

厚生労働行政推進調査事業費補助金（難治性疾患政策研究事業）

分担研究報告書

研究課題：プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究班

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30年10月1日から令和1年9月30日までのプリオン蛋白遺伝子を解析した症例数は、291例であった。プリオン蛋白遺伝子変異なしが224例、そしてプリオン蛋白遺伝子変異ありが67例であり例年通りV180I症例が最多の46例であった。さらに、サーベイランス番号4898症例（E200K）の感染実験を行ったので報告する。

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、ウエ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291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。

感染実験に関しては、ヒト型プリオン蛋白を導入したKi-129Met/Met, Ki-129Val/Valマウスに加えて、M1プリオンに感受性の高いキメラ型であるKi-ChMマウスを用いて頭蓋内投与を行い、発病または死亡まで観察し、マウスの中樞神経系は半球を組織学的検索に、半球は凍結しウエスタンブロット解析用に用いた。

(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。また、動物実験に関しても所属施設の倫理委員会、動物実験委員会での承認済みである。

C. 研究結果

(結果1)

平成30年10月1日から令和1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を解析した症例数は、291例であった。

プリオン蛋白遺伝子変異なし 224例

129M/M, 219E/E 198例

129M/V, 219E/E 17例

129M/M, 219E/K 5例

129V/V, 219E/E 1例

129M/V, 219E/K 1例

24bp deletion 2例

プリオン蛋白遺伝子変異あり 67例

P102L 6例

P105L 2例 (うち129M/V 2例)

V180I 46例 (うち129M/V 13例)

E200K 5例

M232R 8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。

(結果2)

サーベイランス番号4898症例 (E200K) の感染実験

#4898症例は、コドン200K変異を129Metアレルに持ちながら、もう一方は、コドン200Eという野生型で129Valアレル上に持っていた。臨床的には、コドン200変異の家族性CJDというより、M V 2に似た症状を呈し、また129Valを基質としたPMCAにて増幅可能なことより、V 2プリオンが存在するのは、指摘できていたが、200K変異をもつ分子が異常化しているのかどうかは、感染実験を行って実証した。感染実験の結果は、以下のようであった。

Ki-129Val/Valの潜伏期間が最も短く、また全マウスが発病した。一方、Ki-120Met/Metマウスの潜伏期間は691日と長いものであった。これらの潜伏期間に関しては、V 2プリオンが存在するのではないかという当初の予想と合致するものであった。

Ki-129M/M 691±29.9 days (4/5)

Ki-129V/V 422±25.9 (5/5)

Ki-ChM 559~809 (0/8)

また、E200K変異が異常化した場合、M 1プリオンが存在するはずであるが、M 1プリオンに感受性の高いKi-ChMマウスは、全く発病しなかった。V 2プリオンの存在は、その後ウエスタンブロットによって確定的となり、M 1プリオンが存在しないことは、その後の免疫染色

やウエスタンブロットでも確認された。

D. 考察

基本的に遺伝子検索は例年通りであった。

また、家族性プリオン病の代表的なものであるE200K変異をもつ症例で、変異型のプリオン蛋白が異常化したのではなく、野生型の129Val分子の方が異常化した症例が存在することが感染実験をもって証明しえた。

E. 結論

291例の遺伝子解析を行った。また、家族性プリオン病と思われた症例が実は孤発性プリオン病であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akagi A, Iwasaki Y, Hashimoto R, Aiba I, Inukai A, Mimuro M, Riku Y, Miyahara H, Kitamoto T, Yoshida M. A case of M232R genetic Creutzfeldt-Jakob disease with Lewy bodies. *J Neurol Sci.* 2020 Feb 15;409:116605. doi:10.1016/j.jns.2019.116605. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31811987
- 2) Matsuura Y, Ishikawa Y, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. El

minating transmissibility of bovine spongiform encephalopathy by dry-heat treatment. *J Gen Virol.* 2020 Jan;101(1):136-142. doi:10.1099/jgv.0.001335. PMID: 31718739

- 3) Ikeda T, Iwasaki Y, Sakurai K, Akagi A, Riku Y, Mimuro M, Miyahara H, Kitamoto T, Matsukawa N, Yoshida M. Correlating diffusion-weighted MRI intensity with type 2 pathology in mixed MM-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci.* 2020 Jan 15;408:116515. doi:10.1016/j.jns.2019.116515. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31675505
- 4) Iwasaki Y, Hiraga K, Ito S, Ando T, Akagi A, Riku Y, Mimuro M, Miyahara H, Kobayashi A, Kitamoto T, Yoshida M. Autopsy case of MV2K-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with spongiform changes of the cerebral cortex. *Neuropathology.* 2019 Dec;39(6):452-460. doi:10.1111/neup.12595. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31515858
- 5) Minikel EV, Vallabh SM, Orseth MC, Brandel JP, Haik S, Laplanche JL, Zerr I, Parchi P, Capellari S, Safar J, Kenny J, Fong JC, Takada LT, Ponto C, Hermann P, Knipper T, Stehmann C, Kitamoto T, Ae R, Ham

- aguchi T, Sanjo N, Tsukamoto T, Mizusawa H, Collins SJ, Chiesa R, Roiter I, de Pedro-Cuesta J, Calero M, Geschwind MD, Yamada M, Nakamura Y, Mead S. Age at onset in genetic prion disease and the design of preventive clinical trials. *Neurology*. 2019 Jul 9;93(2):e125-e134. doi:10.1212/WNL.00000000000007745. Epub 2019 Jun 6.
- 6) Hayashi Y, Iwasaki Y, Waza M, Shibata H, Akagi A, Kimura A, Inuzuka T, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Shimohata T. Clinicopathological findings of an MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patient with cortical blindness during a course of glaucoma and age-related macular degeneration. *Prion*. 2019 Jan;13(1):124-131. doi:10.1080/19336896.2019.1631680. PMID: 31219399
- 7) Iwasaki Y, Kato H, Ando T, Akagi A, Mimuro M, Miyahara H, Kobayashi A, Kitamoto T, Yoshida M. Autopsied case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease classified as MM1+2C-type. *Neuropathology*. 2019 Jun;39(3):240-247. doi:10.1111/neup.12557. Epub 2019 May 7. PMID: 31062411
- 8) Rossi M, Kai H, Baiardi S, Bartoletti-Stella A, Carlà B, Zenisini C, Capellari S, Kitamoto T, Parchi P. The characterization of AD/PART co-pathology in CJD suggests independent pathogenic mechanisms and no cross-seeding between misfolded A β and prion proteins. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Apr 8;7(1):53. doi:10.1186/s40478-019-0706-6. PMID: 30961668
- 9) Kobayashi A, Iwasaki Y, Takao M, Saito Y, Iwaki T, Qi Z, Torimoto R, Shimazaki T, Munetsue Y, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Kondo H, Mohri S, Kitamoto T. A Novel Combination of Prion Strain Co-Occurrence in Patients with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Am J Pathol*. 2019 Jun;189(6):1276-1283. doi:10.1016/j.ajpath.2019.02.012. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30926338
- 10) Wang Z, Yuan J, Shen P, Abskharon R, Lang Y, Dang J, Adornato A, Xu L, Chen J, Feng J, Moudjou M, Kitamoto T, Lee HG, Kim YS, Langeveld J, Appleby B, Ma J, Kong Q, Petersen RB, Zou WQ, Cui L. Correction to: In Vitro Seeding Activity of Glycoform-Deficient Prions from Variably Protease-Sensitive

Prionopathy and Familial CJD Associated with PrPV180I Mutation. Mol Neurobiol. 2019 Aug; 56(8):5470.doi:10.1007/s12035-019-1508-3. PMID: 30707392

- 11) Kobayashi A, Qi Z, Shimazaki T, Munesue Y, Miyamoto T, Iso da N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Mohri S, Kitamoto T, Yamashita T, Miyoshi I. Ganglioside Synthase Knockout Reduces Prion Disease Incubation Time in Mouse Models. Am J Pathol. 2019Mar;189(3):677-686. doi:10.1016/j.ajpath.2018.11.009. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30553837

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

