

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

## 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

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学（神経内科学） 教授

**研究要旨** プリオン病、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）、進行性多巣性白質脳症（PML）について、感染及び発症メカニズム、疫学・実態を解明し、早期診断法、治療法、感染及び発症予防法を開発、確立することを目的に調査研究を実施し以下の成果を得た：(1) プリオン病：サーベイランス 1691 例のデータを解析、硬膜移植例の発生の持続、わが国の硬膜例の特徴の海外例との比較、わが国のプリオン病患者の長期生存の原因等の疫学・臨床病態解析結果を報告した。診断法として、脳脊髄液中の感染型プリオンタンパク（PrP）（PrP<sup>Sc</sup>）を検出する画期的診断法 RT-QUIC の開発と有用性の検証、血清タウ蛋白測定の診断的意義等を報告した。基礎研究では PrP の立体構造変換過程の解析、アミロイド形成の起点領域の同定、PrP 切断機構の解明、各種蛋白酵素による PrP<sup>Sc</sup> タイピング、PrP によるオートファジーの活性化、プリオン感染早期からの酸化ストレス等を報告した。治療法開発では、プリオン病患者に対するペントサンポリ硫酸脳室内投与による臨床試験を継続評価し、骨髄間葉系細胞脳移植の治療効果を解明し、プリオン増殖抑制作用を有する色素性化合物を発見した。医療器具による二次感染防御対策では、バイオアッセイ及び PMCA によりプリオン不活効果を検討し、アルカリ洗浄剤とオートクレーブの併用が有効であることを見出した。(2) SSPE：全国サーベイランス 2012 の調査方法の策定、臨床病態・治療実態等の調査、皮下埋め込み型持続輸注ポンプによるリバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験を推進した。SSPE ウイルスの神経病原性に関して、モデルマウスにおける SSPE ウイルス作製と M 遺伝子変異、SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異などを見出した。(3) PML：JC ウイルスゲノム検査を通じた全国サーベイランスにて患者発生率を 0.9 人/1 千万人・年と推定した。最近の PML 発症の背景や特徴を明らかにし、JC ウイルス増殖及び粒子形成促進機構解明等で成果を得た。『プリオン病診療ガイドライン 2013』作成を開始、SSPE 及び PML 診療ガイドラインの改訂作業を推進、SSPE・PML ワークショップを開催した。

### 研究分担者

水澤英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学（神経内科学）教授	竹内敦子	東北大学大学院医学系研究科病態神経学講座 助教
金子清俊	東京医科大学神経生理学講座主任教授	横山 隆	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所プリオン病研究センター 上席研究員
作道章一	琉球大学医学部保健学科生体代謝学准教授	大橋祐美子	独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員
坂口末廣	徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門 教授	桑田一夫	岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻 教授
毛利資郎	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所プリオン病研究センター センター長	松田治男	広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室 特任教授
		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 教授

長谷部理絵	北海道大学大学院獣医学研究科獣医 衛生学教室 講師	柳 雄介	九州大学大学院医学研究院ウイルス学 教授
堂浦克美	東北大学大学院医学系研究科 神経化学分野 教授	野村恵子	熊本大学医学部附属病院発達小児科 助教
佐々木真理	岩手医科大学医歯薬総合研究所 超高磁場 MRI 診断・病態研究部門 教授	岡 明	杏林大学医学部小児科 教授
齊藤延人	東京大学医学部附属病院脳神経外科 教授	大塚頌子	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 発達神経病態学 教授
岩崎 靖	愛知医科大学加齢医科学研究所 講師	愛波秀男	静岡県立こども病院地域医療連携室 兼 神経科 室長 兼 医長
高尾昌樹	東京都健康長寿医療センター研究所 専門研究部長	鈴木保宏	大阪府立母子保健総合医療センター 小児神経科 主任部長
坪井義夫	福岡大学医学部神経内科学教室 教授	多田有希	国立感染症研究所感染症情報センター 室長
桶本優子	国立感染症研究所細胞化学部 主任研究官	澤 洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチ センター分子病態・診断部門 教授
浜口 毅	金沢大学附属病院神経内科 助教	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部 部長
細矢光亮	福島県立医科大学医学部小児科学講 座 教授	岸田修二	東京都立駒込病院脳神経内科 部長
市山高志	山口大学大学院医学系研究科小児科 学分野 教授	宍戸-原 由紀子	杏林大学医学部病理学教室 学内講師
楠原浩一	産業医科大学医学部小児科学講座 教授	長嶋和郎	北海道大学大学院医学研究科腫瘍病 理学分野 名誉教授
堀田 博	神戸大学大学院医学研究科微生物学 分野 教授	雪竹基弘	佐賀大学医学部内科（神経内科） 講師
		奴久妻聡一	神戸市環境保健研究所微生物部 副部長

## A. 研究目的

プリオン病、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）、進行性多巣性白質脳症（PML）について、感染及び発症メカニズム、疫学・実態を解明し、早期診断法、治療法、感染及び発症予防法を開発、確立することを目的とする。

対象の 3 疾患は共に進行性で致死的な感染症であり、感染や発症のメカニズムの解明は極めて不十分であり治療法が確立していない。本研究により、これらの致死性感染症の感染や発症機序の解明を進展させ、早期診断法、治療法や発症・感染予防法の開発・確立に貢献する。

プリオン病は人獣共通感染症であり、牛海綿状脳症からの感染である変異型 Creutzfeldt-Jakob 病

（CJD）や医原性の硬膜移植後 CJD 等が社会的問題になっている。有効な治療法や感染・発症予防法はなく、平均 18 ヶ月で死亡する。わが国では、2005 年に初めて変異型 CJD が同定され（Yamada *et al. Lancet* 2006）、また、硬膜移植後 CJD の症例数が全世界の半数以上を占め現在も発症が続いている（Nozaki, Yamada *et al. Brain* 2010）。1980 年代に硬膜移植を受けリスクが高い約 20 万人にも及ぶ患者が潜在する。プリオン病は動物からヒト、ヒトからヒトへ感染し、プリオンの不活化が困難なため、BSE 汚染食品からの変異型 CJD 感染や硬膜移植後 CJD のような医原性感染について国民の不安も大きい。本研究により感染及び発症メカニズムを解明し、発症前及び早期診断法、

治療法、感染・発症予防法を開発・確立することによって、感染リスク評価法や予防策の改善、国民の不安の軽減にも貢献する。

SSPE については、わが国は先進国中で唯一の麻疹流行国であり SSPE の発症が持続している。欧米では SSPE 発症がほとんどないため、治療研究は行われていない。麻疹感染・流行が本症発症に与える影響を解明することはわが国の麻疹予防接種施策の改善に貢献する。また、リバビリン脳室内持続投与療法等の有効な治療法の確立は本症患者の予後改善に貢献する。

PML は HIV 感染者の漸増、血液疾患、自己免疫疾患、それらに対する強力な治療薬の使用に伴い増加している。これらの疾患の発症動向の把握と治療法確立が必要である。本症発症機序の解明研究の進展とともに、早期診断と最適治療を普及させる。

## B. 研究方法

稀少で屈指の難病を対象とする研究課題を達成するため、本領域のエキスパートの臨床医、基礎研究者、獣医学者等を結集した融合的研究組織を構築し、対象となる3疾患ごとに分科会を設置し、研究者間の緊密な連携をとりながら研究を推進した。プリオン病の疫学については「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」の指定研究班と協力し、さらに全国の CJD 担当専門医の協力を得ながら研究を推進した。また、国際共同研究、国際協力（プリオン病に関する EuroCJD グループとの共同研究、SSPE 多発地との共同研究）を継続した。

### 1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態：1999年4月より実施されている CJD サーベイランスの結果を用いて、我が国のプリオン病の状況を調査した（水澤）。わが国ではプリオン病の生存期間が海外よりも長いことが知られているが、無動性無言状態におけるプリオン病患者の治療、経過と剖検について自験12例を用いて後方視的に検討した（岩崎）。プリオン病に対する臨床診断は時に困難なことから、生前にプリオン病が疑われずに剖検され、組織学的検索で診断される例

があり、こうした例の解明は疫学的また公衆衛生学的見地からも重要である。生前プリオン病が疑われず、剖検後病理診断ではじめてプリオン病と確定された症例を検討した（高尾）。わが国では、現在までに多数の硬膜移植後 CJD が発症しており、その発症数は全世界の硬膜移植後 CJD の6割を超えている。わが国で硬膜移植後 CJD が多発した原因を検討する目的で、わが国と海外の硬膜移植後 CJD の違いを検討した（浜口）。

② プリオン病の診断法の開発：MRI の拡散強調画像(DWI)の表示条件標準化によってプリオン病の早期病変診断能が向上することをこれまでに明らかにしてきたが、その診断精度は未だ十分とはいえないため、そこで診断能の更なる向上を目的に多施設共同研究を計画した（佐々木）。独自に確立した異常プリオン蛋白（PrP）増幅検出法 RT-QUIC 法による脳脊髄液診断法を用い、孤発性 CJD 58 確実例、遺伝性プリオン病 99 例について、髄液中の 14-3-3 蛋白およびタウ蛋白定量と RT-QUIC を行った（西田）。脳脊髄液マーカーになることが予想される H-FABP の検査系を構築すると共に、同一髄液について 14-3-3 とタウの両蛋白測定と H-FABP 測定を比較した（松田）。CJD の簡便な血液マーカーを見出すために、Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)の血清および脳脊髄液中の総タウ蛋白濃度を測定し、アルツハイマー病（AD）および CJD に類似した急速進行性の認知症（RPD）を呈する疾患と比較検討を行った（山田）。

③ プリオン病の分子病態解明：プリオン立体構造変換過程は（1）モノマーでの構造変化過程、及び（2）核依存性複製過程からなるが、その詳細を解明するために、15N ラベルしたリコンビナント・プリオンを用い、CPMG 緩和時間分散法を測定、また、強度の異なる超音波をリコンビナント・プリオンに照射し、凝集体（アミロイド）形成反応を、CD スペクトル、赤外吸収、電子顕微鏡などで観測した（桑田）。プリオン病及び蛋白質凝集関連疾患における凝集体多形形成のメカニズムを明らかにするために、酵母プリオン Sup35 をモデル蛋白質として用い、凝集体多形形成のメカニズム解明に向け、凝集前駆蛋白質の揺



らぎや部分構造に着目した核磁気共鳴法解析を行った（大橋）。生細胞を用い正常型 PrP（PrP<sup>C</sup>）の細胞内輸送を全可視化し、併せて PrP<sup>C</sup> および異常型 PrP（PrP<sup>Sc</sup>）の生理的切断に関与する因子群を同定することを目的に、PrP<sup>C</sup> の細胞内での機能を解析した（金子）。PrP<sup>Sc</sup> は、株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例があり、PrP<sup>Sc</sup> の細分化を目的として、プロテイナーゼ K 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP<sup>Sc</sup> 断片のバンドを解析した（横山）。PrP<sup>C</sup> を培養細胞 HEK293T に過剰発現させるとオートファジーが活性化するが、活性化のメカニズムを検討した（坂口）。非定型 BSE プリオンは従来型の BSE プリオンに比べ、ウシや霊長類（サル）に対しより強い感染性を示すが、ヒト神経細胞株（ニューロブラストーマ）を用いることで、非定型 BSE 由来プリオンの霊長類（ヒト）への伝播の可能性の有無、感染成立後の生化学的特徴を検討した（桶本）。プリオン感染時の脳内では異常型 PrP<sup>Sc</sup> の増加と PrP<sup>C</sup> の減少が生じ脳内の酸化ストレス動態が変化することが考えられることから、マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態の解析を行った（作道）。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：プリオン病に対するペントサンポリサルフェート（PPS）の脳室内持続投与による臨床試験を継続し、臨床評価および副作用の検討を行った（坪井）。骨髄由来間葉系幹細胞（MSCs）をプリオン感染マウスに移植する自己移植系モデルにおいて、プリオン病治療効果を評価する目的で、マウス組織より MSCs（mMSCs）を分離し、表面抗原や分化能などの性状解析を行うとともに、mMSCs をプリオン感染マウスの脳内に移植し、生存期間を評価した（長谷部）。プリオン病の治療・予防法開発のための基礎研究として、抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物や生物因子を探索し、それらの評価を行った（堂浦）。

脳外科手術器具等を介したプリオン病の二次感染を予防するための活動を行った（斉藤）。医療現場におけるプリオン病の二次感染を防ぐことを目的に、手術器具を模したワイヤーを用い応用可能なプリオンの不活化処理を行い、処理後の

感染性について、遺伝子改変マウスを用いたバイオアッセイで調べた（毛利）。また、医療器具を介した二次感染防止を目的とした確実かつ簡便なプリオン滅菌法確立のため、定量的 Protein Misfolding Cyclic Amplification（PMCA）法を用いて、様々な滅菌法によるプリオン不活化効果を比較した（竹内）。

## 2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態：我が国の SSPE の実態については、2007 年に行われたサーベイランス 2007 以降の状況が不明である。2012 年に SSPE 患者の実態についてのサーベイランス調査を行うために、一次調査および二次調査の方法と内容を策定した（岡、大塚、鈴木）。特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票データから、SSPE の疫学、臨床情報、療養状況等の把握を試みた（多田）。SSPE 患者における脳脊髄液中アポリポ蛋白 E（Apo E）濃度、臨床的パラメーターとの相関について検討した（市山）。中枢神経系において麻疹ウイルスのレセプターの可能性がある CD147、麻疹ウイルスの RNA 合成に関与しウイルス増殖に必要な因子と考えられる PRDX1、IL-7 からのシグナルの修飾によって麻疹ウイルスの慢性感染を促進している可能性がある IL-7 receptor 各遺伝子について、1 塩基多型を用いて SSPE 患者と健常対照を対象とした関連解析を行った（楠原）。

② SSPE の治療：SSPE に対する有効な治療法はこれまで無く、オンマヤリザバーによるリバビリン脳室内投与療法を試みてきたが、臨床的有効例みられる一方で、副作用やリバビリン治療中止後の症状増悪などもみられたため、本症の 2 例に対し、皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたりリバビリン脳室内持続投与療法を行った（細矢）。SSPE に対しリバビリン治療を実施した施設に対してアンケート調査を実施した（野村）。SSPE におけるインターフェロン（IFN）長期投与の指針を作成するため、アンケート調査を行った（愛波）。

③ SSPE の分子病態解明と治療法開発：麻疹ウイルスが SSPE ウイルスへと変化する機序に関しては未だ不明であり、機序解明のため、マウ

モデルにおいて SSPE ウイルスを作製することを試みた（細矢）。麻疹ウイルスの細胞融合能と神経病原性の関連を明らかにするため、膜融合能が亢進した麻疹ウイルス変異株の H、F、M 遺伝子（膜融合に関与するウイルス蛋白質をコードする）の塩基配列を決定、発現ベクターに組み込んだ H 遺伝子、F 遺伝子を培養細胞に導入し、融合能が亢進した F 蛋白質をコードする F 遺伝子を持つ組換え麻疹ウイルスを作成し、培養細胞およびヌードマウス、生後 10 日のハムスターに脳内接種した（柳）。薬用植物から得たメタノール加温粗抽出エキスをを用い SSPE ウイルス増殖阻害物質を探索した（堀田）。

### 3) PML

① PML のサーベイランスと病態・治療：PML の診断においては脳脊髄液を用いた JC ウイルス（JCV）ゲノム DNA の PCR 検査が有用である。国立感染症研究所において迅速性および定量性、信頼性において優れた定量的 PCR 検査系を確立し、JCV 検査を介したわが国の PML のサーベイランスを行った（西條）。2010 年 6 月より 2011 年 11 月まで国立感染症研究所へ髄液 JCV-PCR 検査依頼のあった PML17 症例（髄液中 JCV-PCR 陽性例）に関して、症状、画像、検査、基礎疾患、薬剤誘発因子を中心に検討した（岸田）。肝移植後に発症した PML 例を報告した（雪竹）。PML 診療に関する最近 1 年間の進歩をレビューした（雪竹）。

② PML の分子病態解明と治療法開発：PML をきたす JCV は oligodendroglia 核内の PML-NBs（promyelocytic leukemia nuclear bodies）で複製する。JCV 感染における PML-NBs の病理学的意義を検討した（宍戸-原）。JCV の後期タンパク質である agnoprotein のウイルス粒子の形成への影響について分子生物学的手法を用いて検索した（澤）。PML 脳では JCV 感染細胞に高頻度で MeCP2 が過剰発現していること、JCT 抗原存在下では MeCP2 により JC early および late 蛋白いずれもプロモーター活性の亢進が認められることから、JCV 関連蛋白による MeCP2 の転写制御について解析した（長嶋）。サル腎臓細胞で JCV の

増殖が HIV-1 Tat タンパクで促進されることを既に報告したが、ヒト神経芽細胞腫である IMR-32 細胞と JCV を持続産生する JCI 細胞を用いて、組換え Tat タンパクの JCV 複製促進について検討した（奴久妻）。

### 4) 診療ガイドラインの整備等

3 対象疾患の診療ガイドラインの整備に向けた取り組み等を行った。

#### （倫理面への配慮）

患者を対象とする臨床研究（診断、治療、遺伝子解析等）、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

## C. 研究結果

### 1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態：2011 年 8 月までに CJD サーベイランス委員会でプリオン病と認定された症例は 1691 例であった。近年は年間 150-160 例の患者が報告されている。全登録患者の内訳は、孤発性 CJD1297 例（77%）、変異性 CJD1 例、硬膜移植歴を有する CJD79 例（5%）、家族性 CJD239 例（14%）、分類未決定の CJD6 例、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病（GSS）65 例（4%）、致死性家族性不眠症 4 例であった。また、これまでに確認されている硬膜移植歴を有する CJD 患者 142 例についても検討を行った。対象者の 81%が 1983-87 年に硬膜移植を受け、移植から発病までの期間の平均は 151 月であった。

本邦のプリオン病患者の生存期間の検討では、死亡した 9 例の全経過は 5~102 ヶ月（中央値 27 ヶ月、平均 34.2 ヶ月）であった。無動性無言状態に至ってから死亡までの期間は 3~80 ヶ月（中央値 22 ヶ月、平均 27.0 ヶ月）だった。孤発性 CJD の 7 例（いずれも MM1 型）に限れば、全経過は 5~31 ヶ月（中央値 24 ヶ月、平均 20.6 ヶ月）であった。無動性無言状態に至ってから死亡までの期間は 3~28 ヶ月（中央値 21 ヶ月、平均 17.0 ヶ

月)であった。

生前、臨床診断されず、剖検にて初めて診断された2症例を検討した。(症例1) 84歳男性、亜急性進行性の神経症状があり、脳梗塞と臨床診断されていたが、剖検にて孤発性CJD+多発性脳梗塞+Alzheimer病変化と診断された。(症例2) 40歳から失調性歩行があり遺伝性脊髄小脳変性症と臨床診断されていたが、剖検にてGSSと診断し、遺伝子検索にてプリオン蛋白遺伝子P102L変異を確認した。

硬膜移植後CJDについて、わが国の142例と海外から報告された48例を比較したところ、硬膜移植を受けた年齢は、わが国が $43.1 \pm 15.1$ 歳、海外例が $31.1 \pm 15.0$ 歳と海外例が有意に若く( $p < 0.001$ )、硬膜移植からCJD発症までの期間については、わが国は $12.1 \pm 5.8$ 年、海外は $10.8 \pm 6.0$ 年であり有意差はなく、硬膜移植を受けた原因疾患は本邦例、海外例とも腫瘍が最も多かったが、次いでわが国では血管障害(28.9%)や片側顔面攣縮・三叉神経痛(18.3%)が多く(海外例と比較して有意差 $p < 0.001$ )、Lyodura<sup>®</sup>が使用されていた割合はわが国で有意に多く( $p < 0.01$ )、PrP遺伝子コドン129多型では、わが国はMM96.6%、MV3.4%、VV0%、海外例は、MM83.3%、MV6.7%、VV10.0%と分布に有意差を認めた( $p < 0.05$ )。

② プリオン病の診断法の開発：MRI DWIによる診断能の更なる向上を目的に、合同画像委員会を組織して全国多施設共同研究体制を構築した。薄切撮像や3 Tesla MRIによって診断能向上が期待できるため、1.5 Teslaと3 Tesla装置による通常スライス厚と薄いスライス厚のDWIを前向きに集積し、連続確信度法による読影実験とROC解析を行う研究プロトコルを策定した。

脳脊髄液を用いたRT-QUIC法の検討では、孤発性CJDで14-3-3蛋白、タウ蛋白ともに陰性でRT-QUIC法陽性を示す例が1例、またタウ蛋白のみ陽性を示した例が2例あり、14-3-3蛋白、タウ蛋白RT-QUIC法のいずれかが陽性である症例は58例中56例であった。遺伝性CJD V180Iでは14-3-3蛋白、タウ蛋白RT-QUIC法の陽性率はいずれも30-40%と低く、一方、GSS P102Lでは14-3-3蛋白、タウ蛋白の陽性率が低いものの

RT-QUIC法では陽性になることが明らかになった。

脳脊髄液中のサンドイッチELISAによるH-FABP測定法を構築し、H-FABP、14-3-3蛋白、タウ蛋白を即的した。総じて、14-3-3蛋白、タウ蛋白の高値のCJD検体においては、H-FABP値も高かったが、14-3-3蛋白とタウが低値のCJD検体でのH-FABP値には幅があった。

血清タウ蛋白の検討では、孤発性CJD群の血清総タウ蛋白濃度は $193 \pm 72.6$  pg/ml(中央値±標準誤差)で、AD群 $0 \pm 3.3$  pg/ml( $p < 0.001$ )、non-CJD-RPD群 $22 \pm 21.8$  pg/ml( $p < 0.01$ )および健常ボランティア群 $0 \pm 9.37$  pg/ml( $p = 0.001$ )に比較し有意に高値であった。CSF総タウ蛋白濃度は孤発性CJD群で、AD群( $p < 0.05$ )、non-CJD-RPD群( $p < 0.05$ )に比較して有意に高値であった。血清総タウ蛋白濃度はCSF総タウ蛋白濃度と有意に相関した( $p = 0.645$ ;  $p < 0.0005$ )。孤発性CJD群では全症例で血清タウ蛋白濃度が測定可能であったのに対し、non-CJD-RPD群では9例中4例で測定感度以下であった。

③ プリオン病の分子病態解明：プリオン立体構造変換過程のNMRによる解析では、CPMG緩和時間分散法測定により、ポリAとポリT領域に遅い交換が見られ、また、試料中の超音波強度を定量化する手法を確立し、凝集体形成過程に対する影響を調べた結果、超音波強度が核形成の確率に比例することを見出した。

酵母プリオンSup35をモデル蛋白質として用いた凝集前駆蛋白質の揺らぎや部分構造に着目した核磁気共鳴法解析では、凝集体のコアとなりうる領域内に特殊な揺らぎを持つ2領域を発見した。その領域はクロスβ構造の形成に重要であると報告されているアスパラギン残基が多く、また分子間相互作用が確認できた。さらに、アスパラギン残基を他の残基に置換することで、凝集コアの変化が確認でき、その領域が凝集体形成の開始点であることが示唆された。

生細胞を用いたPrPの分子内切断については、PrP<sup>C</sup>の分子内切断にカルパインが特異的に関与していること、一方、プリオン持続感染細胞(ScN2a)におけるPrP<sup>Sc</sup>の切断にはカルパインは



関与せず、ScN2a では PrP<sup>C</sup> とは異なる長さの切断断片が生じており、この切断産生は数種の ADAM プロテアーゼの活性阻害剤の添加により減少することが判明した。

プロテイナーゼ K 以外の蛋白質分解酵素処理による PrP<sup>Sc</sup> 断片の解析では、2 種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した PrP<sup>Sc</sup> のバンド型により、スクレイピー-Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP<sup>Sc</sup> の区別が可能であった。

PrP<sup>C</sup> によるオートファジーの活性化メカニズムの検討では、活性化は Src ファミリーの Fyn の活性化型 (CA-Fyn) により増強され、ドミナントネガティブ型 (DN-Fyn) により抑制された。また、PrP 結合分子として同定した Lrp11 (low density lipoprotein receptor-related protein 11) も同様にオートファジーを活性化させた。プリオン感染細胞 N2a においても、LC3 II の発現が増強しており、Lrp11 の発現も上昇していた。

非定型 BSE の L-BSE 由来プリオンと定型 BSE (C-BSE) 由来プリオンの感染を試みたニューロプラストーマ細胞株 (SK-N-SH, SH-SY5Y, BE (2) -M17) のうち、継代 2 代目の SK-N-SH および BE (2) -M17 の 2 株において C-BSE 由来プリオン感染群とともに L-BSE 由来プリオン感染群においても PrP<sup>res</sup> が検出された。感染成立初期 (継代 2 代目) における PrP<sup>res</sup> の糖鎖型パターンは、双方の細胞株ともに C-BSE 由来プリオン感染群では二糖鎖型 PrP<sup>res</sup> の割合が最も多く、L-BSE 由来プリオン感染群では一糖鎖型 PrP<sup>res</sup> の割合が最も多かった

マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態の解析の結果、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) などの DNA 酸化損傷マーカー、尿中イソプラタンなどの脂質酸化損傷マーカーがプリオン感染により増加していること、さらに、superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) を産生する NOX-2 や NO を産生する iNOS の発現がプリオン感染マウス脳において上昇していること判明した。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与法の臨床試験では、プリオン病 11 例[孤発性 CJD 6 例、硬膜移植

後 CJD 2 例、家族性 CJD (GSS 1 例) 3 例]中、これまでに 9 例が死亡、2 例が治療継続している。11 例の治療開始からの経過は平均 31 か月 (4~65 ヶ月)、治療前の modified Rankin Scale (mRS) は 2-5、現在の mRS は全例 5-6 である。同治療の副作用として硬膜下水腫が全例に認められたが、薬剤に関連する血液検査値の異常は見られなかった。病理学的検討では脳内不溶性プリオンの量が少ない症例や、不溶性プリオン蛋白/全プリオン蛋白比の低い症例があった。

マウス MSCs 移植によるプリオン病治療実験では、非移植群の生存期間は 152.3±6.2 (平均±標準偏差) 日、骨髄 (BM) -mMSCs 移植群では 161.8±9.9 日であり、生存期間が有意に延長した (p<0.05, Logrank 検定)。表面抗原の解析結果から、分離した mMSCs には複数の細胞集団が含まれていた。

抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物や生物因子を探索研究では、プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな化合物として、インドール環よりなる色素性化合物を発見した。また、プリオン脳内感染マウスにおいて効果の程度は低いものの、感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインを発見した。

プリオン病患者の脳神経外科手術事例に関して、手術器具等による 2 次感染を予防するため、事例発生施設の現地調査や説明会を行った。また、円滑なフォローアップ支援のために、インシデント発生時に医療機関に依頼・説明するための書類、リスク保有可能性者に説明するための書類、フォローアップの多摩の書類説明資料を作成した。

手術器具を模したワイヤーを用い応用可能なプリオンの不活性化処理を行い、処理後の感染性について、遺伝子改変マウスを用いたバイオアッセイで検討した所、熱、アルカリ、界面活性剤それぞれ単独では不活性化効果が不十分であるが、それらを組み合わせることによって、高い不活性化効果が認められ、また、アルカリ性洗浄剤については、濃度と熱の条件次第で、単独でも高い不活性化効果が得られることが明らかになった。さらに、定量的 PMCA 法を用いて、様々な滅菌法によるプリオン不活性化効果を比較した結果、市販の消毒液ま

たは洗浄剤であるフタラールやアルカリ洗剤に浸漬した状態で通常のオートクレーブ処理（121°C, 15 min）を行うことで、大幅にプリオン不活化効果を高められることが明らかとなった。

## 2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態：サーベイランス 2012 調査の対象、方法を確定した。全国の主要な小児科・小児神経科（約 500 施設）および神経内科の医療機関（約 700 施設）および前回患者が診療を受けていた医療機関を調査対象とし、現在受診している SSPE 患者数、新規発症 SSPE 患者数、二次調査への協力が可能な人数などを一次調査し（平成 24 年 1 月から 6 月）、一次調査結果に基づいて協力が得られる医療機関には説明文、同意書とともに詳細な内容の調査票を送付して二次調査を行う（平成 24 年 7 月から平成 26 年 3 月）。

特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票データの解析結果では、SSPE 患者年齢の中央値は 23 歳、SSPE 発病年齢の中央値は 11 歳、麻疹罹患年齢は 6 歳以下、65%以上が在宅療養で、また 80%以上が全面介助の必要な状態、言語障害、四肢運動障害、歩行障害、知的退行、摂食又は嚥下障害、尿又は便失禁、筋緊張亢進などは 85%以上と高率に認められ、鼻腔栄養あるいは胃瘻ありの者は 70%、人工呼吸器を用いている者は 20%であった。

SSPE 患者の髄液中 ApoE の検討では、ApoE および ApoE E4 濃度は対照群に比して有意に低値で、Apo E3 濃度は有意に高値であった。SSPE 患者において髄液中 Apo E, Apo E4 および Apo E3 濃度と年齢、罹病期間、病期との間に有意な相関は認めなかった。

SSPE 疾患感受性遺伝子の解析では、CD147、PRDX 1、IL-7 receptor 遺伝子について、SSPE 群と健常対照群との間に allele および genotype 頻度の差を認めなかった。

② SSPE の治療：皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法を行った 2 例において、一時的な症状の改善がみられたが、病状の進行を停止するまでには至らなかった。リバビリン持続投与による副作用は見られな

ったため、両症例とも休薬期間をおかず、持続投与を継続した。

リバビリン療法に関するアンケート調査では、23 名中 10 例に効果を認め、臨床症状スコアが低いうちにリバビリン治療を開始すると比較的予後のよい傾向があった。

IFN に関するアンケート調査では、IFN を投与した 59 名中、3 分の 1 が 1 年以内、6 割が 5 年以内に投与を中止した。IFN 投与で一時的にでも症状が改善したのは 13 名、やや改善が 10 名、不変または悪化が 26 名であった。IFN 中止後一時的にでも症状が改善したのは 8 名で、すべて 4 年以内に中止した例であった。IFN 中止後症状が急激に悪化したのは 5 名と少なかったが、15 年継続して中止した症例でも悪化を認めた。

③ SSPE の分子病態解明と治療法開発：マウスモデルにおける SSPE ウイルスを作製研究では、ヌードマウスに麻疹 Edmonston 株を脳内に接種し、体重減少がみられたマウスを安楽死させ脳を摘出したところ、神経細胞に免疫染色陽性所見がみられ、脳ホモジナイズ液からは、接種量の 4~400 倍のウイルスが検出され、麻疹ウイルスの M 遺伝子において最も多くアミノ酸に変異がみられ、それらの多くが uridine から cytosine への変異によるものであった。

麻疹ウイルスの細胞融合能と神経病原性に関する検討では、F 蛋白質の変異により膜融合能が亢進した麻疹ウイルスは、ヒト神経細胞株を含む受容体陰性細胞に感染して細胞融合を起こすとともに、ヌードマウスやハムスターに神経病原性を示した。

薬用植物に含まれる SSPE ウイルス増殖阻害物質を探索では、約 120 種類の薬用植物から得たメタノール加温粗抽出エキスのうち、30 mg/ml の濃度で麻疹ウイルスの宿主細胞へのウイルス吸着を 80%以上阻害する薬用植物エキスを 3 種類見出したが、一方、同濃度で、細胞毒性なしで明確な麻疹ウイルスまたは SSPE ウイルスの増殖阻害を示す薬用植物エキスは今回の粗抽出エキスの中には見出されなかった。

## 3) PML



① PMLのサーベイランスと病態・治療：JCVのPCR検査を介したサーベイランスでは、2007年4月から2011年10月現在までに486名（589件）の検査依頼に対応し、58名のPML患者を確認した。神経内科だけでなく、感染症科や血液内科といったその他の診療科からも検査が依頼されていた。

わが国の最近のPML17例は、男性10例、女性7例で、平均55.9歳、臨床症状では片麻痺、認知機能障害ばかりでなく構音障害が多く（58.8%）、脳画像では左右非対称性の大脳白質両側性病変ばかりでなく大脳萎縮を示す症例が多くみられ（29.4%）、脳脊髄液検査では蛋白増加が9例（52.9%）、細胞数増加が5例（29.4%）にみられ、基礎疾患としては血液系悪性腫瘍が多く（47.1%）、HIV関連性PMLが少ないこと（23.5%）が特徴であり、薬剤誘発因子はプレドニゾロン、シクロフオスファミドなど多岐に渡っていた。

肝移植後で自己免疫疾患を合併するPML症例では、脳脊髄液JCV DNAは誘発薬剤中止の効果を示す一方、メフロキンのJCVに対する効果は限定的であった。原疾患に伴うGVHDのため、誘発薬剤を一部再開せざるを得ず、陰転化していたJCV DNAが陽性となり死亡した。

PMLに関する文献のレビューでは、多発性硬化症患者におけるNatalizumab治療によるPMLについて、患者1000人当たり1.51の発症率であり、死亡率は18%と報告されていた（Kappos *et al. Lancet Neurol* 10:745-758, 2011）。

② PMLの分子病態解明と治療法開発：JCV感染におけるPML-NBsの病理学的意義を検討では、WT/AVP231導入細胞ではPML-NBsに局限して集積したVP1蛋白がVLPに効率よく会合し細胞超微形態は著しく変性していたが、dl-Mt/VP231導入細胞では、VP1蛋白はより広い核内領域に分布し、形態多様なVLPが形成され細胞超微形態の変性は軽度であった。PMLヒト脳組織を超解像顕微鏡法で解析すると、PML-NBsは直径約700nmの球状殻で、VP1はその外表面に局在していた。

JCVの後期タンパク質であるagnoproteinのウイルス粒子の形成への影響の検討では、外郭タン

パク質でありウイルス粒子を構成している後期タンパク質であるVP1はagnoproteinと結合すること、agnoproteinの非存在下ではJCウイルスの粒子の形状が一様でなくなること、agnoproteinはVP1の多量体形成を促進していることが示された。

JCV関連蛋白によるMeCP2の転写制御についての解析では、MeCP2のプロモーターはJCT抗原の発現により活性が亢進することが判明した。

HIV-1 TatタンパクによるJCV転写促進に関する研究では、ヒト神経芽細胞腫であるIMR-32細胞を用いて、組換えTatタンパクがJCVの複製を促進することを明らかにした。さらにTatタンパク添加によりPurine-Rich Element Binding Protein  $\alpha$  (Pur  $\alpha$ )の発現と細胞増殖ともに低下していた。

#### 4) 診療ガイドラインの整備等

3対象疾患についてそれぞれ分科会を設置し、診療ガイドラインの整備に向けた取り組み、ワークショップ等の開催等を実施した。プリオン病については、『プリオン病診療ガイドライン2013』の作成を開始し、アジア太平洋プリオンシンポジウム（2011年7月10-11日、軽井沢）を後援した。SSPEおよびPMLについては、現在の診療ガイドラインの改訂作業を進め、SSPE・PMLワークショップ（2011年8月19日、東京）を開催した。

## D. 考察

### 1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態：わが国ではプリオン病の患者数として年間ほぼ150-160例が報告されている。BSE関連の変異型CJDは2005年に診断された英国滞在歴のある一例のみである（Yamada *et al. Lancet* 2006）。一方、硬膜移植後CJDは、近年、年間5例以下で推移しているものの発生が続いており、今後も硬膜移植後CJDの患者が継続して発生することが予想された。

わが国のプリオン病患者の無動性無言状態における長期生存については、経管栄養や対症療法、通常の看護が大きな理由であると思われた。またプリオン病の剖検はガイドラインに従えば一般

病院でも可能であり、専門施設との連携により詳細な検討が可能であることが明らかになった。

生前に臨床診断されず剖検にて初めてプリオン病と診断された例の検討では、こうした症例が一定数あることが推察され、プリオン病の真の発生率を把握するために重要である。また、臨床診断されていなかったために、プリオン病に対応しない剖検手技や標本作製を行った施設に対して、プリオン病二次感染対策・指導などの支援を適切に行うことが重要と考えられた。

わが国で硬膜移植後 CJD が多発した原因を検討する目的で、わが国と海外の硬膜移植後 CJD 例を比較検討したところ、硬膜移植時の疾患の違い（わが国では生命予後のよい疾患が多い）や PrP 遺伝子の違い（わが国ではコドン 129 MM が多い）が、海外と比較してわが国で多くの硬膜移植後 CJD が発症したことに影響を与えた可能性が考えられた。しかし、頻用された Lyodura<sup>®</sup>がどの国でどのくらいの数の患者に使用されたかという重要な情報は不明のままであり、わが国で硬膜移植後 CJD が多発した正確な原因については依然不明である。

②プリオン病の診断法の開発：MRI による早期診断に関して、最近急速に普及している 3 Tesla 装置を念頭においた撮像条件や診断能の向上をめざした多施設合同研究がスタートした。3 Tesla 装置では皮髄コントラストや artifact が増強するため、診断能低下が危惧されるが、3mm 以下の薄切撮像はこれらの問題を解決できる可能性がある。

本研究班によって開発された RT-QUIC 法による脳脊髄液中の異常 PrP の検出は新しい診断法として世界中から注目されている（Atarashi *et al.* *Nat Med* 2011）。RT-QUIC 法、タウ蛋白定量、14-3-3 蛋白の定量を組み合わせることによって、孤発性 CJD58 例中 56 例で陽性所見が得られた。また、遺伝性プリオン病に関しては PrP 遺伝子の変異部位によって RT-QUIC 法の陽性率が著しく異なることが明らかになった。RT-QUIC は組織障害よりも異常 PrP 産生と密接に関連する検査法と考えられる。また、今後、RT-QUIC 偽陽性例について注意深く検討する必要がある。さらに、脳脊

髄液中の H-FABP 検査法を確立した。H-FABP は 14-3-3 蛋白、タウ蛋白が低値の場合にも上昇を認める場合があり、H-FABP、14-3-3 蛋白、タウ蛋白の 3 マーカーの測定は CJD 診断の感度を上げると考えられた。

CJD の血液マーカーとして血清タウ蛋白を検討した結果、RPD を呈する症例で血清タウ蛋白濃度が高値の場合、CJD の可能性を考慮して鑑別診断を進める必要があることが明らかになった。血清総タウ蛋白濃度と CSF 総タウ蛋白濃度に相関がみられることから、血清総タウ蛋白濃度は CSF 総タウ蛋白濃度を反映していると考えられる。血清総タウ蛋白濃度は CSF 総タウ蛋白濃度と同様に孤発性 CJD で高値となり、孤発性 CJD と AD、non-CJD-RPD の鑑別に有用な、非侵襲的かつ簡便なマーカーである可能性がある。医療行為によるプリオン病二次感染を予防するために、脳神経外科や眼科手術前に血清総タウ蛋白濃度を測定することは、CJD 疑い例を抽出するスクリーニング法になる可能性がある。

③プリオン病の分子病態解明：プリオン立体構造変換過程は、正常プリオンの (1) 立体構造変化、及びそれに引き続いて起きる (2) 核依存性複製過程に分けられるが、今回の解析では、(1) については、ポリ A とポリ T 領域の接触が構造変換の引き金になること、(2) については、プリオンの線維形成に最適な超音波パワーが存在し、その出力制御がプリオン複製過程の制御に利用できる可能性があることが示唆された。

酵母プリオン Sup35 をモデル蛋白質として用いた核磁気共鳴法解析結果から、蛋白質分子内に凝集開始点が複数存在することが明らかになった。変異等の蛋白質の状態や、他分子の結合による揺らぎや構造の変化、そして周囲の環境に依存して、一番有利な開始点が選択されることが考えられ、これが凝集体多形を作るメカニズムのひとつであると考えられる。プリオン病における異常プリオン蛋白やそれに対応する病態の多様性を考える上で重要な成果である。

PrP の細胞内切断の研究では、PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の分子内切断に関与する酵素が異なっており、それらのプロテアーゼの局在の差から切断される細胞

内局在にも差があることが明らかになった。

プロテイナーゼ K 以外の蛋白質分解酵素処理による PrP<sup>Sc</sup> 断片の解析では、エンドプロテアーゼ Arg-C と Lys-C による PrP<sup>Sc</sup> の新たなタイピングの可能性が示唆された。PK 抵抗性領域である PrP コアおよび N 末領域を含んだフラグメントが混在し、そのモル比による違いと考えられるが、今後、コアの構造や PrP203/207 領域の酵素感受性の検討などが必要である。

PrP<sup>C</sup> によるオートファジーの活性化メカニズムの検討では、過剰な PrP<sup>C</sup> または PrP<sup>Sc</sup> が Lrp11 と結合し、Fyn の活性化を介してオートファジーを活性化させる可能性が示唆された。今後、さらに詳細な検討を要する。

非定型 BSE の L-BSE 由来プリオンがヒト由来の神経細胞に感染しうること、PrP<sup>res</sup> の糖鎖のパターンは C-BSE 由来のものとは異なり、ヒトに L-BSE 由来プリオンが感染した場合、変異型 CJD とは異なる生化学的特徴を有し、その結果、異なった表現型を呈することが示唆される。非定型 BSE プリオンに由来する“非定型変異型 CJD”の出現の可能性に留意する必要がある。

マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態の解析結果から、プリオン感染時には脳内で DNA や脂質の酸化ストレス損傷と NOX-2 や iNOS の発現誘導が起っていることが示唆された。これらの変化は発症時期において強く見られ、プリオン病発症の原因であるか、それとも発症の結果としてこのような発現誘導が起きたのかについて、今後の検討が必要である。

④ プリオン病の治療・予防法の開発 : PPS 脳室内投与による臨床試験では、脳の不溶性 PrP が減少していることが示唆される剖検例があり、治療による影響の可能性が考えられた。英国の変異型 CJD の PPS 治療例で長期生存例が報告されている。PPS 脳室内持続投与は、安全で長期治療にも耐えうる治療法である可能性がある。

マウスの BM-mMSCs の脳内移植により、プリオン感染マウスの生存期間が有意に延長したが、そのメカニズムは今後の検討課題である。ヒト MSCs では CD73 と CD105 の発現が必要条件の一つとされているが、今回分離した mMSCs では、

ごく少数の細胞が陽性を示した。このことから今回の mMSCs には複数の細胞集団が存在し、治療効果が希釈されている可能性も考えられた。今後は CD73 や CD105 によるポジティブセレクションを行い、均一な細胞集団を得ることで治療効果が上がるかを検討していく。

プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮するインドール環よりなる色素性化合物を発見したが、今後、活性を持つ化学構造の特定、作用機序の特定や生理学的意義について解明する必要がある。また、プリオン脳内感染マウスにおいて感染後期の末梢投与でも一定の有効性を発揮するサイトカインについては、既に海外では臨床で使われており、発症後投与での有効性が複数の疾患モデルで確認できれば、早期に患者への臨床応用が可能になる可能性もある。

脳神経外科手術機器を介したプリオン病の二次感染予防のために、そうした事例によって発生した二次感染リスク保有可能性者と事例発生施設の支援を継続する必要がある。

バイオアッセイによる医療器具のプリオン不活化効果の検討から、医療現場で通常行われている消毒処理を組み合わせることにより、二次感染の防止可能と考えられるレベル以下に CJD プリオンの感染性が減衰することが明らかになった。アルカリ性洗剤では濃度、温度、処理時間を一定以上に保持すれば、単独の薬剤処理でも CJD プリオンの感染性を検出限界以下に減衰することが可能であり、温度、濃度 (pH)、時間の要素がアルカリ性洗剤を用いた CJD プリオンの感染性減衰には重要であると考えられた。一方、PMCA 法を用いたプリオン不活化効果の検討では、クレゾール、アルカリ洗剤と通常のオートクレーブ処理を組み合わせる方法により PMCA 法で検出できる PrP<sup>Sc</sup> 量は検出限界以下となり、プリオン不活化に有効な方法であること示された。また、定量的 PMCA 法が迅速かつ高感度なプリオン不活化効果比較のためのツールとして利用可能であることが確認された。

## 2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態 : サーベイ



ランス 2012 の調査方法を策定した。こうした調査では医療機関の協力を得ることが難しい現状があり、今後、患者さんの家族会を通じての協力の呼びかけを行うなどの方法で、実態が正確に把握できるように努める必要がある。

特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票データの解析からは、本症患者の実態に関する有用な情報が得られた。しかし、本事業対象者、さらにそのうちデータ入力された者に限られたデータに基づくものであり、その実態を正確に把握できてはいない。本疾患の発症から経過を長期的に把握する一貫したシステムを構築するなど、情報収集の充実が必要である。

SSPE 患者の髄液中 ApoE の検討では、ApoE および ApoE E4 濃度の低下を認めた。今後、患者遺伝子型ごとの解析を行い、病態との関連を検討する必要がある。

SSPE 疾患感受性遺伝子の解析では、CD147、PRDX 1、IL-7 receptor 遺伝子多型は SSPE に対する疾患感受性に関与していないと考えられた。リスク遺伝子を同定し、そのメカニズムを解明することは、新たな治療アプローチにつながる可能性があり、今後、さらに広範囲な網羅的な検索が必要である。

② SSPE の治療：皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法については、穿刺回数が減少し、リバビリンによる副作用がみられなかったことなどから、単回投与と比較して有用な治療法であると考えられた。持続輸注ポンプを用いることにより、在宅でも治療が可能になる。一方、リバビリン持続投与療法は前例がない新しい治療法であり、今後も注意深く加療していく必要がある。

リバビリン治療例のアンケート調査では、早期発見、早期治療開始が重要であることが明らかになった。感染の危険を伴う頻回の穿刺を避ける意味でも持続注入療法の確立と普及が必要と考えられる。

IFN 長期投与に関するアンケート調査により IFN 治療の期間と中止後の症状を調べ、IFN 長期投与の指針が作成できないか検討したが、長期投与した IFN を安全に終了できる時期を示す事は

できなかった。麻疹抗体価の変化など、他の要因を含めて検討する必要がある。

③ SSPE の分子病態解明と治療法開発：マウスモデルにおける SSPE ウイルスを作製研究では、麻疹ウイルス株をヌードマウスの脳内に接種することにより、主に M 遺伝子に変異の蓄積があり、遊離能が低下し、強い神経病原性を有するといった SSPE ウイルスの特徴を有するウイルスを作製することができた。このモデルは分子病態解明及び治療法開発に有用と考えられる。

麻疹ウイルスの細胞融合能と神経病原性に関する検討では、麻疹ウイルスの細胞融合能の亢進は、SLAM や nectin-4 のような効率の良い受容体を持たない細胞で膜融合を起こすこと、動物での神経病原性を高めることが明らかになった。SSPE ウイルス株の多くに、膜融合を促進させる F 蛋白質変異が認められることは、SSPE の病態にこのような F 蛋白質の変異が関与していることを強く示唆する。

薬用植物による SSPE ウイルス増殖阻害物質の探索研究では、SSPE ウイルスの宿主細胞内における増殖を細胞毒性なしで阻害する粗抽出エキスは現時点では見出されていない。現在、一部の粗抽出エキスについてさらなる分画を行い、細胞毒性と抗ウイルス活性を分離できるか否かの実験を進めつつある。

### 3) PML

① PML のサーベイランスと病態・治療：脳脊髄液の JCV 検査を介した PML サーベイランスにより日本国内の PML 患者発生率を推定すると人口 1 千万人あたり年間 0.9 人であった。この数値には脳脊髄液 PCR 検査において陰性であったが、脳組織検査において陽性であった PML と診断された患者は含まれていない。ただし、現在までに判明している範囲内では、その割合は全陽性者数の 10%未満であり、推定値に大きな相違はないと思われる。

わが国の最近の PML17 例や肝移植後 PML 例の検討から、近年の治療による免疫状態良好な HIV 感染者の増加と、基礎疾患に対する多様な免疫抑制系薬剤の使用の増加が、最近の PML 発症の背

景にあるものと推定された。疾患背景の変化に伴い、従来の報告とはやや異なる特徴を有する PML が発症してきている可能性もある。

多発性硬化症に対する Natalizumab 治療による PML 発症が 1.51/1,000 の頻度でみられることが欧米から報告された。本研究班ではメフロキン治療の臨床試験を推進しているが、メフロキン治療の評価はまだ定まっておらず、今後も注意深く有用性について検討していく必要がある。

② **PML の分子病態解明と治療法開発**：JCV 感染における PML-NBs の病理学的意義の検討結果から、感染性のある子ウイルスは PML-NBs 外表面で産生されること、また agnogene は異所性の粒子形成を抑制している可能性があることが示された。

JCV の後期タンパク質である agnoprotein のウイルス粒子の形成への影響に関する検討結果から、JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein がウイルス粒子形成の効率を促進させることが明らかとなった。

JCV 関連蛋白による MeCP2 の転写制御についての解析結果から、MeCP2 と JCT 抗原の発現は相互に関与していることが明らかとなり、MeCP2 と JCT 抗原の発現には positive feedback loop 状の転写制御機構が存在する可能性が考えられ、MeCP2 が JCV の感染と増殖に重要な働きを示すことが示唆された。

HIV-1 Tat タンパクによる JCV 転写促進に関する研究の結果から、JCV の増殖は Tat、Pur  $\alpha$  および JCV T 抗原の複雑な相互作用で促進されていることが示唆された。

## E. 結論

1) **プリオン病**：サーベイランス 1691 例のデータ解析結果と硬膜移植例の発生の持続、わが国の硬膜例の特徴の海外例との比較、わが国のプリオン病患者の長期生存、脳脊髄液中の PrP<sup>Sc</sup> を検出する画期的診断法 RT-QUIC の開発と有用性の検証、血清タウ蛋白測定の診断的意義等を報告した。PrP アミロイド形成の起点領域を同定し、PrP の立体構造変換過程、PrP の切断機構、各種蛋白酵素による感染型 PrP<sup>Sc</sup> のタイピング、PrP によるオ

ートファジーの活性化メカニズム、プリオン感染早期からの酸化ストレスを報告した。プリオン病患者に対するペントサンポリ硫酸脳室内投与による臨床試験を継続評価し、感染実験モデルにおいて骨髄間葉系細胞脳移植の効果を示し、プリオン増殖抑制作用を有する色素性化合物を発見した。医療器具を介したプリオン二次感染の防御法としてアルカリ洗浄剤とオートクレーブの併用がバイオアッセイ及び PMCA でプリオン不活効果があることを見出した。

2) **SSPE**：サーベイランスの策定、臨床・治療実態調査を行い、皮下埋め込み型持続輸注ポンプによるリバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験を推進した。モデルマウスにおける SSPE ウイルス作製と M 遺伝子変異、SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異を報告した。

3) **PML**：サーベイランスにより患者発生率 0.9 人／1 千万人・年と推定し、最近の PML 発症の背景や臨床的特徴を明らかにし、JC ウイルス増殖及び粒子形成促進機構解明等で成果を得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

- 1) Nozaki I, Sakai K, Kitamoto T, Yamada M. Prion protein gene M232R mutation as a cause of genetic prion disease. (Reply to the Letter to the Editor: Beck et al. Prion protein gene M232R variation is probably uncommon polymorphism rather than a cause of inherited prion disease.) *Brain* 135:e210, 2011.
- 2) Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A $\beta$  seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A $\beta$  deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 123:31-37, 2012.
- 3) Sanghera N, Correia BE, Correia JR, Ludwig C, Agarwal S, Nakamura HK, Kuwata K, Samain E, Gill AC, Bonev BB, Pinheiro TJ. Deciphering the

- Molecular Details for the Binding of the Prion Protein to Main Ganglioside GM1 of Neuronal Membranes. *Chem Biol* 18:1422-1431, 2011.
- 4) Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, Sakaguchi S, Nishida N, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* 179:1301-1309, 2011.
- 5) Kobayashi A, Mizukoshi K, Iwasaki Y, Miyata H, Yoshida Y, Kitamoto T. Co-occurrence of types 1 and 2 PrP<sup>res</sup> in sCJD-MM1. *Am J Pathol* 178:1309-1315, 2011.
- 6) Shishido-Hara Y, Ichinose Y, Uchihara T. JC virus intranuclear inclusions associated with PML nuclear bodies: Analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. *Am J Pathol*, in press.
- 7) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from an SSPE patient possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. *J Virol* 85:11871-11882, 2011.
- 8) Uraki R, Sakudo A, Michibata K, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Onodera T. Blocking of FcR suppresses the intestinal invasion of scrapie agents. *PLoS One* 6:e17928, 2011.
- 9) Rosen RF, Fritz JJ, Dooyema J, Cintron AF, Hamaguchi T, Lah JJ, Levine H 3<sup>rd</sup>, Jucker M, Walker LC. Exogenous seeding of cerebral  $\beta$ -amyloid deposition in  $\beta$ APP-transgenic rats. *J Neurochem* 120:660-666, 2012.
- 10) Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and selectivity of the marine toxin neodysiherbaine A and its synthetic analogues to GluK1 and GluK2 kainate receptors. *J Mol Biol* 413:667-683, 2011.
- 11) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 258:1464-1468, 2011.
- 12) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Kitamoto T, Hashizume Y. Survival to akinetic mutism state in Japanese cases of MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease is similar to Caucasians. *Eur J Neurol* 18:999-1002, 2011.
- 13) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine* 29:9321-9328, 2011.
- 14) Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol*, in press.
- 15) Haneda Y, Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Ohsaki A, Ichiyama T. Leukotriene D4 enhances tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced vascular endothelial growth factor production in human monocytes/macrophages. *Cytokine* 55:24-28, 2011.
- 16) Hasegawa S, Mori N, Satomi M, Jiang DP, Hotta H, Matsushige T, Ichiyama T. Interferon production by cells infected with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus or measles virus. *Cytokine* 56:676-679, 2011.
- 17) Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, Wakiguchi H, Kudo K, Kittaka S, Hara M, Furukawa S. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 167:269-274, 2012.
- 18) Hasebe R, Raymond GJ, Horiuchi M, Caughey B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology* 423:205-213, 2012.
- 19) Kimura T, Hosokawa-Muto J, Asami K, Murai T, Kuwata K. Synthesis of 9-substituted 2,3,4,9-



tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *Eur J Med Chem* 46:5675-5679, 2011.

20) Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem* 46:2917-2929, 2011.

#### 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：プリオンタンパク質構造変換抑制剤及びその利用

出願人：国立大学法人岐阜大学

発明者：桑田一夫

出願番号(出願日)：特願 2011-513378 (2010/5/13)

公開番号(公開日)：WO2010/131717(2010/11/18)

2) 発明の名称：JC ウイルス agno を対象とした PML の治療

現権利者-出願人：独立行政法人科学技術振興機構

発明者：長嶋和郎、澤 洋文、岡田由紀

出願番号(出願日)：特願 2001-356836 (2001/11/22)

公開番号(公開日)：特開 2003-160510 (2003/ 6/ 3)

特許番号(登録日)：特許 4840792 号 (2011/10/14)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし