

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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、臨床病態を解明し、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：疫学・臨床病態では、本症 2162 例のデータを解析し、硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)例におけるプリオンの脳内進展様式等を報告した。診断法開発では、脳脊髄液中の感染型プリオン蛋白(PrP^{Sc})を検出する画期的診断法として開発した RT-QuIC の国際共同研究による有用性検証、MRI 経時変化の自動検出プログラム開発等を報告した。基礎研究では、酵母プリオンタンパク質の凝集体と結合する Mlp タンパク質の発見、プリオン病の神経細胞死におけるポストゴルジ小胞輸送障害の役割、種々のプリオン感染モデルとして有用な BvPrP 遺伝子導入マウスの確立等を報告した。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(PPS)脳室内投与による臨床試験の結果を評価し、新たな臨床試験のためのプリオン病コンソーシアム(JACOP)においてプリオン病自然歴登録を開始、糖誘導体等の抗プリオン化合物の作用機序研究等で成果を得た。(2) SSPE：2012 年全国調査で同定された 88 名の患者の臨床的特徴の解析、トルコ共和国との共同研究による検体収集を含む臨床病態の解析を行った。SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異等の意義を解明した。皮下埋め込み型持続輸注ポンプによるリハビリ脳室内持続投与療法の臨床試験を継続し、リハビリ代謝産物 T-CONH₂ の抗ウイルス効果を明らかにした。(3) PML：JC ウイルス(JCV)ゲノム検査を介した全国サーベイランスで7年間に 99 名の患者を確認し、最近の PML 発症の背景や臨床的特徴を明らかにした。JCV の agnoprotein に結合する宿主タンパク質 AP3D、JCV 感染が成立する oligodendrogloma 細胞株、TNF- α の JCV 増殖促進作用、これらの治療薬開発上の有用性を示した。(4) 診療ガイドラインの整備等：3 対象疾患それぞれの分科会において診療ガイドライン作成等を推進し、『プリオン病診療ガイドライン 2014』を平成 26 年 3 月に発刊した(<http://prion.umin.jp/>)。

研究分担者		毛利資郎	東北大学大学院医学系研究科 病態神経学講座 客員教授
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
八谷如美	東京医科大学神経生理学講座 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
作道章一	琉球大学医学部保健学科生体代謝学 准教授	鈴木元治郎	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
横山 隆	独立行政法人 農業・食品産業技術総 合研究機構 動物衛生研究所インフル エンザ・プリオン病研究センター センター長	堀内浩幸	広島大学大学院生物圏科学研究科 免疫生物学 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

堀内基広	北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室 教授	柳 雄介	九州大学大学院医学研究院ウイルス学教授
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	野村恵子	熊本大学医学部附属病院発達小児科 助教
齊藤延人	東京大学医学部附属病院脳神経外科 教授	岡 明	東京大学大学院医学系研究科小児科学 教授
岩崎 靖	愛知医科大学加齢医科学研究所 講師	吉永治美	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 発達神経病態学 准教授
高尾昌樹	東京都健康長寿医療センター研究所 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	砂川富正	国立感染症研究所感染症疫学センター 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
濱口 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	三浦義治	東京都立駒込病院脳神経内科 医長
長谷川俊史	山口大学大学院医学系研究科小児科学分野 准教授	宍戸-原 由紀子	杏林大学医学部病理学教室 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感染症部 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・臨床病態を解明し、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 (vCJD) や医原性の硬膜移植後 CJD (dCJD) 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 vCJD が同定され (Yamada *et al. Lancet* 2006)、また、dCJD の症例数が全世界の約 2/3 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。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。SSPE の発症動態を解明し麻疹感染・流行が本症発症に与える影響を明らかにすることはわが国の麻疹予防接種施策に貢献する。また、神経細胞における麻疹ウイルス (MV)

の持続感染機序は未だ不明であり、分子病態解明に基づく新たな治療法の開発、リバビリン脳室内持続投与療法等の治療法の臨床試験の実施により本症患者の予後改善を図る。

PML は HIV 感染者の漸増、血液疾患、自己免疫疾患、それらに対する免疫治療薬、特に生物学的製剤の使用に伴い増加している。PML の発症動向を把握し、原因となる JC ウイルス(JCV)の脳への感染・増殖機構を解明することによって、早期診断法、最適な治療を確立・普及させる。

B. 研究方法

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、2次感染については「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(研究代表者：水澤英洋)と密接に連携し、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多発地であるトルコ共和国との共同研究ほか)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、山田、浜口他)。dCJDのヒト脳内におけるプリオン進展様式を明らかにするために、移植部位や移植片のサイズがほぼ均一である神経血管減圧術(Jannetta手術)を三叉神経痛や片側顔面痙攣に対して受けたdCJD患者について検討を行った(山田)。発症前のMRI拡散強調像で大脳皮質高信号域を認めたCJD剖検例について、臨床経過、画像所見、病理所見を検討した(岩崎)。Gerstmann-Sträussler-Scheinker病(GSS)P102L-129MにおけるアミロイドPETの病理学的背景を明らかにすることを目的に、剖検例においてPET所見と病理所見を対比した(高尾)。硬膜移植例で移植硬膜によりプリオンのみならず、アミロイドβ蛋白(Aβ)が伝播している可能性を検討した(浜口)。

② プリオン病の診断法の開発：画像診断については、MRI拡散強調画像(DWI)によるプリオン病の早期病変の経時的変化の定量的判定法を開発した(佐々木)。脳脊髄液(CSF)検査については、ヒト孤発性プリオン病確実例109例を対象に総タウ蛋白、14-3-3蛋白、異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})試験管内増幅法(RT-QuIC法)の診断精度を検討した(西田)。CSFマーカーとして心臓型脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)の有用性を報告してきたが、今回はプリオン病および各種認知症疾患の血清中のH-FABPを高感度検出系で検討した(堀内浩幸)。CSFからprotein misfolding cyclic amplification(PMCA)法によって異常PrPを検出する方法を開発するため、リコンビナント正常プリオン蛋白(PrP^C)を用いてCJD患者脳からPMCA法によってヒトプリオンの高効率な増幅を試みた(竹内)。

③ プリオン病の分子病態解明：マウス神経芽細胞腫由来Neuro2a(N2a)細胞において、PrP^C依存性神経細胞死の分子メカニズムを詳細に検討し、関与する因子群を同定した(八谷)。プリオン病原体の細胞間の伝播について明らかにするために、酵母を用いてプリオンの伝播に欠損が生じる変異株を用いて、どのような宿主細胞の因子がプリオンの伝播に関与しているかについて解析した(鈴木)。スクレイピー実験感染羊の脳および脾臓に存在するプリオンの性状を明らかにするために、野生型マウスおよび羊型プリオン蛋白質過発現マウスへの伝達試験と蓄積する異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})のバンド型を解析した(横山)。プリオン病の神経変性のメカニズムを解明するために、ICRマウスの脳内にマウス馴化RML及び22Lプリオンを接種し、マウス脳をウェスタンブロットングで解析した(坂口)。プリオン感染動物の脳内では酸化ストレス増大が起きているが、PrP^C欠乏状態で酸化ストレスが発生するとDNA損傷が起こるのかについて解析するため、プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を用いて、PrP遺伝子発現がDNA損傷マーカーであるcheckpoint kinase 1(chk1)に与える影響について解析した(作道)。伝達性海綿状脳症に広い感受性を有することが知られているbank vole(*Myodes glareolus*)のPrP(BvPrP)遺伝子

を発現するトランスジェニック (TgBv) マウスとノックイン (KiBv) マウスを作成し、感染性について解析した (毛利)。ウシ海綿状脳症 (BSE) において報告されている定型 BSE (C-BSE)、非定型 BSE (H-BSE および L-BSE) において、培養細胞を用いた解析系の樹立を目指した (桶本)。

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、病理所見の検討を行った (坪井)。さらに次世代のプリオン病治療の開発に向けた取り組みとして、GSS 家系の調査を行い (坪井)、さらに臨床試験のための枠組み作りのための全国的な組織づくりを行った (水澤、山田ほか)。PrP が形成する複数の異なるアミロイド線維間における構造転移に関し、NMR、FT-IR、CD を用い構造生物学的及び速度論的解析を行った (桑田)。プリオン病の治療予防開発研究として、糖誘導体のプリオン病モデルマウスにおける作用機序に関する研究を行った (堂浦)。抗プリオン活性を有する薬剤のハイスループットスクリーニング系を作成するために、プリオン持続感染細胞から、タンパク分解酵素処理を用いずに異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を検出可能な cell ELISA を構築した (堀内基広)。脳神経外科手術機器を介したプリオン病の発症に関して、リスク保有者のフォローアップデータを用いて調査を行った (齊藤)。

2) **SSPE**

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・治療：わが国の SSPE の実態については、2007 年に行われたサーベイランス以降の患者動向の状況が不明である。今回、5 年ぶりに SSPE 患者の実態について一次調査および二次調査をサーベイランス調査として行い結果を検討した (岡、鈴木、吉永)。また、特定疾患治療研究事業データを用いて、SSPE の発生状況を解析した (砂川)。ニューロンに多く発現している microtubule-associated protein 2 (MAP2) の血清および髄液中濃度について、トルコ共和国から提供された SSPE 患者の検体 (血清 14 検体、CSF 15 検体) と対照群 (血清 13 検体、CSF 13 検体) について ELISA 法で検討した (長谷川)。

中枢神経系において麻疹ウイルスのレセプターとして機能している可能性がある Nectin-4/PVRL4 遺伝子の多型について、SSPE 群と健常対照群との間で関連解析を行った (楠原)。安全で効果的なリバビリン治療法を確立させるために、リバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行った結果を解析した (野村)。

② SSPE の分子病態解明と治療法開発：神経細胞への感染や病原性における SSPE 由来麻疹ウイルス (MV) 株の F 蛋白質変異の意義を明らかにし SSPE の治療法開発につなげることを目的に、発現ベクターに組み込んだ MV ヘマグルチニン (H) 遺伝子、F 遺伝子を培養細胞に導入し、細胞融合を顕微鏡で観察した (柳)。本研究では、SSPE ウイルス (SSPE-Kobe-1 株) の神経細胞への感染に関わると考えられる遺伝子 (とくに M、F 及び H 遺伝子) を MV 野生株の遺伝子と置換し、培養神経細胞に対する感染性及び細胞融合能、並びにマウス神経病原性に及ぼす影響について解析した (堀田)。SSPE に対しリバビリン脳室内持続投与療法を実施中であるが、リバビリン代謝物の抗ウイルス作用については諸説があり、今回、リバビリン代謝物の 1 つである 1,2,4 triazole-3-carboxamide (T-CONH₂) の抗 MV 効果について検討した (細矢)。

3) **PML**

① PML のサーベイランスと臨床病態・治療：PML の診断においては CSF を用いた 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リアルタイム 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 月から 2013 年 6 月まで国立感染症研究所へ髄液 JCV-PCR 検査依頼のあった 38 例の PML 症例の臨床所見を解析した (三浦)。炎症性 PML を呈した悪性リンパ腫症例を報告した (水澤)。2012 年 11 月から 2013 年 10 月までに報告された PML の診断・治療に関する論文をレビューした (雪竹)。

② PML の分子病態解明と治療法開発：PML は JCV が乏突起膠細胞に感染し、髄鞘崩壊を誘導して発症する。通常の進行性多巣性白質脳症に炎症

反応は伴わないが、少数の症例で高度な炎症細胞浸潤を見る場合がある。炎症反応を伴った進行性多巣性白質脳症について、歴史的背景と過去の報告に基づき、病理組織学的な診断指針の検討を行った(宍戸-原)。宿主細胞内において viroporin として機能する JCV の後期タンパク質である agnoprotein の宿主因子との相互作用を明らかにするために、yeast 2-hybrid system を用いて agnoprotein に結合する宿主因子を同定し、同定した因子の作用機序を解析した(澤)。oligodendroglioma の細胞株および astrocytoma 系の細胞株を用いて JCV 感染実験を行った(長嶋)。HIV-PML において、HIV が感染したマクロファージ系の細胞より産生された TNF- α が JCV の複製を促進する可能性を検討するために、IMR-32 細胞を用いて、TNF- α 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 対象疾患それぞれの分科会において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 : 2012 年 9 月までに全 4281 件を調査し、2162 人(男 : 922 人、女 : 1240 人)をプリオン病と認定した。近年は年間 150-200 例の発症がある。登録患者の内訳は孤発性 CJD : 1655 人(77%)、遺伝性 CJD (genetic CJD) : 325 人(15%)、dCJD : 84 人(5%)、vCJD : 1 人(0.05%)、GSS : 85 人(4%)、FFI : 4 人(0.2%)であった。追跡の結果、患者の 44% が発病後 1 年以内に死亡していた。dCJD 患者に関しては、平成 25 年度に新たに 3 例の発症があり、わが国の硬膜例の総計は 147 例となった。

三叉神経痛または片側顔面痙攣に対する神経血管減圧術後の dCJD は 26 例であった。移植硬膜のブランド名は 23 例(88%)で判明しており、全例が Lyodura[®]であった。移植時年齢、発症時年齢および移植から発症までの期間の平均はそれぞれ 50 歳、61 歳、11 年であった。1999 年以降の 14 例については、11 例が非プラーク型で、2 例はプラーク型と考えられ、1 例では不明であった。非プラーク型症例では、テント上に移植された非プラーク型症例(テント上群)と比較し、神経血管減圧術を受けた症例は vertigo(0% vs 28%; P=0.083)および複視(0% vs 28%; P=0.083)の症例が多い傾向がみられた。非プラーク型症例では、経過中にミオクローヌス 91%、認知機能障害 100%、錐体路徴候 64%、錐体外路徴候 45%、小脳症状 73%、視覚障害 50%、精神症状 73%が認められ、テント上群と比較して、錐体路徴候が少ない傾向がみられた(64% vs 90%; P=0.098)。

発症前の MRI 拡散強調像で大脳皮質高信号域を認めた CJD の検討では、PrP 遺伝子コドン 129 は MM で、病理学的には 1 型 PrP と 2 型 PrP が大脳皮質に混在して認められ、発症前に拡散強調像で高信号を呈した部位は病理学的に 2 型 PrP の沈着が推定された。2 型 PrP 沈着を呈する部位の方が、1 型 PrP 沈着を呈する部位よりも MRI 拡散強調画像の高信号の輝度がより高かった。

GSS P102L-129M の PET 所見と病理所見の検討では、11C-PIB PET は陰性であったが、11C-BF-227 では、アミロイド沈着を示唆する陽性所見を運動野、頭頂葉、線状体、小脳に認めた。神経病理学的には、神経細胞脱落、グリオシスが小脳皮質、小脳、脳幹で顕著で、海綿状変性を小脳皮質に認め、抗 PrP 抗体(3F4)陽性のアミロイド斑を広範に認めた。アミロイド β 蛋白の沈着はなかった。

dCJD と病理学的に診断した 16 症例(35-81 歳)の剖検脳の検討では、16 例中 13 例に脳実質または脳血管に A β 沈着を認めた。16 例の中には、50 歳未満に死亡した若年症例が 3 例含まれていたが(35 歳、39 歳、41 歳)、全例で A β 沈着を認めた。脳実質より脳血管への A β 沈着が目立つ症例が多かった。

② プリオン病の診断法の開発 : MRI DWI による早期病変の経時的変化の定量的判定法として、独

自の信号正規化法と画像統計解析手法を用いた経時的変化の自動検出プログラムを新たに開発した。

CSF マーカーについては、プリオン病 109 確実例において、14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QuIC 法の感度はそれぞれ 88.9%、85.3%、78.9%であった。MM2-視床型では、バイオマーカーと RT-QuIC 法いずれも陰性であった。14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QuIC 法ともに陽性であったのは 72.5%、いずれも陰性だったのは 6.4%であった。脳血管障害・橋本脳症を基礎疾患とした症候性けいれん 4 症例が、偽陽性を示した。

血清 H-FABP の測定では、孤発性 CJD 9 例の平均 H-FABP 量は健常人よりも高値であった。その他では、特にレビー小体型認知症／認知症を伴うパーキンソン病 (DLB/PDD) (8 例) において H-FABP が特に高値を示した。

患者脳プリオンの PMCA による増幅では、MM1 は PMCA 法によるプリオン増幅が困難であり、一方、MV2、VV2、プラーク型 dCJD については Hu129V の基質を用いた場合に非常に高効率に PrP^{Sc} が増幅され、また、E219Q、M232R の変異導入は vCJD の増幅効率をも向上させることが判明した。

③ プリオン病の分子病態解明：

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を用いた PrP による神経細胞死機構の解析では、ミトコンドリア移行に必要な PrP^C の最少領域は 132 から 135 番目にある 4 アミノ酸であること、14-3-3 η に加えて、14-3-3 γ が、PrP^C のミトコンドリア移行の細胞質因子であること、ミトコンドリア蛋白質前駆体の受容体として機能している 3 種類の既知の蛋白質群 (Tom20、Tom22、Tom 70) のうち Tom70 が PrP^C 特異的なミトコンドリア外膜上受容体であること、ミトコンドリア内への輸入には新規のチャンネルが関与していることを明らかにした。

酵母プリオンの凝集機序については、酵母 PrP の凝集体と結合するタンパク質として Mlp タンパク質を単離した。Mlp タンパク質が PrP 凝集体と結合していることや、mlp1mlp2 二重変異株では PrP 凝集体が母細胞から娘細胞へと流入しやすくなっていることを見出した。

スクレイパー実験感染羊の脳および脾臓に存在するプリオンの性状を明らかにするために、野生型マウスおよび羊型プリオン蛋白質過発現マウスへの伝達試験と蓄積する PrP^{Sc} のバンド型を解析したところ、脳に蓄積した PrP^{Sc} 型とプリオンの生物学的性状は一致していたが、脾臓からは複数のプリオン株が検出され、末梢組織の PrP^{Sc} 型別はプリオンの株、種類と一致しないことが示された。

プリオン病の神経細胞死のメカニズムに関する研究では、プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が障害され、PrP^C、インスリン受容体、アトラクチンなどの細胞膜蛋白質がゴルジ装置に蓄積し、細胞膜発現が低下することを見出した。また、この細胞膜発現の低下はマウスがプリオン病を発症する以前から起こっていた。しかし、グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR3 や NR1 の細胞膜発現は低下していなかった。

プリオン病脳で増大していると考えられる酸化ストレスに関する検討では、DNA 損傷の指標である chk1 のリン酸化について、血清存在下において HpL-EM のリン酸化 chk1 は検出限界以下であったが血清除去 18 時間より検出され、血清除去 24 時間でピークとなった。これらのことから、血清除去が DNA 損傷を誘導するとともに、PrP^C 発現は DNA 損傷抑制に関連しているものと考えられた。

TgBv マウスと KiBv マウスによる CJD の接種試験では、TgBv マウスは自発性にプリオン病様症状を呈し、脳内に異常なプリオン蛋白質の蓄積を認めたが、感染性は証明されなかった。KiBv マウスを終生飼育したが、異常なプリオン蛋白質の沈着を認めなかった。また、KiBv マウスは、CJD のみならず定型 BSE、非定型 BSE (H 型、L 型) も伝達され、広い感受性を示した。

わが国のウシから検出された C-BSE および L-BSE に由来するプリオンによるヒト神経細胞株を用いた感染実験により、C-BSE および L-BSE 双方に感受性を有する細胞株が確認され、PrP の産生量を上げることでより安定した解析が可能となった。これらの感染細胞において、プロテアーゼ抵抗性の PrP は C-、L-BSE 由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すことが明

らかとなった。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：PPS 治療を行ったプリオン病 11 例(孤発性 CJD 6 例、dCJD 2 例、家族性 CJD/GSS3 例)について、2013 年に剖検された V180I 家族性 CJD を含め 10 例が死亡、1 例のみ治療継続中である。平均 38 ヶ月(4~77 ヶ月)で、治療中も症状の進行は見られたが、4 例は治療開始から 3 年以上の生存期間を示した。副作用は周術期、血液データ上、治療に関連する異常は見られなかった。6 例で剖検が得られ、1 例は詳細な解析により不溶性プリオンタンパク量がコントロールの CJD 脳に比べ少ないことが示され、4 例の剖検報告では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。

新たな臨床試験の準備のために、全国多施設による臨床研究プリオン病コンソーシアム(Japanese Consortium of Prion Disease: JACOP)がスタートした。プリオン病の自然経過を解明するためのプロトコルの作成等が進行した。臨床試験の対象として、進行が比較的緩やかな GSS が注目され、福岡・佐賀地区に集積する GSS 20 家系の 30 名を越えるリスク保有者の存在を確認した。

NMR 等を用いた構造生物学的及び速度論的解析では、PrP の pH 2.9 fibrils と pH 7.5-like fibrils の間の障壁は低く、可逆的に交換することが可能であるが、pH 7.5-like fibrils と pH 7.5 fibrils の間の障壁は著しく高く、容易に移行できないことが分かった。

糖誘導体の作用に関する検討では、感染ルート(脳内感染、腹腔内感染)や投与ルート(脳室内投与、皮下投与、腹腔内投与)に関係なく、糖誘導体の発病抑制効果にはマウスの系統による違いが観察された。極めて低感受性である Tga20 マウスの遺伝子異常を調べたところ、トランスジーンが pre-T cell receptor alpha 遺伝子の第一イントロンに挿入されているため、同遺伝子の発現が胸腺で検出されないことが判明したが、各種免疫異常動物を用いた検討では糖誘導体の効果は影響をうけなかった。しかし、マクロファージ機能を修飾するチオグリコレート投与やシリカ投与の処置では糖誘導体の効果に影響が見られた。

プリオン持続感染細胞からタンパク分解酵素

処理を用いずに PrP^{Sc}を検出可能な cell ELISA の構築では、96 ウェルプレートに細胞を播種して薬剤処理後、WST 試験により薬剤の細胞毒性を評価し、続いてウェル内で細胞を固定、グアニジンチオシアン酸処理を行った後、抗 PrP モノクローナル抗体 mAb132 を用いて ELISA に準じて PrP^{Sc}を検出することで、タンパク分解酵素処理を行わずに、すべての工程を同一プレート内で完結させることが可能となった。この方法は、1 log 程度のダイナミックレンジを有していた。

脳神経外科手術機器を介したプリオン病の発症に関するリスク保有者のフォローアップデータを用いて調査では、平成25年度は、新規インシデント可能性事案が2件あったが、現時点ではインシデント事例とはならなかった。これまでに13事例がフォローアップの対象となっている。このうち今年度は2事例が10年間のフォローアップ期間が終了した。また、CJD対応の洗浄滅菌条件に耐えるオートクレーブ可能な術中の脳表電気刺激電極を開発した。

2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・検査・治療：サーベイランスの結果、一次調査は 891/1470 施設(回収率 60.6%)で 88 症例が集積された。2007 年の全国サーベイランス調査以降の発症者は 15 名であった。二次調査は 33/64 施設(回収率 51.5%)で 40 症例について解析を行った。性別は男性 20 例、女性 20 例、発症年は 1972 年から 2008 年で、調査時年齢は 13 歳から 49 歳(平均 26.9 歳)であり、罹病期間 15 年以上は半数以上であった。平均発病年齢は 10 歳 2 か月(2 歳 6 か月から 22 歳 4 か月)で、15 歳以降の発病が 5 例、うち 1 例は成人期に発病していた。初発症状は知的退行が最も多く、歩行障害や失立発作等の Jabbour 分類による病期 II 期の症状を初期から認める例も多かった。発症後は多くの症例(31 例中 19 例)で 1 年以内に急速に進行していた。15 歳以降の発病者についても同様の傾向であった。現在の治療はイノシンプラノベクス内服が最も多く、インターフェロン脳室内・髄腔内投与 15 例、リバビリン投与 4 例であり、インターフェロンやリバビリン治療を現在も継続して行っている患者は限られていた。現在

の病期分類では Jabbour IV 期 19 例、V 期 15 例と進行例が 85%であり、医療的ケアも 32 例(80%)で行われていた。最近の病状は不変あるいは悪化傾向にある患者がほとんどで、多くの患者では罹病期間が長期化する中で、現在の治療法では慢性緩徐進行性にあると考えられた。

特定疾患治療研究事業において医療受給者証所持者数は 2000～2012 年度において 84～104 例の範囲であった。1990 年代後半をピークに新規発症者は減少しているが 2012 年にも 1 人の登録が見られた。発病年齢の中央値は 11 歳、麻疹罹患年齢は全例が 6 歳以下で、1 歳以下が多数を占めた。言語障害、知的退行、四肢運動障害、筋緊張亢進、尿又は便失禁を有する状態であり、また摂食又は嚥下障害に対して鼻腔栄養や胃瘻を用いている者も少なくなかった。人工呼吸器使用者も 30%弱認められた。SSPE 症例の多くは要全面介助の在宅療養の状況であった。

MAP2 濃度の検討では、CSF MAP2 濃度は SSPE 群で、対照群に比して、有意な上昇を認めた ($p<0.01$)。一方、血清 MAP2 濃度は両群間に有意差は認めなかった。

Nectin-4/PVRL4 遺伝子多型の検討では、SSPE 群と健常対照群との間に allele および genotype 頻度の差をみとめず、また haplotype 解析でも両群に差をみとめなかった。

SSPE に対するリバビリン治療のアンケート調査では、治療導入に携わった施設は 29 施設あり、治療継続の方針で転院した患者 5 例は、いずれも転院先でも治療を継続することができていた。結果として 18 例中 3 例において有効性を認め、更に 3 例において病状進行の抑制効果の可能性が考えられた。治療経過中に認められた有害事象としては、傾眠傾向 15 例、発熱 12 例、口唇腫脹 7 例、全身倦怠感 6 例、肝機能障害 5 例、嘔気・嘔吐 5 例、細菌性髄膜炎 5 例などがあった。

② SSPE の分子病態解明と治療法開発：神経細胞への感染や病原性における SSPE ウイルス株の F 蛋白質変異の意義の検討では、SSPE 患者由来の MV 株にしばしば認められる F 蛋白質の変異 (T461I および S103I/N462S/N465S) は、F 蛋白質の構造を不安定化し、膜融合能を亢進させることが示された。これらの変異をもつ F 蛋白質を有する

組換え MV は野生型 MV と異なり、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、ヒト神経細胞初代培養で効率よく伝播した。また、哺乳ハムスターに神経病原性を示した。

SSPE-Kobe-1 株の神経細胞への感染に関わると考えられる遺伝子(とくに M、F 及び H 遺伝子)の解析の結果、SSPE-Kobe-1 株と MV 野生株の組換えウイルスを用いた本実験系においては、変異 F タンパク質のみでは神経細胞感染性/細胞融合能及びマウス神経病原性の発現には不十分であること、また、変異 F タンパク質及び変異 H タンパク質の共存により、神経細胞への感染性はわずかに見られたが、細胞融合能及びマウス神経病原性の発現には不十分であることが判明した。一方、変異 F タンパク質、変異 H タンパク質及び変異 M タンパク質の共存により、神経細胞感染性/細胞融合能及びマウス神経病原性は著しく増強され、とくにマウス神経病原性に関しては臨床分離 SSPE ウイルス株(SSPE-Kobe-1)より有意に強かった。

リバビリン代謝産物 T-CONH₂ の MV (Ed) に対する EC₅₀ は 7.1 µg/mL であり、リバビリン 10.3 µg/mL と同程度の抗ウイルス効果を認めた。また、HPLC による測定では、T-CONH₂ 添加群では、一定の割合でリバビリンに変換されており、逆にリバビリン添加群では量としては少ないものの T-CONH₂ への代謝を確認することができた。T-CONH₂ にもリバビリン同様に麻疹ウイルスに対する抗ウイルス効果を認めた。T-CONH₂ 添加群では数%がリバビリンに変換されていた

3) PML

① PML のサーベイランスと臨床病態・治療：JCV の PCR 検査を介したサーベイランスでは、平成 19 年度から同 25 年 12 月現在までに合計 1,040 件(平成 23～25 年度：536 件)の検査を実施し、99 名(平成 23～25 年度：51 名)の PML 患者を確認した。また、平成 19 年度から同 22 年度までの 4 年間、および直近の約 3 年間(平成 23 年 4 月から同 25 年 12 月)における調査結果を比較し、国内における PML の動向を解析した。平成 19 年度からの 4 年間では、PML は血液疾患および HIV 感

感染症を有する患者を中心として発生していたが、直近の約3年間では自己免疫疾患もしくは臓器移植歴を有する患者における PML が増加傾向にあった。また、様々な種類の基礎疾患を有する PML 患者において、女性の割合が増加していた。

2010年6月から2013年6月までに調査した38例の PML 症例情報では、年齢、性別とも従来の報告とほぼ同様で、臨床症状では認知機能障害、構音障害の頻度が高かった。また、画像も従来の報告同様に大脳白質両側性病変で左右非対称性を示す症例が多かったが、大脳萎縮を示す症例が目立った。また CSF 異常を示した症例が比較的多かった。基礎疾患としては悪性腫瘍や膠原病・自己免疫疾患が多く、HIV-PML は 26.3%と少なかった。また誘発薬剤では昨年の報告同様にステロイド使用症例と抗腫瘍薬、エンドキサンやリツキサン使用症例が目立った。脳生検で炎症性 PML を証明した悪性リンパ腫の 53 歳男性例を報告した。ステロイドは使用せず、メフロキンを含む治療にて症状が軽快した。最近1年間の PML に関する報告をみると、多発性硬化症 (MS) と Natalizumab 治療では、PML 発症前における抗 JCV 抗体価の変化や頭部 MRI において他の PML とは異なった画像特徴など、PML 発症を早期に検出するための多数の報告がある。メフロキンの PML 治療は本年も散見される。海外における HIV-PML に対する評価は否定的であるが、非 HIV-PML に対する評価はまだ確定されていない。2013 年、本邦でも PML 診断基準を改訂したが、American Academy of Neurology (AAN) においても診断基準が提唱された。

② PML の分子病態解明と治療法開発: PML の約 10% に炎症所見を伴うことがあり、炎症反応には、JCV に対する制御された免疫応答 (controlled anti-viral inflammation) と、免疫再構築症候群 (IRIS) に見られる秩序を逸脱した過剰な免疫反応がある。両者を鑑別する病理組織学的なポイントとして、PML-IRIS では過剰な免疫応答によりウイルスが排除され少数しか、あるいはほとんど JCV 陽性細胞が検出できないことが多いが、PML with controlled anti-viral inflammation では陽性細胞が多く見られることなどが挙げられた。

JCV の agnoprotein に結合する宿主タンパク質

として adaptor protein complex 3 の δ サブユニット (AP3D) を同定し、agnoprotein が AP3D と結合することにより viroporin として機能することを明らかにした。さらに、agnoprotein と AP3D の結合を阻害することにより JCV 感染を抑制した。

Oligodendroglioma の細胞株および astrocytoma 系の細胞株を用いた JCV 感染実験では、oligodendroglioma の細胞株である U87 細胞株にのみ持続感染が認められ、同じ oligodendroglioma 系の細胞株である A172 および astrocytoma 系である KMG4、U251 細胞株には感染しなかった。

IMR-32 細胞を用いた検討では、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) が JCV の複製を促進した。さらに、JCV 複製促進機構を解明するために、TNF- α 添加による JCV Large T と VP1 の発現量を real-time RT-PCR により定量したところ、Large T のみに有意な発現の増加がみられた。また、核内転写調節因子である NF- κ B の活性化に伴う p65 の核移行量と細胞増殖への影響を調べたところ、p65 の核移行量は増加していたのに対して、細胞増殖には影響がなかった。

4) 診療ガイドラインの整備等

3 対象疾患それぞれ分科会で、診療ガイドラインの整備等に向けた取り組みを行った。

プリオン病については、平成 25 年 12 月に『プリオン病診療ガイドライン 2014』の暫定版を研究班ホームページ (<http://prion.umin.jp/>) 上に公表した。更に、神経学会及び神経感染症学会からの意見やパブリックコメントを得て最終改訂を行い、平成 26 年 3 月に完成版を小冊子及び研究班ホームページ上で公表した。アジア太平洋プリオンシンポジウム (平成 25 年 7 月 21-22 日、長崎) を後援した。

SSPE については、診療ガイドラインの改訂作業が進行した。

PML については、『PML 診療ガイドライン 2013』を平成 25 年 1 月に小冊子及び研究班ホームページ上で公表したが、改訂した研究班診断基準 2013 の精度等についての検討を開始した。

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 150-200 例が報告されている。BSE 関連の vCJD 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、dCJD 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、わが国の硬膜例 147 例は世界全体の約 2/3 にあたる。1980 年代半ばの手術が最もハイリスクであり、潜伏期間が 30 年の例があることを考えると、少なくとも 2010 年代は、今後硬膜移植後 CJD の患者が継続して発生することが予想される。外科手術による 2 次感染リスク保有可能性者と共に今後も注意深い監視が必要である。

PrP^{Sc} の脳内における伝播については、マウス脳内に PrP^{Sc} を注入した報告では、注射部位の周囲より PrP^{Sc} の沈着が広がっていることが報告されている。神経血管減圧術の際に硬膜移植を受けた非プラーク型 dCJD 群ではテント上に移植された群と比較して、vertigo や複視といった脳幹症状を初発症状としてより多く認める傾向があり、移植片に存在する PrP^{Sc} が直接傍の中樞神経系に感染し、その後全体に拡大していく経過として矛盾しない結果であると考えられた。しかし、認知症などの大脳症候から発症する例もあり、直接的な伝播以外の経路(脳脊髄液、血液など)で伝播している可能もある。画像を含めたより詳細な検討が必要である。

発症 8 ヶ月前の MRI 拡散強調像で大脳皮質高信号域を認めた孤発性 CJD の 1 剖検例は、MM1+2 型と考えられ、MM2-皮質型で病理学的に発症し、発症前に MRI にて検出され、経過の途中から MM1 型が合併し急速な臨床経過を呈したと考えられた。MM2-視床型の合併も認められた。1+2 型 CJD 症例では、1 つのプリオン株が先に生じ、その後に異なる株が生じてくるという時間的経過が推定されるが、その機序は、現時点では不明である。非典型的な臨床像と関連しており、今後、臨床診断法確立に向けた取り組みが必要である。

GSS P102L-129M 例におけるアミロイド PET 所見と病理所見の対比では、11C-BF-227 は PrP アミ

ロイド沈着を検出できるが、一方、11C-PIB PET では検出できないことが示唆された。アミロイド PET においてはトレーサーの種類によって PrP アミロイドの検出力が異なることに留意する必要がある。

dCJD 脳の A β 沈着の検討では、若年例でも A β 沈着を認めるなど、硬膜移植によって A β 沈着が促進された可能性を否定できない結果であった。今後、孤発性 CJD、脳外科手術後で硬膜移植歴がなくプリオン病を発症しなかった症例などを対照とした検討を行い、移植硬膜の意義を明らかにする。また、硬膜移植例における Alzheimer 病や他の蛋白 misfolding 病の発症について疫学的な検討が必要である。

② プリオン病の診断法の開発：MRI DWI におけるプリオン病早期病変の経時的変化の自動検出プログラムを新たに開発し、DWI 異常信号域の出現と消退を客観的に評価することが可能となった。本法は今後の早期治療介入における薬効サロゲートマーカーとして有望と考えられた。

CSF マーカーについては、14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法の 3 者の測定は診断上極めて有用であることが明らかになった。異常 PrP を検出する RT-QuIC 法では、症候性けいれんで擬陽性となる場合があることが判明した。RT-QuIC 法を含め、CSF マーカーのみで診断しないように注意を喚起する必要がある。

血清 H-FABP の検討では、プリオン病ばかりでなく、DLB/PDD で高値になることが明らかになった。認知症のバイオマーカーになる可能性があるが、プリオン病のマーカーとしての意義について詳細な検討が必要である。

リコンビナント PrP^C を用い PMCA 法により PrP^{Sc} を増幅する方法の開発では、129VPrP^C を基質に用いた Cell-PMCA 法は、MV2 や VV2 の生前診断法として応用できる可能性だけでなく、プラーク型 dCJD のような感染由来の CJD に関しては、増幅の基質特異性の違いを利用することで、1 つの診断法として応用できる可能性がある。更に、vCJD プリオンでは、コドン 219 および 232 への変異導入が増幅効率を大きく変化させ検出限界の向上をもたらすことが判明した。CSF 診断への応用が期待される。

③ プリオン病の分子病態解明: PrP^Cによるミトコンドリア凝集機構の解析では、PrP^C依存性のミトコンドリア移行には、PrP (132-135)、14-3-3 蛋白質、Tom70 が関与していることが明らかになった。これらの因子のいずれか、もしくは複数の因子を阻害することで、細胞死が遅延あるいは抑制されれば、プリオン病治療の新たな手段となりうることが示唆される。

酵母プリオンをモデル蛋白質とした解析では、核膜孔複合体の構成因子である Mlp タンパク質がタンパク質凝集体と結合している可能性が示された。Mlp タンパク質は nuclear basket と呼ばれ、核膜孔の核側に存在している。このことから、凝集体などのダメージを受けたタンパク質が核内へと輸送されている可能性が考えられる。酵母では核内でプロテアソームの活性が高いことがわかっており、プリオン凝集体などがユビキチン化された後、核内へと輸送されプロテアソームによって分解されている可能性が高い。mlp1mlp2 二重変異株の解析から、mlp1mlp2 二重変異株では PrP などのタンパク質凝集体を母細胞に留めることができずに娘細胞へ流れ込みやすくなり、その結果、細胞寿命が低下すると考えられた。今後、哺乳類においても、PrP などのタンパク質凝集体の伝播や分解機構に Mlp タンパク質が関わっているかを解明し、プリオン病の治療・予防につなげていくことが期待される。

野生型マウスおよび羊型 PrP 過発現マウスへの伝達試験と蓄積する PrP^{Sc} のバンド型を解析では、脳に蓄積した PrP^{Sc} 型と末梢組織の PrP^{Sc} 型は一致しないことが示された。スクレイパーでは、末梢から中枢神経への伝播の際にプリオン株の選択が生じていると考えられた。株の選択または変異に伴う、新興プリオン病の出現メカニズムの一端を示すものと考えられる。

プリオン病の神経変性のメカニズムに関する検討では、プリオンが感染すると、ポストゴルジ小胞輸送が障害され、それによって神経障害がおこる可能性を示した (Uchiyama *et al. Nat Commun* 2013)。プリオン感染による細胞膜蛋白質の細胞膜発現低下が発病に先行し、プリオン病の病態に関与する可能性がある。

プリオン病脳における酸化ストレスに関する

検討では、PrP^C 発現が間接的に DNA 損傷を抑制する可能性が示された。プリオン病発症時にみられるマウス脳内の DNA 損傷が PrP^C 減少によるものかについて、さらなる解析が必要である。

BvPrP 遺伝子導入マウスによる CJD 脳の接種試験では、KiBv マウスは終生、異常 PrP の沈着を認めず、KiBv マウスは CJD のみならず定型 BSE、非定型 BSE (H 型、L 型) も伝達されることから、種々のプリオン感染モデルとして有用であることが明らかとなった。

ヒトニューロプラストーマ細胞株を用いた C-及び L-BSE 由来プリオン感染実験において、PrP の産生量を増加させることにより感染効率および持続感染性が向上すること、これらの感染細胞において BSE 由来プリオンによる細胞内在性 PrP^C から PrP^{res} への変換、および cell to cell の感染が起きていることを確認した。また、C-BSE 由来プリオンについてはマウス神経細胞株 GT1-7 細胞において持続感染が成立した。非定型 BSE は、ヒトにおける孤発性 CJD と同様に、BSE 対策にも関わらず、ウシにおいて散発的に発症することが推定されており、ヒトへの感染性に関する研究は、食品安全上、極めて重要である。

④ プリオン病の治療・予防法の開発: PPS の臨床試験では、PPS 脳室内持続投与療法は安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられた。臨床的に機能的改善を示した症例はみられなかったが、生存期間が長く、生命予後の改善が示唆された。また、剖検例における異常プリオン蛋白蓄積の解析では疾患修飾効果の可能性を示唆した。

新たな臨床試験の準備のために、全国規模の臨床研究のためのプリオン病コンソーシアム (JACOP) が設立され、わが国のプリオン病の自然歴に関する情報が蓄積されつつある。今後、自然歴のデータに基づき、臨床試験の対象として適切なプリオン病のサブグループに対し適切な評価を行う臨床試験のデザインを構築していく。

PrP の NMR 等による解析では、PrP の複数の異なる線維構造間で、構造転移障壁の低いものと高いものが存在することが分かった。これらは、プリオンにおける株の安定化に寄与すると考えられる。一種類の異常型(株)に特異的に結合する低

分子化合物は、他の株に変化すれば、効果がなくなる恐れもあり、治療薬開発に当たっては、PrP^Cの安定化などのメカニズムを考慮する必要がある。

糖誘導体のプリオン病発病抑制効果については、マウス系統差があることが判明した。それには免疫系因子が関与し、マクロファージ機能が影響している可能性が示唆された。胸腺細胞の除去は、糖誘導体の効果を顕著に増強したため、糖誘導体の作用機序に胸腺が関与している。糖誘導体の作用機序解明は、プリオン病に対する疾患感受性機構の解明につながる可能性があり、引き続き解明研究を続ける必要がある。

プリオン持続感染細胞からタンパク分解酵素処理を用いずに PrP^{Sc}を検出可能な cell ELISA を構築することができた。この方法は、1 log 程度のダイナミックレンジを有することから、抗プリオン活性を有する薬剤のハイスループット一次スクリーニング系として有用と考えられる。

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に関する調査研究では、インシデント対応やフォローアップの対目の書類や体制の整備がなされ、順調に対応が始まっている。インシデント事例の調査で判明してきたことは、手術器具の洗浄・滅菌方法について、概ねプリオン対応が計られているが、バイポーラーピンセットなど、一部の器具がプリオン対応となっていない事が問題となり、今後の改善を要する。

2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・検査・治療：2007 年から 5 年後の 2012 年に行われた今回の調査では、患者総数としてはやや漸減傾向にあることが示唆されたが、新規発症例は 2007 年の前回調査以降も認められており、今後は現在行われている麻疹対策により SSPE 発病数の減少が認められるかどうかを明らかにすることが重要である。今回の調査では、ほとんど患者は重症で医療的ケアを必要としながら在宅療養をしていることが明らかになった。こうした成人期で長期療養にある患者の生活環境についての調査は今後重要であり、臨床像に合わせ治療や介護、在宅支援などの方法を検討する必要がある。

特定疾患治療研究事業データを用いた SSPE の発生状況の解析では、医療受給者証所持者数、発症数、症状、介護状況など、本疾患の実態の把握に有用な情報が得られ、上記の調査結果がほぼ裏付けられた。これらの情報は本疾患の実態の把握に有用な情報と考えられるが、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、実態を正確に把握できてはいない。診療や家族支援等の基礎データとして、個人票のデータは有用であり、入力率の更なる向上が望まれる。現在わが国が目指している麻疹排除が達成されれば SSPE の発生はなくなることが期待されるが、その発生数の正確な把握が必要である。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、SSPE の診療や療養支援、麻疹対策の推進に役立てられる情報収集の充実が必要である。

トルコ共和国との国際共同研究を推進し、本症患者の血清および CSF 検体を収集した。MAP2 の SSPE 血清および CSF 中濃度の解析では、SSPE 患者 CSF 中 MAP2 濃度の有意な上昇を認め、ニューロンの細胞体および樹状突起の変性・脱落を間接的に示唆するものと推測した。SSPE の病勢把握、治療効果判定の指標としての有用性については今後検討が必要である。

Nectin-4/PVRL4 遺伝子多型の関連解析では、SSPE 群と健常対照群との間に allele および genotype 頻度の差を認めず、また haplotype 解析でも両群に差を認めなかったことから、Nectin-4/PVRL4 のバリエーションと SSPE に対する疾患感受性との関連は否定的と考えられた。

SSPE に対するリバビリン治療のアンケート調査の解析結果から、SSPE に対するリバビリン治療は、一定の効果があると考えられた。病期が進行しての治療開始では、大きな改善は見込めないため、早期発見、早期治療が望まれる。また、有効濃度を安全域で長時間維持し、感染の危険を伴う頻回の穿刺を避けるため、本研究班で臨床試験が進行中のリバビリンの脳室内持続注入による治療法の有効性、安全性の確立が待たれる。

② SSPE の分子病態解明と治療法開発：発現ベクターに組み込んだ MV H 遺伝子、F 遺伝子を培養細胞に導入し、細胞融合を観察した結果、MV の

F 蛋白質変異による融合能亢進が、SSPE における神経病原性に重要な役割を果たしていると考えられ、SSPE の治療にとって F 蛋白質による膜融合を標的にした抗ウイルス薬が有用であることが示唆された。このような F 蛋白質は、H 蛋白質が SLAM や nectin 4 以外の未知のある分子と結合することによっても、構造変化が誘導され膜融合を起こすことができる。中枢神経系の細胞に発現しているこの未知の分子を同定するとともに、融合能が亢進したウイルスとこの分子の相互作用を阻害する薬剤の開発を目指すべきである。

SSPE-Kobe-1 株の神経細胞への感染に関わると考えられる遺伝子の解析により、SSPE-Kobe-1 株の神経病原性は、変異 M タンパク質、変異 F タンパク質及び変異 H タンパク質が担う強い細胞融合能と相関することが明らかになった。また、SSPE-Kobe-1 株の変異 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性は MV 野生株のそれに比べて減弱している可能性が示唆された。今後、それぞれの変異タンパク質(F、H、M)の中で、どのアミノ酸変異が神経細胞感染/融合能及びマウス神経病原性に関与しているかを解明する必要がある。

リバビリン代謝物 T-CONH₂ はリバビリンと同様に抗 MV 効果を認め、Vero 細胞では毒性を認めなかった。リバビリンの生体内での代謝経路を考えると、T-CONH₂ の抗ウイルス効果は代謝変化したリバビリンが抗ウイルス効果を示しているものと考えられた。T-CONH₂ はリバビリンの代謝物であるが、リバビリンの前駆物質として働く可能性が考えられた。

3) PML

① PMLのサーベイランスと臨床病態・治療: JCV のPCR検査を介したサーベイランスでは、7年にわたる国内のPMLの発症や背景疾患の変化を解析したところ、直近では自己免疫疾患や臓器移植歴を有する患者の発症が増加傾向にあることが明らかになった。これらの動向について今後も注視していく必要性がある。

日本国内発症 PML の基礎疾患が HIV 感染症から悪性腫瘍や自己免疫疾患へと変遷してきていることに伴い、誘発薬剤も免疫抑制剤や抗がん剤、生物学的製剤使用症例が増えてきている。これに

伴って症状では認知機能障害、構音障害の頻度があがり、大脳萎縮、CSF 異常を示す症例が増えてきていると考えられた。

NatalizumabによるPMLはその特徴・治療指針、発症予見のデータなど対応が進んできている。メフロキンの評価は海外のHIV-PMLを中心とした治験ではウイルス量の低下は認められなかったが、非HIV-PMLへの効果は今後の研究課題である。本研究班が推進しているメフロキン臨床試験データの集積が待たれる。AANのPML診断基準と本研究班による「進行性多巣性白質脳症(PML)の診断基準2013」を比較すると、AANのものは病理所見がなくてもdefiniteと診断できる点の特徴である。今後、PML臨床例を国際比較するにあたり、臨床診断基準の違いに留意する必要がある。

② PMLの分子病態解明と治療法開発: PMLの約10%にみられる炎症反応には、JCVに対する制御された免疫応答(controlled anti-viral inflammation)と、免疫再構築症候群(IRIS)に見られる秩序を逸脱した過剰な免疫反応とがある。今後、炎症反応に関する病態評価方法を確立していく必要がある。

JC ウイルスの agnoprotein が viroporin として機能するには、細胞膜上に pore を形成することだけでなく、特定の宿主因子である AP3D と直接相互作用することが必要不可欠であることを明らかにした(Suzuki *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2013)。さらに、agnoprotein と宿主因子 AP3D との特異的相互作用は JCV 感染症治療薬の新たな標的となる可能性が示された。

Oligodendroglioma U87 細胞株に維持型持続感染が成立したことは、新たな JCV 感染における許容細胞の可能性があり、oligodendroglia の JCV 感染における特異的因子を検索する上で重要な知見である。Oligodendroglioma 細胞株でも A172 細胞株では感染が認められなかったことから、同じ oligodendroglia であっても JCV 増殖における特異的核内因子の存在が異なる可能性がある。

神経芽細胞腫である IMR-32 細胞を用いて検討したところ、HIV Tat タンパクが JCV の増殖を促進することを既に報告したが、本研究では TNF- α が JCV の複製を促進することを明らかにした。ヒトの oligodendroglioma 由来細胞株において TNF- α

が JCV の前期および後期プロモーターを活性化することが過去に報告されており、HIV-1 が感染したマクロファージ系の細胞より産生された TNF- α が JCV の複製を促進する可能性が示唆される。

4) 診療ガイドラインの整備等

『プリオン病診療ガイドライン 2014』の暫定版を平成 25 年 12 月に公表し、完成版を平成 26 年 3 月に刊行した。『PML 診療ガイドライン 2013』を発刊した。『SSPE 診療ガイドライン』の改訂作業が進行した。

『プリオン病診療ガイドライン 2014』については、2002 年 1 月に厚生労働省・特定疾患対策研究事業『遅発性ウイルス感染に関する調査研究班』（主任研究者：北本哲之）によって発刊された『クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル・改訂版』以来の本症ガイドラインとなる。本ガイドラインでは、治療の項目で、近年、臨床試験が行われてきた治療法の推奨グレードを示し、プリオン病患者・家族に対する心理社会的支援の項目や、さらに研究班による診療支援情報を掲載した。本ガイドラインにより、わが国における本症の診療水準の向上が期待される。

E. 結論

1) プリオン病：

① 疫学と臨床病態：本症 2162 例のデータ解析結果、硬膜移植例の発生の持続、硬膜例におけるプリオンの脳内進展過程、硬膜移植後 CJD における A β 沈着、GSS アミロイド沈着の PET 所見と神経病理所見との相関、プリオン病の MRI DWI の経時変化解析用の自動検出プログラム作成、CSF 中の PrP^{Sc}を検出する RT-QuIC 法ほかの CSF マーカーの診断的意義、PMCA 法によるヒト MV2、VV2、vCJD プリオン検出等を報告した。

② 分子病態：PrP^C 依存性神経細胞死に関連する PrP^C のミトコンドリア移行に関わる因子、酵母プリオンタンパク質の凝集体と結合する Mlp タンパク質の発見、プリオン病の神経細胞死におけるポストゴルジ小胞輸送障害の役割、種々のプリオン感染モデルとして有用な BvPrP 遺伝子導入マウスの確立等を報告した。

③ 治療法開発：プリオン病患者に対する PPS 脳室内投与による臨床試験結果の評価、新たな臨床試験準備のための臨床研究コンソーシアム (JACOP) によるプリオン病自然歴調査、糖誘導体の抗プリオン病作用の作用機序等を報告した。

2) SSPE：2012 年全国調査による 88 名の患者同定と臨床的特徴の解析、特定疾患治療研究事業データを用いた発生状況の解析、トルコ共和国との国際共同研究を含む臨床病態および治療実態を解析した。SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異の意義等を報告した。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 of 臨床試験を継続し、リバビリン代謝産物 T-CONH₂ の抗ウイルス効果を明らかにした。

3) PML：JCV の PCR 検査を介したサーベイランスで 7 年間に 99 名の患者を確認し、最近の PML 発症の背景 (自己免疫疾患、臓器移植歴等が増加) や臨床的特徴を明らかにした。JCV の agnoprotein に結合する宿主タンパク質 AP3D、JCV 感染が成立する oligodendroglioma 細胞株、TNF- α の JCV 増殖促進作用、これらの治療薬開発上の有用性を示した。

4) 診療ガイドラインの整備等：3 対象疾患それぞれの分科会において診療ガイドライン整備等を推進した。『プリオン病診療ガイドライン 2014』を平成 26 年 3 月に発刊した。

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) Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice.

- Autophagy* 9:1386-1394, 2013.
- 2) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat Commun* 4:1846, 2013.
 - 3) Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Hasegawa H, Hall WW, Sawa H. Viroprotein activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:18668-18673, 2013.
 - 4) Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation: another mechanism of viral evolution. *Trends Microbiol* 21:320-324, 2013.
 - 5) Ichimura T, Taoka M, Shoji I, Kato H, Hatakeyama S, Isobe T, Hachiya N. 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM 32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation. *J Cell Sci* 126:2014-2026, 2013.
 - 6) Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K. Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *J Virol*, in press.
 - 7) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.
 - 8) Abe Y, Hashimoto K, Watanabe M, Ohara S, Sato M, Kawasaki Y, Hashimoto Y, Hosoya M. Characteristics of viruses derived from nude mice with persistent measles virus infection. *J Virol* 87:4170-4175, 2013.
 - 9) Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *J Virol* 87:8745-8755, 2013.
 - 10) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1171-1175, 2013.
 - 11) Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon 129 genotypes. *J Biol Chem* 288:21659-21666, 2013.
 - 12) Leszek J, Trypka E, Kato H, Hachiya N. Break down of insulin system in brain; Link from Alzheimer's disease to type 3 diabetes. *J Alzheimer Dis*, in press.
 - 13) Fujita K, Matsui N, Takahashi Y, Iwasaki Y, Yoshida M, Yuasa T, Izumi Y, Kaji R. Increased interleukin-17 in the cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study of rapidly progressive dementia. *J Neuroinflamm* 10:135, 2013.
 - 14) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One* 8:e60003, 2013.
 - 15) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. *PLoS One* 8:e54915, 2013.
 - 16) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. *PLoS ONE* 8:e60627, 2013.
 - 17) Masujin K, Kaku-Ushiki Y, Miwa R, Okada H, Shimizu Y, Kasai K, Matsuura Y, Yokoyama T. The N-terminal sequence of prion protein consists an epitope specific to the abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}). *PLoS One* 8:e58013, 2013.
 - 18) Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Orba Y, Ohtake N, Nagakawa K, Niikura K, Kimura T,

Kasamatsu H, Sawa H. Cysteine residues in the major capsid protein, Vp1, of the JC Virus are important for protein stability and oligomer formation. *PLoS One* 8:e76668, 2013.

19) Teruya K, Doh-ura K. Amyloid-binding compounds and their anti-prion potency. *Curr Top Med Chem* 13:2522-2532, 2013.

20) Kuwata K. Logical design of medical chaperone for prion diseases. *Curr Top Med Chem* 13:2432-2440, 2013.

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