y, Saito Y, Aiba I, Kobayashi A, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of MV2K + C-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with widespread cerebral cortical involvement and Kuru plaques. *Neuropathology*. 37(3): 241-248, 2017
- 3) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Akagi A, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a prion protein gene codon 180 mutation presenting with pathological laughing and an exaggerated startle reaction. *Neuropathology*. 37(6): 575-581, 2017
- 4) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of steroid-responsive encephalopathy with convulsion and a false-positive result from the real-time

- quaking-induced conversion assay. *Prion*. 11(4): 284-292, 2017
- 5) Fernández-Borges N, Espinosa JC, Marín-Moreno A, Aguilar-Calvo P, Asante EA, Kitamoto T, Mohri S, Andréoletti O, Torres JM. Protective Effect of Val<sub>129</sub>-PrP against Bovine Spongiform Encephalopathy but not Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerg Infect Dis*. 23(9): 1522-1530, 2017
  - 6) Harada R, Ishiki A, Kai H, Sato N, Furukawa K, Furumoto S, Tago T, Tomita N, Watanuki S, Hiraoka K, Ishikawa Y, Funaki Y, Nakamura T, Yoshikawa T, Iwata R, Tashiro M, Sasano H, Kitamoto T, Yanai K, Arai H, Kudo Y, Okamura N. Correlations of <sup>18</sup>F-THK5351 PET with post-mortem burden of tau and astrogliosis in Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 59(4): 671-674, 2018
  - 7) Takeuchi A, Kobayashi A, Morita M Kitamoto T. Application of protein misfolding cyclic amplification for the rapid diagnosis of acquired Creutzfeldt-Jakob disease. *Medical Research Archives*, Vol. 5, 1-11, 2017
  - 8) Kobayashi A, Kitamoto T, Mizusawa H. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*. 2017 (in press).
  - 9) Hayashi Y, Yamada M, Kimura A, Asano T, Satoh K, Kitamoto T, Yoneda M, Inuzuka T. Clinical findings of a probable case of MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with antibodies to anti-N-terminus of  $\alpha$ -enolase. *Prion*. 11(6): 454-464, 2017
  - 10) Akagi A, Iwasaki Y, Mimuro M, Kitamoto T, Yamada M, Yoshida M. Pathological progression of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with a PrP V180I mutation. *Prion*. 12(1): 54-62, 2018
  - 11) Cali I, Cohen ML, Haik S, Parchi P, Giaccone G, Collins SJ, Kofskey D, Wang H, McLean CA, Brandel JP, Privat N, Sazdovitch V, Duyckaerts C, Kitamoto T, Belay ED, Maddox RA, Tagliavini F, Pocchiari M, Leschek E, Appleby BS, Safar JG, Schonberger LB, Gambetti P. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with Amyloid- $\beta$  pathology: an international study. *Acta Neuropathol Commun*. 6(1): 5, 2018
  - 12) Munesue Y, Shimazaki T, Qi Z, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Mohri S, Kitamoto T, Kobayashi A. Development of a quick bioassay for the evaluation of transmission properties of acquired prion diseases. *Neurosci Lett*. 668: 43-47, 2018
  - 13) Ito Y, Sanjo N, Hizume M, Kobayashi A, Ohgami T, Satoh K, Hamaguchi T, Yamada M, Kitamoto T, Mizusawa H, Yokota T. Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein

gene. Biochem Biophys Res  
Commun. 496(4): 1055-1061, 2018

## 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

