

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

エンドポイント QUIC による prion seeding activity 定量法の 妥当性検討

研究分担者：西田教行	長崎大学生命医科学域
研究協力者：石橋大輔	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：布施隆行	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
研究分担者：岩崎 靖	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 埼玉医科大学国際医療センター
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 プリオンの全身分布と微量な活性の定量的な評価を可能にすることで、医療の安全性、患者検体の取扱上の留意点に関する科学的根拠を示し、ガイドライン等に反映させることを目的に基礎的検討を行った。

A. 研究目的

Real-time Quaking-induced conversion (RT-QUIC)法は、プリオンのシード活性を高い感度で評価できる方法である。エンドポイント法を用いることで 50% seeding dose (SD₅₀)を算出し、活性を定量することが可能で、プリオン病患者の脳組織では、およそ 10¹⁰/g SD₅₀で、スクレイピー感染動物モデルの感染価に近似している。今年度はエンドポイント法の妥当性を再検討したので報告する。

B. 研究方法

sCJD 患者の各種臓器を採取し、冷凍保存後、ビーズショッカーを用いて 10%乳剤を作成した。粗遠心後の上清の 10 倍希釈系列を作成し、RT-QUIC を行い、およそのエンドポイントを求めたのち、小腸組織乳剤の 10⁻⁴および 10⁻⁵希釈サンプルを 96-well plate に分注し、種々の条件で陽性率を求めた。RT-QUIC はヒトリコンピナント PrP 23-230 129M を基質として用い、TECAN Infinite 2000 にて行い、結果はポワソン分布モデルとの比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者臓器の摘出と使用は倫理委員会承認のプロトコールに従い家族の同意を得て、病理解剖時に採取した。

C. 研究結果

陽性well数を母数32、16、8、6、4のそれぞれでカウントし、SD50を求めた。各臓器のSD50を求めるにはN=8以上にてconfidential level 95%であることがわかった。

D. 考察

孤発性プリオン病患者における感染性プリオンは過去の動物実験の結果から感染性異常プリオン蛋白は中枢神経系に限局すると考えられてきたが、脳の 100 分の 1~1000 分の 1 程度の微量のプリオン活性が各種末梢臓器にも認められる。微量な活性を正確に定量的に評価するには、希釈サンプルを最低 N=8 用いて陽性率を求める必要があることがわかった。末梢臓器におけるシード活性を正確かつ定量的に評価し、患者臓器や生体サンプルの取り扱いにおける危険性を正しく評価することが今後可能

になる。患者検体数を増やし、またサブタイプごとにデータを収集する必要がある。

E. 結論

各種末梢臓器にも認められる微量なプリオンシード活性を正確に定量的に評価するには、希釈サンプルを N=8 以上用いて RT-QUIC を行い、陽性率を求める必要がある。

[参考文献]

1) 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. *EBio Medicine* 12:150-155, 2016.

F. 健康危険情報

患者の非神経系臓器においてもプリオン活性が認められるため、臓器に取扱にはガイドラインに従ったプリオン不活化が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sano K, Atarashi R, Satoh K, Ishibashi D, Nakagaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Mishima K, Nishida N. Prion-like seeding of misfolded α -synuclein in the brains of dementia with Lewy body patients in RT-QUIC. *Mol Neurobiol* 55:3916-3930, 2018.
- 2) Taguchi Y, Lu L, Marrero-Winkens C, Otaki H, Nishida N, Schatzl HM. Disulfide-crosslink scanning reveals prion-induced conformational changes and prion-strain-specific structures of the pathological prion protein PrP^{Sc}. *J Biol Chem* 293:12730-12740, 2018.
- 3) Taguchi Y, Lu L, Marrero-Winkens C, Otaki H, Nishida N, Schatzl HM. Correction: Disulfide-crosslink scanning reveals prion-induced conformational changes and prion strain-specific structures of the pathological prion protein PrP^{Sc}. *J Biol Chem* 293:14925, 2018.
- 4) Miyazaki Y, Ishikawa T, Kamatari YO, Nakagaki T, Takatsuki H, Ishibashi D, Kuwata K, Nishida N, Atarashi R. Identification of alprenolol

hydrochloride as an anti-prion compound using surface plasmon resonance imaging. *Mol Neurobiol* 56:367-377, 2019.

2. 学会発表

- 1) 石橋大輔, 中垣岳大, 石川岳志, 水田賢志, 濱田 剛, 西田教行. *in silico* プリオン病創薬における薬効特異性の評価. 生体機能と創薬シンポジウム 2018, 福岡, 8.23-24, 2018.
- 2) 中垣岳大, 西田教行. FK506 の孤発性クロイツフェルトヤコブ病感染モデルにおける治療効果. 第 6 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 松本, 8.25, 2018.
- 3) 渡邊 健, Juliann Nzemi Makau, 石川岳志, 大滝大樹, 水田賢志, 中垣岳大, 石橋大輔, 浦田秀造, 安田二郎, 西田教行. インフルエンザウイルス複製を標的とした蛋白質-蛋白質相互作用阻害剤の開発. 第 71 回日本細菌学九州支部総会/第 55 回日本ウイルス学会九州支部総会, 北九州, 9.7-8, 2018.
- 4) Makau JN, Watanabe K, Ishikawa T, Mizuta S, Kobayashi N, Nishida N. Identification of influenza A Virus inhibitors targeting viral nucleoprotein. 第 71 回日本細菌学九州支部総会/第 55 回日本ウイルス学会九州支部総会, 北九州, 9.7-8, 2018.
- 5) 中垣岳大, 的場苑子, 石橋大輔, 西田教行. 炭酸水素カルシウムメゾ構造体によるプリオン不活化能の検討. 第 71 回日本細菌学九州支部総会/第 55 回日本ウイルス学会九州支部総会, 北九州, 9.7-8, 2018.
- 6) Nakagaki T, Nishida N. Administration of FK506 prolongs survival of mice expressing humanized prion protein infected with Creutzfeldt-Jakob disease agent. Asian Pacific Prion Symposium 2018 (APPS2018), Tokyo, October 4-5, 2018.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 発明の名称: プリオン病治療薬
出願人: 国立大学法人長崎大学
発明者: 石橋大輔, 西田教行
出願番号(出願年月日): 特願 2018-177224 (2018.9.21)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし