

臨床研究に関するお知らせ

宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野では、下記の臨床研究を実施しています。皆様には本研究の趣旨をご理解頂き、ご協力を賜りますようお願い申し上げます。

研究課題名：神経変性疾患におけるタンパク質異常凝集機構の解明と新たな診断・予防・治療法の開発に向けた基礎的研究

1. 研究の概要

プリオン病、レビー小体病（パーキンソン病(PD)とレビー小体型認知症(DLB))、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症等の神経変性疾患は、加齢と共に罹患率が上昇することが知られており、高齢化の進行する先進諸国において重要な医学的社会的課題とされています。近年、これらの疾患の多くは、伝達性疾患であるプリオン病と類似したメカニズムによって体内伝播されることが示されており、病態機構に共通のタンパク質凝集メカニズムが存在すると考えられるようになっていますが、そのメカニズムの詳細は不明なままです。そして、現在においても有効な予防・治療法はなく、また診断も困難である場合が少なくありません。

これら神経変性疾患群のメカニズム解明のためには疾患モデル系が必須であり、それらには①試験管内反応系、②培養細胞モデル系、③疾患モデルマウス系の3つの段階が想定され、それらの開発が試みられています。これまで主任研究者らは、これら神経変性疾患の中で主にプリオン病について、上記の①、②において研究を行ってきており、それらを研究の背景として以下に記述します。

まず①において主任研究者らは、以前、異常型プリオンタンパク(PrP)の神経系での異常凝集体の蓄積が原因の神経変性疾患であるプリオン病において高感度の異常型 PrP 試験管内増幅法 (Real-time quaking-induced conversion: RT-QUIC 法) の開発に成功しています。この手法の鍵は、シード(反応の種: この実験系では異常型 PrP) 依存反応はただちに起こるが、自然発生の異常型 PrP(原因タンパク質異常凝集) 形成反応はできる限り起こらない条件を見出すことでした。これまで原因タンパク質異常凝集を試験管内で自然形成させる実験系は数多く報告されてきましたが、それらは自然発生とシード依存反応の鑑別を焦点にしておらず、その2つを分離することにより病原タンパク質の異常凝集体の有無を判定できる診断法となりうることに着目し、実際に成功したのはこの RT-QUIC 法が初めてでした。

RT-QUIC 法は、大量調整の容易な大腸菌由来 recombinant PrP (recPrP) を変換反応の基質とし、攪拌機能付きの蛍光プレートリーダーを用いて、96well dish 上におけるシード依存的な recPrP フィブリルの増幅過程をモニターすることにより、検体中の異常型 PrP の有無を判定できるというものです。この方法では、検体が多数の場合でも非常に簡便に、かつほぼ real-time に測定可能なシステムを構築することが可能です。我々は、このアッセイ系を用いてプリオン患者髄液中の微量な異常型 PrP を検出可能であることを明らかにし、プリオン病の診断に有用であることを示しました。その後、イタリア、アメリカの共同研究グループは、RT-QUIC 法を用いて、ヒトプリオン病の早期より異常型 PrP が蓄積するとされていた嗅粘膜上皮細胞を、内視鏡下に鼻腔からのアプローチで綿棒等により採取し、それらを検体として RT-QUIC 法を行ったところ、髄液を用いた場合よりも高い感度(97%)で陽性となることを報告しています。

さらに RT-QUIC 法では、検体を連続希釈後、反応を行うことにより、検体中のプリオン活性

を試験管内のシード活性として測定可能です。数か月～年単位の時間のかかる動物実験と比べ、2～3日間で測定できるのが大きな利点の一つです。我々は、ヒトプリオン病患者由来の脳組織以外のほとんどの臓器において、脳組織の1/1,000～1/10,000レベルのプリオン活性が存在することも明らかにしています。さらに最近、アメリカの研究グループは、RT-QUIC法によりヒトプリオン病患者由来の皮膚組織にプリオン活性が存在することを報告しています。

一方、プリオン病以外の異常なタンパク質凝集性神経変性疾患（アルツハイマー病、レビー小体病や前頭側頭型認知症等）においても、プリオン病と類似したメカニズムによって異常凝集体が伝達されるという研究結果が、最近になり数多く報告されています。プリオン病におけるRT-QUIC法の開発に触発され、それらの疾患に適用可能なRT-QUIC法開発が試みられており、すでに我々も含め、レビー小体型認知症の原因タンパク質である α シヌクレインや前頭側頭型認知症の原因タンパク質であるタウのリコンビナントタンパク質を反応基質として用いたRT-QUIC法が報告されています。

②の培養細胞（cell culture）モデル系に関しては、現在、プリオン病の予防・治療薬のスクリーニングにはマウスプリオン株の持続感染培養細胞が用いられています。そこで見出された一部の化合物がヒトプリオン病にも効果があることが期待されたが、これまでに臨床的に有効性が示されたものはありません。マウスプリオン株とヒトプリオン病とは候補化合物に対する反応性が大きく異なることも報告されており、ヒトプリオン病の病態解明と予防・治療法の開発のためにはヒトプリオン持続感染培養細胞の樹立が必要と考えられますが、現在に至るまで達成されていません。

この研究では、第一に①試験管内（cell-free）反応系としてのRT-QUIC法を現在応用が進められているプリオン病に加え、アルツハイマー病、レビー小体病や前頭側頭型認知症等へ適応可能なアッセイ系として発展させ、早期発見・鑑別診断として有用なツールとして開発することを第一の目的とします。具体的な目標としては、アルツハイマー病には β アミロイドあるいはタウ、レビー小体病に対しては α シヌクレイン、前頭側頭型認知症に対してはタウあるいはTDP-43を基質とし、反応のシードにはそれら疾患の患者、と対象者由来の検体を用いたRT-QUIC法の確立です。検体として想定されるのは血液、髄液、皮膚、中枢神経（脳、脊髄）、嗅粘膜上皮、その他の各種臓器（消化管、肺、脾臓、肝臓等）です。第二にヒトプリオン持続感染培養細胞あるいはその他のタンパク質異常凝集持続培養細胞を樹立し、それらの細胞を用いた病態機構の解明と予防・治療効果のある化合物のスクリーニングを行います。第三に原因タンパク質発現トランスジェニックマウスや野生型マウスに患者由来検体（脳乳剤等）やRT-QUIC法の産物やタンパク質異常凝集持続培養細胞等を接種し、その体内伝播のメカニズムの解明と、予防・治療薬の評価を行います。これらの研究は、タンパク質異常凝集性神経変性疾患の病態機構の解明に貢献すると同時に、不治あるいは難治性疾患であるこれら疾患の予防・治療法の開発を大きく進展させるものと期待できます。

2. 目的

本研究は、プリオン病、レビー小体病、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症等の神経変性疾患におけるタンパク質異常凝集機構の解明と新たな診断・予防・治療法の開発に向けた基礎的研究が目的です。なお、本研究は、神経変性疾患の分野における新たな知見を得ることを目的とする学術研究活動として実施されます。

3. 研究実施予定期間

この研究は、倫理委員会承認後から2023年3月まで行われます。

4. 対象者

研究協力機関にて1993年以降2018年12月31日までに病理解剖あるいは神経病理学・生化学的診断を受けられた方が対象となります。

5. 方法

①研究協力機関において採取された方由来の試料（脳・皮膚・嗅粘膜上皮・髄液・血液等）中のタンパク質異常凝集体をRT-QUIC法により検出できるか、検討します。その際、対象となる方のカルテ情報から、検査結果、病理所見等を利用して頂き、感度・特異度を測定します。

②試料（脳乳剤）を培養細胞に曝露し、タンパク質異常凝集持続培養細胞を樹立します。

③試料（脳乳剤）を原因タンパク質発現トランスジェニックマウスや野生型マウスに接種し、伝達性と病理像を検証します。なお、本学における試料・情報の管理責任者は、宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野 助教 森 剛志です。

6. 利益相反（COI）

この研究に関する経費は、文部科学省科学研究費（課題名：ヒトプリオン持続感染培養細胞樹立による増幅機構の解明と新たな予防・治療法の創出）、武田科学振興財団 2018年度特定研究助成（課題名：伝達性神経変性疾患の病態分子機構の解明と予防・治療法の開発）資金で実施します。

なお、この研究の実施責任者と分担研究者は、関連する企業やおよび団体等から経済的な利益の提供を受けているため、利益相反は発生しますが、宮崎大学医学部等における臨床研究等利益相反マネジメント規定に従い、この研究の公正な実施に影響が出ないよう配慮いたします。

宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野

教授 新 竜一郎

電話：0985-85-0871

FAX：0985-85-6475