

Figure 4. Neuronal loss and gliosis revealed by haematoxylin and eosin stain (A, E), Bodian's stain (C) or immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) (B, D, F). A, B: centromedial nucleus of the thalamus. C, D: inferior olivary nucleus. Neuronal loss is more evident in the medial part (left side of panel C, which represents the rectangular area depicted in panel D). E, F: cerebral cortex (frontal lobe). Both spongiform change and gliosis are remarkable. Bars: 50 μ m (A, B, E, F), 200 μ m (C), 1 mm (D).

amus or inferior olivary nucleus (Figure 5C,D). In the cerebellar molecular layer, punctate deposits of PrP were focally observed (Figure 5A), and the regions with these deposits were coincident with the extent of spongiform change. Likewise, fine granular deposition of PrP was also detected together with spongiform degeneration in the cerebral cortex (Figure 5B). The distribution of PrP deposits appeared to be more broad and noticeable in the cere-

bral cortex than in the cerebellum. As a unique finding, the anti-PrP antibody revealed swollen and/or frizzled axons in the deeper parts of the cerebral white matter, in the corpus callosum, or at the borders of the thalamus and caudate nucleus (Figure 5E). Axonal transported substances, APP (Figure 5E, inset) and SNAP-25 (data not shown) were also detected immunohistochemically in those axons.

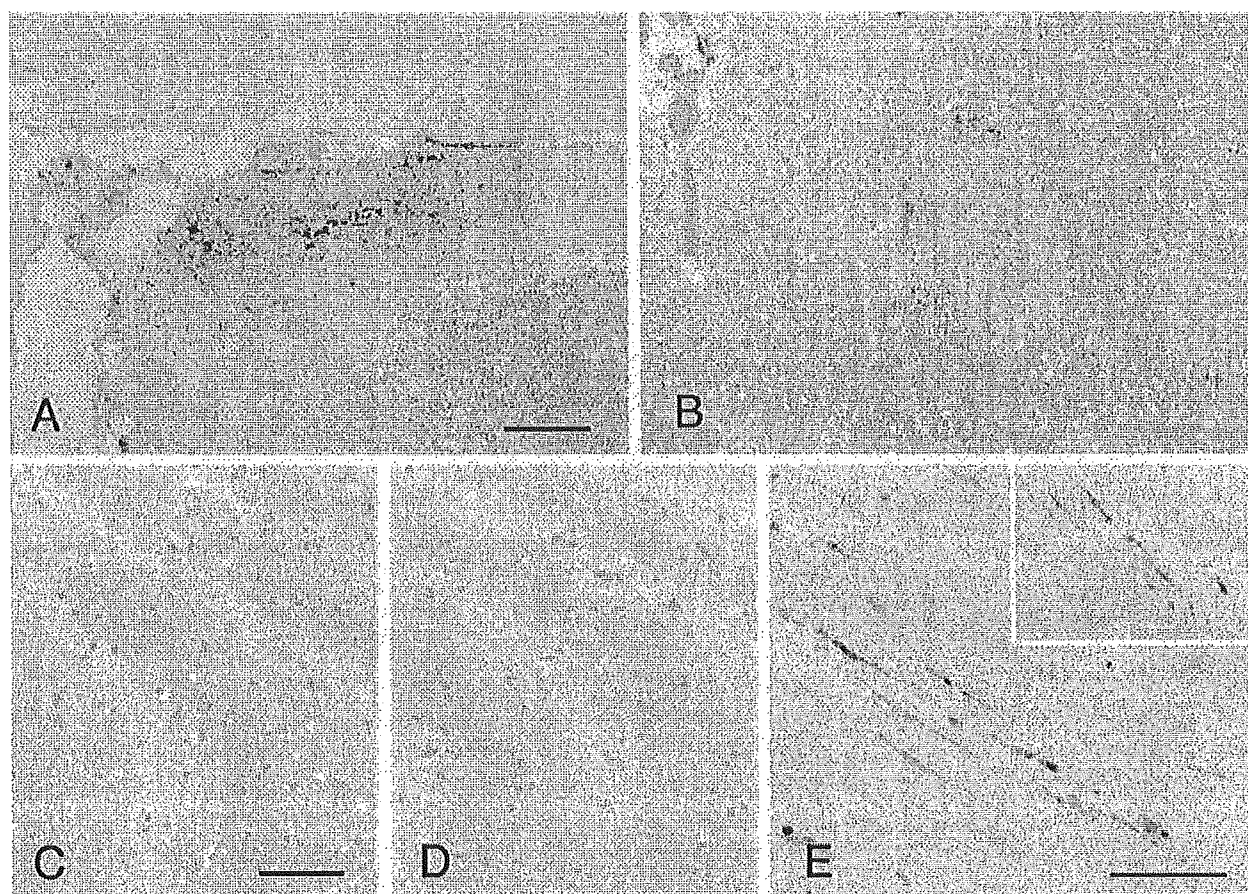


Figure 5. Immunohistochemistry for prion protein (PrP) deposition. A: cerebellum. B: frontal cortex. C: centromedial nucleus of the thalamus. D: inferior olivary nucleus. PrP deposition can not be detected in the thalamus or the inferior olivary nucleus, but coarse or fine granular PrP deposition is visible within the cerebral cortex and the cerebellar molecular layer. E: axons with swollen and/or frizzled features can be detected in the white matter at the border of the thalamus. These axons are also immunostained with anti-APP (amyloid precursor protein) antibody (inset). Bars: 50 μ m (A, B, E), 100 μ m (C, D).

Although the conventional method of Western blot analysis for PrP^{res} failed to detect any particular signal (data not shown), by application of phosphotungstic acid precipitation that preferably concentrates PrP^{res} but not cellular PrP [12], Western blot analysis of the extract from the frontal cortex of this case revealed a detectable amount of PrP^{res} (Figure 6). The molecular weight of non-glycosylated form of PrP was about 19 kDa (PrP^{res} type 2 pattern) and also the PrP^{res} glycoform ratio was compatible with that of FFI, which has been previously reported [14]. The extract from the cerebellum showed no significant signal in Western blot analysis even with phosphotungstic acid precipitation (data not shown).

The disease of this case was successfully transmitted to some of the mice inoculated with tissue homogenate from the frontal cortex. The incubation time was 571.6 ± 61.1

days (5/7 of the inoculated mice developed TSE) in the NZW mice and 736 ± 64.4 (5/8) in the Tg7 mice, respectively. Although not all the mice developed TSE, diseased mice demonstrated lethargy in the terminal stage rather than excitability. In the TSE-developed mice pathological examination of the brain showed that spongiform change and gliosis were prominent in the cerebral cortex in addition to the thalamus (Figure 7). Immunohistochemistry for PrP revealed that diffuse granular PrP deposition was present within the deep layer of the cerebral cortex as well as in the lateral portion of the thalamus (Figure 7B,E).

Discussion

It is established that there is an overlapping spectrum between classical FFI and CJD in association with PRNP

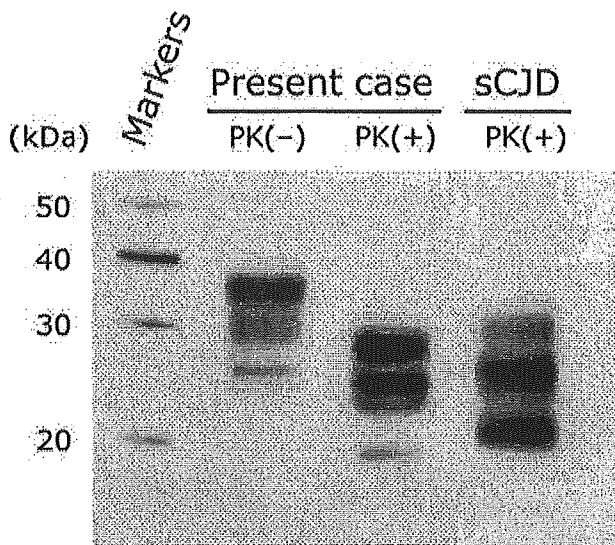


Figure 6. Western blot analysis for protease-resistant prion protein (PrP^{res}). Brain homogenate of the frontal cortex of this case is treated with or without proteinase K (PK), and then PK-digested sample is followed by the 40-times concentration with phosphotungstic acid precipitation for PrP^{res}. The abnormal PrP molecules in the frontal cortex of this case migrate as PrP^{res} type 2. PrP molecules in the lane sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) are also shown as a standard type 1 PrP (MM1). Molecular sizes (kDa) are indicated on the left.

D178N [6]; however, this case adds to our knowledge about this disease. Although the present case had FFI genotype, the clinical features were initially characterized by prominent cerebellar ataxia, and the neuropathological findings were also atypical in the following respects. First, PrP deposition and spongiform change in the cerebral cortex were more conspicuous than in the thalamus or inferior olivary nucleus, both of which are extremely vulnerable sites for FFI. It has been previously reported that heterozygotes Met/Val at codon 129 result in a longer clinical course than homozygotes [4], and it is therefore possible that the lesions seen in the cerebral cortex were more prominent simply because of the longer course of illness in this patient. However, a further noteworthy point about this case is rather that there was no PrP deposition either in the thalamus or in the inferior olivary nucleus.

Second, immunohistochemical examination detected a peculiar deposition of PrP within the molecular layer of the cerebellum. The localized lesions of granular deposits of PrP and spongiform change in the cerebellar molecular layer seemed to be similar to those reported in a patient from an Austrian FFI family [15]. The cerebellar ataxia of this case could have attributed to the loss of granular neu-

rones and degeneration of Purkinje's cells, in addition to the lesions of the inferior olivary nucleus, although the pathology related to PrP deposition could have also been responsible.

A third atypical feature is that the neuronal loss in the thalamus was most noticeable in the centromedial nucleus. A previous study revealed that severe atrophy of the anterior ventral and dorsomedial thalamic nuclei was consistently observed, whereas that of other thalamic nuclei was less severe and they were inconsistently affected [2]. In this case, the medial portion of the thalamus was indeed damaged crucially, but the principal lesion was different from the typical pathology of FFI.

In addition, an interruption of axonal transport was suggested. Some of the axons were swollen and associated with PrP accumulation, and both APP and SNAP-25 were also accumulated in those axons. APP and SNAP-25 are presynaptic protein and APP is considered as the most effective marker for axonal injury [16]. Aberration in recruitment of PrP might be involved in the pathogenesis of TSE, as described previously [17,18].

This case showed a small amount of specific PrP^{res} in the cerebral cortex but not in the cerebellum as detected by Western blotting. The ratio of PrP^{res} quantity in those regions was visually correlated with that of immunohistochemical reactivity for PrP. Although fresh frozen samples from the thalamus or the inferior olivary nucleus were not obtained for Western blot analyses, we suspect that PrP^{res} in such regions would be too sparse to be detected by Western blotting even in combination with phosphotungstic acid precipitation. The type 2 migration pattern and the glycoform ratio of PrP^{res} in this case were compatible with those in the typical FFI [14]; however, it remains to be elucidated whether these abnormal proteins that can be classified in the same PrP^{res} type may have different influences on the neurodegeneration processes.

Finally, the transmission study revealed that a pathogen in the frontal cortex of this case might be different from that of an FFI case previously reported by Dr Tateishi and his colleagues [13]. NZW mice infected with a thalamic tissue sample of a typical FFI case exhibited excitability as the principal clinical sign and demonstrated PrP deposition predominantly localized within the thalamus. On the other hand, NZW mice infected with a frontal cortical tissue sample from the present case showed lethargy as a clinical sign, and demonstrated diffuse PrP deposition within the deep layer of the cerebral cortex, as well as in the lateral portion of the thalamus. The PrP deposition

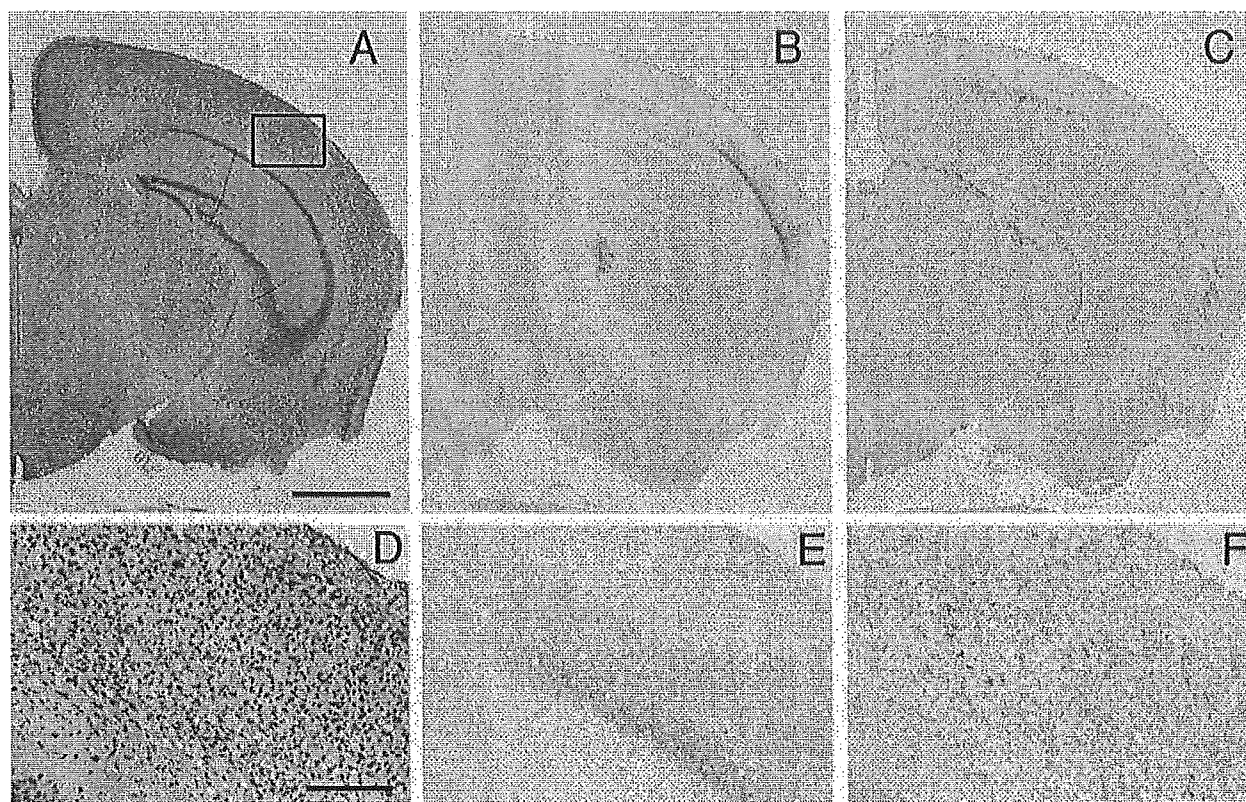


Figure 7. Histological profiles of the mice inoculated with the patient's brain material. A, D: hematoxylin and eosin stain. B, E: prion protein (PrP). C, F: glial fibrillary acidic protein. Spongiform change, PrP deposition and astrocytic gliosis can be observed within the deep layer of the cerebral cortex as well as in the lateral portion of the thalamus. D–F: high power magnifications of the cortical lesions represent the rectangular area depicted in panel A. Bars: 1 mm (A–C), 150 μ m (D–E).

pattern of this mouse was distinctive against that of mouse models with other scrapie strains, thus refuting the possibility of contamination. It is not clear whether there were more than two pathogen strains in the brain and whether the strains were dependent on the brain areas. Because we have not examined transmissibility of this case systematically and not obtained frozen materials for Western blot analysis, this aspect still awaits further clarification.

In conclusion, the present case which had FFI genotype showed atypical features, especially with regard to the PrP deposition pattern; there was no deposition within the thalamus or inferior olivary nucleus. Diversity in disease phenotype among patients with the same genotype suggests that some other unidentified factors as well as abnormal PrP deposits or other as yet unknown genetic factors may be responsible for the pathogenesis of the disease. In this study we have shown that variation in pathogen strains may also be one such factor and this factor could have greatly affected the pathogenesis in the present case of FFI.

Acknowledgements

We thank Ms K. Hatanaka for her excellent technical assistance. This study was supported partly by a grant to K. Doh-ura from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Part of this study was carried out at the Morphology Core, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University. The English used in this manuscript was revised by Miss K. Miller (Royal English Language Centre, Fukuoka, Japan).

References

- 1 Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Wills PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Gambetti LA, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; **258**: 806–8

- 2 Manetto V, Medori R, Cortelli P, Montagna P, Tinuper P, Baruzzi A, Rancurel G, Hauw JJ, Vanderhaeghen JJ, Malleux P, Bugiani O, Tagliavini F, Bouras C, Rizzuto N, Lugaresi E, Gambetti P. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 1992; 42: 312-9
- 3 Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986; 315: 997-1003
- 4 Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Autilio-Gambetti L, Capellari S, Monari L, Cortelli P, Montagna P, Lugaresi E, Gambetti P. Molecular pathology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 1998; 8: 539-48
- 5 McLean CA, Storey E, Gardner RJ, Tannenberg AE, Cervenakova L, Brown P. The D178N (cis-129M) 'fatal familial insomnia' mutation associated with diverse clinicopathologic phenotypes in an Australian kindred. *Neurology* 1997; 49: 552-8
- 6 Zerr I, Giese A, Windl O, Kropp S, Schulz-Schaeffer W, Riedemann C, Skworc K, Bodemer M, Kretzschmar HA, Poser S. Phenotypic variability in fatal familial insomnia (D178N-129M) genotype. *Neurology* 1998; 51: 1398-405
- 7 Nagayama M, Shinohara Y, Furukawa H, Kitamoto T. Fatal familial insomnia with a mutation at codon 178 of the prion protein gene: first report from Japan. *Neurology* 1996; 47: 1313-6
- 8 Kawasaki K, Wakabayashi K, Kawakami A, Higuchi M, Kitamoto T, Tsuji S, Takahashi H. Thalamic form of Creutzfeldt-Jakob disease or fatal insomnia? Report of a sporadic case with normal prion protein genotype. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 93: 317-22
- 9 Mizusawa H, Ohkoshi N, Sasaki H, Kanazawa I, Nakanishi T. Degeneration of the thalamus and inferior olives associated with spongiform encephalopathy of the cerebral cortex. *Clin Neuropathol* 1988; 7: 81-6
- 10 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 D178N-129M mutation of PRNP presenting as cerebellar ataxia without insomnia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 388
- 11 Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T. Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002; 103: 199-208
- 12 Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP (Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4: 1157-65
- 13 Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R, Cervenakova L, Gajdusek DC. First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 1995; 376: 434-5
- 14 Parchi P, Capellari S, Gambetti P. Intracerebral distribution of the abnormal isoform of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal insomnia. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 16-25
- 15 Almer G, Hainfellner JA, Brucke T, Jellinger K, Kleinert R, Bayer G, Windl O, Kretzschmar HA, Hill A, Sidle K, Collinge J, Budka H. Fatal familial insomnia: a new Austrian family. *Brain* 1999; 122: 5-16
- 16 Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 88: 433-9
- 17 Ferrer I, Puig B, Blanco R, Marti E. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience* 2000; 97: 715-26
- 18 Liberski PP, Budka H. Neuroaxonal pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97: 329-34
- 19 Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E. Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* 2003; 2: 167-76

Received 4 February 2004

Accepted after revision 26 April 2004

アルツハイマー病診断用プローブ

工藤 幸司

要約：アルツハイマー病 (AD) においては最初の臨床症状が顕性化するはるか以前からアミロイドβタンパク (Aβ) を主構成成分とする老人斑 (senile plaque) の蓄積が始まっている。Aβのβシート構造を認識するプローブ (低分子有機化合物) を開発し、これをPETまたはSPECTで扱える核種で標識して生体に投与し、脳内Aβとプローブの結合量およびその空間的分布からADを診断しようとするのがアミロイドイメージングである。アミロイドイメージングはADの病理像を追跡することから発症前診断を可能にすると考えられている。すでにいくつかのプローブの探索的臨床研究が開始されており、従来の診断法に比し明らかに優れていることが確かめられている。本稿ではAD診断法としてのアミロイドイメージングの有用性、プローブの現状および薬理作用等について概説する

1. はじめに

ここ数年のAD研究はこれをさかのぼるさらに10年に比しても急速な進歩がみられた。進歩の第1はADを発症前に診断できる技術に目途がついたこと、第2は免疫療法(1-6)やβおよびγセクレターゼ阻害薬(7-12)等によって根本的治療が可能になりそうなこと、第3は第1の診断をもとに、第2の治療的介入を加えることによって、診断時点で発症前でさえあればADに罹せずに人生をおくれる時代がやがて到来しそうなことである。

本稿では進歩の第1, すなわちアミロイドイメージングと呼ばれる新しい診断法の意義, 波及効果, さらなる発展等について論じるとともに, 本診断法の鍵をにぎるβシート構造をとったAβを認識するプローブ

(低分子有機化合物)の現状, 開発状況, 薬理学的特性等につき薬理学者の眼からも述べてみたい。但し, 現時点においても, 著者らのプローブもさらに最適化中であり, そのプローブの最前線および開発ノウハウの深層部分を明らかにできないことをお許しいただきたい。

ADは現状では臨床症状を指標にMMSE (Mini Mental State Examination) や長谷川式などの神経心理学的テストによって主として診断されている。しかし患者を取り巻く家族, または臨床家がAD特有の臨床症状に気付いた時には, それぞれAβおよび過剰リン酸化タウタンパクを主構成成分とする老人斑および神経原線維変化, さらに神経細胞脱落 (脳萎縮) 等の病理像はもはや取り返しのつかないほど進行していることが知られている。すなわち, 現状のAD診断をガンのそれに例えるなら, 末期状態に達した時点でしか検出されていないことになる。近年, 一部ADの前駆状態と考えられているMCI (Mild Cognitive Impairment; 軽度認知障害) という概念が起こってきた(13, 14)が, ADに進行するMCIにおいても病理学的にはすでに立派なAD状態である(15, 16)ことが明らかにされている。ADの病理像は老人斑, 神経原線維変化, 神経細胞脱落の順にあらわれ, 最初の病理像である老人斑蓄積は臨床症状が顕在化する数10年前(40年前からとする研究者もいる)から始まると考えられている。これらの事実はADの臨床像と病理像, 言い換えるとclinical ADとpathological ADとの間には大きな乖離が存在することを示唆している (図1参照)。この乖離にはいわゆる代償機能が関与しているものと考えられる。AD病理像が進行してもかなりの部分代償機能がこれを補い続け症状発現を抑えているが, 病理

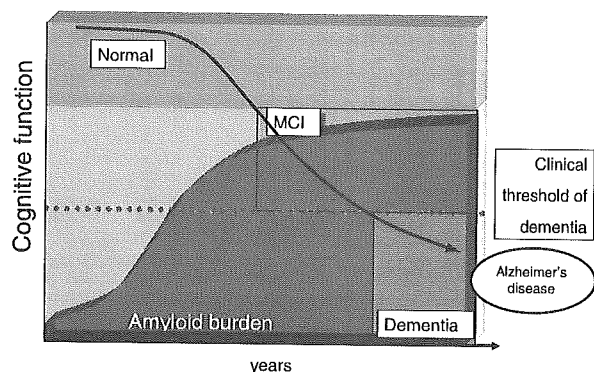


図1 アルツハイマー病における臨床像と病理像との乖離

Cognitive function (認知機能) を指標とすると、同機能が低下し MCI (Mild Cognitive Impairment) を経て、一定の閾値を下回った時点からアルツハイマー病と診断されるが、病理像 (Amyloid burden) は MCI 以前からすでに AD 状態である。(文献 15,16 を参考とした)

像が代償機能を上回り症状が表に現れたときにはすでに手遅れの病理像を呈することになるのであろう。脳は AD に関しては沈黙の器官とすることができる。

2. アミロイドイメージングの原理

昨年 (2004 年) 6 月、かねて AD であることを公表していたロナルド レーガン アメリカ第 40 代大統領が 93 歳の生涯を閉じた。彼が AD の初期であることを公表したのは 1994 年であるが、これをきっかけとしていわゆるレーガン研究所が設立された。この研究所の大きな業績の 1 つが AD 診断に関するコンセンサスレポート (17) である。同レポートが求めているのは、病態像を捉えていること、鑑別および早期診断ができること、診断の感度および特異度はいずれも 80%、陽性的中率は 90% などである。同レポートは現時点においても AD 診断法開発におけるバイブルないしはガイドライン的役割を果たしている。

コンセンサスレポートが発表された当初は同レポートが求めている基準、特に感度、特異度、陽性的中率はかなり高いハードルと考えられていたが、これを克服する可能性が高いと期待されているのがアミロイドイメージングである。

アミロイドイメージングは AD の病理像を追跡し、その病理像から AD を診断しようとする技術である。それではこの診断法はいかなる戦略に基づく技術であるかについて解説すると、概念は以下の通りであり、その概念図を図 2 に示した。

1) AD の病理学的主徴のひとつ、老人斑のほとんど

は β シート構造をとった $A\beta$ によって形成されている。

- 2) 同シート構造をとった $A\beta$ に特異的選択的に結合し、かつ容易に血液-脳関門を透過する低分子有機化合物を見いだす。
- 3) この化合物を PET または SPECT で扱うことが可能な核種で標識する。
- 4) これをプローブとして生体に静脈内投与する。
- 5) プローブは血液-脳関門を越えて脳内の老人斑を形成している $A\beta$ に結合する。一定時間後には非結合プローブは洗い流され、 $A\beta$ に結合したプローブのみが脳内に残る。
- 6) これを PET または SPECT を用い、イメージング画像として取り込み、 β シート構造をとった脳内 $A\beta$ (=老人斑) 蓄積量の定量およびその空間的分布から AD を診断する。

画像診断における画像は普通、形態と機能とに分けられるが、アミロイドイメージングは脳の病理像を覗き込むことから、むしろ病理画像と呼ぶのがふさわしいのかもしれない。

アミロイドイメージングは臨床症状に先立つ病理像の内、 $A\beta$ ないしは老人斑を追跡することから、原理的に鑑別、早期さらに発症前診断が可能である。このことはアミロイドイメージングと近年開発が進んでいる免疫療法、 β および γ セクレターゼ阻害薬等の根本療法を組み合わせることにより、前述したように、診断時点で発症前でさえあれば、AD に罹患しないで一生を送れることを意味する。この世から AD が消え去るのも夢ではないのかもしれない。

3. アミロイドイメージングプローブの現状

さて、ここでアミロイドイメージングによる診断法に絶対不可欠なプローブに話題を移そう。この技術が臨床で応用されるための最大のハードルは、 β シート構造をとった $A\beta$ に特異的選択的に結合し、且つ血液-脳関門を容易に透過し、さらに標的 (β シート構造をとった $A\beta$) 以外からは速やかにクリアランスされるなどの優れた特性を有するプローブを見いだすことにある。著者らの経験では、プローブとして必要とされるいくつかの特性のうち一方の特性を上げると別の特性が下がるといったまさに匙加減をみながらの創薬であり、なかなか理想とするプローブへ到達することが難しいのが現実である。

世界でこの領域の研究に参画している主なチームは、UCLA Barrio ら、ピッツバーグ大 Klunk ら、ペンシ

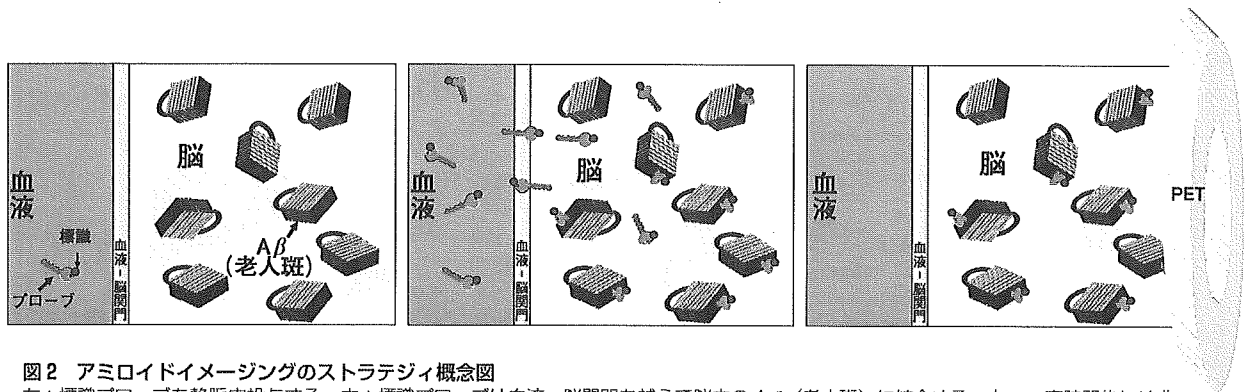


図2 アミロイドイメージングのストラテジ概念図

左：標識プローブを静脈内投与する。中：標識プローブは血液-脳関門を越えて脳内のAβ（老人斑）に結合する。右：一定時間後には非結合プローブは洗い流され、Aβに結合したプローブのみが残る。これをPETを用いて画像診断する。

ルベニア大 Kung ら、それにビーエフ研究所-東北大学先進医工学研究機構の著者らの4チームである。1994年、Klunk らは Chrysamine-G と名づけたこの分野の先駆けのプローブを発表した(18) (以下、プローブの化学構造はすべて図3参照)。このプローブは図3で見ると Congo Red の誘導体であり、Aβ に対しては高い親和性が認められるものの、親化合物の持つ脳移行性の低さは解決されていなかった(18, 19)。彼らの Chrysamine-G 系統プローブは X-34 (20)、さらに Methoxy-X-04(21) へと引き継がれている。X-34 がさらに修飾されたのが BSB(22)、ISB(23)、IMSB(23) であり、これらは主としてペンシルベニア大 Kung 夫妻らによって報告された。

2001年、Klunk らは Thioflavin-T の3位の N を4級から3級に替えることによって、脳からのクリアランスに優れたプローブ (BTA シリーズ) が得られることを見だし(24)、以後彼らはこのシリーズに集中して研究を続けている。

一方、Kung 夫妻は BTA シリーズ周辺の TZDM(25)、TZPI(25)、IBOX(25) を経て、Klunk らの特許に抵触しない SB-13(26)、IMPY(27, 28) へと研究を移している。UCLA Barrio らのプローブ FDDNP(29) は蛍光染料 DDNP(30) の F 化合物である。

2002年初頭、世界で初めて AD 患者にアミロイドイメージング用 PET プローブが投与された画像が紹介された(31)。この栄誉に浴したのは Barrio らのチーム、プローブは ^{18}F FDDNP であった。 ^{18}F FDDNP の集積は ^{18}F FDG 代謝の低下している部位にみられ、また側頭葉部位における集積は Aβ および神経原線維変化を反映していると考えられる。しかし ^{18}F FDDNP は脳幹、特に橋付近の非特異的結合があまりにも多く、このプローブがスタンダードな AD 診

断用プローブになるとは考えにくい。

現在、最も進捗度の高いプローブは ^{11}C PIB (= ^{11}C 6-OH BTA-1) である。このプローブ関連の情報を要約すると以下の通りである。

- 1) スウェーデン ウプサラ大学 PET センター(32) においてまず最初の、次いでカナダ トロント大学(33) でヒト PET スタディが行われ、その後かなりの施設で追試が行われている模様である。現在までのところ感度、特異度のデータは出ていないが、学会発表および論文データからみて AD と非 AD との鑑別は十分に可能であり、また従来の診断法に比し明らかに優れている、が著者の意見である。
- 2) Klunk ら(32) によると AD 患者脳において高い集積の認められる部位は前頭葉、側頭頭頂葉などであるが、これらは明らかに健常コントロール画像と異なっており、また ^{18}F FDDNP と同様、 ^{18}F FDG 代謝の低下している部位に集積がみられた。 ^{11}C PIB 集積と ^{18}F FDG の代謝率を比較したところ、前者の集積の方が後者の代謝率よりも AD 患者-健常コントロール間のデータのオーバーラップが少なかった。このことはこのプローブによる診断の方が ^{18}F FDG を用いたそれよりも AD の診断精度が優れていることを示唆している。しかし一方、AD 患者において ^{11}C PIB 集積が正常レベルであった例、正常コントロールでも集積の高かった例なども見られている。これらが false positive/negative なのか、または発症前高リスク者であったのかは今後多例数を重ねて検討する必要がある。
- 3) 老人斑がそれほど蓄積しないことが知られている視床、線条体、後部帯状回等へもかなりの集積が

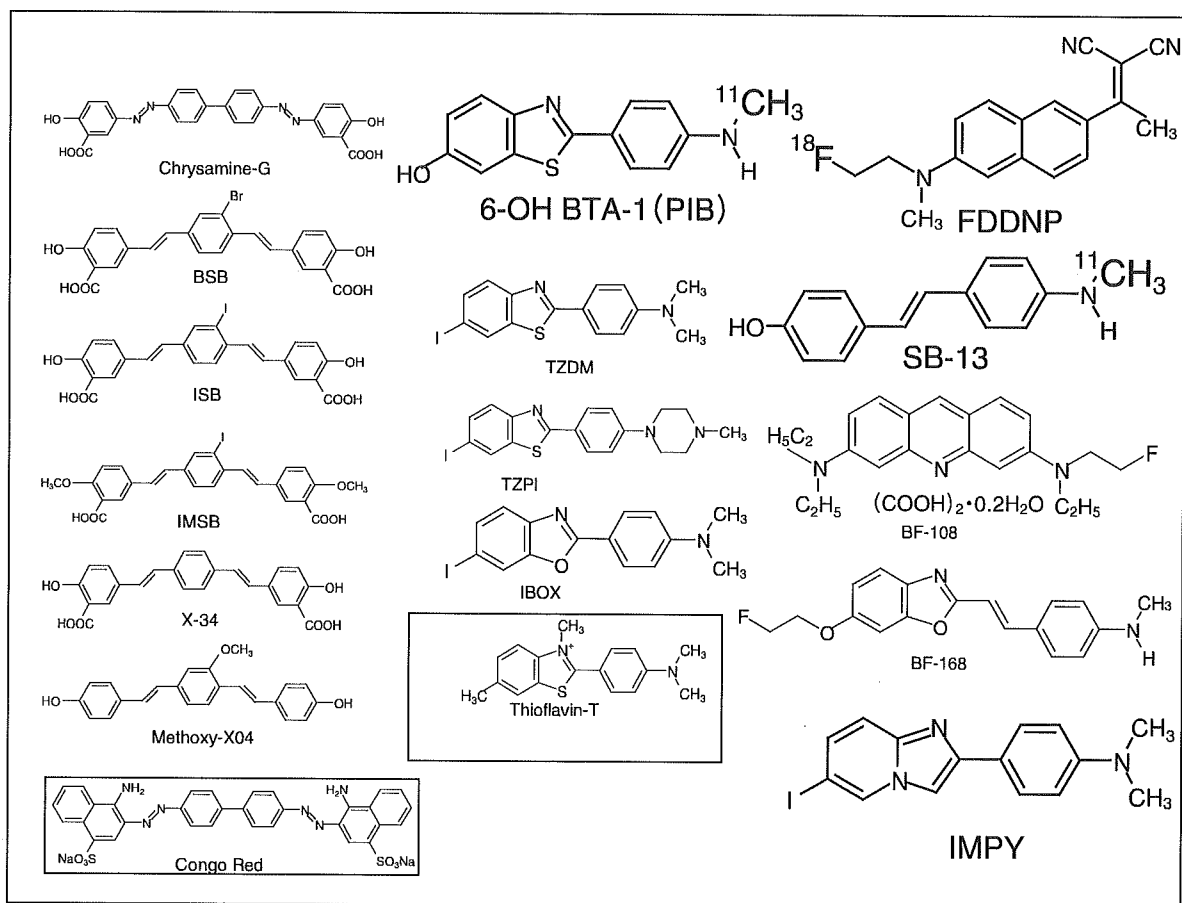


図3 アミロイドイメージング用に開発されたプローブ群

認められる(32, 33) ようである。皮質における集積はADの病理像から見て一応納得できるが、なぜ線条体等においてかなりの非特異的集積が見られるかは不明である。

- 4) A β が脳内に蓄積するトランスジェニック (Tg) マウスにおいては、このプローブとA β との結合性はそれほど高くないことが、開発者自らによって報告されている(34)。
- 5) ゼネラル エレクトリックス-アマーシャム ヘルスのもとで開発が進められているようである。

次に、 $[^{11}\text{C}]$ SB-13であるが、最近トロント大学より $[^{11}\text{C}]$ PIB との比較という形で探索的臨床研究データが発表された(33)。AD患者におけるプローブの集積部位は、前頭葉、後頭側頭-下部頭頂連合皮質であり、 $[^{11}\text{C}]$ PIBの集積とよく似ていた(線条体への集積をも含めて)と報告されている。

4. 著者らのプローブ

さて、日本であるが時限研究法人(1997年2月-2004年2月)ビーエフ研究所において著者らによって研究がなされていたが、東北大学(著者ら)チームによって同研究所の成果が引き継がれている。著者らのそれらはAD脳病理像に対する親和性から以下の3つのグループに大別される。

- 1) びまん性老人斑を含む老人斑に対して結合特異性の高いプローブ群
びまん性老人斑は老人斑に先立つ(時間的に)病理所見といわれることから、これらのプローブを用いることにより、より早期診断が可能になると推測される。
- 2) 老人斑および神経原線維変化の両者をほぼ同等に認識するプローブ群
現在までのところ、競合研究者のプローブはアミ

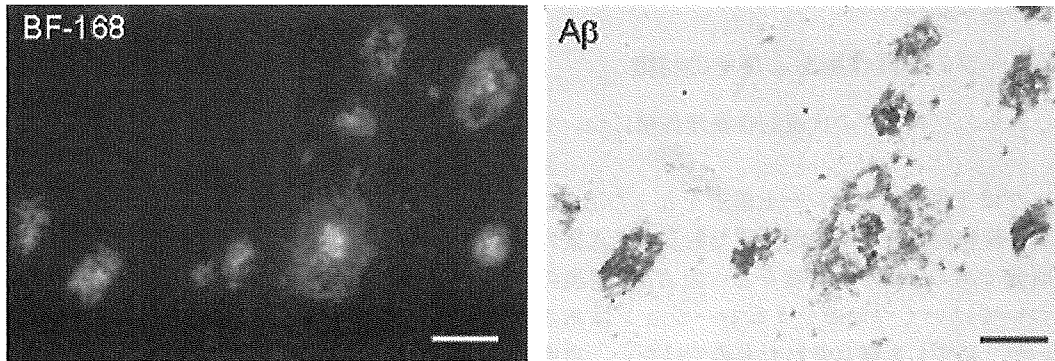


図4 アルツハイマー病患者脳切片における BF-168 の染色像 (蛍光顕微鏡下)
左: BF-168 右: 抗 A β 抗体染色. スケールは 50 μ m. (文献 38 より引用, 一部改変)



図5 APP23 トランスジェニックおよび野生型マウスにおける [18F]BF-168 静脈内投与後のオートラジオグラフィ像
左: APP23 トランスジェニックマウスにおけるオートラジオグラフィ像. 右: 野生型マウスにおけるオートラジオグラフィ像. (文献 38 より引用, 一部改変)

ロイドイメージング用プローブとはいうものの、
両病理所見に対する認識度に多少の差こそあれ、
すべてこのタイプのプローブである。

3) 神経原線維変化に対して結合特異性の高いプローブ群

このような特性を有するプローブは世界的にみても未だ報告されていない。

著者らのプローブは BF-108(35, 36) から始まり、
ついで Benzoxazole 誘導体(37-39)へと研究が転換した。
Benzoxazole 誘導体の中で代表的プローブ BF-168 の
成績を示す(37, 38) と、同プローブは AD 患者脳の老人斑
に結合特異性が高かった (図 4)。また同プローブの [18F]体は
遺伝的に脳内に A β が蓄積する Tg マウスにおいて特異的に
アミロイド斑に結合した (図 5)。また、著者らが見いだした
前述 3 プローブ群は、脳切片に蟻酸を前処理することによ
ってタンパクの β シ

ト構造を破壊すると、その結合性が完全に失われること
から、彼らは両タンパクの β シート構造を認識していると
結論される。

著者らが 2005 年度初頭からヒト探索的臨床試験を
計画しているプローブは BF-168 とほぼ同様の性質を
有する更なる進化体 BF-227 (= THK-002) である。
これまで報告されてきた競合研究者のプローブは総て、
老人斑および神経原線維変化の両者を認識するが、著
者らはそれぞれに選択性の高いプローブ、すなわち、
「びまん性老人斑を含む老人斑に対して結合特異性の
高いプローブ」および「神経原線維変化に対して結合
特異性の高いプローブ」を持っている。前者のプローブ
は老人斑に選択性が高く、従来のプローブでみられ
る神経原線維変化のノイズが入りにくいということで、
老人斑をターゲットとした免疫療法、 β および γ セク
レターゼ阻害薬の臨床評価には、まさにぴったりの評
価モニターとなるであろう。また後者は AD 診断に前

者とは異なった切り口を与えてくれるであろう (AD の重症度診断など)。

5. プローブの薬理作用およびその特徴

次にこれらのプローブの代表的な薬理作用について述べる。

プローブはまず第1に β シート構造をとった $A\beta$ に対して高い親和性を持つことが必要である。老人斑の主構成成分である β シート構造をとった $A\beta$ の構造の詳細についてはいくつかのシミュレーションはある(40, 41)が、必ずしも確立されたものではない。高度な専門家が集まる学会等でよく見かけるスライドでさえもアミノ酸をパラレル配置にする研究者がいる一方、アンチパラレル配置にする研究者もいる。また、 $A\beta$ は市販されており、緩衝液中でこれを容易に β シート構造をとらせることができるが、この β シート構造とTgマウス脳における $A\beta$ 、さらにAD患者脳の $A\beta$ とは三者間でそれぞれ少しずつではあるが構造が異なることが示唆されている。例えばTgマウスの $A\beta$ には結合しないが、AD患者脳のそれには結合するなど、プローブによってさまざまな結合パターンを示すことを著者自身しばしば経験している。

ADにおいて観察される老人斑の前駆状態と考えられている、いわゆるびまん性老人斑 (diffuse plaque) も $A\beta$ の蓄積像であるが、これを認識するプローブ(38, 39)と認識しないそれら(29)とがある。プローブは総て $A\beta$ の β シート構造を認識すると謳っているが、前者を用いるとびまん性老人斑は β シート構造をとっていることになるが、後者のそれでは同シート構造をとっていないことになる。これらは化合物の結合性からタンパクの構造を推定することからくる矛盾と考えられる。

$A\beta$ にはアミノ酸の長さから $A\beta$ 1-40と $A\beta$ 1-42とがあるが、AD患者脳標本上でこれを見分ける免疫染色と対比すると、現在報告されているプローブではこの違いを見分けることができない。抗体ではタンパクのアミノ酸配列を、プローブでは構造をそれぞれ認識しているからであろう。

プローブは化学構造的にCongo Redタイプ、Thioflavin Tタイプおよびその他に大きく分類される。普通のレセプターアッセイでは多少の標識リガンドの構造の違いは克服できるが、例えばCongo Redタイプ標識リガンドの $A\beta$ バインディングは同タイプのプローブによってよく置換されるが、その他のタイプのそれらによっては極めて置換されにくく、またその逆も真であることが知られている(23)。このことはプロ

ーブの基本構造の違いによって $A\beta$ バインディングサイトはそれぞれ異なること、いいかえればプローブの基本構造の違いの数だけバインディングサイトが存在することを示唆している(42)。

いわゆるアミロイドイメージングを謳ったいくつかのプローブが臨床試験に供されてきたが、これらは必ずしも $A\beta$ のみに選択性が高いわけではない。これらはAD病理像のもう1つの β シート構造をとるタンパク、すなわち過剰リン酸化タウタンパク (ないしは神経原線維変化) をもほぼ同程度に認識することが知られている。したがって、結果として得られたこれらプローブの集積画像にそれぞれの病理像がどの程度関与しているのかを決定することはできない。その意味でそれぞれ過剰リン酸化タウタンパク(43, 44)または $A\beta$ のどちらか一方のみに選択性の高いプローブの出現が待たれており、ここに前述した我々のプローブ群の存在意義の一つがあると著者は考えている。

$A\beta$ はAD患者脳内に蓄積する。当然プローブは血液-脳関門を透過することが必要である。現在、臨床試験成績が報告、実施中あるいは計画中のPIB(45)、SB-13(46)およびIMPY(22, 28)のマウス実験例を示すと、静脈内投与2分後には脳1g当たり投与絶対量の3%以上が脳内へ移行し、30分後では2分後の20%以下まで脳内含量が減少している。このように投与直後には急速且つ大用量が脳へ移行し、その後急速に脳からクリアランスされるという相反する2つの特性を持たせなければならないことが、これらプローブのドラッグデザインを難しいものになっている。

現状のアミロイドイメージングはプローブのいずれかの部位に標識された同位体を追跡することから、代謝された同位体が脳内にとどまったり、脳へ再移行するような標識法は避けなければならない。プローブごとに適切な標識法および部位を開発しなくてはならないことも、プローブ開発を難しくしている一因である。

6. その他のアミロイドイメージング法

最近、HiguchiらのMRIを用いたアミロイドイメージング法(47)とPETを用いたそれとの違いについてよく質問を受ける。彼らの方法は $A\beta$ を認識するF化合物のFを追跡する技術であるが、測定原理上、PETと比較して空間分解能は圧倒的に優れているが、時間的分解能、感度は劣っている。MRIの感度は 10^{-4} M、PETのそれは 10^{-12} Mと考えられている(48)ことなどから、Higuchiらも述べているように(47)この方法のヒト臨床応用にはハードおよびソフトウェアの更なる進化に加えて優れたF化合物の開発が必

要であろう。進化が現実になったならばPETにとって代わるのは必然と思われるが。

近年、分子イメージングに新しい手法、特に光技術が進出してきた。著者周辺では、各種ガン細胞にLuciferase 遺伝子を導入してこれをマウスに植え込み、その後 Luciferin を静脈内投与して得られる発光画像から抗ガン剤の効果を評価する際に汎用されている。いわゆるレポーターマウスを用いる方法であり、Luciferin-Luciferase 系以外にも GFP を用いる系などがある(49)。感度は発光では 10^{-17} M、蛍光では 10^{-12} M と考えられている(49)。小動物用測定装置としては6社ほどから発売されているが、これらのいくつかを使用した経験からみて、光技術ないしはレポーターマウスは多少の問題点はあるものの、有用性の高い薬理的評価法ないしは分子イメージング法に成長することは確実と感じている。

AD 関連では黄色蛍光タンパクと A β を共発現させたダブル Tg マウスが報告されている(50)。同マウスを用いることによりインビボにおいてプローブなしに A β をイメージングすることが可能である。

7. プローブの更なる最適化および更なる発展性

今後より非特異的結合の少ないアミロイドイメージング用 PET プローブを目指して更なるプローブの最適化が加えられるであろうと思われる。^[18F]FDDNP から始まる数プローブを第1世代と呼ぶならば、誰もが納得するプローブは第2または第3世代のそれ(ら)になるのかもしれない。特により臨床有用性の高い^[18F]標識プローブ、また前述したように A β または過剰リン酸化タウタンパクのいずれか一方に選択性の高いプローブの開発に向けて研究が進んでいる。アミロイドイメージングというこの診断法がもっている本質的に極めて優れた特長が生かされ、欠点が解消されたプローブを目指して各チームの努力、そしてプローブの更なる進化も続いている。

これまで述べてきたプローブは総てタンパクの β シート構造を認識する化合物群である。タンパクの β シート構造とこれに関連する疾病に目を向けてみると、同シート構造をとったタンパクの出現が病因、または病因の一部に関与していると考えられている疾病、さらに同シート構造をとったタンパクをマーカーとして検出することが診断の物差しとなりうる疾病には、AD 以外に多数存在することが知られている。これらの疾病はタンパクの高次構造の変化により疾病が引き起こされるという概念から、コンフォメーション病(またはフォールディング病)とも呼ばれ、多くの神経変

性疾患、神経難病疾患が含まれている。今回述べてきたプローブは AD 特有の2つのタンパクの β シート構造を認識することは明らかではあるが、同時にこれらのプローブおよびその周辺化合物はコンフォメーション病特有の β シート構造を取ったタンパクを認識する、すなわち(AD 診断プローブと同じようなストラテジを導入することにより)診断プローブとなりうる可能性、さらに同シート構造を認識することを介して同シート構造をとるタンパクの産生を抑制する、すなわち治療薬となる可能性が示唆されており(51-53)、著者らもこれらに関していくつかの成果を得ている。

アミロイドイメージング(およびその周辺技術)は、AD(および周辺疾患)の早期、鑑別、発症前診断を可能とすることから、結果として、また波及効果として得られる患者(予備軍)・家族、臨床家、そして社会、国民の保健・医療福祉に対する福音および医療経済的節約効果は多大なものになるであろう。

文 献

- 1) Schenk D, et al. Nature. 1999;400:173-177.
- 2) Bard F, et al. Nat Med. 2000;6:916-919.
- 3) Hock C, et al. Nat Med. 2002;8:1270-1275.
- 4) Hara H, et al. J Alzheimers Dis. 2004;6:483-488.
- 5) Tabira T, et al. Rinsho Shinkeigaku. 2004;44:778-780.
- 6) Oddo S, et al. Neuron. 2004;43:321-332.
- 7) John V, et al. J Med Chem. 2003;46:4625-4630.
- 8) Schmidt B. ChemBiochem. 2003;4:366-378.
- 9) Tian G, et al. J Biol Chem. 2002;277:31499-31505.
- 10) Takahashi Y, et al. J Biol Chem. 2003;278:18664-18670.
- 11) Kimura T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2004;14:1527-1531.
- 12) Kimura T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2005;15:211-215.
- 13) Petersen RC, et al. JAMA. 1995;273:1985-1992.
- 14) Winblad B, et al. J Intern Med. 2004;256:240-246.
- 15) Gomez-Isla T, et al. J Neurosci. 1996;16:4491-4500.
- 16) Price JL, et al. Ann Neurol. 1999;45:358-368.
- 17) The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group. Consensus Report on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". Neurobiol Aging. 1998;19:No.2.
- 18) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 1994;15:691-698.
- 19) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 1995;16:541-548.
- 20) Styren SD, et al. J Histochem Cytochem. 2000;48:1223-1232.
- 21) Klunk WE, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2002;61:797-805.
- 22) Skovronsky DM, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:7609-7614.
- 23) Zhuang ZP, et al. J Med Chem. 2001;44:1905-1914.
- 24) Klunk WE, et al. Life Sci. 2001;69:1471-1484.
- 25) Zhuang ZP, et al. Nucl Med Biol. 2001;28:887-894.
- 26) Ono M, et al. Med Biol. 2003;30:565-571.
- 27) Kung MP, et al. Brain Res. 2002;956:202-210.
- 28) Zhuang ZP, et al. J Med Chem. 2003;46:237-243.
- 29) Agdeppa ED, et al. J Neurosci. 2001;21:RC189.
- 30) Jacobson A, et al. J Am Chem Soc. 1996;118:5572-5579.
- 31) Shoghi-Jadid K, et al. Am J Geriatr Psychiatry. 2002;10:24-35.
- 32) Klunk WE, et al. Ann Neurol. 2004;55:306-319.
- 33) Verhoeff NP, et al. Am J Geriatr Psychiatry. 2004;12:584-595.
- 34) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 2004;25: No.S2, p. S232.
- 35) Shimadzu H, et al. J Label Compd Radiopharm. 2003;46:765-772.
- 36) Suemoto T, et al. Neurosci Res. 2004;48:65-74.
- 37) Shimadzu H, et al. J Label Compd Radiopharm. 2004;47:181-190.

- 38) Okamura N, et al. *J Neurosci*. 2004;24:2535-2541.
- 39) Okamura N, et al. *J Mol Neurosci*. 2004;24:247-255.
- 40) Ohhashi Y, et al. *J Biochem*. 2002;131:45-52.
- 41) Tycko R. *Biochemistry*. 2003;42:3151-3159.
- 42) Lockhart A, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:7677-7684.
- 43) Small GW, et al. *J Mol Neurosci*. 2002;19:323-327.
- 44) Hardy J. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:1539-1540.
- 45) Mathis CA, et al. *J Med Chem*. 2003;46:2740-2754.
- 46) Ono M, et al. *Nucl Med Biol*. 2003;30:565-571.
- 47) Higuchi M, et al. *Nat Neurosci*. 2005;8:527-533.
- 48) Fujita M, et al. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Lippincott Williams & Wilkins. 2002. p. 411-425.
- 49) Maggi A, et al. *TIPS*. 2004;25:337-342.
- 50) Brendza RP, et al. *J Clin Investigation*. 2005;115:428-433.
- 51) Bresjanac M, et al. *J Neurosci*. 2003;23:8029-8033.
- 52) Sadowski M, et al. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:775-784.
- 53) Ishikawa K, et al. *J General Virology*. 2004;85:1785-1790.

著者プロフィールは 125(4)235 頁をご参照ください。

プリオン病の治療法の現状

The latest progress in prion therapeutics



逆瀬川裕二(写真) 堂浦克美

Yuji SAKASEGAWA and Katsumi DOH-URA

東北大学大学院医学系研究科附属創生医学応用研究所プリオン蛋白研究部門プリオン蛋白分子解析分野

◎プリオン病はいまだ有効な治療法がない。発症すると確実に死に至る進行性の変性神経疾患である。プリオン病を引き起こす感染体プリオンはわれわれの身体に豊富に存在するプリオン蛋白質の構造変異体であるため、強い免疫寛容により免疫系に認識されない。むしろ、一部の免疫系はプリオンの増殖の場となっている。感染によって抗体の産生が認められず、長い潜伏期に続く発症後の急速な神経変性の進展は、プリオン病の治療を非常に困難なものにしている。現在、プリオンおよび感染のメカニズムについて急速に理解が進み、また、いくつかの薬剤は臨床にて一定の効果が確認されている。今後は治療薬の開発だけでなく、早期発見を可能にする技術や検査法の開発が求められる。



Key word : プリオン病, 治療, 薬物, 免疫療法

プリオン病(伝達性海綿状脳症)は進行性の神経変性疾患であり、有効な治療法が確立されていない現在、治療不能の致死性の難病となっている。孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(孤発性 CJD)を代表とするヒトプリオン病は、年間 100 万人に 1 人の割合で発症し、数週間から数カ月で急激に症状が進行し、死に至る(一部の遺伝性プリオン病には数年にわたって症状が進行するものもある)。発症すると脳内に海綿状の神経変性ととも、プリオンとよばれる感染性をもつ蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積を生じる。プリオンが実験動物へと感染しうるとは以前から知られていたが、現実にプリオンに汚染した飼料を介してウシ海綿状脳症(BSE)がイギリスを中心とするヨーロッパに蔓延し、さらにその BSE からヒトへの感染と考えられる変異型 CJD が発生した 1996 年には世界を巻き込む大きなパニックとなった。アメリカや日本ではプリオンに感染した硬膜などの生体材料の移植によって医原性 CJD が発生し、とくに日本では対策の遅れもあり、100 人を超える症例が報告され、薬害ヤコブ

病として大きな社会問題となっている。

現在、プリオン病に対する理解が進み、また感

サイド
メモ
1

プリオン病の免疫療法

プリオンは生体内に豊富に存在する PrP^Cの立体構造異性体であるため、たとえ感染しても強い免疫寛容によって抗体産生や炎症などの免疫応答は起こらない。一方、プリオン蛋白質に対する抗体を腹腔内投与することによって、すでにリンパ内系にプリオンの感染が成立しているマウスにおいてプリオンの末梢から中枢神経への感染を抑制し、発症を遅延させることが報告されている。抗体の脳室内投与は脳内の神経細胞死を誘発するが、末梢での抗体の曝露においては顕著な副作用は認められておらず、ワクチン療法や持続的な末梢への抗体投与といった免疫療法は、経口あるいは末梢からのプリオンの感染に対する予防あるいは感染初期の治療法として期待される。ただしワクチン療法については、免疫寛容を回避するための理論的および技術的なブレイクスルーが必要と思われる。

染防止対策がうまく機能していることもあり、BSE や変異型 CJD の発生は小康状態あるいは減少に転じている。しかし、発症していないにもかかわらず感染性を有する、いわゆるキャリアの存在が動物実験や変異型 CJD の症例から示唆されており、また輸血による変異型 CJD の症例が報告されるなど、今後、変異型 CJD のキャリアが発症する可能性、またそのキャリアから輸血などの医療行為によって感染が拡大する可能性が出てきた。一刻も早い有効な予防薬や治療薬の開発が待たれる。近年、プリオン病の基礎研究や治療薬のスクリーニング・検出技術に大きな進展があり、いくつかの薬剤についてはすでに臨床で研究が行われその有効性が検討されている。

プリオン病とは

プリオン病は通常のウイルスや細菌の感染と異なり、プリオンとよばれる蛋白質によって感染が引き起こされる¹⁾。プリオンはプロテアーゼや高熱に耐性をもつ不溶性の蛋白質(PrP^{Sc})であるが、生体にはまったく同じアミノ酸配列をもつ正常型プリオン蛋白質(PrP^C)とよばれる膜蛋白質が存在する。これらの蛋白質の高次構造(コンフォメーション)は大きく異なり、前者はβシートに富み、

サイド
メモ
2

プリオンの株(strain)

プリオンには性質の異なる“株”という個性があることが知られている。ウシ海綿状脳症(BSE)は非典型的なものを除くと単一の株と考えられているが、ヒツジのスクレイピーには20種類以上のプリオン株が知られており、ヒトプリオン病も複数の株に分けることができる。株によってプリオンの脳内での蓄積部位や生じる神経症状、プロテアーゼや熱への耐性などが異なっており、その違いはプリオンの蛋白質高次構造の違いによって生じると考えられている。薬剤によっては株の違いによって治療成績が大きく異なるものが知られており、そのような薬剤にアンフォテリシンB、分岐ポリアミン、キナクリンなどがある。プリオン病の根本的な治療には、このような株の違いを考慮した薬剤の選択や、場合によっては複数の治療薬によるカクテル療法が必要かもしれない。

アミロイドとよばれる不溶性の多量体を形成し、後者はαヘリックスに富む可溶性の単量体として存在している。正常プリオン蛋白質の機能は不明であるが、プリオン病の感染には必須で、この蛋白質をもっていないノックアウトマウスはプリオンを摂取されてもプリオン病に感染しない。ヒトPrP^Cは第20染色体短腕のPRNP遺伝子にコードされており、遺伝型プリオン病を引き起こす多数の変異が知られている。

治療薬スクリーニングの開発

プリオン病の治療薬の開発には、プリオン持続感染培養細胞を用いてPrP^{Sc}の産生量を測定するアッセイ法と、プリオンを摂取したハムスターやマウスの潜伏期の長さを指標にしたアッセイ法がおもに用いられている。

前者は簡便であり、多数の検体を迅速に処理することが可能で、後にメンブレンフィルターに転写することで、さらに迅速に検体を扱えるように工夫されている。しかし、PrP^{Sc}の産生量とプリオンの感染価はかならずしも一致するわけではなく(たとえばプロテアーゼ感受性のプリオンは測定できない)、また、培養細胞で治療効果があっても動物実験では毒性があったり治療効果が認められないことがあるなどの欠点がある。

後者は感染価と潜伏期の長さが比例関係にあることを利用して感染価を測定する方法である。これまで開発されたプリオン検出系のなかでもっとも感度がよいことが知られているが、確定するのに時間と費用がかかることが欠点である。これまではハムスターを用いた動物実験がもっとも早くプリオンを検出できる実験法であったが、マウスにおいてもPrP^Cを過剰発現したトランスジェニックマウスを用いることで潜伏期を短縮することに成功しており、種の異なるプリオン蛋白質のキメラ蛋白質のノックインマウスを利用することによって種の壁による影響を小さくすることや、腹腔内にプリオンを摂取後、脾に蓄積するPrP^{Sc}を測定することによって感染を30日で検出することも可能になった²⁾。

またその他に、[PSI+]や[URE3]という酵母プリオンを用いたスクリーニング系や³⁾、PrP^Cと

表 1 試験管, 培養細胞あるいは動物を用いた実験で抗プリオン活性が認められたおもな薬剤, 化合物

カテゴリー	薬剤・化合物	根拠	予想されるメカニズム	欠点
アミロイド結合性試薬	Congo red	PrP アミロイドへの結合	PrP ^{Sc} への結合と安定化	脳血液関門の非透過性, 予防のみ
アミロイド吸収	ヨードドキシソルピシン	PrP アミロイドの構造弛緩	PrP ^{Sc} への結合	脳血液関門の非透過性, 毒性
ヨードドキシソルピシン構造類似体	テトラサイクリン	ヨードドキシソルピシンとの構造の類似性	PrP ^{Sc} への結合	
ポリエン系抗生物質	アンホテリシン B*	抗真菌薬	コレステロールへの結合と PrP ^C のエンドサイトーシス阻害	プリオン株依存性, 毒性
ポリアニオン誘導体	ペントサンポリサルフェート*	抗ウイルス薬	PrP ^C への結合と PrP ^C のエンドサイトーシス阻害	脳血液関門の非透過性, 予防のみ
β シート破壊ペプチド	プリオン蛋白質由来ペプチド	PrP ^{Sc} の構造破壊	PrP ^{Sc} との相互作用	易分解性, 免疫, 脳血液関門の非透過性
テトラピロール	ポルフィリン	蛋白質との結合	PrP ^C あるいは PrP ^{Sc} への結合	脳血液関門の非透過性, 予防のみ, 毒性
分岐ポリアミン	分岐ポリアミン	トランスフェクション実験からの知見	リソソームでの PrP ^{Sc} の不安定化	脳血液関門の非透過性, プリオン株依存
アクリジンとフェノキアジン誘導体	キナクリン*, クロルプロマジン	脳血液関門易透過性	リソソームでの PrP ^{Sc} の不安定化	毒性, プリオン株依存性
抗プリオン蛋白質抗体	D-18, 6H4	PrP ^C あるいは PrP ^{Sc} への結合	PrP ^C あるいは PrP ^{Sc} への結合	脳血液関門の非透過性, 免疫寛容, 神経細胞死
NMDA 受容体アンタゴニスト	メマンチン, フルピルチン*	神経細胞死抑制	神経細胞死抑制	

*: 臨床で検討.

PrP^{Sc}の相互作用を蛍光相関分光法を用いて測定するハイスループットスクリーニング法⁴⁾があらたに開発されている.

プリオン検出法の開発

PrP^{Sc}の検出法には, 従来使用されてきたプロテアーゼ処理によって混在する PrP^Cを除去し, プロテアーゼ耐性の PrP^{Sc}をメンブレンあるいはプレート上で免疫化学的に測定する Western blot 法や ELISA 法以外に, あらたに, PrP^{Sc}に特異性をもつポリマーでコーティングしたプレートを用いる ELISA 法や, コンフォーメーションを認識する抗体を用いた ELISA 法(CDI 法)⁵⁾などプロテアーゼ処理を省略した検出法も開発されている. また, PrP^{Sc}との相互作用によってコンフォーメーション変化を起こし, 蛍光を発するよう工夫されたペプチドを用いた高感度検出法や, DNA の増幅に使われている PCR 法によく似た方法によって PrP^{Sc}を増幅するという検出法(PMCA 法)など, まったく新しい原理による検出法も開発されている. PMCA 法は, PrP^{Sc}からなる凝集体がある条件下で

PrP^Cを重合してより大きな PrP^{Sc}凝集体を形成することを利用している. 一定時間ごとに超音波処理と重合反応を繰り返すことにより PrP^{Sc}を増幅するという方法で, これまでもっとも感度のよかったバイオアッセイと同等以上の感度を有しており, 血液中のごく低濃度の PrP^{Sc}の検出などにおいて現在もっとも高感度の測定法となっている⁶⁾. すでに自動化されており, 血液や尿など低濃度のプリオンを含む試料の高感度検出とプリオン病の早期発見への応用に期待されている.

プリオン病の治療薬候補

プリオン病の治療薬候補として多くの薬剤, 化合物が報告されている⁷⁾. ①アミロイドに結合することが知られている Congo red や抗腫瘍薬ヨードドキシソルピシン, その構造類似体のテトラサイクリン, ②抗真菌薬からアンホテリシン B などのポリエン系抗生物質, ③ペントサンポリサルフェートなどのポリアニオン誘導体, ④蛋白質の高次構造に影響を与える β シート破壊ペプチドやポルフィリンなどのテトラピロール類, ⑤抗プリオン

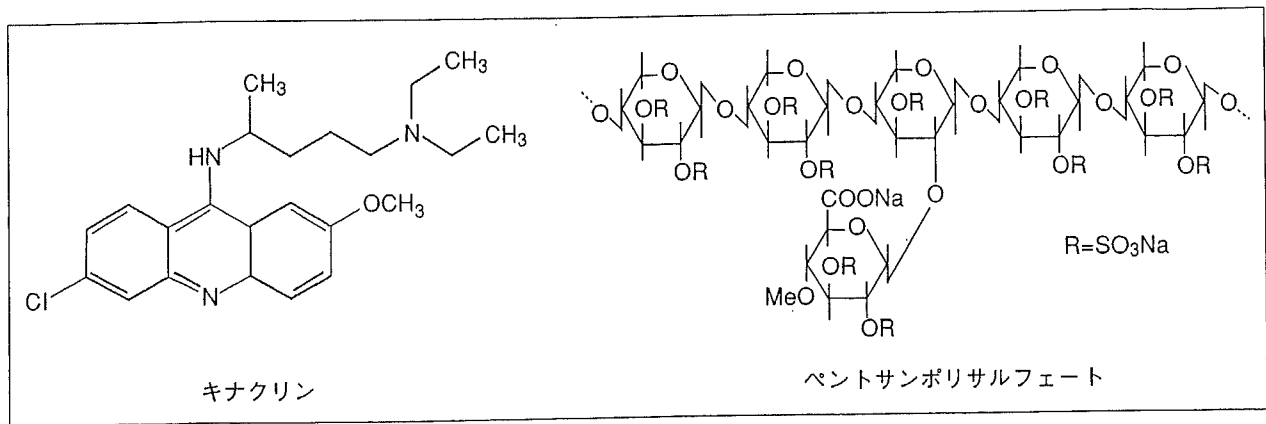


図 1 キナクリンとペントサンポリサルフェートの構造図

活性を示すトランスフェクション試薬から見出された分岐性ポリアミン, ⑥抗プリオン蛋白質抗体, ⑦脳血液関門(BBB)を透過する既存の治療薬からのスクリーニングよりみつかった抗マラリア薬キナクリンや抗精神薬フェノチアジンなど, ⑧神経細胞死を抑制する薬剤から NMDA 受容体拮抗薬メマンチンや中枢性鎮痛薬フルピルチンなどがある(表 1)。これらのなかで患者に実際に応用されている薬剤および化合物には, アンフォテリシン B, ペントサンポリサルフェート, キナクリン, フルピルチン, などがある。

本稿では, 日本で臨床研究が進行しているキナクリン, ペントサンポリサルフェートについて解説する(図 1)。

キナクリンは長年にわたって抗マラリア薬として広く使用されている薬剤であり, 安全性も高いことから, アメリカおよびイギリスにて臨床研究が進められている。日本においても孤発性 CJD 22 例, 医原性 CJD 5 例, 遺伝性プリオン病 4 例の計 31 例の症例に対し, 300 mg/day を経口あるいは経管投与にて 12 週間の連続投与というプロトコールで臨床研究が行われた。その結果, 12 例で覚醒度や自発語, 注視など臨床症状に一過的な改善が認められたが(効果が認められた例: 孤発性 9 例, 医原性 2 例, 遺伝性 1 例), 16 例に肝機能障害や溶血性貧血などの重大な副作用が認められ, より毒性の低い塩酸キニーネに変更されたものの, 持続的な薬効を保つことと副作用を抑えることが困難であることが判明している⁸⁾。

ペントサンポリサルフェート(PPS)は脳血液関門を透過しないため, 微量注入器具を用いて脳室

内へ連続投与することが検討され, 動物実験では脳内接種後 10 日からの投与で 173%, 30 日からの投与で 93% の潜伏期の延長が認められた⁹⁾。本薬剤は, 2003 年, イギリスにて 1 例の変異型 CJD 患者で臨床研究が開始されたが, 脳の萎縮の進行は止まらなかったものの副作用は認められず, 臨床症状は落ち着いており, 現在まだ経過を観察中である。日本でも福岡大学で孤発性 CJD 患者の臨床研究が開始されており, これまでに明らかな臨床症状の改善は認められないものの, 副作用は認められず, 経過が観察されている¹⁰⁾。PPS を用いた脳室内持続投与療法はイギリスや日本以外の国でも開始され, 全世界で 20 例近い患者に実施されており, 現在最も効果的な治療法のひとつと考えられている。今後, 最適の治療プロトコールの完成と臨床症状の改善が判断できる症例での検討が求められる。

おわりに

プリオン病は通常の細菌やウイルスなどを介した感染症と異なり, 感染してからの潜伏期が長く, 発症直前まで感染の有無を知ることができないうえ, 急速に進む神経変性を治療していくことは非常に難解な問題となっている。末梢から中枢神経への感染を予防することは現在開発されているいくつかの薬剤でも可能と思われるが, それには発症前に治療を開始することが必須であり, 現在のところ, 医原性プリオン病や遺伝性プリオン病などを将来発症する可能性のあるヒトには応用することができないもの実際的ではない。MRI 拡散強調画像や脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質などが神経変

性初期の診断の助けとなることが報告されているが、より早い時期での診断のためのマーカーの探索や検出方法の開発が求められる。血液や尿中のPrP^{Sc}の高感度検出は感染初期あるいは発症初期の検出法となるかもしれない。従来、PrP^{Sc}が神経変性の原因と考えられていたが、いくつかの実験から、PrP^CあるいはPrP^CからPrP^{Sc}に変化する中間体が神経毒性の本体との仮説が浮上している。

この毒性本体の解析やメカニズムを明らかにすることで、新しい治療法へと結びつくかもしれない。

文献

- 1) Prusiner, S. B. : Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** : 13363-13383, 1998.
- 2) Kitamoto, T. et al. : Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294** : 280-286, 2002.
- 3) Bach, S. et al. : Isolation of drugs active against mammalian prions using yeast-based screening assay. *Nat. Biotech.*, **21** : 1075-1081, 2005.
- 4) Bertsch, U. et al. : Systematic identification of anti-prion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J. Virol.*, **79** : 7785-7791, 2005.
- 5) Bellon, A. : Improved conformation-dependent immunoassay : suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J. General. Virol.*, **84** : 1921-1925, 2003.
- 6) Castilla, J. et al. : Detection of prions in blood. *Nat. Med.*, **11** : 982-985, 2005.
- 7) Rossi, G. et al. : Therapeutic approaches to prion diseases. *Clin. Lab. Med.*, **23** : 187-208, 2003.
- 8) 山田達夫・他 : クロイツフェルト・ヤコブ病患者に対するキナクリン治療—31症例における効果、副作用の分析—厚生労働省科学研究費補助金難病性疾患克服研究事業プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究, 平成15年度分担研究報告書, pp.113-124.
- 9) Doh-ura, K. et al. : Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J. Virol.*, **78** : 4999-5006.
- 10) 山田達夫, 坪井義夫 : ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究, 厚生労働省科学研究費補助金こころの健康科学研究事業, プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究平成16年度分担研究報告書, pp.8-9.

* * *

特 集 プリオン病 update

プリオン病の治療*—ペントサン ポリサルフェート脳室内持続投与—

● 坪井義夫** / 山田達夫** / 堂浦克美***

Key Words : prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease, pentosanpolysulphate, cerebroventricular infusion

ペントサンポリサルフェート(PPS) 脳室内持続投与療法開始までの過程

1. ヒトプリオン病の歴史と現状

孤発性のCreutzfeldt-Jakob病(CJD)は1921年に初めて報告された疾患であるが、人類史上おそらくは古くから存在していた疾患であると考えられる。臨床症状は、まず発症年齢が40歳から80歳までで、年間発生率は100万人にひとりであるとされている。本邦では年間に100名前後の患者が発生する計算になるが、CJDサーベイランス委員会報告でもとくに矛盾しない報告がなされている。平均年齢は65.6歳である¹⁾。典型的な症状としては、進行性の痴呆とミオクローヌス、小脳性運動失調や視覚異常などの臨床症状のほか、脳波では周期性同期性放電が認められ、診断に有用とされている。また、脳脊髄液中の14-3-3蛋白、neuron-specific enolase(NSE)やタウ蛋白がCJDにおける神経細胞死の生物学的マーカーとして有用であることが報告されている^{2)~5)}。また、プリオン蛋白遺伝子(PRNP)内コドン129のメチオニンとバリンの遺伝子多型は臨床表現型

に影響を与えることがわかっている⁶⁾。遺伝性プリオン病の発生は全体の約10%を占めている。遺伝性プリオン病は、いずれも常染色体優性遺伝でPRNP内に点変異あるいは挿入変異を有する。

ヒト硬膜の移植後に数年から十数年経った後に発症する医源性プリオン病も、発生は本邦で100例を超えた⁷⁾。変異型CJDは1996年に報告され、ウシ海綿状脳症(BSE)との関連が確実視されている⁷⁾。孤発型CJDとの違いは、若年発症(平均29歳)で進行はやや遅い。脳病理も異なり海綿状病理の周囲にflorid plaquesが認められる。英国での発生がほとんどであるが、最近本邦でも1例目が報告された⁸⁾。このような新興のプリオン病は人類史上存在しなかった疾患である。この孤発性の疾患と人為的な感染性プリオン病を同一に語ることはできない可能性がある。しかし、これらプリオン病には共通性がみられる。

臨床的にどの型のCJDも発症年齢、初発症状に違いはあるものの進行性であり、ほぼ数カ月から長くても数年で無動無言となり死に至る。また、病理的には異常型プリオン蛋白(PrP^{sc})の沈着がみられる。また、孤発性でも感染性プリオン病と同様に動物摂取において伝播、感染性を有する点にある。これが以前より伝播性海綿状脳症transmissible spongiform encephalopathies(TSE)といわれていた所以である。

* Treatment for prion disease. Cerebroventricular infusion of pentosanpolysulphate.

** Yoshio TSUBOI, M.D. & Tatsuo YAMADA, M.D.: 福岡大学医学部神経内科(〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1); Department of Neurology, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180, Japan.

*** Katsumi DOH-URA, M.D., Ph.D.: 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白研究部門; Division of Prion Protein Study, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan.

2. PrP^{sc}とは

すべての動物において正常プリオン蛋白(PrP^c)は存在し、生理的作用は確定的ではないが、銅結合蛋白質としての機能や酸化ストレスに関与している可能性がある。PRNPがコードする蛋白質であり、転写後にゴルジ体で糖鎖修飾を受け、細胞膜に移動する。培養細胞では細胞膜上での半減期は3~6時間であり、その後分解されるとされている⁹⁾。PrP^cは253アミノ酸蛋白で、分子量は35-36kDaで、主に中枢神経系で、少量はリンパ球組織で発現する。

一方、PrP^{sc}はすべてのプリオン病の病理で認められ、人のみならず動物のプリオン病、たとえばスクレイピーにおいても脳にその蓄積が認められる。PrP^{sc}は感染性を有すると考えられている。事実、接種感染実験において、種を越えて伝播が可能であり、新たなプリオン病を生じる。PrP^{sc}による感染後に、PrP^cになんらかの構造変化が引き起こされ、βシート構造に富むPrP^{sc}へと変化し、病的蓄積を生じる¹⁰⁾と考えられている。したがって、PrP^cが発現していない宿主にはプリオン病は感染しない。

脳におけるPrP^{sc}の病的蓄積が神経細胞死、反応性のグリオシス、マイクログリアの増加、そして、海綿状変化をひき起こす。これらの脳病理はプリオン病の診断に必須で、アミロイド斑が認められることもある。

3. PPSが治療薬として選ばれた理由

これまでに実験室的に有効性の確立された薬剤が臨床的に応用された報告は数少ない(表1)。PPSは動物感染実験において、末梢から感染する前に投与すれば発症を遅らせる効果があること、また、神経芽腫細胞におけるPrP^{sc}の蓄積を阻害する¹²⁾¹³⁾ことなどがわかっていた。この効果はPPSがプリオン蛋白の線維形成を阻害するかあるいは細胞膜上のプリオン蛋白を減少させるためと推察されている¹⁴⁾¹⁵⁾。PPSは脳血液関門を通らないために脳室内に直接投与する必要があった。Doh-uraら¹⁶⁾は、脳内感染させたマウスに対して4週間の脳室内薬物投与を感染後10日目および35日目に開始した。使用薬物はPPSのほかキノリン、アンホテリシンBなどであった。

発症遅延効果はアンホテリシンBにおいて、

表1 抗プリオン病効果の認められる化合物

・ 抗細菌剤	・ ポリアニオン
Dapsone	Carrageenan
・ 抗真菌剤	Dextran sulfate
Amphotericin B	HPA-23
・ 抗寄生虫剤	Pentosan polysulfate*
Quinacrine*	その他
Chloroquin	Chlorpromazine*
・ 免疫賦活剤	LTβ-R-Ig
CpG	Tetrapyrroles
oligodeoxynucleotide	

*臨床的に使用されたことがあるもの。

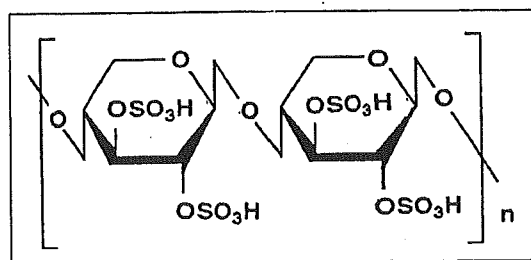


図1 Chemical structure of pentosan polysulfate (PPS)

感染後10日目の投与で30%、35日目の投与で12%であった。ところが、PPSはアンホテリシンBより際立った発症抑制効果を示した(10日目投与で173%、35日目投与で93%)。このときもっとも有効な投与量は230μg/kg/dayであった。投与開始が早いほど発症抑制効果は強力であった。脳の免疫組織学的検討やウエスタンブロットでも脳へのPrP^{sc}蓄積は著明に抑制されており、また、230μg/kg/dayの投与量では明らかな副作用は認めず、犬における実験でも230μg/kg/dayまでの投与量ではいかなる副作用も示さなかった。

PPSは硫酸化多糖(図1)で、これまでに海外で間質性膀胱炎や関節炎の治療に用いられてきた。静脈内に投与されたPPSの半減期は1mg、10mg、100mgでそれぞれ7分、21分、55分である。ヘパリンと同様に、投与後は網内系細胞に取り込まれ、飽和すると血中にとどまり、尿中に排泄される¹⁷⁾。細胞に取り込まれたPPSは脱硫酸化されて、されにゆっくりと数日かけて尿中に排泄される。経口で投与されても血中には低濃度しか検出されない(0.5~4%)¹⁸⁾。経口で投与され、しばらく後に膀胱における抗炎症作用が発現されるが、これは代謝物質が有する作用と考えら