

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、抗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、変性剤や細胞破砕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、スクレイパ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。培養細胞の破砕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

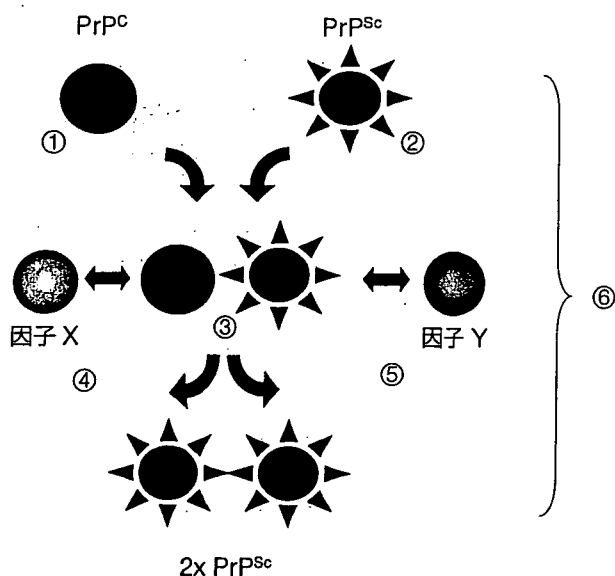


Fig. 4 プリオン病治療薬開発のストラテジー

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のコードン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ビン(Iodoxorubicin: 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

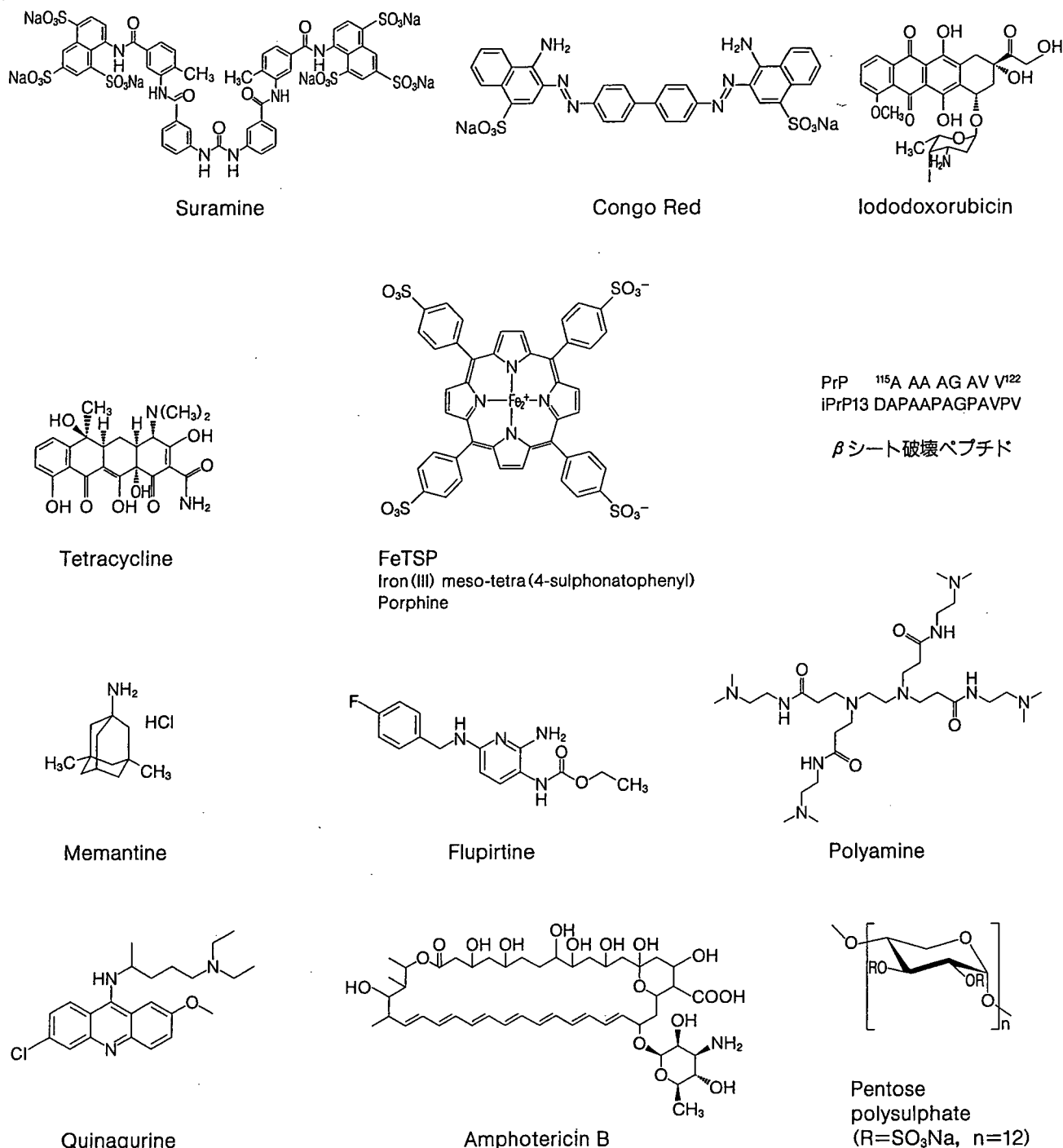


Fig. 5 さまざまなプリオン病治療候補化合物

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)などのポリエン系抗生物

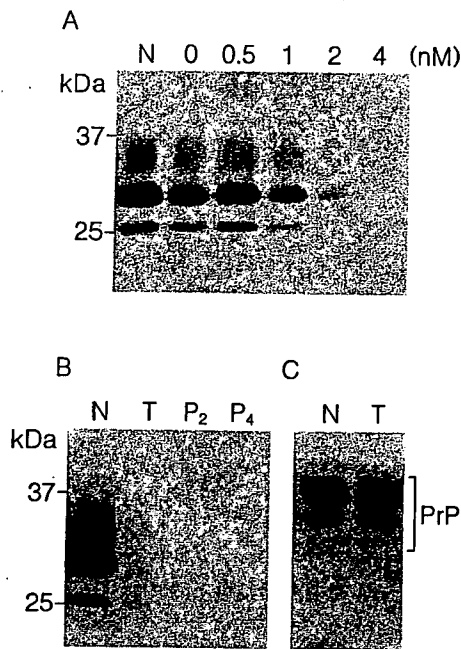


Fig. 6 スチリルベンゾール誘導体の PrP^{Sc} 産生抑制効果

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^c 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

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, Liebman 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-Laue 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。これまでにマリアアの治療薬である 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

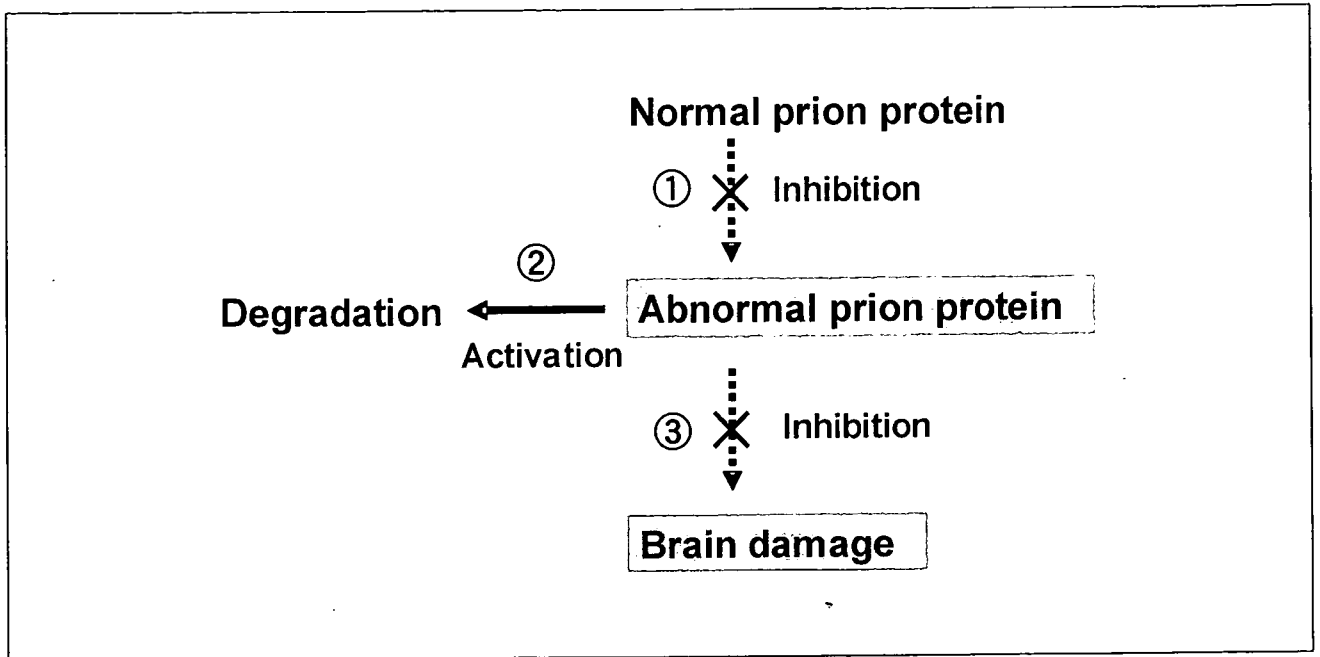


Fig. 1 Potential drug targets for the treatment of prion diseases

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）開発は治療薬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ラリア薬, 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

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人と比較的可成りな疾患であるが、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¹⁾、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¹⁾。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¹⁾。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¹⁾。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²⁾、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³⁾、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⁴⁾、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⁵⁾、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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾、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⁹⁾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¹⁰⁾。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。ヨードドキシソルビ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

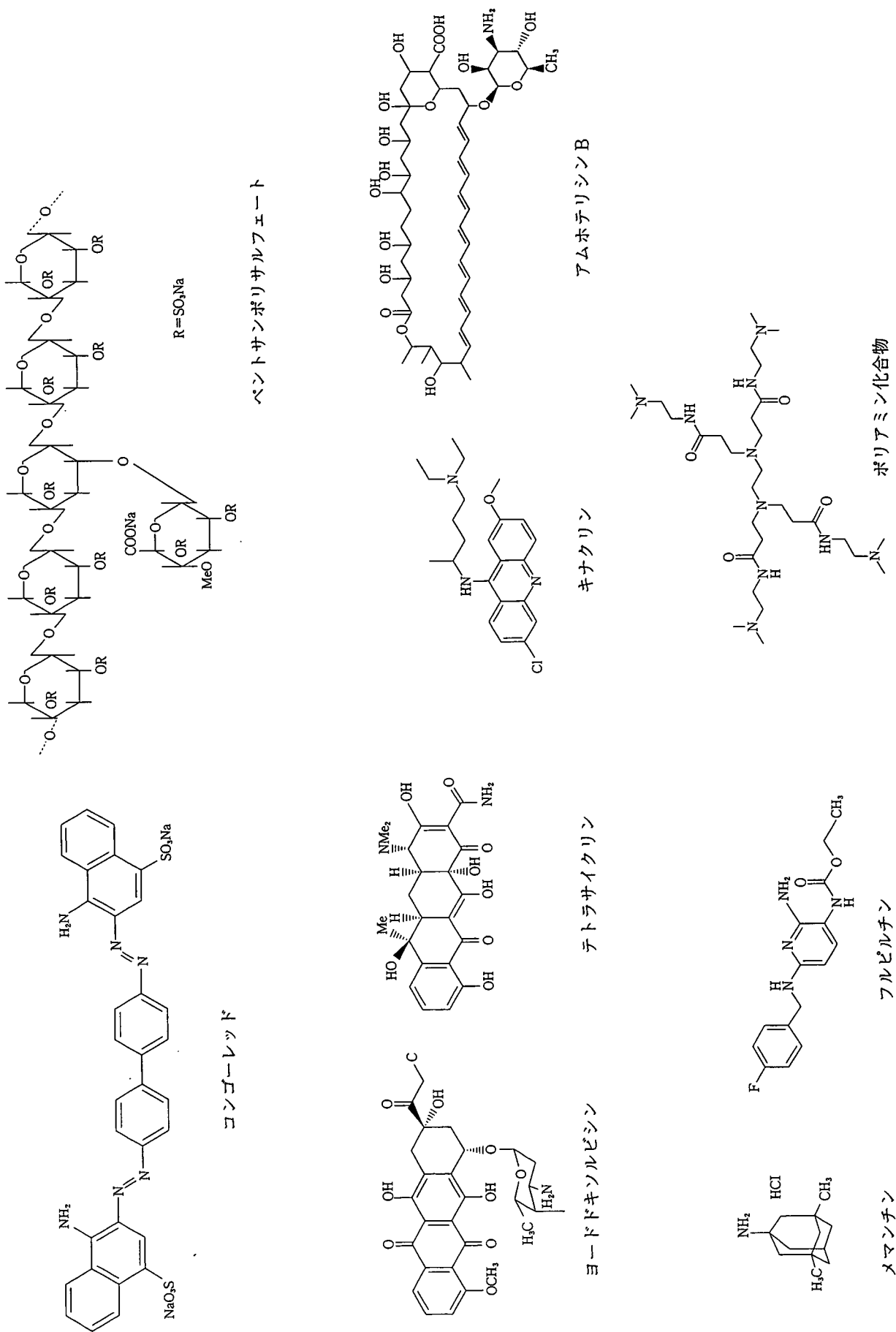


図 1 プリオンの病治療候補化合物

れたものもある。抗マラリア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¹¹⁾、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¹²⁾、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¹³⁾、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¹⁴⁾、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¹⁵⁾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¹⁶⁾。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¹⁷⁾。PPSを用いた脳室内持続投与療法はイギリス¹⁸⁾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¹⁹⁾。

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实际的ではない。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を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.