

プリオン病の治療及び予防を目指した基礎研究

研究課題名：プリオン病の治療とワクチン開発のための基盤構築

坂口 末廣

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染分子病態学 助教授

はじめに

プリオン病は、異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) から構成されている病原体「プリオン」が体内に侵入し、宿主蛋白である正常プリオン蛋白 (PrP^C) を PrP^{Sc} へ構成的に構造変換することにより引き起こされる神経変性疾患である。我々は、PrP^C 欠損 (PrP^{-/-}) マウスを用いて PrP^C の正常機能を解析した。また我々は、PrP^C から PrP^{Sc} への異常変換を阻害する siRNA や抗 PrP 抗体の治療効果についても検討した。さらに我々は、レコンビナント PrP によるプリオンワクチンの効果についても検討した。

研究結果と考察

PrP^{-/-} マウスにおける PrP^C の機能解析

図 1

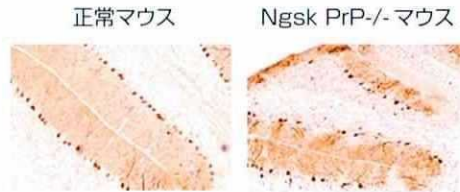
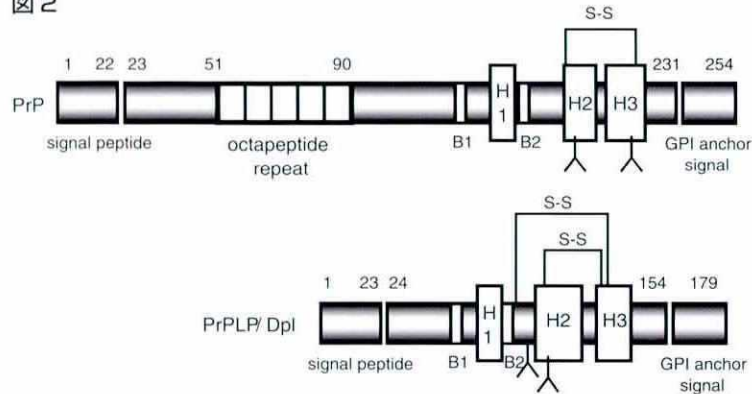


図 2



我々は、独自に作製した Ngsk PrP^{-/-} マウスがプルキンエ細胞死を起こし (図 1)、PrP^C を再導入するとプルキンエ細胞死が正常に回復することから、PrP^C がプルキンエ細胞の長期生存に必要であることを報告した。しかし、他の研究室で作製された Zrch I PrP^{-/-} ではこのような異常が認められなく、どうしてこのような違いが生じるのか長年謎であった。最近我々は、PrP の C 末領域と非常に高い類似性を有する PrP 類似蛋白 (PrPLP/Dpl) を見出した (図 2)。また我々は、この遺伝子が Ngsk PrP^{-/-} マウスの脳特異的に異所性に過剰に発現していることも見出し報告した。

今回我々は、プルキンエ細胞死における PrP^C と PrPLP/Dpl の役割について検討するために、Zrch I PrP^{-/-} マウスバックグラウンドに PrPLP/Dpl を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、これらのマウスは、PrPLP/Dpl の発現量に比例してプルキンエ細胞死をきたした。しかし、Zrch I PrP^{+/-} バックグラウンドではプルキンエ細胞は遅れて死

に、Zrch I PrP^{+/+} バックグラウンドではプルキンエ細胞死がほとんど観察されなかった。これらの結果は、PrP^CとPrPLP/Dplが機能的に拮抗しプルキンエ細胞の生死を決定していることを示した。

また我々は、一過性前脳虚血による海馬神経細胞の細胞死におけるPrP^CとPrPLP/Dplの役割について解析した。Zrch I PrP^{-/-} マウスに脳虚血を行うと、雄では強い神経細胞死が認められたが、雌では神経細胞死が認められなかった。このことは、PrP^Cの機能が性差により異なることを示している。しかし、雄に女性ホルモンを投与しても神経細胞死は軽減されず、この性差は性ホルモンに関係ないことが示唆された。一方、Nsgk PrP^{-/-} マウスでは、性差による違いは認められず、雌も雄と同様に強い細胞死を示した。興味深いことに、Ca²⁺チャンネル拮抗薬のflunarizineをNsgk PrP^{-/-} マウスに投与すると、雌では神経細胞死が緩和されたが雄ではその効果は認められなかった。これらの結果は、PrPLP/DplがCa²⁺の負荷を増し神経細胞死を来とし、逆にPrP^CはCa²⁺の負荷を軽減することで神経細胞を保護していることが示唆された。

siRNA 及び抗 PrP 抗体による PrP^{Sc} の産生抑制

我々は、PrP 翻訳領域内の異なる5カ所の部位を標的にしたPrP-siRNA #1～5をプリオン感染神経芽細胞 (ChN2a-58) に導入し、PrP^{Sc}の産生抑制効果について検討した。その結果、PrP-siRNA #3を除いて全てのPrP-siRNAにおいて、PrP^{Sc}産生抑制が認められた。特に、PrP-siRNA #1は最も強い抑制効果を示した。次に、PrP-siRNA #1をプリオン感染マウスの脳内または脾臓に導入し、in vivoにおけるsiRNAの効果を検討した。その結果、脳内におけるPrP^{Sc}の減少は観察されなかったが、感染脾臓では、コントロール siRNAと比較して、有意にPrP^{Sc}の減少が認められた。

抗 PrP 抗体を感染細胞に反応させると、その機序は不明であるが、PrP^{Sc}の産生を抑制することが知られている。そこで我々は、抗 PrP モノクロナル抗体 Sh3.9を感染マウスの脳室内に持続投与を行いその治療効果を検討した。感染後期の13週目からSh3.9抗体を投与しても、有意な潜伏期の延長は認められず、PrP^{Sc}の脳内蓄積の減少も認められなかった。しかし、感染中期の8週目から投与すると、潜伏期の延長は認められなかったが、脳内のPrP^{Sc}の蓄積は半分ほどに減少していた。このことは、Sh3.9抗体が脳内におけるPrP^{Sc}の蓄積を抑制することを示した。潜伏期の延長が認められなかったのは、おそらくSh3.9抗体が生命予後に重要な部位に到達出来なかったためと考えられる。したがって、siRNAの場合と同様に、いかに効率良くSh3.9抗体を脳内にデリバリーするかが今後の課題である。

異種プリオン蛋白免疫によるプリオン病の発症遅延効果

我々は、マウス、ハムスター、ウシ、ヒツジ、ヒトのリコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) をBALB/cマウスの腹腔内に免疫すると、マウスrPrPは抗体反応を起こさないが、それ以外の異種のrPrPは程度の差はあるが高い抗原性を示すことを見出した。また興味深いことに、異種rPrPを免疫して得られた抗血清はマウスrPrPと反応性を示した。また、ウシと羊のrPrPを免疫したマウスにプリオンを感染させると、マウスrPrPを免疫したマウスや非免疫のマウスと比べて有意に潜伏期が延長した。

今後の展望

我々は、PrP^CがPrPLP/Dplの神経変性作用に拮抗し、プルキンエ細胞を保護する機能を有することを明らかにした。また我々は、siRNAや抗体を用いて、プリオン感染細胞におけるPrP^{Sc}の産生を抑制することができた。プリオン病の治療法を開発するには、PrP^Cの分子レベルにおける機能解明をさらに進めていき、プリオン病の分子病態を明らかにすることが必要だと考えている。また、siRNAや抗体をいかに効率良く脳内へデリバリーしていくかもこれからの大きな問題だと考えている。我々は、異種rPrPを免疫することにより、プリオン病の発症を遅延させることができ、プリオンワクチンの可能性について強く示唆することができた。今後、異種rPrPの抗原性を高め、より効果の高いプリオンワクチンの開発を目指していきたいと考えている。

主要論文リスト

1. Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine* (in press)
2. Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M: Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136, 281-287, 2005
3. Sakaguchi S: Prion protein, prion protein-like protein, and neurodegeneration. *Neurodegeneration and Prion Disease* edited by David R. Brown, 167-193, 2005, Springer
4. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures. *Journal of Virology*, 79, 7104-7112, 2005
5. Atarashi R, Sakaguchi S, Shigematsu K, Katamine S: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI Journal*, 3: 82-90, 2004
6. Sakaguchi S: Antagonistic roles of prion protein and prion protein-like protein in neurodegeneration. *Recent Research Developments in Experimental Medicine*, 1: 47-61, 2004
7. Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 1247-1252, 2004

特許

坂口末廣、石橋大輔、山中仁木：ワクチンと免疫方法（出願番号 2005-157931）