

ADNI はヨーロッパやオーストラリアにおいても独自のスタートが予定されており 2007 年から本格的に起動することになるが、いまこそ Japan-ADNI をどのように起動させ実りある成果を得るか、真剣に考えるべき節目のときであろうと思われる。

アミロイドイメージングのAD診断における意義および原理

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を補助的に用いて診断されている。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づいたときには、アミロイドおよび過剰リン酸化タウ蛋白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)など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 診断を癌のそれにたとえるなら、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軽度認知障害 (mild cognitive impairment : MCI) という概念が提唱され^{1,2)}、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^{3,4)}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現れ、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十年前からはじ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。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、病理像が代償機能を上まわ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。アミロイドの蓄積と臨床的な発症との関連を図 1 に示す。

しかし、臨床像と病理像とが乖離しているという AD におけるこの現象は、もし的確に生体の病理像をとらえることができるならば、AD の発症

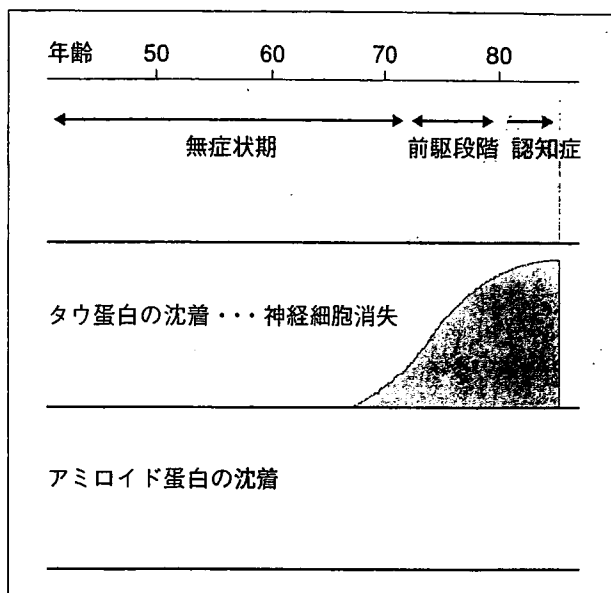


図 1 脳病理の進行と臨床症状の関連

物忘れがはじめて現れる 10~20 年前からアミロイドが脳に蓄積しはじめる。しかし、この段階ではまったくの無症状である。その後、タウのリン酸化と神経細胞死が進み、“臨床的な発症”となつてはじめて水面上に顔を出す。アミロイド蓄積の早期検出と発症予防が期待される。

前診断(予知)が可能となること、また診断時点においてたとえ高リスク者であっても、診断時点で発症前、すなわち十分に代償機能が働いている時点でありさえすれば、これに根本治療を加えることにより、その後 AD に陥らずに一生を過ごせることが可能になることを示唆させる。

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ストラテジーに基づく技術であるかについて解説すると、概念は以下のとおりである。

- 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 β によって形成されている。
- ② 同シート構造をとった A β 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出す。
- ③ この化合物を陽電子断層撮影装置 (positron emission tomography : PET) 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。

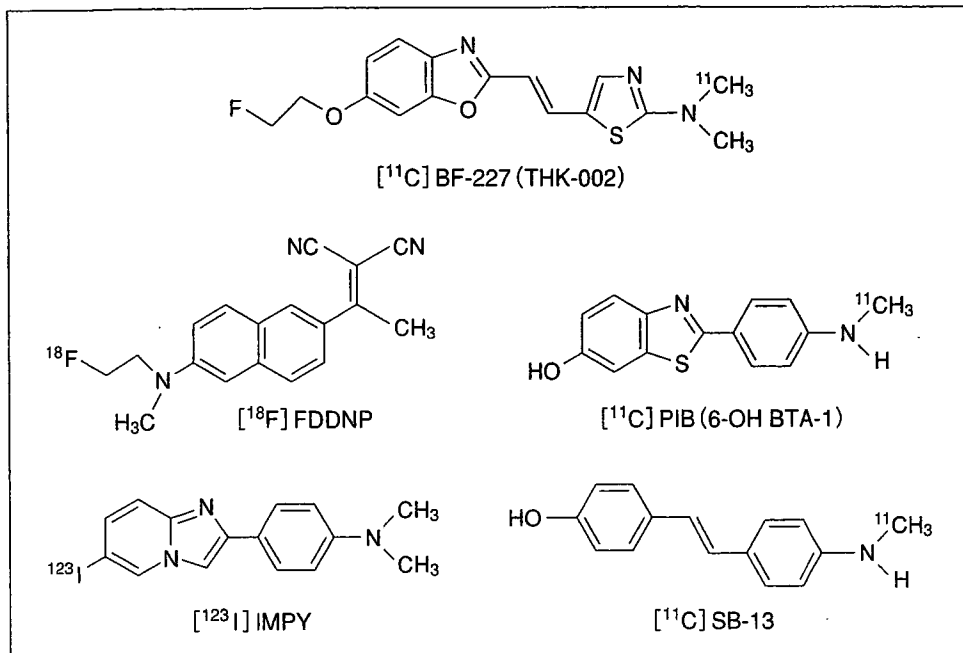


図 2 わが国のBF-227やアメリカでアミロイドイメージング用に開発されたプローブの名称とその化学構造式

化合物の構造の違いはアミロイドとの結合特性に微妙な差異を生む。たとえば、PIBはより diffuse plaques を認識し、BF-227 はより凝集した compact plaques を認識する傾向がある。また、FDDNP は Plaques と Tangles の両者を検出するとされている。

- 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 $\text{A}\beta$ 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、 $\text{A}\beta$ に結合に結合したプローブのみが脳内に残る。
- ⑥ これを PET 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 $\text{A}\beta$ (=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。

アミロイドイメージング用プローブおよびそれらの臨床応用の現状

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 $\text{A}\beta$ に特異的選択的に結合し、かつ血液-脳関門を容易に透過し、標的 β シート構造をとった $\text{A}\beta$ 以外からは速やかにクリアランスされる、さらに標識体は母化合物の特性を損なわない、などの優れた特性を有するプローブを見出すことにある。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。

現時点で探索的臨床試験が実施されたことが確認されているアミロイドイメージング用プローブは、UCLA・Barrio らの $[^{18}\text{F}]$ FDDNP、ピッツバーグ大・Klunk らの $[^{11}\text{C}]$ PIB、ペンシルベニア大・Kung 夫妻らの $[^{11}\text{C}]$ SB-13、わが国においては BF 研究所-東北大チーム(著者ら)の $[^{11}\text{C}]$ BF-227 である(図 2)。

$[^{11}\text{C}]$ BF-227 は東北大学チームによって 2005 年 7 月から探索的臨床試験が開始された。AD 患者での検討では投与直後は健常人と同様の集積分布を示したが、30 分以降においては老人斑の好発部位である前頭葉、側頭葉、頭頂葉などの大脳皮質領域で放射能の集積が観察され、健常人とは異なる集積像を示し、十分にアミロイドイメージングプローブとしてのポテンシャルを有することが示唆されている⁵⁾(図 3)。今後、定量解析法の検討や $[^{11}\text{C}]$ PIB などとの比較を行い、その詳しい臨床試験結果は追って報告したい。

$[^{18}\text{F}]$ FDDNP は世界で最初にヒトに供されたアミロイドイメージング用プローブである⁶⁾。AD 患者における $[^{18}\text{F}]$ FDDNP の集積は $[^{18}\text{F}]$ 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 $\text{A}\beta$ および神経原線維変化を反映

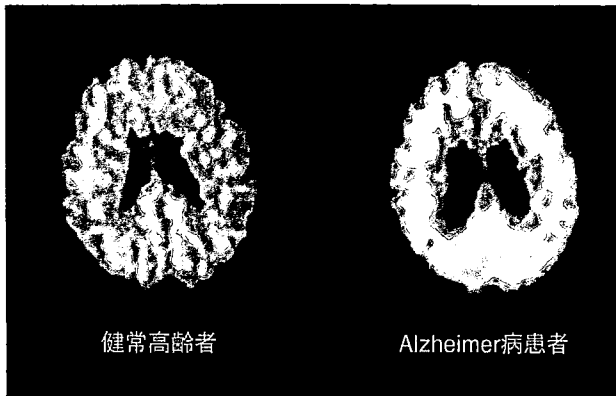


図3 ヒトでの臨床試験成績

左は高齢者健常人, 右は Alzheimer 病と臨床診断されている, 重症度は中等度レベルの患者でのアミロイド画像. 黄色や赤で示されている皮質部位はアミロイドの蓄積を示すものと考えられる.

していると考えられる^{6,7)}. しかし, その高い脂溶性に基づくと思われる非特異的結合が問題となっている.

[¹¹C] PIB は現時点でもっとも臨床評価の進んでいるプローブであり, 国内においても数施設でその評価が行われている. AD 患者における評価では [¹⁸F] FDG を用いた際の PET 画像よりも明らかに診断精度に優れていることが示唆されており, AD とコントロールとを明確に峻別できると報告されている^{8,9)}.

Mintun らは 41 例の nondemented subjects の [¹¹C] PIB・PET 画像を撮影し, 4 例(61~77 歳)の脳皮質における binding potential values と AD 患者のそれらとの間で有意差がなかったことを報告している¹⁰⁾. また, MCI 患者の結果では AD 患者とほぼ同等の集積を示す例と, コントロールとほぼ同様の結果が得られる例とが報告されている⁹⁾が, 2006 年 7 月 15~20 日, スペイン・マドリッドにおいて開催された第 10 回国際 Alzheimer 病学会(The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders)においても, MCI 患者においては AD 患者とほぼ同等の集積を示す例とコントロールと同じ集積を示す例とがあること, また前者群の一部からは AD に進行する例がみられるが, 後者群からは進行例がみられないことが複数の研究施設から報告された.

最近, [¹¹C] PIB のヒトデータを最初に学会報

告したスウェーデン・ウプサラグループによって, AD 患者における 2 年間の追跡データが発表された¹¹⁾. それによると脳皮質における [¹¹C] PIB retention は 2 年前とほとんど変わらなかったが, 一方, [¹⁸F] FDG の代謝率はこの間, 約 20% の低下を示したと報告されている. また, マドリッドにおける国際 Alzheimer 病学会においても, AD 患者における AD 評価スケールと [¹¹C] PIB 集積との関連はそれほど高くなく, むしろ [¹⁸F] FDG の代謝率との関連のほうが高いことが複数の施設から示されていた.

以上, プローブ [¹¹C] PIB のこれらの結果は, 以下のようにまとめて考察することができるものと思われる. MCI において AD 並みの集積を示す群のなかのみから AD に進行する例がみられることから, これらは AD コンバート群または AD 高リスク群であり, コントロールと同じ集積を示す例は AD へコンバートしない MCI である可能性が高いと思われる. Mintun らの観察した 4 例は, 臨床症状はみられないものの AD 高リスク者である可能性が高い. AD 患者の 2 年間の追跡で [¹¹C] PIB 集積がほとんど変わらなかった事実, 前述した MCI での事実, さらに Mintun らの 4 例の事実は病理像としての Aβ の蓄積は AD 発症時点や MCI 時点よりもさらに遡った時点ですでにほぼプラトー状態に達していることを示唆させる. このことはまた, [¹¹C] PIB は MCI およびそれ以前(発症前)の高リスク者を検出できるとともに, AD 患者の重症度または進行度診断についてはこのプローブは不得意であることをも示唆させる. しかし, これらは現時点での考察であり, これらを検証するためにはさらなる追跡試験が必要であろう.

残念ながら [¹¹C] PIB 以外は広範な臨床試験が実施されていないのが現状である. [¹¹C] PIB 以外のプローブが MCI およびそれ以前においてどのような挙動を示すかは今後のデータを待ちたい.

アミロイドイメージングのさらなる発展

現時点で臨床試験が実施されているプローブは, [¹⁸F] FDDNP を除いてすべて [¹¹C] 標識体

である。臨床有用性は、半減期の長い [^{18}F] 標識体のほうが圧倒的に優れていることから、世界中でその開発が行われており、著者らもこれに取り組んでいる。

現状のアミロイドイメージングは PET 用プローブ・PET が主流を占めているが、原理的にはそれぞれに対応した診断装置を用いることにより、SPECT 用、MRI 用、さらに近赤外線蛍光プローブもアミロイドイメージング用プローブになりうると考えられ、事実、前二者については [^{123}I] IMPY がすでに臨床試験に供され¹²⁾、後二者についてはプロトタイププローブが報告されている (MRI 用プローブ ; FSB¹³⁾、近赤外線蛍光プローブ ; AOI-987¹⁴⁾)。

文献

- 1) Petersen, R. C. et al. : Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.*, **273** : 1985-1992, 2001.
- 2) Winblad, B. et al. : Mild cognitive impairment-beyond controversies, towards a consensus : report of the international working group on mild cognitive impairment. *J. Internal Med.*, **256** : 240-246, 2004.
- 3) Gomez-Isla, T. et al. : Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **16** : 4491-4500, 1996.
- 4) Price, J. L. and Morris, J. C. : Tangles and plaques in nondemented aging and preclinical Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, **45** : 358-368, 1999.
- 5) Arai, H. et al. : [^{11}C]-BF-227 and PET to visualize amyloid in Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dementia*, **2**(3) (Suppl. 2) : S312, 2006.
- 6) Shoghi-Jadid, K. et al. : Localization of neurofibrillary tangles and β -amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **10** : 24-35, 2002.
- 7) Kepe, V. et al. : Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** : 702-707, 2006.
- 8) Klunk, W. E. et al. : Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.*, **55** : 306-319, 2004.
- 9) Lopresti, B. J. et al. : Simplified quantification of Pittsburgh compound B amyloid imaging PET studies : A comparative analysis. *J. Nucl. Med.*, **46** : 1959-1972, 2005.
- 10) Mintun, M. A. et al. : [^{11}C] PIB in a nondemented population Potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology*, **67** : 446-452, 2006.
- 11) Engler, H. et al. : Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, **129** : 2856-2866, 2006.
- 12) Clark, C. M. et al. : Imaging amyloid with [^{123}I] IMPY SPECT. *Alzheimer's Dementia*, **2**(3) (Suppl. 2) : S342, 2006.
- 13) Higuchi, M. et al. : 19F and 1H MRI detection of amyloid β plaques *in vivo*. *Nat. Neurosci.*, **8** : 527-533, 2005.
- 14) Hintersteiner, M. et al. : *In vivo* detection of amyloid- β deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat. Biotech.*, **23** : 577-583, 2005.

* * *



プリオン病の分子標的治療

Development of Molecular Target Based-Therapy for Prion Diseases

逆瀬川 裕二* 堂浦 克美*

Yuji Sakasegawa, Katsumi Doh-ura

Abstract

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies, are fatal, neurodegenerative diseases that include Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie in animals. Prion diseases are characterized by the accumulation of a misfolded prion protein, PrP^{Sc}, which is made by a posttranslational conformational change of the host-encoded cellular prion protein, PrP^C. The process of the conformational change remains enigmatic, but a large number of researches on the therapeutic intervention have been done in experimental models over the past 30 years. Against the background of the occurrence of variant CJD in the UK in the 1990s, which is considered to occur by transmission of the BSE agent and to possibly spread through secondary infection via blood transfusion, the research on the development of therapeutic agents has been accelerated using an increasing number of disease models in animals, cells and *in vitro* system. Candidate therapeutic targets for prion diseases include the following four factors: the PrP^C; the PrP^{Sc}; the cellular factors associated with the conversion of PrP^C into PrP^{Sc}; the cellular factors responsible for the neurodegenerative processes. In this article, recent advances in the therapeutic development for prion diseases on the basis of molecular targeting are reviewed, and its future perspectives are discussed.

Key words: prion disease; variant Creutzfeldt-Jacob disease; therapeutics; diagnosis; blood transfusion

はじめに

プリオン病は正式には伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathy: TSE) と呼ばれる海綿状脳症を伴う致死性の進行性神経変性疾患である。発症すると、他の多くの神経変性疾患と同様に脳内に異常蛋白質を蓄積する。この異常蛋白質は人獣共通の感染性を持っており、プリオン病を感染症というだけでなく、生物学的にも常識から外れた特異な疾患としている。ヒトプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) は100万人に1人の割合で発症する稀な病気であるが、1996年に変異型CJDがウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy: BSE) 由来であることが報告されると、社会的にも経済的にも大きなパニックを引き起こした。プリオン病は感

染症だけでなく遺伝病でもあるが、その8割は孤発性で発症原因は現在でも不明である。変異型CJDは、血液を介して二次感染することが報告され、BSEが沈静化してきている現在においても、いまだ脅威の対象となっている。近年になって、プリオンの構造解析や試験管での合成、高感度検出系の開発など、治療法開発のための環境が整いつつあるが、残念ながら、現在もまだ確立された治療法は見出されていない。本稿では、プリオン病の発症に関わる分子とそれを標的としたプリオン病治療薬の現状について解説したい。

I. プリオン病とは

プリオン病はプリオンと呼ばれる感染因子によって発症する、致死性の進行性変性疾患である¹⁾。ヒトプリオン病は、発症原因によって(1)孤発性、(2)遺伝性、(3)感染性

* 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野 (〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1) Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

Table 1 日本におけるヒトプリオン病の分類

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) (70~80%)	
MM1, MV1 (古典型)	ミオクロヌス・PSDあり, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス型, 発症は60歳代, 進行は亜急性
MM2 (皮質型・視床型)	ミオクロヌス・PSDなし, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス型, 発症は60歳代, 進行は緩徐
MV2 (失調型)	ミオクロヌスあり, PSDなし, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス・プラーク型, 発症は60歳代, 進行は緩徐
VV1 (痴呆型)	ミオクロヌス・PSDなし, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス型, 発症は20歳代, 進行は緩徐
VV2 (失調型)	ミオクロヌスあり, PSDなし, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス・プラーク型, 発症は60歳代, 進行は緩徐
遺伝性プリオン病 (10~15%)	
Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群 (GSS)	P102L, P105L, A117V, Y145Stop など, 進行は緩徐, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス・プラーク型
致死性家族性不眠症 (FFI)	D178N (コドン129がメチオニンのときのみ), 進行は亜急性, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス型
家族性CJD	P105T, P150T, D178N, V180I, E200K, V210I, M232R など, 進行は亜急性, PrP ^{Sc} 沈着はシナプス型
感染性プリオン病 (~10%)	
クールー	ニューギニアのフォア族の食人儀式より
医原性CJD	硬膜移植後CJD, 生体由来材料からの感染
変異型CJD (vCJD)	BSE由来, vCJD患者血液からの二次感染

sCJDは, コドン129の多型(メチオニン(M)/バリン(V))と, ウェスタンブロットのバンドパターン(タイプ1とタイプ2)によって, 6種類のサブタイプに分けられる。vCJDはsCJDのバンドパターンが異なり, 区別することができる。PSD: periodic synchronous discharge (脳波における周期性同期性放電)

Table 2 PrP^C と PrP^{Sc} の比較

	PrP ^C	PrP ^{Sc}
正常脳・リンパ組織	+	-
感染脳・リンパ組織	+	+
一次構造・翻訳後修飾	共通	共通
培養細胞内局在	細胞膜(脂質ラフト)	酸性コンパートメント
ホスホイソシトール特異的リパーゼ	感受性	耐性
培養細胞における産生時間 (t _{1/2})	< 1時間	15時間
半減期 (t _{1/2})	3-6時間	>24時間
蛋白質分解酵素抵抗性	感受性	抵抗性
界面活性剤への可溶性	可溶性	不溶性
アミロイド	-	+
高次構造		
α-helix	42%	30%
β-sheet	3%	43%

に分類される(Table 1)。発症原因の詳細については現在もまだ不明であるが, 正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が何らかの原因によってプロテアーゼや高熱に耐性を持つ不溶性の異常感染型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})へと立体構造(コンフォーメーション)が変化することによって起こると考えられている(Table 2)。そのため, 他の多くの神経変性疾患と同じく「コンフォーメーション病」の1つに数えられている。PrP^Cは第20染色体短腕にある

PRNP遺伝子にコードされており, 遺伝性プリオン病を引き起こす45の変異が報告されている²⁾(Fig. 1)。また, PRNPにはコドン129と219に正常多型が認められており, いずれもプリオン病の発症に大きな影響を与えている。例えば, コドン129が, コドン178の変異(D178N)においてメチオニンであれば, 家族性致死性不眠症(familial fatal insomnia: FFI)を, バリンであれば経過の長い遺伝性CJDとなる。また, コドン219にリジン

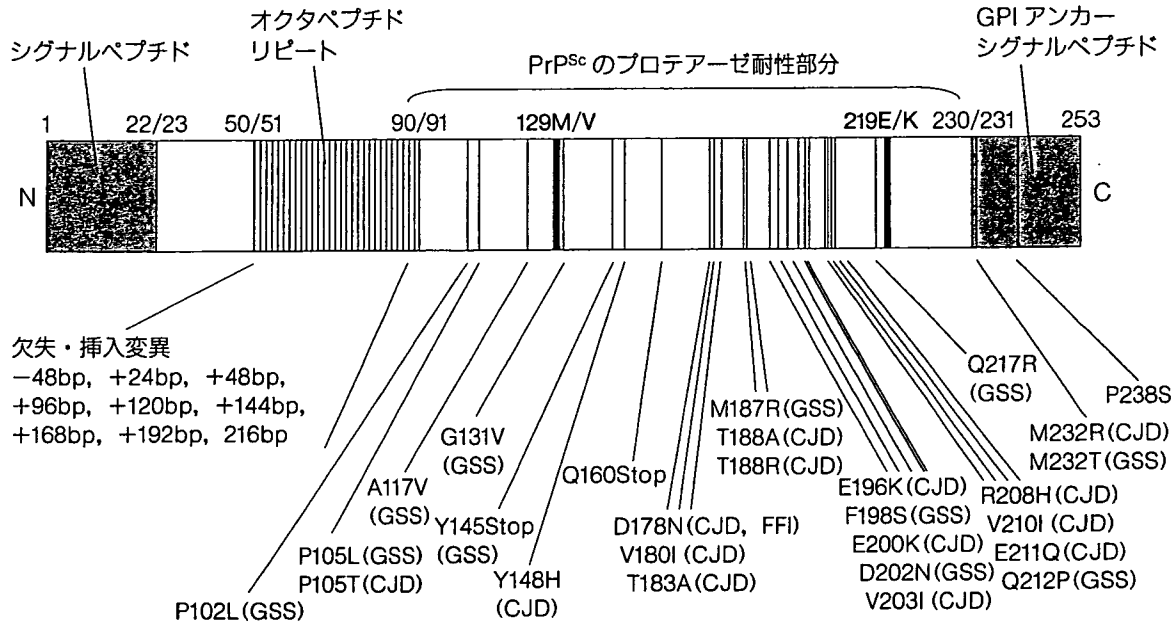


Fig.1 ヒト遺伝型プリオン病に確認された主な変異

現在確認されている主なヒトプリオン病の多型と変異をコドンの番号とアミノ酸のアルファベット表記にて示した。太字は正常多型。D178N はコドン 129 がメチオニンのときは FFI に、バリンのときは経過の長い遺伝型 CJD となる。

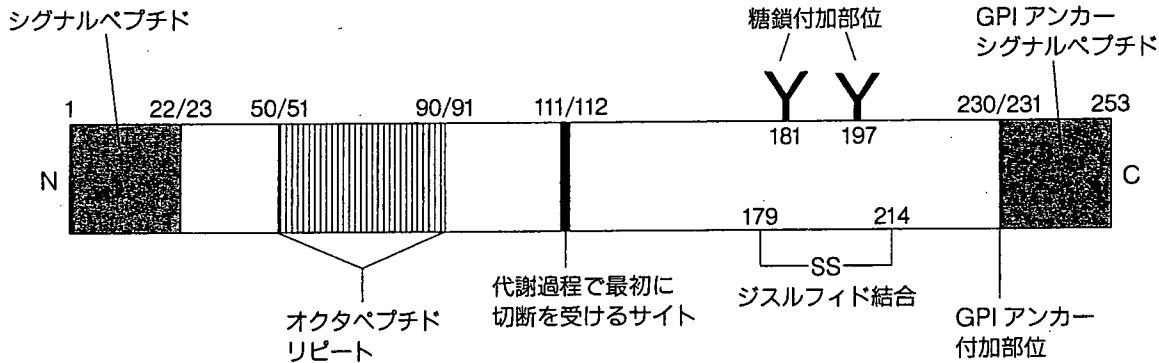


Fig.2 プリオン蛋白質 (PrP^c) の一次構造

ヒトプリオン蛋白質の一次構造を示した。N末とC末のシグナルペプチドは小胞体内腔で切除される。C末側には新たに GPI アンカーが付加され、膜上に係留される。オクタペプチドリPEATの4つのヒスチジン残基 (61 H, 69 H, 77 H, 85 H) とそれに続く2つのヒスチジン残基 (96 H, 111 H) は Cu²⁺ との結合に寄与する。

を持つアレルは、孤発性 CJD の発症を抑制することが知られている (しかしながら、変異型 CJD は抑制されないなど、プリオンの系統 (株; 後述) によって効果が異なるようだ)。

II. PrP^c の細胞内局在と機能

PrP^c は細胞膜, 特に, コレステロールやスフィンゴ脂質に富む細胞膜ドメイン, 脂質ラフトに局在する銅結合性膜蛋白質である。小胞体内腔で合成された後, N末と

C末にある疎水性のシグナルペプチドの切断を受け, さらにC末側には膜に係留されるための糖脂質 glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) アンカーが付加される。1つのジスルフィド結合と2つの糖鎖付加を受けた後, Golgi 体に移行し, さらにシアル酸などの糖鎖の修飾が行われる。糖鎖付加は必ずしも起こるわけではなく, 糖鎖を2個, どちらかに1個, または糖鎖の付加を受けない4種類の分子が存在する (Fig. 2)。不均一な糖鎖の修飾を受けることにより, 見かけ上の分子量は異なっており, 電気泳動によってこれらを分離すると, 付加されて

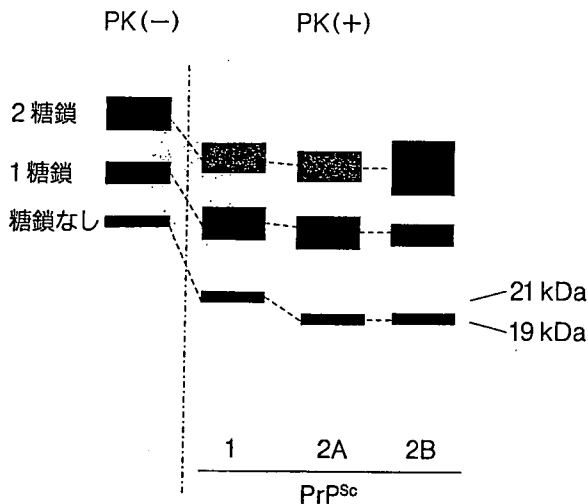


Fig. 3 異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) のウェスタンブロット図

PrP^{Sc}を含む組織をプロテアーゼの1種、プロテイナーゼK (PK)で消化後、電気泳動によって分離後、膜上にブロットし、プリオン抗体で染色した。PK(-)は消化前のサンプルを示し、PK(+)は消化後のサンプルを示す。パターンによってタイプ1とタイプ2に分ける。タイプ2は糖鎖の量比によって、さらにAとBに分けることができる。孤発性CJDはタイプ1とタイプ2Aに分類され、変異型CJDはタイプ2Bのパターンを示す。

いる糖鎖の数によって3つの大きなバンドの塊となって検出される (Fig. 3)。

PrP^Cの機能はいくつか報告されているが、まだコンセンサスが得られていない。ノックアウトマウスを用いた実験から長期記憶、日内・睡眠周期、酸化ストレス作用などが報告されている。また、リンパ細胞の成熟化、銅の代謝、細胞接着、神経突起伸長、シグナル伝達、アポトーシス抑制に関与するとの報告もある。

III. プリオンの複製機構と神経変性

プリオンの複製機構としては、2つのモデルが考えられている。1つはPrP^CとPrP^{Sc}が平衡状態にあり、何らかのきっかけで核を形成するようになると平衡がPrP^{Sc}側に偏り、PrP^{Sc}の重合体へ成長するという「核依存性重合モデル」である。もう1つは上述のモデルとは異なり、PrP^CとPrP^{Sc}は平衡状態にないが、PrP^Cが活性化した状態 (PrP* と呼ばれている) になると、PrP^{Sc}とヘテロダイマーを形成し、PrP^{Sc}へと構造変換するという「ヘテロダイマーモデル」である。後者は、PrP^CからPrP*への活性化に細胞内因子を想定していることが特徴である。試験管の中での反応では、PrP^{Sc}の重合体 (シード) の添加によって、PrP^C→PrP^{Sc}が促進されることを考慮

すると、「核依存性重合モデル」が支持される。一方、変性剤や細胞破碎液などを添加することによってPrP^C→PrP^{Sc}の反応が促進されることを考えると、「ヘテロダイマーモデル」が支持される。いずれの複製機構をとっているのか、あるいは第3の複製機構をとっているのか、現在のところ不明である。

また、最近の研究によってPrP^{Sc}の実像も変わりつつある。(1) PrP^{Sc}の分布や蓄積量とプリオンの感染価が必ずしも一致しない、(2)プロテアーゼ感受性のPrP^{Sc}が存在する、(3)プリオン感染価の最も高い分子種が14~28分子からなるオリゴマーである、(4)試験管内でのプリオン複製には、ソニケーションや蛋白質変性剤で処理するなどPrP^{Sc}アミロイドを不安定にする操作が必要である。以上のような知見から筆者らは、プリオンの実体とは次のようなものと考えている。

プリオンは形成された初期は、プロテアーゼ感受性の不安定な構造をもつオリゴマーであり、時間の経過とともにより安定な、いわゆるプロテアーゼ耐性のPrP^{Sc}に重合する。いったん、プロテアーゼ耐性のPrP^{Sc}になっても、ソニケーションや変性剤の添加により賦活化することができる。酵母プリオンの複製にはHsp104と呼ばれるシャペロン分子が必須であるが³⁾、このシャペロン分子は、まさに上記のようなプリオンの活性化を行っているように思われる。残念ながら、哺乳動物ではHsp104に相当する細胞内因子はみつかっていない。最近、スクレイピーのプリオン株の中で、より複製活性の高い株は、より不安定なアミロイドを形成することが報告された⁴⁾。この結果も上記の考えを支持している。

一方、最近になってPrP^{Sc}自体には細胞毒性が認められないことが報告された。プリオンに脳内感染した後に神経細胞だけにPrP^Cの発現が消失するように作製されたトランスジェニックマウスでは、神経細胞以外ではPrP^{Sc}の複製が引き続き起こっているにもかかわらず、神経細胞ではPrP^{Sc}の産生も起こらず、神経変性も生じないことが報告された⁵⁾。この結果は、プリオン複製にかかわる細胞死は神経細胞特異的であり、PrP^{Sc}単独では細胞死は起こらず、神経に発現するPrP^Cの存在が必須であることを示している。

IV. 治療薬スクリーニング法の開発

治療薬の開発には、その効果を測定する評価系が必要となる。米国カリフォルニア大サンフランシスコ校 (UCSF) の Prusiner 教授のグループは、ハムスターへプリオンを脳内接種することにより、その潜伏期の長さ

よってプリオンの感染価を測定する、バイオアッセイ法を開発した。ハムスターは最短 60 日で発症するため、プリオン研究の迅速化に大きく貢献することとなった。このバイオアッセイは、これまで開発されたプリオン検出系の中で最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。現在では、PrP^Cを過剰発現するトランスジェニックマウスの開発によって、ほぼ同等に潜伏期を短縮することに成功している。加えて、PrP^{Sc}と同じアミノ酸配列を有する PrP^Cを発現するように作製されたトランスジェニックマウスやノックインマウス⁶⁾を用いることによって、種の異なるプリオン感染や多型に関わる感染も再現できるようになった。また、腹腔内にプリオンを接種後、感染初期に PrP^{Sc}の蓄積が認められる脾臓中の PrP^{Sc}の産生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ている。

より短時間で容易にプリオンの増殖を測定するために、プリオン持続感染細胞を用いた実験法も開発されている。培養細胞の破碎液をプロテアーゼによって消化し、プロテアーゼ耐性を持つ PrP^{Sc}のみを電気泳動で分離した後、ウェスタンブロット法によって免疫化学的に検出する方法である (Fig. 3)。また、細胞を直接メンブレン上に移した後、免疫化学的に検出する方法(セルブロット法)⁷⁾も考案されており、より多くの検体を測定できるようになっている。プロテアーゼを用いた上述の方法は、プロテアーゼ感受性の PrP^{Sc}を見逃がすことになり、また、動物を用いたバイオアッセイでの結果と必ずしも一致しないこともあり、一次スクリーニングとして用いられることが多い。また、試験管内での PrP^Cから PrP^{Sc}への変換を測定する方法や、[PSI+]や[URE3]などの酵母プリオンを用いた方法(コロニーの色で感染の識別ができる)が開発され⁸⁾、同様に治療薬スクリーニングに利用されている。最近では、PrP^Cと 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⁹⁾や表面プラズモン共鳴法による PrP^Cとの相互作用を利用したスクリーニング法¹⁰⁾が新たに開発されている。

V. 高感度プリオン検出法の開発

PrP^{Sc}の検出には、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ウェスタンブロット法や ELISA 法が従来使用されてきた。その後、IDEXX 社の HerdCheck BSE Antigen Test Kit

のような PrP^{Sc}に特異性を持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)¹¹⁾などプロテアーゼ処理を用いない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¹²⁾や、DNAの増幅に使われている PCR 法によく似た原理によって、試験管内で PrP^{Sc}を増幅するという検出法(PMCA 法)¹³⁾など、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、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、これまで最も感度のよかったバイオアッセイを凌ぐ感度を有しており、ごく低濃度の PrP^{Sc}の検出などにおいて現在最も高感度の測定法となっている。これまで増幅できるプリオン株が限定されるなどの問題があったが、条件の改善により克服されつつある。反応の自動化も完了しており、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¹⁴⁾と、プリオン病の早期発見への応用が期待されている。

VI. プリオン病の治療法開発のストラテジー

PrP^Cはプリオンの複製だけでなく、神経細胞死すなわち神経変性にも大きく関与しており、治療の着目すべき標的因子となっている。治療法に関わる分子標的としては、現時点で判明している分子は PrP^Cと PrP^{Sc}だけであるが、加えて PrP^Cおよび PrP^{Sc}に働きかける細胞内因子、分解酵素、また、プリオン複製のプロセスで誘導される神経細胞死に関わる因子などが挙げられる (Fig. 4)。以下に治療法のストラテジーと治療薬候補の化合物、薬剤について示す(治療薬候補化合物の詳細については総説を参照のこと¹⁵⁾) (Fig. 5)。

1. PrP^Cの除去

PrP^Cを神経細胞から除去することは、PrP^Cの機能不全によって大きな障害が認められていない現時点において、最も効果的な治療法となる。治療法としては(1) PrP^Cの RNAi などによるノックダウン¹⁶⁾、(2) PrP^Cの分解系の活性化、あるいは(3)プリオン複製の場である脂質ラフト、あるいはその近傍の膜コンパートメントへの移行を阻害すること、などが考えられる。PrP^Cはその代謝過程で分子中央部の切断を受けることが知られているが、切

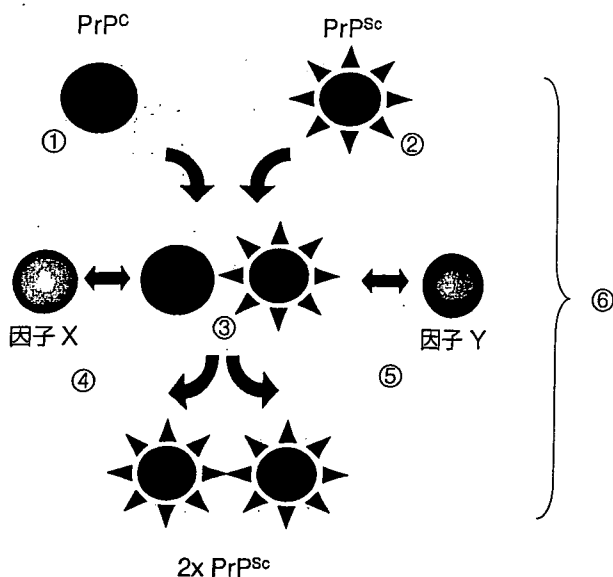


Fig. 4 プリオン病治療薬開発のストラテジー

治療薬開発のストラテジーをヘテロダイマーモデルで示した。① PrP^C の除去、② PrP^{Sc} の除去、③ PrP^C と PrP^{Sc} の相互作用阻害、④ PrP^C の安定化、⑤ PrP^{Sc} の不活性化、⑥ 神経細胞死の抑制。

断を受けた PrP^C 分子はプリオン複製の基質となりえないことが指摘されており、この過程を触媒する酵素も治療薬のターゲットになる¹⁷⁾。寄生虫治療薬スラミン(Suramin)は PrP^C の変性を促し、細胞膜上への移行を阻害するが、感染細胞を用いた実験にてスラミンが PrP^{Sc} の産生を抑制することが報告されている¹⁸⁾。

2. PrP^{Sc} の除去

PrP^{Sc} の分解はマウス脳では>24時間の半減期で起こっており、この過程に関わる分子については不明であるが、この分解系の活性化によって PrP^{Sc} の除去ができる可能性がある¹⁹⁾。

3. PrP^C と PrP^{Sc} の相互作用阻害

プリオン蛋白質に対する抗体は PrP^C あるいは PrP^{Sc} へと結合することによって、プリオン複製を阻害していると考えられている¹⁹⁾。アミロイド結合性の化合物も同様の阻害様式を持っていると期待されており、筆者らのグループでもアミロイド・イメージングに使用される化合物が、非常に低濃度で PrP^{Sc} 産生を阻害することを報告している²⁰⁾(Fig. 6)。

4. PrP^C の構造安定化

PrP^C の構造の不安定化はプリオン複製を促進する可能性があるが、PrP^C の不安定化を促進するような細胞

内分子は、まだみつかっていない。PrP^C のコドン 219 にリジン残基を持つ PrP^C は、ドミナントネガティブにプリオン産生を抑制することが知られており²¹⁾、この分子の標的がそのような細胞内因子と推定されている。一方、試験管内のプリオン複製実験によって、RNA 分子など(ポリ A など)のマイナスチャージを持つ分子が促進することが報告されている²²⁾。一方、PrP^C の安定化を促進するような薬剤は治療薬候補となる。岐阜大の桑田らのグループでは、そのような薬剤をコンピュータを用いた *in silico* スクリーニングで探索し、治療薬リード化合物をみつけ出すことに成功している。また、ポルフィリンなどのテトラピロール系の化合物は、PrP^C の分子中央部の疎水性ドメインに結合し、培養感染細胞を用いた実験でプリオン複製を抑制することが報告されている²³⁾。

5. PrP^{Sc} の不活性化

グリコサミノグリカン (GAG) の1つであるヘパラン硫酸は、PrP^{Sc} を含む沈着物中に見出され、PrP^C とも結合することが報告されている。ヘパラン硫酸などの GAG はウロン酸とアミノ糖の2糖の繰り返しからなる高分子多糖であるが、よく似た構造を持つペントサンポリサルフェート (PPS)²⁴⁾ やコンゴレッド (CR)²⁵⁾ は、培養細胞で PrP^{Sc} の産生を阻害し、特に前者は、動物で生命予後を改善することが報告されている。これらの高分子多糖は、アミロイド結合性を示すことでも知られる。アミロイドとの結合が知られているヨードドキシソルピシン (Iododoxorubicin: IDOX)²⁶⁾ や、その構造類似体であるテトラサイクリン (Tetracycline)²⁷⁾ も培養細胞で変異型プリオン蛋白質の凝集を抑制することが報告されている。なお、CR、IDOX、テトラサイクリンなどは、疎水性のコアと親水性の置換基を持っており、アミロイドだけでなく、アミロイド形成能を持ち細胞毒性を示すことが知られている PrP^C の部分ペプチド 106-126 とも相互作用し、このペプチドのアミロイド化を抑制することが報告されている。また、アミロイドなどのβシート構造を破壊する合成ペプチド²⁸⁾ は、培養細胞などの実験で変異型プリオン蛋白質の凝集を阻害することが報告されている。また、酵母細胞におけるプリオンの複製を促進する Hsp104 のようなシャペロン分子は、哺乳細胞ではみつかっていないが、もし、そのような分子が存在すれば有効な治療薬の分子標的となるであろう。

6. 神経細胞死の抑制

プリオン複製に伴う細胞死は、神経細胞特異的である。プリオンの複製は阻止できなくとも、神経細胞死を抑制

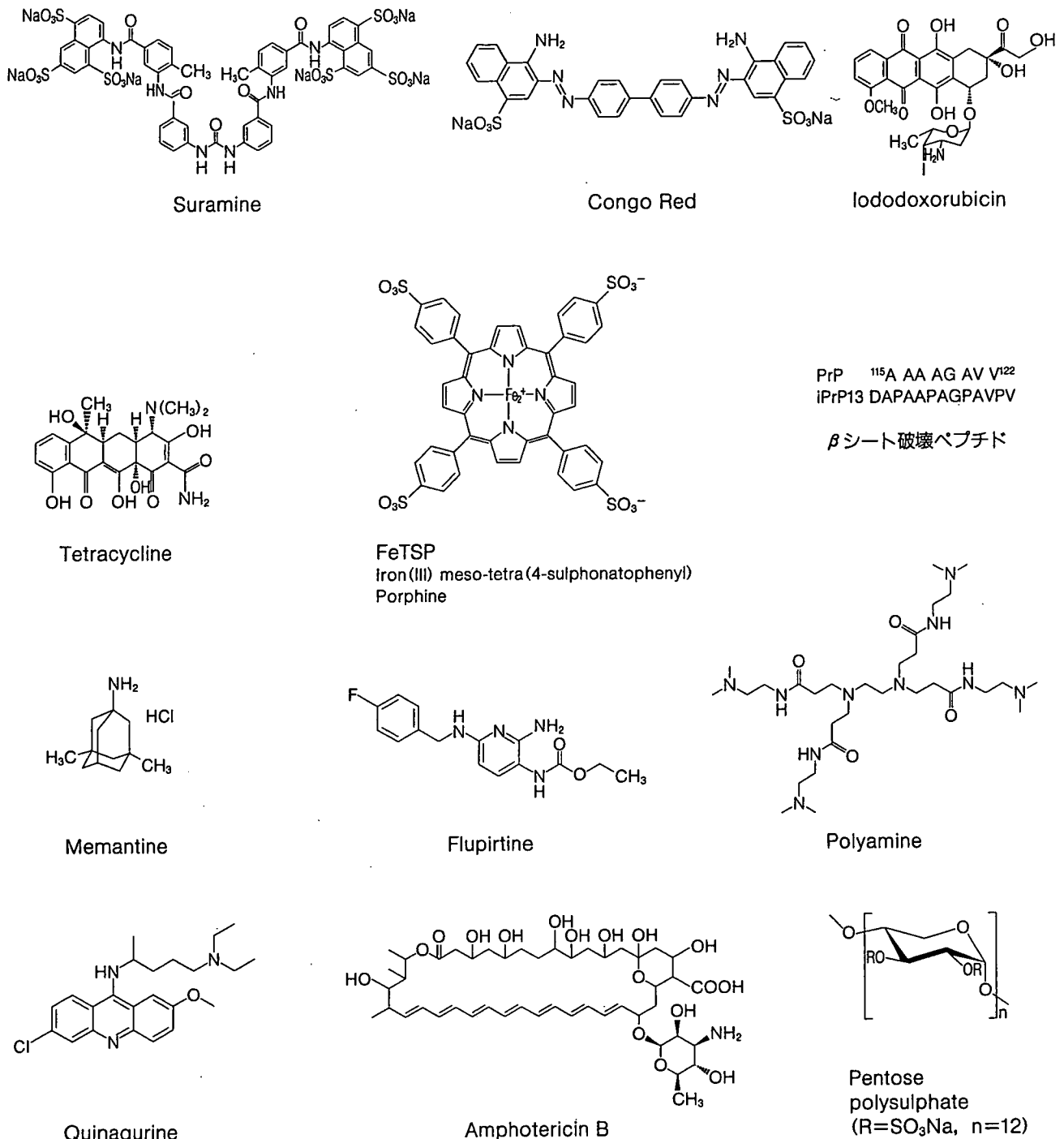


Fig. 5 さまざまなプリオン病治療候補化合物

することができれば、プリオン病の発症は抑えられることになる。NMDA 受容体拮抗薬メマンチン (Memantine)²⁹⁾ や中枢性鎮痛薬フルピルチン (Flupirtine)³⁰⁾ はアポトーシス抑制剤として治療薬としてすでに臨床試験されている。フルピルチンについては、CJD 患者 28 名について二重盲検試験として臨床試験が行われた。その結果、認知機能の低下を有意に抑制したもの

の、CJD の進行は抑制できないことが報告された。

7. その他

既知の抗生剤や抗精神病薬のスクリーニングなどから偶然みつかった薬剤がある。抗マalaria薬からキナクリン³¹⁾ などの 3 環系化合物、抗ウイルス薬からはアンフォテリシン B (Amphotericin B) などのポリエーテル系抗生物

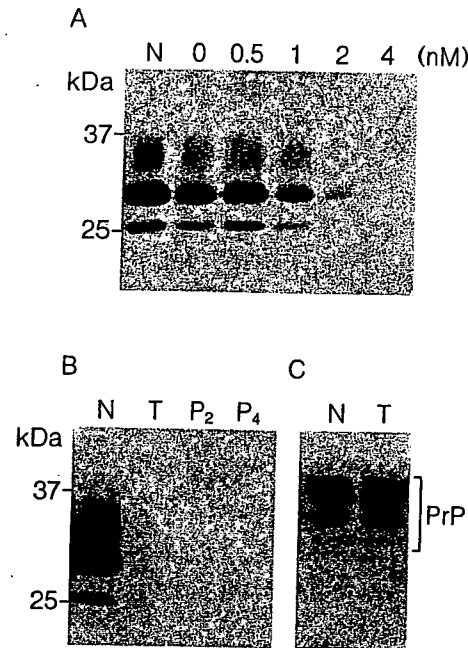


Fig. 6 スチリルベンゾール誘導体の PrP^{Sc} 産生抑制効果

A: プリオン感染培養細胞をスチリルベンゾール誘導体の1つ BF-168 で処理した。BF-168 は IC₅₀ = 0.4 nM というごく低濃度で PrP^{Sc} の産生を抑制する。B: 10 nM BF-168 で処理した後、薬剤を除いて培養を続けたが、4回継代しても PrP^{Sc} の産生は認められない (P₂ は2回継代, P₄ は4回継代を示す)。C: 10 nM BF-168 で非感染細胞を処理しても PrP^{Sc} の発現には影響しない。

質³²、培養細胞実験に使用されるトランスフェクション試薬からはポリアミン化合物³³が見出されている。

キナクリン (Quinacrine) や⑤のペントサンポリサルフェート (Pentosan polysulfate: PPS) については、欧米に先駆けてわが国で臨床試験が行われている。キナクリンは福岡大学にて臨床試験が行われた³⁴。一時的な症状の改善が認められたものの、効果が一過性であり、肝臓障害などの重篤な副作用のため、より毒性の低い塩酸キニーネに変更して投薬が続けられたが、効果を維持することには成功していない。ペントサンポリサルフェートについても福岡大学にて臨床試験が行われている。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た。脳の萎縮の進行は止まらないものの、一部の症例では臨床症状は落ち着いており、効果と安全性について現在も評価が続けられている。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25例の患者に実施されており、現在期待されている治療法のひと

つと言える³⁵。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、また免疫応答が認められないため、発症直前まで感染の有無を知ることができない。加えて、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波及を抑えることは、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。また、医原性プリオン病や遺伝性プリオン病など、将来発症する可能性のある場合に予防的な投与は有効であると思われるが、いつ発病するかわからない病気に対して長期の投薬は、使われる薬の安全性を考えると実際的ではない。いったん発症してからの治療では、現時点では、それを抑える治療薬は見出されておらず、そのためにも発症前に治療を開始することが必須であり、発症前診断法の開発が急務である。

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に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検索や、検出法の開発が求められている。高感度 ELISA 法やプロテアーゼ処理をしない ELISA 法など、これまで検出できなかったプリオンを検出できる下地が整ってきた。特に、PMCA 法は、血液や尿中の PrP^{Sc} を検出できるとの報告があり、感染初期あるいは発症初期における有効な検出ツールになるに違いない。今後の研究の進展によっては、プリオン複製と神経細胞死を分離し、感染はしても発症しないようにできる可能性もある。治療薬の研究開発とともに、プリオンの複製メカニズムや神経細胞死のメカニズムもいずれ明らかになり、治療法開発が加速するものと思われる。

文献

- 1) Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982
- 2) 山田正仁: Prion 蛋白遺伝子と臨床症状. *神経内科* 57: 398-407, 2002
- 3) Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Lieberman SW: Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* 268: 880-884, 1995
- 4) Eiden M, Palm GJ, Hinrichs W, Matthey U, Groschup MH, et al: Synergistic and strain-specific effects of

- bovine spongiform encephalopathy and scrapie prions in the cell-free conversion of recombinant prion protein. *J Gen Virol* 87: 3753-3761, 2006
- 5) Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klöhn PC, Collinge J, et al: Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871-874, 2003
 - 6) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Shin RW, 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
 - 7) Klöhn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C: A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11666-11671, 2003
 - 8) Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond JM, Blondel M, et al: Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nature Biotechnology* 21: 1075-1081, 2003
 - 9) Bertsch U, Winklhofer KF, Hirschberger T, Bieschke J, Giese A, 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
 - 10) Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 29: 927-932, 2006
 - 11) Bellon A, Seyfert-Brandt W, Lang W, Baron H, Vey M, et al: Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J Gen Virol* 84: 1921-1925, 2003
 - 12) Gustiananda M, Liggins JR, Cummins PL, Gready JE: Conformation of prion protein repeat peptides probed by FRET measurements and molecular dynamics simulations. *Biophys J* 86: 2467-2483, 2004
 - 13) Saborio GP, Permanne B, Soto C: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813, 2001
 - 14) Castilla J, Saá P, Soto C: Detection of prions in blood. *Nat Med* 11: 982-985, 2005
 - 15) Trevitt CR, Collinge J: A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* 129: 2241-2265, 2006
 - 16) Kong Q: NAI: a novel strategy for the treatment of prion diseases. *J Clin Invest* 116: 3101-3103, 2006
 - 17) Hachiya NS, Imagawa M, Kaneko K: The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Med Hypotheses* 68: 670-673, 2007
 - 18) Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Schätzl HM, et al: Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* 20: 3957-3966, 2001
 - 19) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Prusiner SB, et al: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412: 739-743, 2001
 - 20) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Doh-ura K, et al: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* 99: 198-205, 2006
 - 21) Perrier V, Wallace AC, Kaneko K, Safar J, Cohen FE, et al: Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6073-6078, 2000
 - 22) Deleault NR, Geoghegan JC, Nishina K, Kascsak R, Supattapone S, et al: Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* 280: 26873-26879, 2005
 - 23) Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B: Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12117-12122, 1998
 - 24) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Iwaki T, et al: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78: 4999-5006, 2004
 - 25) Caughey B, Race RE: Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem* 59: 768-771, 1992
 - 26) Tagliavini F, McArthur RA, Canciani B, Giaccone G, Post C, et al: Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* 276: 1119-1122, 1997
 - 27) Forloni G, Iussich S, Awan T, Colombo L, Tagliavini F, et al: Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10849-10854, 2002
 - 28) De Gioia L, Selvaggini C, Ghibaudi E, Diomedea L, Salmons M, et al: Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J Biol Chem* 269: 7859-7862, 1994
 - 29) Müller WE, Ushijima H, Schröder HC, Forrest JM, Heffner-Lauc M, et al: Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 246: 261-267, 1993
 - 30) Otto M, Cepek L, Ratzka P, Doehlinger S, Prange H, et al: Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. *Neurology*

- 62: 714-718, 2004
- 31) 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
- 32) Demaimay R, Adjou KT, Beringue V, Demart S, Dormont D, et al: Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol* 71: 9685-9689, 1997
- 33) Supattapone S, Wille H, Uyechi L, Safar J, Scott MR, et al: Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 75: 3453-3461, 2001
- 34) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士: 厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学研究事業即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究—平成15年度総括研究報告書(主任研究者: 堂浦克美). 11-22, 2004
- 35) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, Rainov NG, et al: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect* 50: 394-396, 2005

— <お知らせ> —

第31回 関東臨床神経生理研究会

<テーマ MRI検査の最前線—拡散テンソル画像>

日時 2007年5月26日(土)14:00~17:30
 会場 東京医科歯科大学 医歯学総合研究棟
 (最寄駅: JR線, 東京メトロ丸の内線「御茶ノ水駅」, 東京メトロ千代田線「新御茶ノ水駅」)
 会費 2,000円(会場整理費・通信連絡費)
 担当世話人 宇川義一(東京大学), 黒岩義之(横浜市立大学), 松浦雅人(東京医科歯科大学)

プログラム

A. 基礎編

- | | |
|--------------------------------|------------|
| 1) 初心者のためのMRI検査の基礎 | 松田哲也(玉川大学) |
| 2) Diffusion Tensor Imagingの基礎 | 増谷佳孝(東京大学) |

B. 応用編

- | | |
|--------------------------|-----------------|
| 3) 線条体と大脳皮質の連絡—猿とヒトとの対応— | 林拓也(国立循環器病センター) |
| 4) 脳外科疾患への応用 | 鎌田恭輔(東京大学) |
| 5) 拡散テンソル画像の神経変性疾患への臨床応用 | 渡辺宏久(名古屋大学) |

※ 事前登録はありません。当日直接会場にお越し下さい。

連絡先 関東臨床神経生理研究会事務局
 東京医科歯科大学大学院生命機能情報解析学分野内
 事務局担当 清水 E-mail: masa.mtec@tmd.ac.jp
 Tel: 03-5803-5372 Fax: 03-5803-0165

プリオン病への治療アプローチ

堂浦 克美

神経治療学 第24巻 第6号 別刷

平成19年11月25日発行

Reprinted from Neurological Therapeutics, Vol. 24, No. 6, p. 647-650, November 2007

プリオン病への治療アプローチ*

堂浦 克美**

Key Words : prion disease, therapy, pentosan polysulphate, amyloidophilic chemical, prion imaging

変異型プリオン病や医原性プリオン病（下垂体ホルモン製剤やヒト乾燥硬膜の使用による）が若年者で多発し、プリオン病の治療開発への関心が高まっている。しかしながら、患者および発症リスクキャリアーの数は製薬企業に創薬への関心を抱かせるほど多くはなく、プリオン病の治療開発は医者や医学・薬学研究者に委ねられている。

プリオン病は、蛋白質性感染因子であるプリオンが原因で起こる病気であり、プリオンの本体は異常型プリオン蛋白である。この蛋白は難溶性で凝集体を形成し、脳に沈着する。プリオン病治療の標的は、この異常型プリオン蛋白の産生を抑制すること、異常型プリオン蛋白の分解を促進すること、異常型プリオン蛋白による神経変性を抑えることである（Fig. 1）。細菌やウイルスなどの通常病原因子と異なり核酸を持たないプリオンがどのように増殖複製するのか、その機序解明はいまだにプリオン病研究の中で最も魅力的な研究テーマの一つであるため、異常型プリオン蛋白の産生阻害メカニズムに関する研究や阻害化合物の探索研究は活発に展開されている。この領域においては、遺伝子治療や再生医療などを見据えた基礎研究も進められているが、これまでにインビボ実験で目を見張るような成果は得られていない。一

方、阻害化合物を基にした創薬研究も活発に進められ、インビボ実験でも有効なものが発見されるようになってきているが、ヒトへの応用にはなお5年、10年といった時間を要する段階にある。

これらの治療法開発研究や創薬研究と並行して、即戦的な治療薬探索研究も行われている。これは、他の疾患の治療に使われている医薬品の中からプリオン病治療に応用できるものを探索するものである。これまでにマalariaの治療薬であるquinacrineやquinine^{1,2)}、非麻薬性鎮痛剤であるflupirtine³⁾、間質性膀胱炎や静脈炎の治療薬であるpentosan polysulphate⁴⁾、抗生物質であるdoxycycline⁵⁾、高脂血症の治療薬であるsimvastatin⁶⁾などに治療効果が観察されている。Quinacrine, quinine, pentosan polysulphate, simvastatinは異常型プリオン蛋白の産生抑制に、doxycyclineは異常型プリオン蛋白の分解促進に、flupirtine, simvastatinは神経変性抑制に働いている。Quinacrine, quinine, flupirtineはすでに患者で実験的治療が実施されて、効果と安全性についての評価が行われた。Quinacrineやquinineは、一過性の脳機能改善効果が患者で観察されたが、肝障害などの副作用が高率に発生したため、現在のところ積極的には患者への投与は行われていな

* Therapeutic Approaches to Prion Diseases.

** 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野 Katsumi DOH-URA : Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine

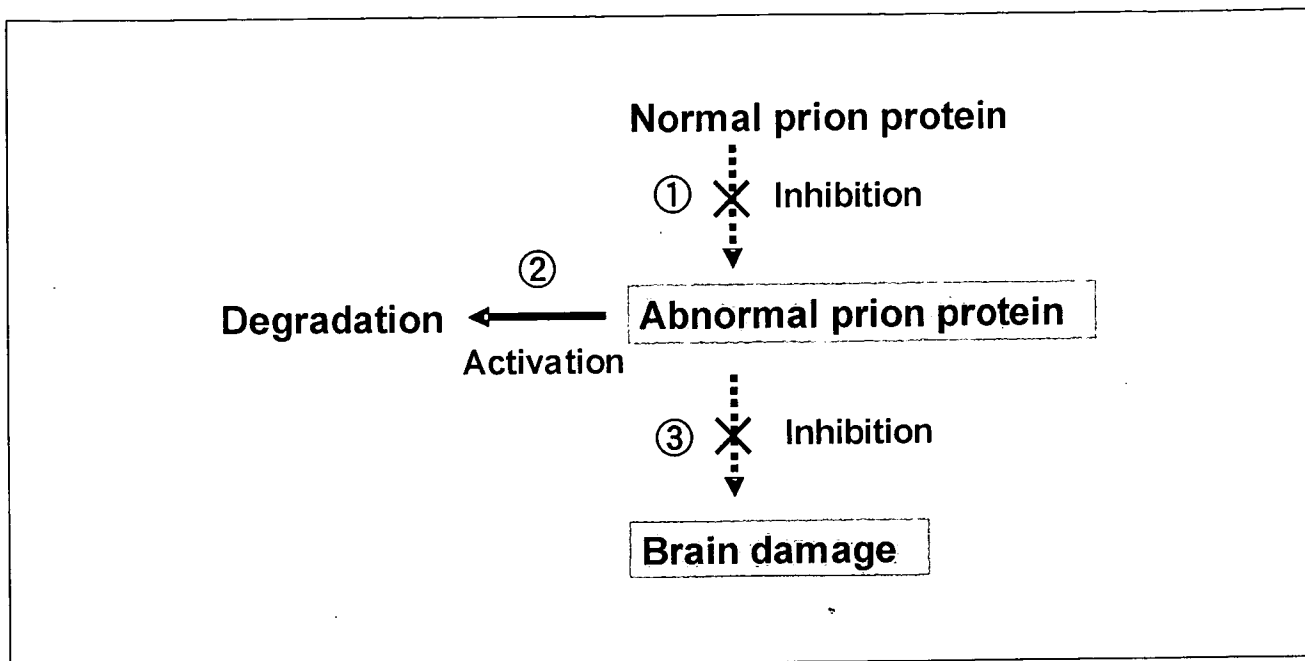


Fig. 1 Potential drug targets for the treatment of prion diseases

Inhibition of abnormal prion protein synthesis (①), activation of abnormal prion protein degradation (②), and inhibition of brain damage caused by abnormal prion protein (③) are potential drug targets.

い⁷⁾. Flupirtineは、患者の認知機能障害の改善に有効であるが、生命予後を改善する効果はないことが明らかとなっている⁸⁾. 一方、doxycyclineやsimvastatinは、イタリアとドイツで患者への実験的治療が始まっており、国内においても、これらの医薬品を使った実験的治療の準備が進められている。Pentosan polysulphateは英国、フランス、米国、日本の患者で実験的治療が実施されているところであり、次に記載するように効果と安全性について評価が行われている。

Pentosan polysulphateの脳室内持続投与は、我々がその優れた治療効果を動物実験で発見し安全性を確認した実験的治療法である⁴⁾. この治療法はこれまでに25例のプリオン病患者で実施されている。亜急性に進行するプリオン病では効果はなく、変異型ヤコブ病のように緩徐進行型プリオン病の若年発症者で延命効果が期待されるが、病気の進行を完全に止めてしまう程の治療効果は得られていない^{9, 10)}. また、長期治療中に硬膜下水腫を合併する症例が比較的多く、その原因は不明である。日本では、緩徐に進行する病型のプリオン病患者において、効果と安全性の評価が続けられている。Pentosan polysulphate療法は脳神経外科手術を必要とする侵襲的な治療法であり、

脳室カテーテルや持続注入ポンプの留置手術を必要とする点だけでなく、pentosan polysulphateの脳室から脳実質内への拡散が効率的でない点、pentosan polysulphateが弱い抗凝血作用を持っている点などが弱点となっている。末梢投与で本治療法の効果を凌ぐ治療薬の開発が必要である。

一方、我々はアミロイド親和性化合物が抗プリオン活性を持っていることをこれまで報告してきた^{11, 12)}. アミロイド親和性化合物はAlzheimer病の新規画像診断薬（アミロイド・イメージングプローブ）として最近盛んに開発されている¹³⁾. 脳移行性に優れたアミロイド・イメージング化合物は、プリオン感染動物の末梢静脈内に投与した場合には脳内のプリオン・アミロイドを描出できるだけでなく、生命予後改善効果を発揮する。我々が最近発見したアミロイド親和性化合物は、経口投与でも良好な脳移行を示し、プリオン感染マウスにおいて優れた生命予後改善効果を発揮するものである¹⁴⁾. この化合物は、プリオン感染マウスで治療効果を発揮するだけでなく、Alzheimer病モデルマウスにおいても老人斑沈着を抑制するなどの治療効果を発揮し、脳内にアミロイド沈着を起こす疾患の治療に有効と考えられる。このアミロイド親和性化合物をヒトに応用するには安全性

や治療効果を上げるために物性を改良する必要があり、創薬のプロである製薬企業の協力なしには実用化は困難である。市場性のないプリオン病治療薬開発に製薬企業を巻き込むためには、市場性のある疾患の治療薬開発とリンクさせることが一つの手段と考えられ、アミロイド親和性化合物がその一例として期待される。

動物実験では感染の極早期から治療を開始すれば、より一層の生命予後改善効果が観察されることより、早期診断（特に発症前診断）開発は治療開発とともにプリオン病を克服する上で必要不可欠である。また、病勢や治療効果を評価するための手段の開発も必要不可欠である。これまでは、罹病期間が治療効果の評価指標として一般的に使われてきたが、罹病期間は発症年齢、性別、病型、看護・介護、延命治療などにより影響を受けるため良い指標とは言えない。患者の脳内のプリオンを直接測定することが出来ないことや、早期診断・病勢診断の指標となる良い代理マーカーがないことが問題である。我々は、患者の脳内に蓄積した異常プリオン蛋白をアミロイド親和性化合物をプローブとしてPET（ポジトロン・エミッション・トモグラフィ）で画像化できないか検討を開始した。脳内に蓄積した異常プリオン蛋白量をイメージングで測定できれば、信頼性の高い早期診断・病勢診断や治療効果の評価が可能となる。

文 献

- 1) 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
- 2) Murakami-Kubo I, Doh-Ura K, Ishikawa K et al : Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78 : 1281-1288, 2004
- 3) Schroder HC, Muller WE : Neuroprotective effect of flupirtine in prion disease. *Drugs Today* 38 : 49-58, 2002
- 4) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I et al : Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78 : 4999-5006, 2004
- 5) Forloni G, Iussich S, Awan T et al : Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 10849-10854, 2002
- 6) Mok SW, Thelen KM, Riemer C et al : Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 348 : 697-702, 2006
- 7) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士ほか : クロイツフェルト・ヤコブ病患者における抗マalaria薬, キナクリン, キニーネ治療の効果と副作用に関する研究. 厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）「即戦略的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究」（主任研究者 堂浦克美）平成15年度総括研究報告書, p11-22, 平成16年4月
- 8) Otto M, Cepek L, Ratzka P et al : Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD : A double-blind study. *Neurology* 62 : 714-718, 2004
- 9) Parry A, Baker I, Stacey R et al : Long term survival in a patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease treated with intraventricular pentosan polysulphate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78 : 733-734, 2007
- 10) Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P et al : Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies : is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther* 7 : 713-726, 2007
- 11) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y et al : Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* 85 : 1785-1790, 2004
- 12) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N et al : Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* 99 : 198-205, 2006
- 13) Furumoto S, Okamura N, Iwata R et al : Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Curr Top Med Chem* 7 : 1773-1789, 2007
- 14) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ et al : Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81 : 12889-12898, 2007

Therapeutic Approaches to Prion Diseases

Katsumi DOH-URA

Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine

Recent outbreaks of variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and iatrogenic CJD through the use of cadaveric growth hormone or dural grafts in younger people have been greatly concerned in many countries and have necessitated the development of suitable therapies.

Long-term cerebroventricular administration of pentosan polysulphate (PPS), a clinical approach based on our preclinical study in rodent models of prion diseases, has been carried out in 25 patients with various types of prion diseases. Although its therapeutic efficacy remains to be confirmed, preliminary clinical experience indicates extended survival in some young patients with slow progressing disease. This treatment, however, does not seem to produce obvious clinical improvement in rapidly progressive disease. Further prospective investigation of PPS administration is necessary to obtain high-quality evidence of its clinical benefits.

Our previous studies showed that amyloidophilic chemicals are effective as anti-prion chemicals when administered intravenously. Recently a new orally available amyloidophilic chemical has been developed, which possesses satisfactory permeability in the brain and which is remarkably effective in prolonging the incubation times of intracerebrally infected animals. The findings are encouraging, but further improvement of the pharmacokinetic properties and safety profiles are necessary before clinical application can be considered.

In parallel with development of therapeutics, diagnostic tools to detect abnormal prion protein deposition in the patients need to be developed. Positron emission tomography with amyloidophilic chemical probes might be expected as one of the tools and be useful for not only making earlier a diagnosis but also evaluating disease progression.

日本臨牀 第65巻・第8号（平成19年8月号）別刷

特集：プリオン病と遅発性ウイルス感染症

プリオン病の診断支援・治療への試み

逆瀬川裕二 堂浦克美