

# 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

Recent advances in the diagnosis and the therapeutics for human prion diseases

Yuji Sakasegawa, Katsumi Doh-ura

Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine

## Abstract

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies, are fatal, neurodegenerative disorders associated with the accumulation of a misfolded infectious prion protein which is made by a posttranslational conformational change of the host-encoded cellular prion protein. A large number of studies to reveal the pathogenesis of prion diseases have been done using such experimental models as animals, cell cultures and cell-free systems over the past 30 years. The prion pathogenesis is still enigmatic, but current explosion of the knowledge about prion biology has led to the discovery of either more reliable diagnostic measurements or more beneficial therapeutic candidates. Here, the recent advances are reviewed in the diagnostics and the therapeutics for prion diseases.

**Key words:** prion disease, diagnosis, therapeutics

## はじめに

プリオン病は、プリオンと呼ばれる蛋白性の感染体によって引き起こされる伝播性の海綿状脳症である。罹患率は年間100万人に1人と比較的まれな疾患であるが、1996年に新たに見つかった変異型クロイツフェルト-ヤコブ病(変異型CJD)がウシ海綿状脳症からの感染によるものであり、トリインフルエンザなどの人獣共通の感染症と同じく大きな社会問題となっている。現在、変異型CJDの発生は減少方向に向かっていると考えられているが、血液や手術器具などからの2次感染による拡大の恐れもあり、なお引き続き注意が必要である。プリオン病は発症前に診断することが難しく、発症後は急速

に病状が進行することもあり、現在においても確立された治療法は見いだされていない。しかし、動物実験では早い時期に治療的介入を開始すれば治療効果が期待できることが明らかになっており、治療法とともに早期診断法の開発は重要な課題となっている。

本稿では、最近のプリオン病の早期診断と治療法の開発の現状について解説する。

## 1. ヒトプリオン病と発症メカニズム

ヒトプリオン病は、大きく孤発性、遺伝性、感染性に分類され<sup>1)</sup>、更にプリオン蛋白質の遺伝子型と異常感染型プリオン蛋白質の生化学的特徴によって細かく分類されている(表1)。正常型ヒトプリオン蛋白質をコードする遺伝子

表 1 ヒトプリオン病

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, 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, 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, プリオン斑, 発症は 60 歳代, 進行は緩徐
VV1 (痴呆型)	ミオクロヌス・PSD なし, 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, プリオン斑, 発症は 60 歳代, 進行は緩徐
遺伝性プリオン病 (10-15%)	
ゲルストマン・ストロイスラー シャインカー症候群 (GSS)	P102L, P105L, A117V, Y145Stop など, 進行は緩徐, プリオン斑
致死性家族性不眠症 (FFI)	D178N (コドン 129 がメチオニン), 進行は亜急性
家族性 CJD	P105T, P150T, D178N (コドン 129 がバリオン), V180I, E200K, V210I, M232R など, 進行は亜急性
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, プリオン斑
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, プリオン斑

sCJD は, コドン 129 の多型 (メチオニン (M)/バリオン (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。

(PRNP) には, 129 番と 219 番アミノ酸の正常多型とともに, 55 の点変異や挿入・欠失変異が報告されている<sup>1)</sup>。129 番アミノ酸の多型は, プリオン病の病態に大きな影響を与えており, 例えば 178 番アミノ酸の点変異では 129 番アミノ酸がメチオニンであるアレルをもつ場合は致死性家族性不眠症 (FFI) となり, バリオンをもつ場合は経過の長い CJD となる。

プリオン病の発症メカニズムの詳細についてはよくわかっていないが, これまでの研究によって次のように考えられている<sup>1)</sup>。我々の身体には正常型プリオン蛋白質が脳, 神経を中心として全身に広く発現している。正常型プリオン蛋白質は銅結合能をもつ細胞膜結合型糖蛋白質であるが, その生理機能はよくわかっていない<sup>1)</sup>。孤発性プリオン病や家族性プリオン病では, 正常型プリオン蛋白質が何らかの原因で高次構造の異なる異常感染型へと変化することによって引き起こされる。プリオン蛋白質に認められる変異や多型はこの高次構造変化に影響を与えていると考えられる。異常感染型プリオン蛋白質は, 周りの正常型プリオン蛋白質を異常型へと変化させながら増殖する。末梢で産生された異常感染型プリオン蛋白質も最終的には中

枢神経系へと移動し, 脳内での神経細胞死を誘発する。しかし, 異常感染型プリオン蛋白質そのものは神経細胞死を起こさないことが指摘されており<sup>2)</sup>, 正常型から異常感染型への構造変化の過程で, 神経細胞死が誘導されると考えられる。

我が国におけるヒトプリオン病の 7 割は孤発性 CJD であり, その典型例 (MM1 や MV1) に関しては, 特徴的な臨床症状とその急速な症状の悪化から比較的容易に診断することができる。一方, 経過が緩徐で, 不眠や自律神経障害などの認知機能障害以外の症状で発症するサブタイプ (MM1 と MV1 の一部や MM2, MV2, VV2, VV1) は, 典型例の診断に有効な脳波 PSD (周期性同期性放電) や, MRI などの画像診断, 髄液 14-3-3 蛋白質やタウ蛋白質などの生化学マーカーに異常が認められないなど, 診断を下すことが難しい場合が多い。また, プリオン病の病態や分類に多型が大きな影響を与える点や, 同一の PRNP 遺伝子変異を有する家族性プリオン病症例であっても臨床的表現型が必ずしも一定でなく, 症例によってはばらつきがみられ診断しにくい点を考慮すると, プリオン病の診断において遺伝子検査は必須と考えられる。

### a. 画像診断

近年、様々な画像診断法が提案されているが<sup>3)</sup>、なかでもMRI拡散強調画像は早期診断への利用が期待されている。孤発性CJDの典型例や変異型CJDにおいては感度、特異度ともに優れており<sup>4)</sup>、現在において最も有力な早期診断法と考えられている。現在、厚生労働省‘プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班’では、拡散強調画像解析の標準化を検討しており、今後は異なる施設で得られた画像データを同一基準で比較検討することが可能となり、診断精度の向上に寄与することが期待される。

### b. 生化学的マーカー

プリオン病の生化学的マーカーとして、髄液中の14-3-3蛋白質、タウ蛋白質(総タウ蛋白質)、神経細胞特異的エノラーゼ(NSE)などが有効であるとの報告がなされている。なかでも14-3-3蛋白質はWHOの診断基準にも採用され、最もよく使われているプリオン病の生化学的マーカーである。しかし、感度・特異度は当初報告されたほど高くはなく、非典型例や緩徐進行例で検出されにくい、他の神経変性疾患と鑑別しなければならないなど、幾つか問題点が指摘されている。髄液中総タウ蛋白質は、14-3-3蛋白質より感度・特異度ともに優れているとの報告があり<sup>5)</sup>、今後の研究展開が期待される。

プリオン感染後に変動を示す他の生化学マーカーや遺伝子発現については、細胞や動物モデルを用いて精力的に研究されているが、現在まだ有効なものは見いだされていない。最も確実なプリオン病の生化学的マーカーは異常感染型プリオン蛋白質の検出であり、剖検脳における確定診断に利用されている。変異型CJDでは、口蓋扁桃の生検が有効であることが報告されている。これまで異常感染型プリオン蛋白質の検出には、プロテアーゼ耐性を示すコア部分を免疫学的な手法によって検出する方法(ELISA法やウェスタンブロット法)が用いられてきたが、尿や血液中の微量の異常感染型プリオン蛋白質の検出には成功していない。最も感度の高いア

ッセイ法は、動物を用いたバイオアッセイであるが、時間やコストの面で実用化には難がある。米国テキサス大学のSotoらのグループがそれに匹敵あるいは凌駕する検出法を開発した。これは、脳ホモジネートとソニケーションを利用して異常感染型プリオン蛋白質を増幅する方法(protein misfolding cyclic amplification: PMCA)であり、ごく微量の異常感染型プリオン蛋白質を数日から10数日で検出レベルまで増幅可能である<sup>6)</sup>。増幅の自動化も完了しており、血液や尿中の微量の異常感染型プリオン蛋白質の検出にも成功したことが最近報告された<sup>7)</sup>。これまでは、ハムスターやマウスなど動物実験での報告であるが、ヒトプリオンについても将来応用可能と思われる。英国では未発症のプリオン感染者の存在が予測されており<sup>8)</sup>、変異型CJD患者の血液からの2次感染と考えられる症例が報告される<sup>9)</sup>など、輸血や血液製剤からの2次感染による変異型CJDの拡大が懸念されている。ヒトプリオンの尿、血液からの検出が一刻も早く実用化されることが望まれている。

## 2. 治療薬の開発(図1)

治療薬の開発は、30年以上続けられているが、いまだ確立した治療法は見つかっていない。治療薬の開発の詳細については総説を参照されたい<sup>10)</sup>。プリオン病の発症にかかわる因子としては、正常型プリオン蛋白質と異常感染型プリオン蛋白質以外は明らかとなっていないため、治療薬候補化合物の標的は主にアミロイドとしての性質をもっている異常感染型プリオン蛋白質である。異常感染型プリオン蛋白質を含む脳内のアミロイド斑の構成成分の一つにアミロイド親和性をもつグリコサミノグリカン(GAG)が見いだされたことから、GAGとよく似た構造をもつコンゴーレッド、ヘパラン硫酸などが治療薬の候補となった。ヨードドキシソルピシンとその構造類似体のテトラサイクリンもアミロイド結合性から見いだされた化合物である。一方、抗ウイルス薬、抗寄生虫薬、あるいは血液脳関門を透過しやすい既存薬の中から見いださ

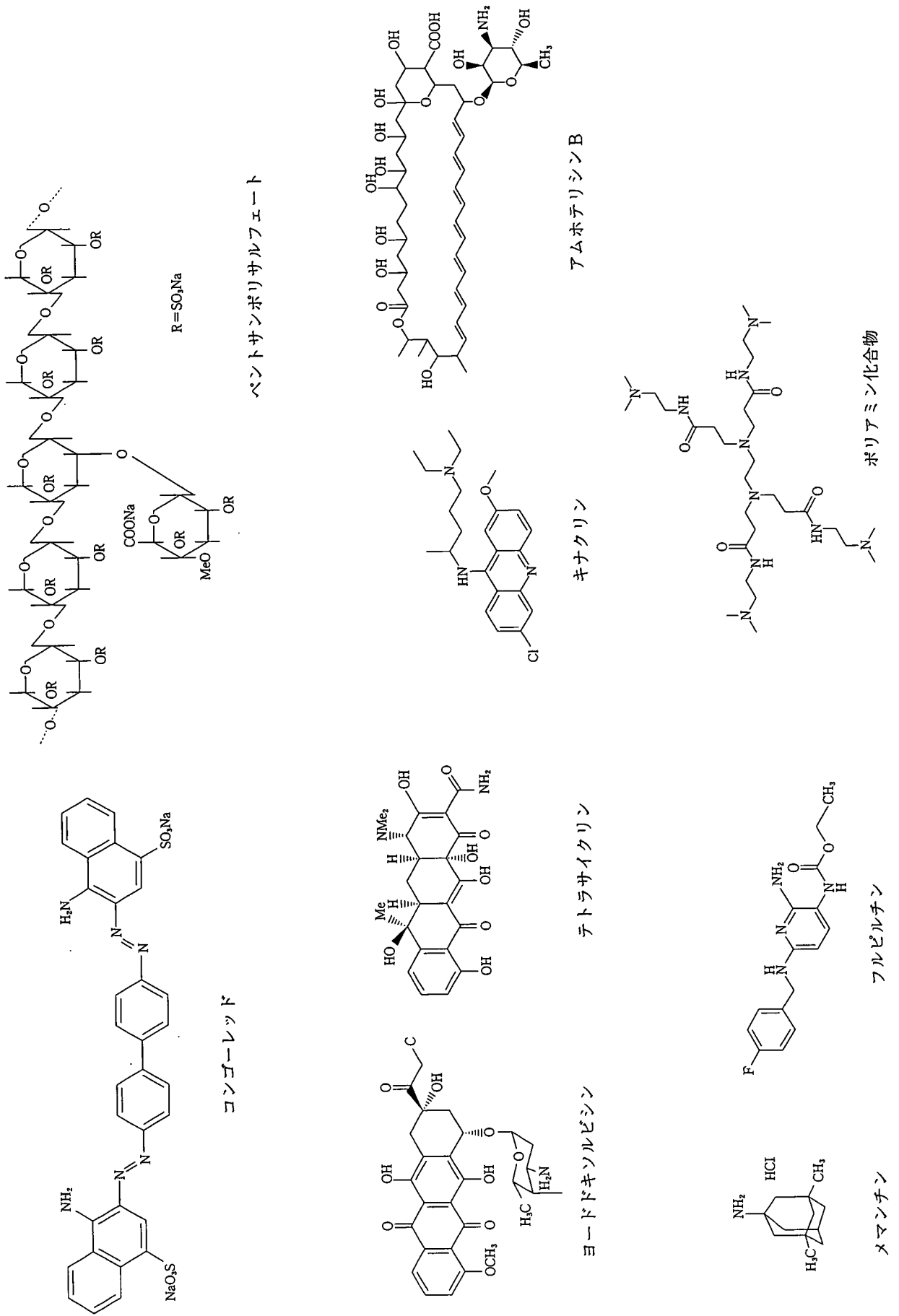


図 1 プリオン病治療候補化合物

れたものもある。抗マalaria薬からキナクリンなどの3環形化合物が、抗ウイルス薬からはアムホテリシンBなどのポリエン系抗生物質が、抗精神病薬からクロルプロマジン、神経細胞のアポトーシス抑制剤としてNMDA受容体拮抗薬メマンチン、中枢性鎮痛薬フルピルチンが見いだされ、これらのなかには臨床試験で治療効果が検討されたものもある。トランスフェクション試薬の一つポリアミン化合物は、感染培養細胞の実験から見つかった化合物である。

大規模スクリーニング系も幾つか開発されている。酵母プリオンを用いた方法<sup>11)</sup>、ベータシート構造をとると蛍光を示すペプチドを用いた方法<sup>12)</sup>、正常型と異常感染型プリオン蛋白質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<sup>13)</sup>、表面プラズモン共鳴法によるPrP<sup>C</sup>との相互作用を利用したスクリーニング法<sup>14)</sup>、正常型プリオン蛋白質の構造を安定化するような化合物をコンピュータ上でスクリーニングする*in silico*スクリーニング<sup>15)</sup>などである。

上記のようなスクリーニングで選別された化合物は最終的には疾患動物を用いた実験によって治療効果と安全性が評価されている。感染実験に用いられる動物は、プリオンの種類により発症するまでの期間(潜伏期間)が決まっており、潜伏期の長さはプリオンの感染力に逆相関する。したがって治療薬の効果は、潜伏期間の延長で評価されることになる。プリオン蛋白質のノックアウトマウスにヒト、ウシ、マウスなど種の異なるプリオン蛋白質の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノックインマウスによって、種の壁を低くし、潜伏期を短くすることにも成功している。

これまでに臨床試験で治療効果を検討された化合物には、キナクリン、ペントサンポリサルフェート、クロルプロマジン、アムホテリシンB、メマンチン、フルピルチンなどがある。キナクリンとペントサンポリサルフェート(PPS)は、欧米に先駆けて我が国で臨床試験が行われている。キナクリンは、投与による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

あった。肝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臨床試験が続けられたが、効果を維持することには成功していない<sup>16)</sup>。PPSは血液脳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。その結果、脳の萎縮の進行は止まらなかったものの、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の評価が現在も続けられている<sup>17)</sup>。PPSを用いた脳室内持続投与療法はイギリス<sup>18)</sup>や我が国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一つといえる。今後、最適な治療プロトコルの完成と臨床症状の改善がより容易に判断できる緩徐進行例や若年の発症早期例での検討が求められる。

フルピルチンについては、28人のCJD患者について二重盲検試験として臨床試験が行われた。しかし、CJDの認知機能の低下を有意に抑制したものの、CJDの進行を抑制することはできていない<sup>19)</sup>。

## おわりに

プリオン病は、通常のウイルスや病原菌などによる感染症と異なり、免疫応答が認められず、発症するまで診断することが難しく、神経変性が急速に進行することが、プリオン病の治療を極めて困難なものにしている。医源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場合には、予防的な薬剤の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する長期の投薬は、使われる薬の安全性を考えると実際的ではない。多くの治療薬候補化合物は、感染直前あるいは感染直後からの治療開始において優れた効果を発揮することが動物実験で示されている。しかし、現在行われている候補化合物の臨床試験は、発症後からの治療開始であることより効果がはっきりと認められない場合が多い。発症前に治療を開始することが重要であり、早期あるいは発症前診断法の開発は治療法の開発とともに急務となっている。検出技術の進歩により、ごく微量の異常

感染型プリオン蛋白質や、プロテアーゼに感受性をもつ、これまで見逃されてきたプリオンの検出法など、治療法の評価系として有用というだけでなく、早期診断に応用できる可能性がでてきた。特に、PMCA法による異常感染型プリオン蛋白質の検出は、体液中のごく微量の異常感染型プリオン蛋白質を検出できることにより、発症前あるいは発症初期における有効な診断ツールになるに違いない。最近、プリオン複製と

神経細胞死は必ずしも相関しないことが指摘されており、今後の研究でプリオンの複製と神経細胞死を分離することができれば、感染後に発症しないようにすることも可能となる。また、プリオンの複製やそれに引き続く神経細胞死のメカニズムの詳細はいまだに不明な点が多いが、今後、これらの過程に関与する因子が解明されれば、それらを標的とした治療薬開発が展開されるものと思われる。

## ■ 文 献

- 1) Prion Biology and Diseases 2nd ed (ed by Prusiner SB), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004.
- 2) Mallucci G, et al: Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**: 871-874, 2003.
- 3) 藤田浩司ほか: CJDの画像診断. *Clinical Neuroscience* **24**: 317-320, 2006.
- 4) Jin K, et al: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* **62**: 502-505, 2004.
- 5) 佐藤克也ほか: CJDの診断マーカー. *Clinical Neuroscience* **24**: 307-311, 2006.
- 6) Saborio GP, et al: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**: 810-813, 2001.
- 7) Castilla J, et al: Detection of prions in blood. *Nat Med* **11**: 982-985, 2005.
- 8) Ironside JW, et al: Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study. *BMJ* **332**: 1186-1188, 2006.
- 9) Editorial Team: New case of transfusion-associated vCJD in the United Kingdom. *Euro Surveill* **11**: E0602092, 2006.
- 10) Trevitt CR, Collinge J: A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* **129**: 2241-2265, 2006.
- 11) Bach S, et al: Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* **21**: 1075-1081, 2003.
- 12) Gustiananda M, et al: Conformation of prion protein repeat peptides probed by FRET measurements and molecular dynamics simulations. *Biophys J* **86**: 2467-2483, 2004.
- 13) Bertsch U, et al: Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol* **79**: 7785-7791, 2005.
- 14) Kawatake S, et al: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* **29**: 927-932, 2006.
- 15) Lorenzen S, et al: In silico screening of drug databases for TSE inhibitors. *Biosystems* **80**: 117-122, 2005.
- 16) 山田達夫ほか: 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), p11-22, 2004.
- 17) 山田達夫, 坪井義夫: 「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17年度総括分担研究報告書(主任研究者: 堂浦克美), p8-10, 2006.
- 18) Todd NV, et al: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect* **50**: 394-396, 2005.
- 19) Otto M, et al: Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. *Neurology* **62**: 714-718, 2004.