

厚生省特定疾患調査研究事業

家族性及び外因性プリオン病の
発症遅延方策に関する介入研究

平成12年度研究報告書

平成 13 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

はじめに

平成12年度の「家族性及び外因性プリオン病の発症遅延方策に
関する介入研究」の研究報告を公表する

平成 13 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

目 次

総括研究報告書	1
---------------	---

分担研究報告書

1. プリオン蛋白逆変換活性ペプチドの同定	9
-----------------------------	---

長崎大・院医・感染分子病態学 片 峰 茂

2. プリオン病の遺伝子治療の基礎的研究	16
----------------------------	----

東北大・院医・病態神経学 北 本 哲 之

3. ヒト・プリオン病発症遅延薬物の評価に関する研究	20
----------------------------------	----

九州大・院医・動物実験施設 毛 利 資 郎

4. スクレイピー早期発症マウスと脳内持続注入器具を	
----------------------------	--

用いたin-vivo薬剤評価システムの開発	30
-----------------------------	----

九州大・院医・脳研病理 堂 浦 克 美

研究成果の刊行に関する一覧表	37
----------------------	----

研 究 班 構 成

区 分	氏 名	所 属 施 設 名	所属施設に おける職名	T E L F A X
主任研究者	片 峰 茂	長崎大学大学院 医学研究科 感染分子病態学講座	教 授	T 095-849-7057 F 095-849-7060
分担研究者	北 本 哲之	東北大学大学院 医学系研究科 病態神経学講座	教 授	T 022-717-8147 F 022-717-8148
分担研究者	毛 利 資郎	九州大学大学院 医学系研究院 動物実験施設	教 授	T 092-642-6147 F 092-642-6165
分担研究者	堂 浦 克美	九州大学大学院 医学系研究院 脳神経病研究施設	講 師	T 092-642-5537 F 092-642-5540

總 括 研 究 報 告

総 括 研 究 報 告

〔研究課題名〕

家族性及び外因性プリオン病の発症遅延方策に関する介入研究

〔主任研究者氏名〕

片 峰 茂（長崎大・大学院医学研究科・教授）

〔研究要旨〕

プリオン病モデルを利用した薬剤の有効性評価系の確立と、発症遅延方策のための新規の薬剤・方法論の開発を目的として研究を遂行した。まず有用性の高い薬剤有効性評価のための試験管内（無細胞系）、培養細胞、動物（マウス）の複数の実験系を確立し、それを用いて既存薬剤のPrP産生沈着阻害及び発症遅延効果を検討した。その結果、アンフォテリシンBの効果をCJDマウスモデルで初めて確認し、Quinacrine、Quinine、Reactive green 19によるプリオン接種マウスの発症遅延効果を初めて明らかにした。また新規発症遅延候補分子として、試験管内で異常PrPのプロテアーゼ抵抗性を喪失させる活性（逆変換能）を有するペプチドを同定した。異常化の起こらない外来性PrPによる内在性PrPの異常化抑制効果も明らかにした。

〔分担研究者氏名〕

北 本 哲 之（東北大・院医・教授）

毛 利 資 郎（九州大・院医・教授）

堂 浦 克 美（九州大・院医・講師）

〔研究目的〕

プリオン病は発病すると手の施しようがなく、発病させないつまり発病遅延をさせる方策を開発することが緊急の課題である。しかしながら有効性の裏付けのある方策は未だ存在せず、臨床現場での患者（保因者）を対象とした介入研究には未だ倫理的に問題が多い。我々は現時点においては、プリオン病モデルを利用した薬剤の有効性評価系の確立と、発症遅延方策のための新規の薬剤・方法論の開発が何よりも先決であると考えた。

プリオン病の本態が正常プリオン蛋白 (PrP^C) の異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) への翻訳後変換であることが判明しているため、この変換制御が発症遅延方策の眼目となる。また PrP^C 発現量がプリオン病の潜伏期を規定することから遺伝子治療による

PrP^C発現制御も有望な試みであり、特徴的なプリオン病脳組織病変（海綿状神経変性）形成に直接関与する細胞因子も発症遅延薬剤の標的となりうる。そこで本研究班においては、(1) 試験管内（無細胞系）、培養細胞、動物の異なる3システムを用いてプリオン病発症遅延方策の有効性評価系を確立し、それにより既知あるいは新規の薬剤（方策）の有効性を検討すること、とくに遺伝子改変技術により外因性および家族性プリオン病双方のマウスモデルを作製すること、(2) プリオン蛋白と物理的に相互作用をする正常宿主蛋白あるいはファージディスプレイ法により同定されるペプチドをプリオン蛋白変換制御物質の候補として検索すること、(3) コンディショナル・ターゲティング法によりプリオン接種前後の様々な時期にPrP^Cの発現量を人為的に制御することのできるマウスを作出しこれを用いて遺伝子治療の可能性を探ること、(4) PrP^{Sc} への異常化が起こらない外来性PrPによる内在性PrP異常化抑制効果を検討し外来性PrP遺伝子による遺伝子治療の可能性を探ること、(5) プリオン病脳組織病変（海綿状神経変性）形成に直接関与する細胞因子を同定しそれに対する制御薬剤を開発すること、を具体的目標とした。

本年度は、上記研究課題を継続して遂行したが、本報告書では特に成果の得られた以下の課題について報告する。

〔研究方法〕

外来性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定：

文献的に選択し、候補薬剤として選出したアムフォテリシン B (Amphotericin B、AmBと略)、クロロキン (Chloroquine、Cqと略)、フタロシアニン (Phthalocyanin、Phcと略)、マンノースアミン (D-mannosamine、Mnと略) についてマウスプリオン福岡1株の脳内あるいは腹腔内接種の系で発症遅延効果を検討した。

in vivo薬剤評価システムの作製とそれを用いた薬剤の発症遅延効果の評価：

ハムスター型プリオン蛋白を発現する遺伝子改変マウスTg7マウスに1%263K脳乳剤20ulを脳内に接種後1.5週目または5週目にAlzet(r)浸透圧ポンプをマウス皮下に埋め込み脳内にカニューレを留置することにより脳内への持続的な薬液注入を4週間行い、マウスが死亡するまでの潜伏期間への効果を検討した。培養細胞を用いた病原性プリオン蛋白生成阻害剤の探索により有効性を認めたreactive green、quinine、E-64d、quinacrineについて2-3種の異なる濃度で本法により発症遅延効果を検定した。各濃度群につき4匹前後のマウスを用いて実験を行った。

プリオン蛋白に結合するペプチドの異常型プリオン蛋白に及ぼす影響の検討：

これまでランダムペプチドライブラリ (12mer) よりリコンビナント PrP (121-231) への結合活性を有するファージをクローニングし、その塩基配列に基づき合成した3種類のペプチドの PrP への結合を直接証明した。今年度はこれらペプチド

の異常プリオン蛋白への試験管内での影響、とくにプロテナーゼK抵抗性に及ぼす効果を検討した。

外来性PrPによる内在性PrP異常化抑制効果の検討：

ヒト・マウスキメラ型プリオン蛋白を導入したトランスジェニックマウスとして、Tg-ChM#30（コドン129Metタイプ）、Tg-ChV#12, #21（コドン129Valタイプ）の感染実験を行った。また、ノックアウトマウスとの交配によって、マウスのプリオン蛋白のablated background (0/0)、hetero-zygous background (W/0)、wild background (W/W)のトランスジェニックマウスを作製し、感染実験を行った。発現量を野生型マウスの発現量と比較したところ、Tg-ChM#30が0.7倍、Tg-ChV#12が2倍、Tg-ChV#21が4倍の発現量を示した。さらにマウスのプリオン蛋白遺伝子を改変したTg-flag（シグナルペプチドのあとのN末端KKの後にflag tagを挿入し、また3F4 epitope tagも導入したトランスジェニックマウス）とTg-FFI（マウスのプリオン蛋白遺伝子のコドン177AspをAsnに変更したもので、ヒトのFFIの変異に相当する変異を導入したトランスジェニックマウス）の感染実験を行った。感染実験に使用したヒトの脳乳剤は、孤発例古典型CJDの一例で、プリオン蛋白遺伝子には変異がなくコドン129M/M、コドン219E/Eであり、異常プリオン蛋白はタイプ1型である。また、マウスのプリオン株としては、福岡1株を主に使用し、FFI型のトランスジェニックマウスにおいては、ヒトFFIより分離したマウス・FFIプリオン株も使用した。

〔結果と考察〕

外来性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定：

プリオン接種7日前からAmBを投与したマウス(－7)では潜伏期間は平均180日±5.1となり対照マウスの平均146日±4.0に比べて34日の延長が認められた。一方、プリオン接種後60日を経過してAmB投与を開始したマウス(+60)では、潜伏期間は平均161日±11.6で対照マウスに比べて15日間の延長が認められた。クロロキン(Cq)についても、脳内接種前14日からCq投与を始めたグループのなかで100mg/Kgdayと最も濃度の高い投与群のみ、有意に延長(18日)した。PhcやMnでは投与量を変化させても潜伏期間に影響がなく、今回の濃度範囲では全く効果がなかった。無効であった薬物に関しては、接種後薬物が脳関門を越えて標的組織である脳内に分布したかどうかについても甚だ疑問であり、その効果についてこれだけで結論を出すのは早計である。より高濃度、あるいは脳内に浸潤しやすい構造の異性体などによる更なる試験が必要であると考えている。

in vivo薬剤評価システムを用いた薬剤の発症遅延効果の評価：

E-64dは3.2 nmol/day x 4 weeks投与群では1 %263K脳乳剤接種後5週目より脳内持続投与を開始しても対照群に比して発症遅延する傾向が見られたが統計学的には対照群と有意差は認められなかったquinacrineは、脳内接種後5週目より投与を開始したもので0.3 nmol/day x 4 weeks投与群でも1.6 nmol/day x 4 weeks投与群でも対照群に比し6日間（52日→58日）の有意な発症遅延効果が見られた。reactive green 19は4 ug/day x 4 weeks投与群で1 %263K脳乳剤接種後1.5週目より脳内持続投与を開始したもので対照群に比して10日間（52日→62日）の有意な発症遅延効果が見られた。quinineはいずれも脳内接種後5週目より脳内持続投与開始1.6 nmol/day x 4 weeks投与群で対照群に比して11日間（52日→63日）の有意な発症遅延効果が見られた。

プリオン蛋白に結合するペプチドの異常型プリオン蛋白に及ぼす影響の検討：

ファージディスプレイ法を用いてランダムペプチドライブラリよりリコンビナント PrP (129-231) への結合活性を有する3種類の12-merペプチドを同定した。そのうち一つに、試験管内で直接PrPScのprotease K抵抗性を消失させる活性があることが判明した。この活性には100倍以上のモル濃度のペプチドが必要であること、24時間以上の反応時間が必要であることが判った。今後マウスモデルでの発症遅延効果が確認できれば有望な薬剤となる。

外来性PrPによる内在性PrP異常化抑制効果：

Tg-ChM#30に関するヒト・プリオンによる感染実験の結果は、0/0バックグラウンドでは150日±15.2日、W/0バックグラウンドでは215日± 30.8日、W/Wバックグラウンドでは375日±45.5日という結果であった。これは、0.7倍に発現しているレコンビナント・ヒト型プリオン蛋白の異常化を野生型のマウスプリオン蛋白が発現量依存性に阻害していることを示している。Tg-ChV#12に関しても同様の結果が得られた。接種材料を、マウス株である福岡1株にした場合は、Tg-ChM#30 W/Wでは190日±21.0日となり、W/0では390日±11.7日、0/0では539日±20.2日となった。マウスプリオン蛋白の異常化に関しても、conversion competent であるヒト型プリオン蛋白が抑制的に働いていることも明らかとなった。

W/Wバックグラウンドで、Tg-flagシリーズの感染実験を行ったところ、マウス・プリオン福岡1株に対する潜伏期間は、Tg-flag#6が172日±8.1日、Tg-flag#7が182日±11.0日、Tg-flag#11が249日±8.8日であった。また、0/0バックグラウンドでも感染が成立したので、conversion competentのflag/3f4レコンビナントプリオン蛋白の共存が、発現量に応じて潜伏期間を延長することが確かめられた。

Tg-FFI#48（発現量 0.2倍） W/Wで福岡 1 株を用いて感染実験を行ったところ潜伏期間は274日±14.0日であった。この潜伏期間の延長を比較するために、ヒト型で発現量0.7倍を示すTg-ChM#30 W/Wで福岡1株の潜伏期間を再提示すると190日±21.0日となる。わずか0.2倍の発現量のマウス変異型プリオン蛋白（FFI型変異）の方が、種を越えたヒト型プリオン蛋白よりも抑制効果が高かったわけである。さて、FFI型トランスジェニックマウスは、家族性プリオン病のモデルとして開発したが、現時点では自然発症は認められず、また0/0バックグランドでの福岡1株とマウスのFFI株による感染成立も観察されていない。つまり、現時点ではconversion incompetentのプリオン蛋白である。このconversionincompetentのプリオン蛋白が、感染の抑制に有効であることを示す一つの典型例である。

〔結 論〕

プリオン病モデルを利用した薬剤の有効性評価系の確立と、発症遅延方策のための新規の薬剤・方法論の開発を目的として研究を遂行し、以下の成果を挙げた。

- (1) 既知薬剤のうちアンフォテリシンBの効果をCJDマウスモデルで初めて確認した。またプリオン接種後60日よりの後期投与の有効性も明らかにした。
- (2) マウス脳内薬剤持続注入系を用いてQuinacrine、Quinine、Reactive green 19によるプリオン接種マウスの発症遅延効果を初めて明らかにした。
- (3) 試験管内で異常PrP（PrP^{Sc}）のプロテアーゼ抵抗性を喪失させる活性（逆変換能）を有するペプチドを同定した。
- (4) 異常化の起こらない外来性PrPによる内在性PrPの異常化抑制効果を明らかにし、外来性PrP遺伝子を用いた遺伝子治療によるプリオン病発症遅延に展望を拓いた。

〔研究発表〕

1. 論文発表

Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoke, R., Moriuchi, R., Niwa, M., and Katamine, S.: Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *J. Virol.* 74, 411-417, 2000

Satoh, J., Kuroda, Y., Katamine, S.: Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am. J. Pathol.* 157, 59-68, 2000

Li, A., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Roy, B.C., Nakaoke, R., Arima, K., Okimura, N.,

Kopacek, J., and Shigematsu, K.: Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20(5), 553-567, 2000

Nakaoke, R., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Nishida, N., Arima, K., Shigematsu, K. and Katamine, S.: Early appearance but lagged accumulation of detergent-insoluble prion protein in the brains of mice inoculated with a mouse-adapted Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20 (6), 717-730, 2000

Li, A., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Roy, B.C., Nakaoke, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J., and Katamine, S.: Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of the PrP deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. *Am. J. Pathol.* 157 (5), 1447-1452, 2000

Milhavet, O., McMahon, H.E., Rachidi, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., Arlotto, M., Casanova, D., Riondel, J., Favier, A., and Lehmann, S.: Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13937-13942, 2000

Deli, M.A., Sakaguchi, S., Nakaoke, R., Abraham, C.S., Takahata, H., Kopacek, J., Shigematsu, K., Katamine, S. and Niwa, M.: Prion protein fragment 106-126 is toxic to cerebral endothelial cells expressing cellular prion protein. *NeuroReport* 11, 3931-3936, 2000

Konaka K, Kaido M, Okuda Y, Aoike F, Abe K, Kitamoto T, Yanagihara T.: Proton magnetic resonance spectroscopy of a patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neuroradiology.* 42(9), 662-665, 2000

Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, Sato T.: Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. *Epidemiol Infect.* 125(1), 201-205, 2000

Kitamoto T.: Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology.* 20 Suppl, S52-54, 2000

Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T.: Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal

antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neurosci Lett.* 21, 288(3), 179-182, 2000

Doh-ura K., Iwaki T., Caughey B.: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.* 74, 4894-4897, 2000

Doh-ura K., Mekada E., Ogomori K., Iwaki T.: Enhanced CD9 expression in the mouse and human brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 774-785, 2000

Kawashima T., Doh-ura K., Torisu M., Uchida Y., Furuta A., Iwaki T.: Differential expression of metallothioneins in human prion diseases. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 251-262, 2000

Taniwaki Y., Hara H., Doh-ura K., Murakami I., Tashiro H., Yamasaki T., Shigeto H., Arakawa K., Araki E., Yamada T., Iwaki T., Kira J.: Familial Creutzfeldt-Jakob disease with D178-129M mutation of PRNP presenting as cerebellar ataxia without insomnia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 388, 2000

片峰茂：プリオン病の病態と分子診断 臨床病理 48巻5号, 437-441, 2000

西田教行、片峰茂：プリオン病マウスモデル 「特集 発生工学による疾患マウスモデル」 細胞32巻11号（9月臨時増刊号）, 24-28, 2000

片峰茂：実地医家のためのKey Word解説「プリオン病」 medical forum CHUGAI 4巻5号, 43, 2000

片峰茂：プリオン病：プリオンタンパク 生体の科学 51巻5号 「ノックアウトマウスリスト」, 511, 2000

坂口末廣、片峰茂：プリオン病とプリオン蛋白 感染・炎症・免疫 30巻4号, 2-11, 2000

古川ひさ子, 堂浦克美: ヒト・プリオン蛋白単量体はより可逆的にfibrillogenic conformationへ変換. *MEDICAL BRIEFS IN Brain & Nerve.* 10(3), 13, 2000

古川ひさ子, 堂浦克美: 分子医学的・臨床病理学的解析に基づく散発性クロイツフェルト・ヤコブ病の新分類. MEDICAL BRIEFS IN Brain & Nerve. 10(4), 5-6, 2000

川島敏郎, 堂浦克美: プリオン病の分子医学. 現代医療 32, 100-103, 2000

川島敏郎, 堂浦克美: クロイツフェルト・ヤコブ病. 脳の科学2000年増刊号, 371-374, 2000

堂浦克美: プリオン病の現状と治療薬開発の動向. BIO Clinica 15, 932-936, 2000

2. 学会発表

新竜一郎、坂口末廣、中桶了太、有馬和彦、片峰茂：プリオン蛋白欠損マウスにおけるグリア細胞の活性化. 第48回日本ウイルス学会学術集会、平成12年10月12日、三重県津市

坂口末廣、李愛民、新竜一郎、中桶了太、有馬和彦、白木洋、片峰茂：感染型プリオン蛋白逆変換活性を有するペプチドの同定. 第48回日本ウイルス学会学術集会、平成12年10月12日、三重県津市

〔知的所有権の取得状況〕

なし

分 担 研 究 報 告

プリオン蛋白逆変換活性ペプチドの同定

班 員： 片峰 茂 (長崎大・大学院医学研究科・感染分子病態学)
研究協力者： 坂口 末廣 (長崎大・大学院医学研究科・感染分子)
Li Aimin (長崎大・大学院医学研究科・感染分子)
白木 洋 (福岡県赤十字血液センター)

〔研究要旨〕

プリオン病の病態形成には、蛋白分解酵素感受性の正常型プリオン蛋白 (PrP^C) から抵抗性の異常型PrP (PrP^{Sc}) への変換が深く関与している。今回我々は、10年度に報告したレコンビナントマウスPrPに結合する3つのペプチドのうち1つが、PrP^{Sc}を蛋白分解酵素感受性に逆変換させる活性を有していることを見出した。その活性はペプチドの濃度依存性であり、反応時間依存性であった。現在プリオン病の治療法はまだ開発されていなが、今回のPrP逆変換活性を有するペプチドの同定は、プリオン病のペプチド療法開発に向けて大きく貢献するものと考えられる。

〔研究目的〕

ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病をはじめとするプリオン病は、海綿状神経変性やグリア細胞の増生（グリオシス）を病理学的特徴とする感染性海綿状脳症である¹⁾。英国および欧州では、ウシのプリオン病である狂牛病からヒトへの感染が起こったと考えられる新型クロイツフェルト・ヤコブ病が多発し、世界的な規模でこのような感染が起こるのではないかと危惧されている²⁾。また、我が国でも、感染硬膜の移植によるクロイツフェルト・ヤコブ病の症例が多数報告され、問題となっている³⁾。しかし、プリオン病の治療法は確立していない。プリオン病の根治療法の早急な開発が、世界的レベルで期待されている。

プリオン病の病態形成には、PrP^CからPrP^{Sc}への変換が深く関与していると考えられている¹⁾。つまり、変換により蓄積するPrP^{Sc}の神経毒としての作用、および変換に伴うPrP^Cの枯渇によるPrP^Cの機能消失が、その病態形成に重要であると考えられている。これまで、試験管内PrP変換系や感染細胞を用い、PrP変換を抑制し、PrP^{Sc}の産生を抑制するPrP由来のいくつかのペプチドが報告されている^{4, 5)}。今回我々は、マウスPrP^{Sc}を蛋白分解酵素感受性PrPに変換させる活性が、10年度に既に報告したレコンビナントマウスPrP (PrP121-231) に結合する12merの3つのペプチド⁶⁾のうち1つに存在することを見出したので報告する。

〔研究方法〕

- 1 合成ペプチド：ペプチド自動合成装置により合成し、ゲルクロマトグラフィーにより精製した。
- 2 PrP^{Sc}の部分的精製：福岡1プリオン株感染ddYマウス脳から、界面活性剤抽出法と分画遠心法によりPrP^{Sc}の部分的精製を行った⁷⁾。
- 3 PrP逆変換反応：部分的精製PrP^{Sc}とペプチドを反応液（50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulphonate）にて37℃、48時間反応させた。その後、その半量をプロテネースK（100 μ g/ml）にて37℃、30分間消化した。
- 4 ウェスタンブロッティング：蛋白を12%SDS-ポリアクリルアミドゲルに展開し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ブロッッキングしたのち、抗レコンビナントマウスPrPウサギ血清にて室温で2時間反応させた。洗浄したのち、ペルオキシダーゼ抱合抗ウサギIgGヤギ血清（5000倍希釈、アマシャムファルマシア）にて1時間反応させた。シグナルは、ECLキット（アマシャムファルマシア）にて検出した。

〔結 果〕

3種類の合成ペプチド（12P-1, 12P-3, 12P-5）のPrP逆変換活性を、逆変換反応後のPrPの量的変化をウェスタンブロッティングにて検出し検討した。12P-1, 12P-3, 12P-5およびレコンビナントPrPに結合しない2つのコントロールペプチドを用いた全ての逆変換反応において、プロテネースK消化前のPrPの量は同じであった（図1）。また、プロテネースK消化後のPrPの量は、12P-3と12P-5の両ペプチドおよびコントロールペプチドで同じであった（図1）。しかし、12P-1での反応ではプロテネースK消化後のPrP量の明らかな減少が認められた（図1）。これらの結果は、12P-1がPrP^{Sc}をプロテネースK感受性にするPrP逆変換活性を有していることを示した。

次に、12P-1によるPrP逆変換活性が、濃度または時間依存性であるか検討した。まず種々の濃度の12P-1をPrP^{Sc}に加えて、37℃2時間反応させた。その結果、12P-1とPrP^{Sc}のモル濃度比が100倍で逆変換活性が検出されるようになり、モル濃度比の上昇に伴いその活性も上昇した（図2a）。次に、モル濃度比を1：1000に固定し、様々な時間で反応させた。その結果、12P-1による逆変換活性は逆変換反応後36時間頃から検出され、時間とともにその活性も上昇した（図2b）。

さらに、逆変換によって産生されたプロテナーS感受性PrPの可溶性について検討した。逆変換反応後、15000g、20分、4℃にて遠心し、沈澱分画と上清分画におけるPrPをウェスタンブロッティングにて検出した。その結果、コントロールペプチドおよび12P-1による反応後のPrPは全て沈澱分画に検出された（図3）。

〔考 察〕

今回我々は、濃度および時間依存性にPrP^{Sc}をプロテナーS感受性PrPに変換させるペプチド12P-1を同定した。変換されたPrPが可溶性でなかったことは、それが可溶性のPrP^Cそのものでなく、PrP^{Sc}とPrP^Cの中間体PrPであることを示唆した。12P-1はプロリン残基を多く含んでいて、12個のアミノ酸のうち5個がプロリンである。このことは、これらのプロリン残基がPrP逆変換活性に重要であることを示唆した。Sotoらは、PrPのアミノ酸残基115から122に相当する領域に4個のプロリンを導入した13merのiPrPが、同様な活性を示したことを報告している⁸⁾。実際、我々も12P-1のプロリン残基に変異を導入した合成ペプチドが逆変換活性を欠失することを認めている（data not shown）。プロリン残基がどのようにPrP逆変換活性に関与しているのかは、今後の課題である。

プルシナー博士が提唱するプリオン仮説によると、PrP^{Sc}がプリオン病の病原体プリオンであるとしている。Sotoらは、PrP逆変換活性を示すiPrPがプリオン感染価を低下させることを報告した⁸⁾。この結果は、プリオン仮説を支持するものと考えられる。我々が同定した12P-1もプリオン感染価を減少させることができるのか検討することは、プリオン仮説の是非を検討するためにも必要である。

PrP^CからPrP^{Sc}への変換によるPrP^{Sc}の脳内蓄積は、プリオン病の病態形成に深く関与している¹⁾。我々は、PrP^{Sc}の脳内蓄積がミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞を活性化し、活性化されたグリア細胞が多量のライソゾーム酵素や活性酸素といった神経細胞毒性物質を産生し神経細胞死が起こるというモデルを提唱した⁹⁾。12P-1がPrP^{Sc}によるグリア細胞活性化を抑制しプリオン病を抑制するのか検討することは、プリオン病のペプチド治療法開発に向けて大切であると考えられる。しかし、12P-1が他の機構を通じてプリオン病を抑制できる可能性も有る。

12P-1のアミノ酸配列は既知の蛋白と類似性を示さなかったが、PrP逆変換活性を有する12P-1は、PrP^{Sc}の凝集を解除する分子シャペロンの機能を有していると考えられる。Edenhoferらは、分子シャペロンであるHsp60がPrP^Cと結合することを報告した¹⁰⁾。12P-1のような逆変換活性を有する未知の宿主蛋白を同定することは、プリオン病の治療だけではなく、アルツハイマー病などの他の凝集病の治療法の確立に繋がると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B.: Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am. J. Pathol.* 146: 785-811, 1995
- 2) Cousens, S.N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R.G., and Smith, P.G.: Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385: 197-198, 1997
- 3) 中村好一、北本哲之、佐藤 猛、柳川 洋： クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス結果。厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班。平成11年度研究報告書、55-65, 2000
- 4) Chabry, J., Caughey, B., and Chesebro, B.: Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 276: 13203-13207, 1998
- 5) Hoelscher, C., Delius, H., and Buerkle, A.: Overexpression of nonconvertible PrP^C Δ114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP^{Sc} accumulation. *J. Virol.* 72: 1153-1159, 1998
- 6) 片峰 茂、坂口末廣、Li Aimin、中村三千男、白木 洋：プリオン蛋白変換制御物質の探索。厚生省特定疾患調査研究事業（重点研究）家族性および外因性プリオン病発症遅延方策に関する介入研究。平成10年度研究報告書、15-21, 1999
- 7) Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Marmorstein, A.D., and Potempska, A.: Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arc. Biochem. Biophys.* 285: 579-590, 1987
- 8) Soto, C., Kascsak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Winsniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I., and Frangione, B.: Reversion of prion protein conformational changes by synthetic β -breaker peptides. *The Lancet* 355, 192-197, 2000
- 9) Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoke, R., Moriuchi, R., Niwa, M., and Katamine, S.: Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *J. Virol.* 74: 411-417, 2000
- 10) Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S., and Winnacker, E.-L.: Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperons of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70: 4724-4728, 1996

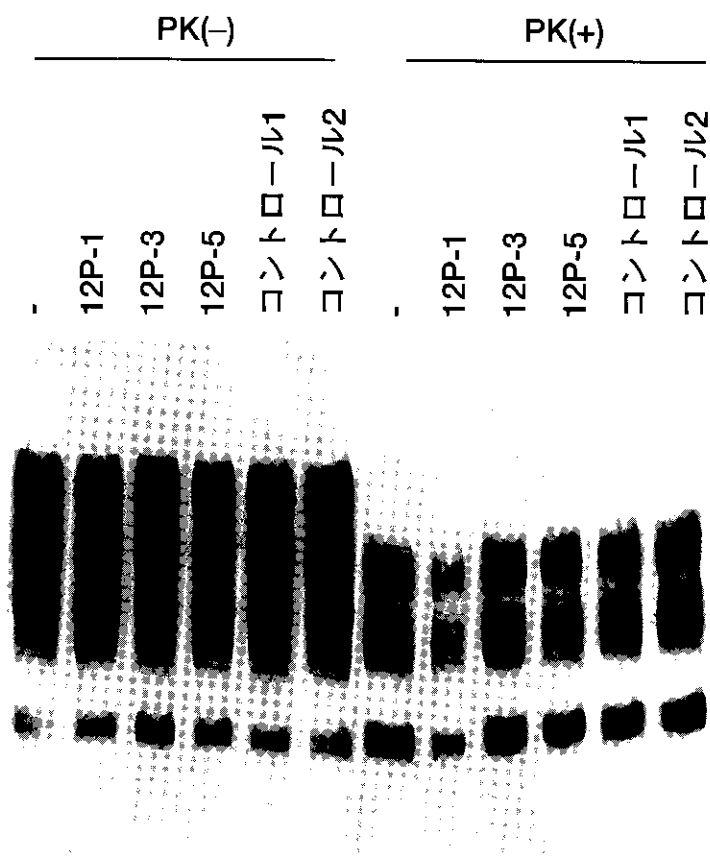


図1：PrP逆変換活性ペプチドの同定。
PrP^{Sc}とペプチドを1：1000の濃度比で逆変換反応を行った。PK：プロテナーゼK。

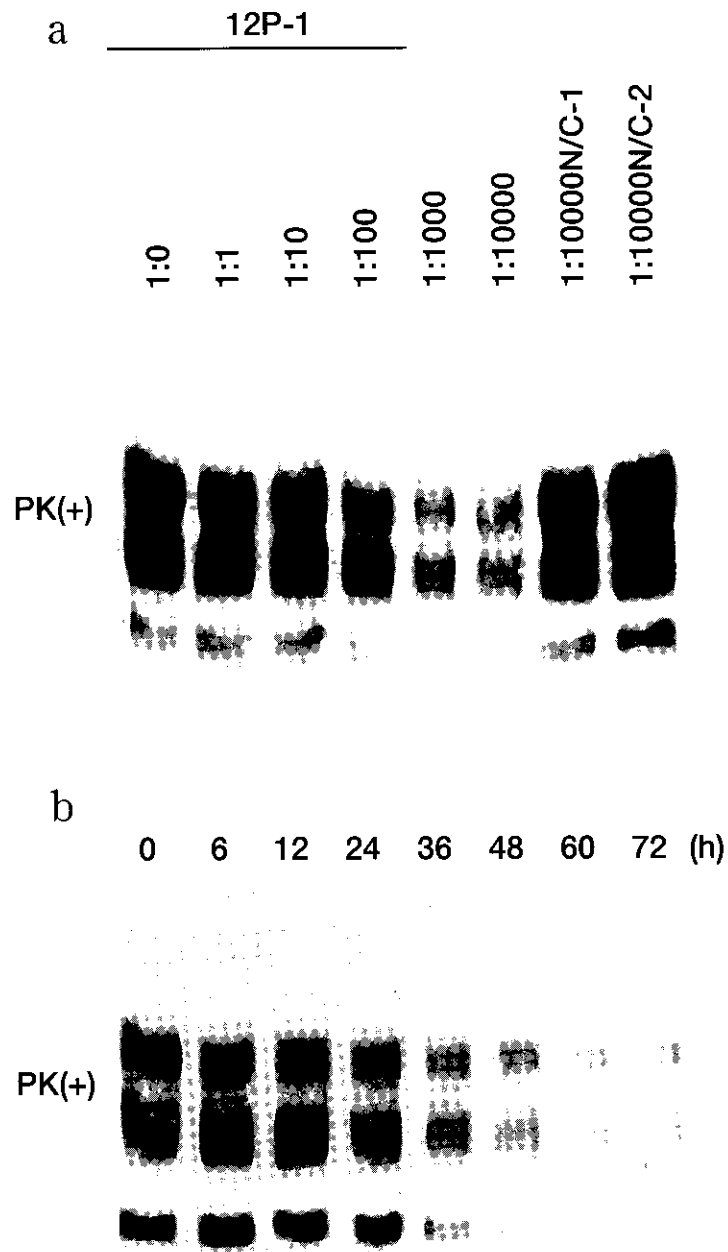


図 2 : (a) 濃度依存性PrP逆変換反応。
PrP^{Sc}と12P-1のモル比を1 : 10000まで
変化させ逆変換反応を行った。N/C :
コントロールペプチド。
(b) 時間依存性PrP逆変換反応。0から
72時間まで逆変換反応を行った。PK :
プロテナーゼK ; N/C : コントロールペ
プチド。