

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 総合研究報告書

プリオン病患者の髄液中のバイオマーカーの検討 および消化管組織のプリオン活性の検討

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：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：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	埼玉医科大学医学部（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 プリオン病の診断には髄液マーカーが有用であるが、感度が十分に高いとは言い切れない。特に RT-QUIC 法での異常プリオンの検出感度を向上させることが望ましい。剖検時の消化管、各種臓器から比較的高いシード活性を認められることから診断への応用可能性が見込まれるが、生前の検体は入手が困難である。そこで通常診療の一環として得られた生検組織のパラフィン包埋標本を用いることを検討した。基礎実験ではホルマリン固定しパラフィン包埋した脳からも固定前の臓器同様の活性を検出できることが確認されたことから、今後発症早期での各種生検サンプルを用いた RT-QUIC 診断が可能になると考えられる。

A. 研究目的

プリオン病患者の髄液中バイオマーカーの検討と問題点を明らかにし、かつ全身の臓器におけるプリオン活性の分布を明らかにする。プリオン活性の定量的な評価の検討および固定臓器からの検出方法を確立する。

B. 研究方法

孤発性プリオン病 455 症例について発症時期、検査所見について詳細に検討した。平成 23 年 10 月から平成 28 年 9 月まで長崎大学に髄液検査の測定依頼のあった症例について髄液中のバイオマーカーの検討と異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QUIC 法) を行った。また孤発性プリオン病患者 4 症例と遺伝性プリオン 2 症例の消化管組織のプリオン活性を測定した。

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 PrPSc を検出した。DTT (200mM) と SDS (2%) を含む溶液に組織を入れて、99℃、500 rpm 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、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)

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。検査および実験については、医学部共同生物災害防止実験施設内の BSL2、BSL3 実験室を利用し、病原体の拡散防止には万全を期している。

C. 研究結果

平成28年度までにサーベイランス委員会において孤発性プリオン病と診断されたのは533例、非プリオン病が621例で髄液中のバイオマーカーの14-3-3についてELISA法の感度は78.7%、タウ蛋白は75.4%、RT-QUIC法が70.1%であった。剖検時の主要臓器では、腎臓、肝臓等にも脳の1万分の1程度の活性が見られた。また消化管は食道から大腸までいずれも活性を認めた。シード活性の定量的に評価においてはendpoint RT-QUIC法ではn=8以上のサンプルデータをもとに算出すべきことがわかった。またパラフィン包埋検体からもRT-QUIC法にてプリオン活性を調べることに成功した。

D. 考察

髄液検査におけるバイオマーカーの感度特異度を正確に把握した。実臨床にマーカー検索の意味を正確に理解してもらう可能になったと考える。特に RT-QUIC の特異度は非常に高いものの感度は70%にとどまることからより高感度な手法の開発が望まれる。末梢臓器において比較的高いシード活性を定量的に評価できることから診断検査における有用性があるかもしれない。また患者臓器や生体サンプルの取り扱いにおける危険性をより正しく評価できると考えられる。将来的には発症前のプリオンキャリア探索も可能になると考えられる。基礎実験ではホルマリン固定しパラフィン包埋した脳からも固定前の臓器同様の活性を検出できることが確認されたことから、今後発症早期での各種生検サンプルを用いた RT-QUIC 診断が可能になると考えられる。

E. 結論

髄液中バイオマーカーの感度は70%を超えており一定の有用性を認めるが、RT-QUIC法は改善の余地があり、今後発症早期での各種生検サ

ンプルを用いた RT-QUIC 診断を検討する必要がある。

[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.
- 2) 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.
- 3) 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

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。また、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) 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, 2017.
- 2) Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Real-Time Quaking-Induced Conversion for Diagnosis of Prion Disease. *Methods Mol Biol* 1658:305-310, 2017.
- 3) 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.
- 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) Yamaguchi K, Kamatari YO, Ono F, Shibata H, Fuse T, Elhelaly AE, Fukuoka M, Kimura T, Hosokawa-Muto J, Ishikawa T, Tobiume M, Takeuchi Y, Matsuyama Y, Ishibashi D, Nishida N, Kuwata K. A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques. *Nat Biomed Eng* 3:206-219, 2019.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Makau JN, Watanabe K, Otaki H, Mizuta S, Ishikawa T, Kamatari YO, Nishida N. A Quinolinone Compound Inhibiting the Oligomerization of Nucleoprotein of Influenza A Virus Prevents the Selection of Escape Mutants. *Viruses* 12:E337, 2020.
 - 11) 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) Miyazaki Y, Ishikawa T, Takatsuki H, Ishibashi D, Nishida N, Atarashi R. Drug discovery for prion diseases by using surface plasmon resonance imaging. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 5-8, 2017.
 - 2) Satoh K, Nishida N, Shirabe S. Biomarkers for human prion disease: Results from the Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Committee in Japan. XXIII World Congress of Neurology/58th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Kyoto, September 16-21, 2017.
 - 3) 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.
 - 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.
 - 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) 西田教行. プリオンの高感度検出法開発とプリオンの体内分布再評価. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 神戸, 6.8-10, 2017.
- 9) 石橋大輔, 石川岳志, 中垣岳大, 丹下寛也, 西田教行. プリオン病におけるインシリコ創薬開発. 第 70 回日本細菌学九州支部総会/第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 那覇, 9.8-9, 2017.
- 10) 中垣岳大, 高月英恵, Elizer Tsvetkov, 西田教行. 腸内細菌叢がプリオン感染に及ぼす影響の解析. 第 70 回日本細菌学九州支部総会/第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 那覇, 9.8-9, 2017.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 渡邊 健, Juliann Nzembi 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.
- 14) Makau JN, Watanabe K, Ishikawa T, Mizuta S, Kobayashi N, Nishida N. Identification of influenza A Virus inhibitors targeting viral uncleoprotein. 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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影響. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12-3-6, 2019.

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： α -シヌクレイン検出方法
出願人：長崎大学, 福岡大学
発明者：西田教行, 佐藤克也, 新竜一郎, 布施隆行, 佐野和憲
出願番号(出願年月日)：特願 2017-228820 (2017.11.29)
公開番号(公開年月日)：-
特許番号(登録年月日)：-
- 2) 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)
公開番号(公開年月日)：-
特許番号(登録年月日)：-

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし