

厚生労働科学研究費補助金 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

病理組織切片からの高感度異常型プリオンタンパク検出法の開発

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：中垣岳大 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

研究要旨 医療の安全性向上に資するためにプリオンの全身分布の実態を調査し、診療ガイドラインへ反映を目指している。様々の病型ごとのデータの蓄積が必要であるが、問題点の一つは発症死亡後の病理解剖でのデータだけでは、いつ、どの臓器にどれくらい蓄積するのか、という臨床上重要な疑問に答えることができない。臨床検体に応用し、プリオンの定量的な評価を行うために必要な基礎的技術開発として、本年度パラフィン包埋組織からのプリオン検出法の基礎検討を実施した。病理組織切片からプリオンを検出できれば、検査や手術で作成された切片を用いて未発症キャリアのスクリーニングが可能になり、プリオン病の発症前診断体制の確立につながる。本研究ではその第一段階として、プリオン感染マウスの脳組織切片からプリオンを検出する方法を検討した。

A. 研究目的

クロイツフェルトヤコブ病 (CJD) 等のプリオン病は異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を主体とするプリオン病原体とする致死性の疾患である。これまでの治療薬研究の結果から、プリオン病の克服には可能な限り早期に診断、治療を開始することが重要であることが分かっている。しかし、PrP^{Sc} の蓄積が始まる時期や発症までのタイムコース、発症に至る確率、キャリアの年齢別人口比率など未発症キャリアに関する根本的な情報が明らかになっていない。

我々は超微量の PrP^{Sc} を検出する RT-QUIC 法を用いて全国のプリオン病の疑い例の髄液を検査してきた。理論的にはこの方法で未発症キャリアを検索することが可能であるが、症状のない人からの髄液採取は倫理、侵襲の面からも非常に難しい。そこで検査や手術の際に採取、作成された組織切片から PrP^{Sc} の検出が可能になれば、被検者に負担をかけずにキャリア数を確定し、発症までの時間経過予想が可能となると考えられる。本研究ではプリオン感染マウスの脳組織切片から RT-QUIC 法を用いて PrP^{Sc} を検出する条件を検討し、その感度を評価した。

B. 研究方法

孤発性 CJD 患者から作成した 10%脳乳剤 (BH) をヒト化プリオンタンパクノックインマウス¹ に接種し、終末期に解剖した。マウスの半脳はパラフィン包埋して組織切片を、残りの半脳からは BH を作成した。脳組織切片は脱パラ後、組織からタンパクを抽出し、RT-QUIC 法で PrP^{Sc} を検出した。海外のグループは DTT (200mM) と SDS (2%) を含む溶液に組織を入れて、99°C、500rpm で 60 分振盪することでパラフィン切片からタンパク質を抽出している²。本研究ではこの条件を基に RT-QUIC 法に適したタンパク抽出条件を検討した。

(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。また、症状が進行したマウスは麻酔下で安楽死させた後、組織を回収した。

C. 研究結果

まず、タンパク抽出に必要な溶液の組成を検討した。DTT200mM を含む溶液と DTT を含まない溶液でタンパク質を抽出し、RT-QUIC を行ったところ、DTT を含まない溶液で抽出したサ

ンプルの方が感度が高くなった。さらに、SDS の濃度を 0-2%の間でタンパク質を抽出し、濃度を検討したところ、少なくとも 0.1%以上の SDS では 0.4mg/mL 以上のタンパク質が抽出できることが分かった。さらにこの条件でタンパク抽出したサンプルと生の組織を用いて RT-QUIC を行ったところ、同程度の感度が得られることが分かった。

D. 考察

ホルマリン固定-パラフィン包埋後のサンプルからタンパク質を効率よく回収するためには SDS が重要であることが分かった。また、そのサンプルに含まれるプリオンは生の組織と同程度の活性を有していた。その一方でプリオンは不活化が難しいゆえにパラフィン包埋切片を用いた未発症キャリアのスクリーニングが可能であると予測できる。今後はマウスの脳組織だけでなく、腎臓、肝臓などの非神経組織からの検出条件を確定し、ヒトの組織へ応用を図る。

E. 結論

プリオン感染マウス脳組織のパラフィン包埋切片からプリオンを検出する方法を確立した。

[参考文献]

- 1) Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T. Humanized knock-in mice expressing chimeric prion protein showed varied susceptibility to different human prions. *Am J Pathol* 163:2585-93, 2003.
- 2) Tanca A, Abbondio M, Pisanu S, Pagnozzi D, Uzzau S, Addis MF. Critical comparison of sample preparation strategies for shotgun proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples: insights from liver tissue. *Clin Proteomics* 11:28, 2014.

F. 健康危険情報

ホルマリン固定-パラフィン包埋後のサンプルでもプリオン活性が認められるため、病理組織切片の取扱には注意し、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) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Mori T, Atarashi R, Nishida N. Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models. *Brain* 142:1035-1050, 2019.
- 2) Fuchigami T, Kawasaki M, Koyama R, Nakaie M, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Ono M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated benzofuran derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *ACS Infect Dis* 5:2003-2013, 2019.
- 3) Satoh K, Fuse T, Nonaka T, Dong T, Takao M, Nakagaki T, Ishibashi D, Taguchi Y, Mihara B, Iwasaki Y, Yoshida M, Nishida N. Postmortem quantitative analysis of prion seeding activity in the digestive system. *Molecules* 24:4601, 2019.
- 4) Matsubara T, Satoh K, Homma T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Atarashi R, Sudo Y, Uezono Y, Ishibashi D, Nishida N. Prion protein interacts with the metabotropic glutamate receptor 1 and regulates the organization of Ca²⁺ signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

2. 学会発表

- 1) 丹下寛也, 中垣岳大, 田口 謙, 石橋大輔, 西田教行. プリオン蛋白の液相分離. 第 72 回日本細菌学会九州支部総会・第 56 回日本ウイルス学会九州支部総会, 熊本, 9.13-14, 2019.
- 2) 中垣岳大, 西田教行. 病理組織切片からの高感度異常型プリオンタンパク検出法の開発. 第 72 回日本細菌学会九州支部総会・第 56 回日本ウイルス学会九州支部総会, 熊本, 9.13-14, 2019.
- 3) 四元 鉄, 中垣岳大, 西田教行. 炭酸水素カルシウムメゾ構造体を用いたプリオン不活化の検討. 第 72 回日本細菌学会九州支部総会・第 56 回日本ウイルス学会九州支部総会, 熊本, 9.13-14, 2019.
- 4) Nakagaki T, Nishida N. Investigation of the effect of dysbiosis caused by Ceftriaxone on the oral infection with mouse adapted BSE. Asian Pacific Prion Symposium 2019 (APPS2019), Wako, October 3-4, 2019.

- 5) Taguchi Y, Nishida N. Molecular dynamics simulation for investigation of strain diversity of prions. Asian Pacific Prion Symposium 2019 (APPS2019), Wako, October 3-4, 2019. 影響. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12-3-6, 2019.
- 6) Otaki H, Taguchi Y, Nishida N. Computational study of the interaction and structural properties of α -synuclein amyloids. Asian Pacific Prion Symposium 2019 (APPS2019), Wako, October 3-4, 2019.
- 7) Tange H, Nakagaki T, Taguchi Y, Ishibashi D, Nishida N. Liquid phase separation of prion protein initiates amyloid formation. Asian Pacific Prion Symposium 2019 (APPS2019), Wako, October 3-4, 2019.
- 8) 石橋大輔, 中垣岳大, 西田教行. プリオン感染における I 型インターフェロン受容体の
- 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

