

図1 :

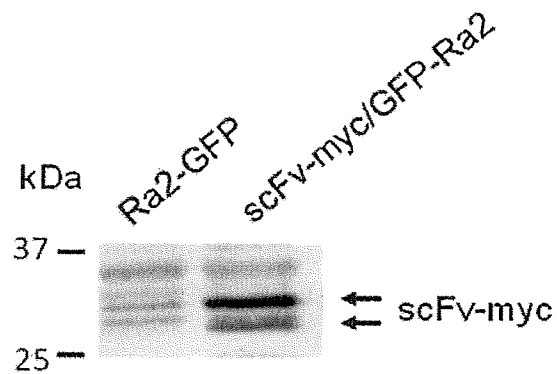


図1 : Ra2マイクログリアにおけるscFv-myc抗体の発現。scFv-myc/GFP-Ra2では26.5kDaと28kDa付近に特異的なシグナルが検出できた。高分子量のシグナルは糖鎖が付加したscFv-myc抗体で、低分子量のシグナルは糖鎖が付加しないscFv-mycである。

表1 : マウスにおける scFv-myc/GFP-Ra2 の抗プリオン効果

プリオン株	接種時期	生存期間 (日, 平均値 ± SD)		p 値
		GFP-Ra2	scFv-myc/GFP-Ra2	
Chandler	感染前 3, 1 週	167.2 ± 1.5	172.0 ± 5.0	0.014
	感染後 7 週	166.2 ± 5.6	162.6 ± 5.7	ns
	感染後 13 週	164.6 ± 4.3	164.8 ± 3.6	ns
22L	感染後 7 週	157.1 ± 2.7	161.7 ± 7.5	0.035
	感染後 13 週	159.2 ± 4.4	157.0 ± 3.7	ns

ns, not significant.

組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究

分担研究者：杉村和久（鹿児島大学工学部化学生命工学科）

研究協力者：橋口周平（鹿児島大学工学部化学生命工学科）

研究要旨

β シート構造のプリオン蛋白に特異的に結合するヒト単鎖抗体 (PRB7, PRB30) は、プリオン蛋白の立体構造を認識する。大量のタンパク質を必要とするX線結晶構造解析等の構造解析を行うため PRB7 scFv 抗体から IgG 抗体へのエンジニアリングを達成し、PRB7 IgG1 抗体において、 β シート構造のプリオン蛋白に特異性が認められた。

A. 研究目的

本研究では、組み換えヒトプリオン蛋白を試験管内でフォールディングさせ、正常型プリオン蛋白質 (PrP^C)と病原性構造異性体 (PrP^{Sc}) の類似プリオン蛋白質を作製し、これらの分子にヒト抗体ファージライブラリを直接反応させ、1) 正常型プリオン蛋白質 (PrP^C)と病原性構造異性体 (PrP^{Sc}) を識別するヒト抗体を確立すること、2) これらの抗体を用いて、PrP^{Sc} を ELISA、イムノブロットィング法により直接同定、検出、定量する方法を確立すること、3) ヒト抗体医薬としての可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト IgG1, IgG2 および IgG3 抗体の定常領域遺伝子とヒトイムノグロブリンκ鎖の定常領域遺伝子を組み込んだ

pcDNA3.1 由来のカセットベクターに、PRB7 抗体遺伝子の可変部領域遺伝子をクローニングし、高等動物細胞で発現させるための発現ベクターを構築した。また、シグナル配列を T 細胞レセプター α 鎖 (TCR α)由来のものに置きかえた発現ベクターを構築した。

(2) 作製した PRB7 の VH 遺伝子および VL 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを FreeStyleTM MAX reagent (Invitrogen) を用いて Free Style 293F 細胞 (Invitrogen) に導入し、1週間後の培養上清から Ni カラムを用いて IgG 抗体を精製した。

(3) PRB7 の VH 遺伝子および VL 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを DEAE-dextran 法を用いて COS7 細胞に導入し、5日後に培養上清を回収後、ドットブロットィングやウエスタンブロットィングにより発現量を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、「遺伝子組み換え生物の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

C. 研究結果

PRB7 の VH 遺伝子および VL 遺伝子を組み込んだ発現ベクター (PRB7 IGHC / pcDNA3.1 および PRB7 IGKC / pcDNA3.1) を FreeStyle™ MAX reagent により Free Style 293F 細胞に遺伝子導入したところ、いずれの IgG サブクラスにおいても抗体の発現が認められた。精製後の試料を用いてプリオン蛋白との反応性を解析したところ、IgG1 に変換した PRB7 IgG1 抗体において、β型プリオン蛋白への特異的な結合が認められた。しかしながら、ゲルろ過カラムを用いた解析の結果、PRB7 IgG1 抗体は多量体として存在していることが明らかとなった。Free Style 293F 細胞を用いた結果では H 鎖の発現量が微量であり、H 鎖と L 鎖の発現のアンバランスが認められた。H 鎖の発現量を高めるために発現ベクター、イムノグロブリン H 鎖のシグナル配列の検討を行ったところ、TCR α 鎖由来のシグナル配列を有する PRB7 H 鎖遺伝子を、CMV プロモーターを有する発現ベクター (pcDNA3.1) に組み込んだ場合に、H 鎖の発現量が最も改

善された(0.5 mg/ml)。

L 鎖についても、シグナル配列およびプロモーターの異なる発現ベクターを構築し、作製したベクターの組み合わせ、比率等の条件を詳細に検討した。その結果、TCR α 由来のシグナル配列を有する H 鎖発現ベクター (PRB7 IGHC1 / pcDNA3.1) およびイムノグロブリンκ鎖 (Igκ) 由来のシグナル配列を有する L 鎖発現ベクター (PRB7 IGKC / pcDNA3.1) を COS7 細胞にコトランスフェクションした場合、β型プリオン蛋白への特異性を示す完全な IgG1 抗体 (>300 μg / L) の発現が認められた。

D. 考察

Free Style 293F 細胞を用いた結果では、H 鎖の L 鎖の発現量のアンバランスが IgG 抗体のアセンブリに影響することが示唆された。H 鎖および L 鎖の発現解析で高い発現量を示した発現ベクターを用いることで、ことで、COS7 細胞において、β型プリオン蛋白への特異性を示す完全な IgG1 抗体の発現が認められた。今回作製した発現ベクターでの IgG 抗体の収量は、PrP^{Sc} に対する反応性の解析、免疫沈降実験および結晶解析に用いるには十分な量が確保できているが、培養条件を詳細に検討することでさらなる改善が期待される。

E. 結論

CMV プロモーターおよび TCRαシグナ

ル配列を有する PRB7 IgG1 の H 鎖発現ベクター、CMV プロモーターおよびイムノグロブリン κ 鎖シグナル配列を有する L 鎖発現ベクターを DEAE-dextran 法を用いて COS7 細胞にコトランスフェクションすることにより、 β 型プリオン蛋白への特異性を示す IgG1 抗体を作製した。

F. 研究発表

学会発表

β 型プリオン特異的ヒト抗体の特異性に及ぼす IgG 定常領域の影響の検討、第 82 回日本生化学会大会, 10 月, 2009, 兵庫

G. 知的所有権の出願・登録状況

ヒト抗プリオン抗体および該抗体フラグメント、 PCT/JP2005/015121

β型プリオン蛋白特異的ヒト単鎖抗体の調製法の検討

分担研究者：橋口 周平（鹿児島大学工学部化学生命工学科）

研究協力者：杉村 和久（鹿児島大学工学部化学生命工学科）

研究要旨

ヒト一本鎖 (scFv) 抗体を提示しているファージディスプレイライブラリーを用いて作製されたβ型プリオン蛋白 (β-PrP) は、大腸菌での可溶性蛋白としての発現量が低い。本研究課題では、PRB7 および PRB30 scFv 抗体を、チオレドキシン、NusA および DsbA との融合タンパク質として発現させ、PRB7 および PRB30 scFv 抗体を精製するための調製方法の確立を試みた。

A. 研究目的

これまでの研究で遺伝子組み換えプリオン蛋白を用いて作製したβ型プリオン蛋白を用いて、プリオン蛋白のβ構造を特異的に認識するヒト一本鎖 (scFv) 抗体 (PRB7, PRB30) を単離しているが、これらの scFv 抗体は、大腸菌 (HB2151) での可溶性蛋白としての発現が不安定であり精製が難しい。また、PRB7 scFv を大腸菌封入体として発現させるこれまでの試みでは、結合特異性を再現できる scFv 抗体が得られていない。本研究では、PRB7 および PRB30 scFv 抗体の大量発現系を確立するため、大腸菌での蛋白質のジスルフィド結合の形成に参与するチオレドキシン、大腸菌内での可溶性を促進する Nus 蛋白、ペリプラズムでのフォールディングに参与する DsbA 蛋白を利用した

PRB30 scFv の発現系の確立を試みた。

B. 研究方法

PRB7 および PRB30 scFv 抗体遺伝子を pET-32b (Thioredoxin)、pET-39b (DsbA) および pET-43.1b (Nus) (Novagen) の BamHI 及び XhoI サイトにクローニングし、RosettaTM (DE3) に形質転換した。1 mM のイソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) 存在下で 12 時間培養した。遠心及び超音波処理により、上清、ペリプラズムまたは細胞質画分を分画し、scFv 抗体の結合活性を、プリオン蛋白がコートされた 96 穴イムノプレートに加え ELISA 法により解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、「遺伝

子組み換え生物の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

C. 研究結果

PRB30 scFv 抗体を、scFv- Thioredoxin 融合蛋白 (pET32b /PRB30)、 scFv-DsbA 融合蛋白 (pET39b/PRB30) および scFv-Nus 蛋白融合蛋白 (pET43.1b/PRB30) として発現させるための発現ベクターを構築し、大腸菌 (RosettaTM: DE3) に形質転換した。イソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド (IPTG; 1 mM) 存在下で 12 時間培養後の菌体を超音波処理し、上清、ペリプラズムまたは細胞質画分を分画し、scFv 抗体の発現を解析した。その結果、細胞質画分において可溶性 scFv- Thioredoxin 融合蛋白および可溶性 scFv-Nus 蛋白融合蛋白の発現が認められた。scFv-DsbA 融合蛋白については、ペリプラズム、培養上清においても発現していた。これらの試料を用いて、 β 型プリオン蛋白との特異性を ELISA 法により解析したところ、scFv- Thioredoxin および scFv-DsbA 融合蛋白は、プリオン蛋白との結合活性が認められなかったが、scFv-Nus 融合蛋白は、 β 型プリオン蛋白への特異性が認められた。

D. 考察

大腸菌の細胞質内で、蛋白のフォールディングに関与する分子シャペロンの活性化に関わる Nus 蛋白と融合して発現させることで、活性のある PRB30 scFv 抗体を作製できることが示された。NusA 融合 PRB30 単鎖抗体は NusA タンパク質と PRB30 単鎖抗体の間にタンパク質分解酵素であるトロンピンで切断されるモチーフを持つため、精製後 PRB30 単鎖抗体として単離することが可能である。

E. 結論

発現、精製の難しい PRB30 scFv 抗体を NusA 融合 PRB30 単鎖抗体として大腸菌の細胞質内に発現させることで、 α 型プリオン蛋白には結合せず、 β 型プリオン蛋白だけに特異性を示す PRB30 scFv 抗体の発現系を確立した。れた。

F. 研究発表

学会発表

β 型プリオン特異的ヒト抗体の特異性に及ぼす IgG 定常領域の影響の検討、第 82 回日本生化学会大会、10月、2009、兵庫

G. 知的所有権の出願・登録状況

ヒト抗プリオン抗体および該抗体フラグメント、PCT/JP2005/015121

プリオン病患者における髄液中での免疫反応に関する研究

研究分担者： 調 漸 長崎大学保健・医療推進センター
研究協力者： 佐藤 克也 長崎大学医歯薬総合研究科 感染分子解析学

研究要旨

ヒトプリオン病では従来、免疫系の病態への関与はほとんどないとされてきた。そのために現在までヒトプリオン病患者における免疫反応は未だ不明な点が多い。今回、これまでにほとんど検討されていないヒトプリオン病における髄液中のサイトカインについて解析を行った。平成20年度の研究にて我々はプリオン病の病態への免疫系の関与を明らかにする目的で、髄液中の一部のサイトカインの検索を行った。平成21年度ではより正確なサイトカインの解析を行うために、症例数の追加及びさらなるサイトカインテストの追加を行い、プリオン病と類似疾患との比較検討を行った。炎症性サイトカインであるIL-1 β ・IL-6・TNF- α ・1型IFN(IFN- α /IFN- β)に加え、ミクログリア・アストロサイトに関与するサイトカインとしてIL-8・PGE2についても検討を行った。さらに抗炎症性サイトカインであるIL-10についても検討した。プリオン病患者髄液中のIL-8のみが他の疾患群と比べ有意に高かった。IL-8はアストロサイト・ミクログリアに双方に関連するサイトカインとされているが、ミクログリア由来のサイトカインPGE2は正常範囲であることからヒトプリオン病におけるアストロサイトの活性化と増殖を反映している可能性が考えられ、臨床的に鑑別診断マーカーとしての意義があると考えられる。

A. 研究目的

ヒトプリオン病では従来、免疫系の病態への関与はほとんどないと思われてきた。現在までヒトプリオン病患者における髄液中のサイトカインについては検討されておらずが、ヒトプリオン病における免疫反応は未だ不明な点が多く、解析が求められている。しかしながら、これまでにヒトプリオン病における免疫応答は研究されていない。今回我々はヒトプリオン病患者の髄液中サイトカイン濃度の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

CJD (n=41), 脳炎/髄膜炎 (n=18), 多発性硬化症(MS)(n=19), アルツハイマー型認知症 (DAT) (n=16), コントロール(CTL)(N=18)において髄液中のINF- α ・ β ・ γ 及び各種サイトカイン

(IL-1 β ,IL-6,TNF- α ,IL-4,IL-8,IL-10)について検討した。又同時に血清中の,IL-1 β ,IL-6,TNF- α を各種特異的ELISAキットも用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学倫理委員会の承認を得て、長崎大学の倫理規程に準拠し、インフォームドコンセントを得ておこなった。患者検体を全て匿名化して管理し、個人情報に関しては厳重に保管し、ことに患者情報ファイルは施錠できる書庫に保管している。またヘルシンキ宣言に基づき研究を遵守した。

C. 研究結果

プリオン病患者ではIL-1 β 、IL-6、TNF- α ,1型IFN(IFN- α /IFN- β)については感度以下であり、IL-8については他の疾患に比べて有意(P<0.05)に高かった(図1,2,3,4,5,6,7)。また多発

性硬化症 (MS)、脳炎・脳症患者では IL-1 β 、IL-6、TNF- α については有意に高かった (P<0.01)。IL-8 は多発性硬化症 (MS)、脳炎・脳症患者ではプリオン病に比べ有意に低いが、正常対照群に比べ有意に高かった。髄液中の TNF- α 、PGE2 についてはすべての群 (CJD、MS、脳炎・脳症、正常対照群) において感度以下であった。

D. 考察

髄液中のサイトカインの測定結果では 発症したヒトプリオン病患者ではニューロン由来の炎症性サイトカインはほとんど認められない。一方、アストロサイト・ミクログリア系のサイトカイン (IL-8) は著明に高く、ミクログリア系サイトカインとされる PGE2 は感度以下であった。IL-8 がミクログリア、アストロサイト双方から分泌される可能性があり、PGE2 はアストロサイトからの分泌能が知られていないことを考えると、ヒトプリオン病患者の IL-8 はアストロサイトの活性化と増生を示唆しているものと思われた。INF-I, TNF が感度以下であったことは、西田らの基礎研究報告にあるようにプリオン感染によってこれらの産生経路が抑制されていることを反映しているのかもしれない。一方で IL-10 が AD や MS 群と比較し明らかに高値であることは興味深い。

E. 結論

ヒトプリオン病患者では髄液中には炎症性サイトカインはほとんど認められず、一方アストロサイト・ミクログリア系のサイトカインが著明に高く、ヒトプリオン病において、アストロサイトが主にプリオンに応答し、自然免疫系の活性化 (IL10) と抑制 (INF-I) が病態に関与する可能性が示唆された。また髄液中 IL-8 は鑑別診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

- 1: Satoh K, Kawakami A, Shirabe S, Tamai M, Sato A, Tsujihata M, Nagasato K, Eguchi K. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian. *Acta neurologica Scandinavica*. 2009. [published online]
- 2: Satoh K, Tobiume M, Mutsukura M, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S and Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Laboratory Investigation* (2010 in press)
- 3: Ida H, Aramaki T, Nakamura H, Fujikawa K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Satoh K, Origuchi T, Kawakami A, Furuichi I, Kawabe Y, Eguchi K Different expression levels of TNF receptors on the rheumatoid synovial macrophages derived from surgery and a synovectomy as detected by a new flow cytometric analysis. *Cytotechnology*. 2009;60:161-164
- 4: Mutsukura K, Satoh K, Shirabe S, Tomita I, Fukutome T, Morikawa M, Iseki M, Sasaki K, Shiaga Y, Kitamoto T, Eguchi K. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation: comparative analysis with pathological findings and diffusion-weighted images. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2009;28:550-557
- 5: Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Satoh K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K. Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory

myopathy: histologic and MRI study. Rheumatology international. 2009 [published online]

学会発表

1) 第 106 回日本内科学会総会・講演会.

平成 21 年 4 月 10-12 日, 岡 芳知, 東京.
ポスター: 柘田智子, 本村政勝, 徳田昌紘,
立石洋平, 石飛進吾, 福田 卓, 佐藤克也,
辻野 彰, 吉村俊朗, 江口勝美. 重症筋無力
症の嚥下機能評価に関する検討.

2) 第 285 回日本内科学会九州地方会.平成 21
年 5 月 30 日, 辻 貞俊, 北九州. 一般口演: 六
倉和生, 佐藤克也, 福田 卓, 辻野 彰, 吉村
俊朗, 中村龍文, 本村政勝, 今西大介, 波多智
子, 江口勝美. 進行性の認知機能障害で発症し,
骨髄生検にて診断しえた血管内悪性リンパ腫
症(IVL)の 1 例.

3) 第 21 回日本神経免疫学会.平成 21 年 3 月
12-13 日, 楠 進, 大阪. ワークショップ: 柘
田智子, 本村政勝, 徳田昌紘, 福田 卓, 石飛
進吾, 佐藤克也, 辻野 彰, 吉村俊朗, 江口勝
美, 辻畑光宏. アセチルコリン受容体・ $\alpha 67-76$
抗体は重症筋無力症の重症度と相関する.

4) 第 34 回日本脳卒中学会総会.平成 21 年 3 月
20-22 日, 小林祥泰, 島根. 一般口演: 立石洋
平, 辻野 彰, 福田 卓, 佐藤克也, 中村龍文,
本村政勝, 吉村俊朗, 江口勝美, 北川直毅, 永
田 泉. 当院における Stroke Care Unit と地域
医療連携が脳卒中診療に与える影響.

5) 第 34 回日本脳卒中学会総会.平成 21 年 3 月
20-22 日, 小林祥泰, 島根. 一般口演:ポスタ
ー: 辻野 彰, 立石洋平, 六倉和生, 徳田昌紘,
坂井無二子, 柘田智子, 福田 卓, 佐藤克也,
本村政勝, 江口勝美. 他の疾患に合併した急性

期無症候性脳梗塞の症例検討.

6) 第 185 回日本神経学会九州地方会.平成 21
年 3 月 28 日, 山田達夫, 福岡. 一般口演: 徳田
昌紘, 本村政勝, 柘田智子, 坂井無二子, 立石
洋平, 福田 卓, 佐藤克也, 辻野 彰, 中村龍
文, 江口勝美, 吉村俊朗, 福島直美. seminoma
を合併した Isaacs 症候群の 1 例.

7) 第 50 回日本神経学会総会.平成 21 年 5 月
20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演: 六倉和
生, 佐藤克也, 江口勝美, 調 漸, 長郷国彦,
岸田日帯, 黒岩義之,三條伸夫, 水澤英洋. クロ
イツフェルト・ヤコブ病(CJD)における血液脳
関門(BBB)についての検討.

8) 第 50 回日本神経学会総会.平成 21 年 5 月
20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演: 佐藤克
也, 調 漸, 六倉和生, 江口勝美, 新竜一郎,
西田教行. CJD 患者における髄液中の異常プ
リオン蛋白の検出.

9) 第 50 回日本神経学会総会.平成 21 年 5 月
20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演: ポスタ
ー: 辻野 彰, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 坂井無
二子, 立石洋平, 吉村俊朗, 佐藤 聡, 辻畑光
宏, 佐藤克也, 本村政勝, 江口勝美. 孤発性若
年性パーキンソン病におけるホモ接合マッピ
ング.

10) 第 50 回日本神経学会総会.平成 21 年 5 月
20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演: 本村政
勝, 石飛進吾, 柘田智子, 徳田昌紘, 福田 卓,
六倉和生, 佐藤克也, 辻野 彰, 吉村俊朗, 江
口勝美. アセチルコリン受容体 $\alpha 67-76$ 抗体と
MG 嚥下障害に関する検討.

11) 第 27 回日本神経治療学会総会.平成 21 年 6
月 11-12 日, 内野 誠, 熊本.

一般口演：佐藤克也, 福田 卓, 六倉和生, 徳田昌紘, 立石洋平, 坂井(加用)無二子, 柘田智子, 辻野 彰, 吉村俊朗, 中村龍文, 本村政勝, 江口勝美. 当科における重症筋無力症(MG)・胸腺腫に合併した赤芽球癆(PRCA)の5症例.

12) 第14回日本神経感染症学会総会.平成21年10月16-17日中野今治. 一般口演：佐藤克也, 調 漸, 六倉和生, 江口勝美, 新竜一郎, 西田教行. CJD患者における髄液中の異常プリオン蛋白の検出.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録；なし

その他：なし

H. マスコミ等での報告

なし

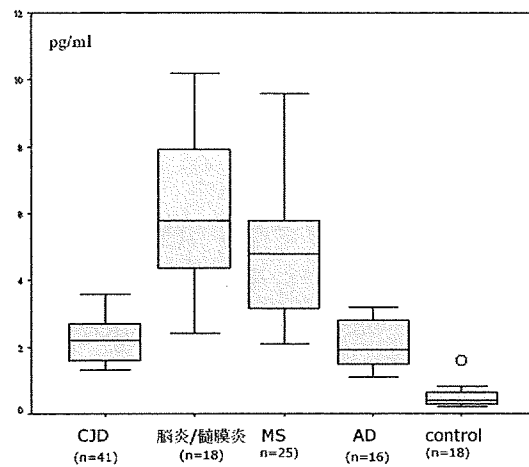


図1. 髄液中 IL-18

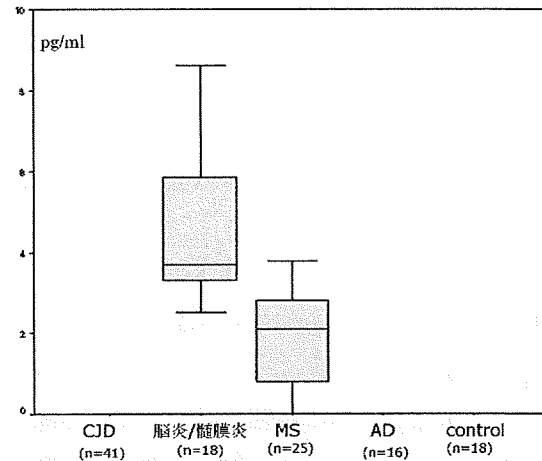


図2. 髄液中 IL-6

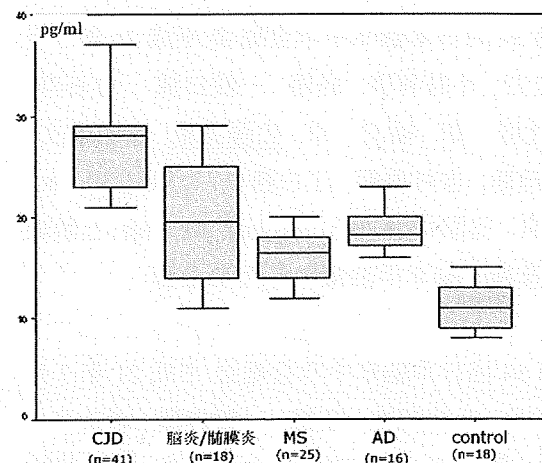


図3. 髄液中 IL-8

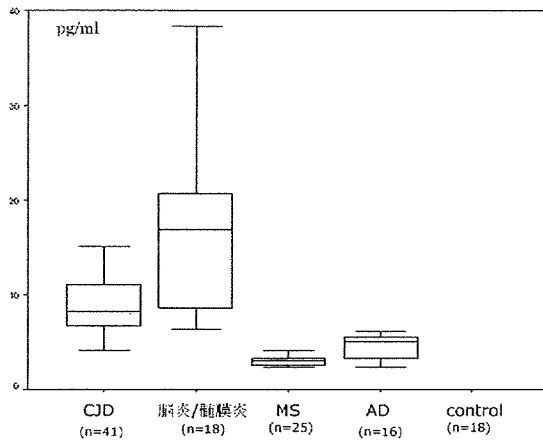


图4. 髓液中 IL-10

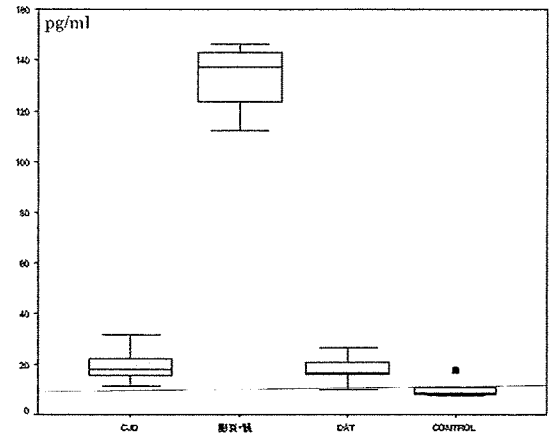


图7. 髓液中 IFN- γ

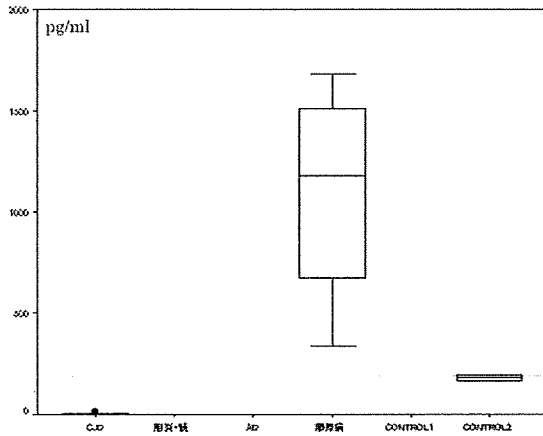


图5. 髓液中 IFN- α

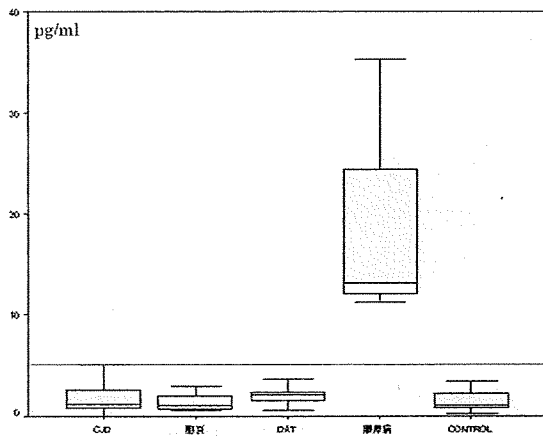


图6. 髓液中 IFN- β

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
坂口末廣	プリオン病予防ワクチンの開発の試み	山本重夫	バイオ医薬の開発技術とシーズ	シーエムシー出版	東京	2009	373-384

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N.	Hyperefficient PrPSc amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique	The FEBS Journal	276 (10)	2841-2848	2009
Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Toriyama K, Nakatani A, Takahara O, Kawai K.	Synaptophysin immunoreactivity in adrenocortical adenomas: a correlation between synaptophysin and CYP17A1 expression.	European Journal of Endocrinology	161(6)	939-945	2009
Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Suzuki S, Kawai K, Takahara O.	Primary Aldosteronism with Aldosterone-Producing Adenoma Consisting of Pure Zona Glomerulosa-Type Cells in a Pregnant Woman	Endocr Pathol	20(1)	66-72	2009
Ida H, Aramaki T, Nakamura H, Fujikawa K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Satoh K.	Different expression levels of TNF receptors on the rheumatoid synovial macrophages derived from surgery and a synovectomy as detected by a new flow cytometric analysis	Cytotechnology	60	161-164	2009

Mutsukura K, Sato K, Shirabe S, Tomita I, Fukutome T, Morikawa M, Iseki M, Sasaki K, Shiaga Y, Kitamoto T, Eguchi K.	Familial Creutzfeldt-Jakob Disease with a V180I Mutation: Comparative Analysis with Pathological Findings and Diffusion-Weighted Images	Dementia and Geriatric Cognitive Disorders	28	550-557	2009
Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Sato K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K.	Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory myopathy: histologic and MRI study	Rheumatol International	-	-	2009
Sato K, Kawakami A, Shirabe S, Tamai M, Sato A, Tsujihata M, Nagasato K, Eguchi K.	Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian.	Acta Neurol Scand.	121	338-341	2010
Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H.	Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases	Expert Opinion on Therapeutic Patents	19(7)	907-917	2009
Sakaguchi S	Prospects for Preventative Vaccines Against Prion Diseases	Protein and Peptide Letters	16(3)	260-70	2009
坂口末廣	プリオン病と治療戦略の最近の動向	BRAIN and NERVE	61(8)	929-938	2009

研究成果の刊行物・別刷

第36章 プリオン病予防ワクチンの開発の試み

坂口末廣*

1 はじめに

プリオン病はプリオンの脳内増殖により起こる神経変性疾患である¹⁾。効果的な治療・予防法はない。プリオン病はヒトのみでなく動物にもみられる¹⁾。ヒトのプリオン病は、原因不明の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病、プリオン蛋白質 (prion protein; PrP) 遺伝子に変異を有する遺伝性プリオン病 (家族性クロイツフェルト・ヤコブ病, ゲルストマン・ストロイスラー・シェインカー症候群, 致死性家族性不眠症), 及び感染が原因であると明らかに特定できる感染性プリオン病に分類できる²⁾。ヒトプリオン病の大部分 (90~95%) は原因不明の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病である²⁾。遺伝性プリオン病は約 10% を占める²⁾。感染性プリオン病は残りの数パーセントである²⁾。感染性プリオン病には、世界的な社会問題を引き起こしたウシ海綿状脳症 (狂牛病) の感染による新型クロイツフェルト・ヤコブ病, パプアニューギニアのフォア族の食人慣習により感染したクールー, 脳下垂体ホルモン投与, 角膜移植, 深部脳波電極の挿入, そして脳硬膜移植による医原性プリオン病がある³⁾。残念ながら, 我が国では, 硬膜移植による 68 例のクロイツフェルト・ヤコブ病が報告されている (2006 年 9 月時点)⁴⁾。

クールーは食人慣習の禁止により, 発症者数が激減した。現在でもわずかな発症が報告されているが, これらの患者は食人慣習の禁止以前に感染した人々と考えられている。また, 狂牛病の減少により, 新型クロイツフェルト・ヤコブ病の患者数も減少した。しかし, これらの患者はすべて, PrP 遺伝子の 129 番目のコドンの遺伝子多型がメチオニン/メチオニン (M/M) のホモ接合体である。これまでの研究から, M/M 接合体がプリオン感染に最も感受性が高く, M/ヴァリン (M/V) ヘテロ接合体が中程度, V/V ホモ接合体が最も感染しにくいことが知られている^{5,6)}。現時点では, 残念ながら, プリオン病の発症前診断が不可能である。このため, M/V や V/V のヒトが感染しているのか判断できない。今後, これらのヒトが新型クロイツフェルト・ヤコブ病を発病するのか, 十分に注意して監視していく必要がある。また英国では, 新型クロイツフェルト・ヤコブ病に感染しているヒトの血液を輸血されたヒトが, 後に新型クロイツフェルト・ヤコブ病を発病した例が 3 例報告された⁷⁻⁹⁾。このことは, 医療行為による新型クロイツフェ

* Suehiro Sakaguchi 徳島大学 疾患酵素学研究センター 神経変性疾患研究部門 教授

ルト・ヤコブ病の二次感染の危険性を示唆した。さらに北米では、多数の野生及び家畜のシカにプリオン病（慢性消耗性疾患）が発生し、狂牛病と同様にヒトに感染するの大きな問題となっている¹⁰⁾。このようにプリオン病感染の危険性が以前と比べて非常に高いことから、プリオンワクチンの早急な開発が期待されている。

2 プリオン感染メカニズム

2.1 プリオン

プリオンの実体は正確に解明されていない。我々の正常組織、特に脳に強く発現する正常プリオン蛋白質（Cellular isoform of PrP; PrP^c）が、構造を変化させることにより産生された異常プリオン蛋白質（Scrapie isoform of PrP; PrP^{Sc}: scrapie はヒツジの代表的なプリオン病）から構成されていると考えられている¹¹⁾。

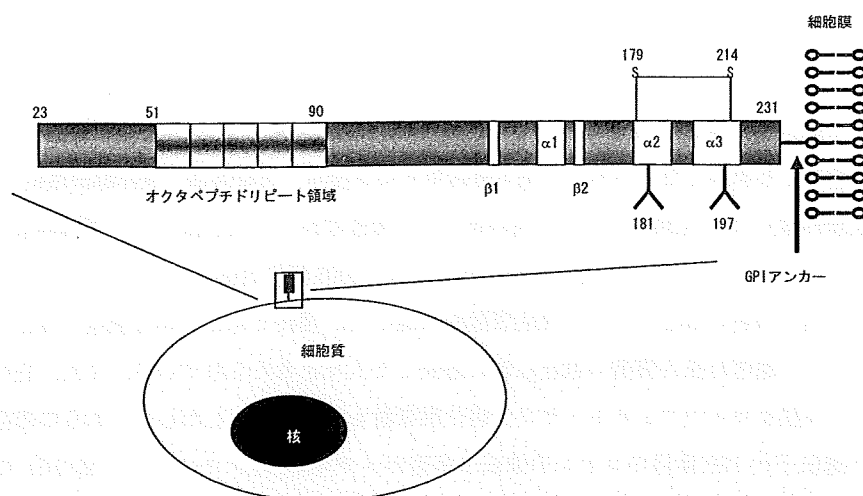


図1 マウス PrP^c の蛋白構造

PrP^c は 254 個のアミノ酸からなる前駆体蛋白として翻訳される。N 末 22 個のアミノ酸はシグナルペプチドとして、C 末 23 個のアミノ酸は GPI アンカー・シグナルとして機能し、小胞体内で切断される。従って、成熟したマウス PrP^c はアミノ酸 23~231 からなり、GPI アンカーを介して細胞膜表面に結合している。成熟 PrP^c の N 末領域はランダムコイル構造である。この領域には銅イオンと結合し酸化ストレスの調節に関与していると考えられている、8 個のアミノ酸(P(H/Q) GG(G/-)WGQ)が 5 回繰り返したオクタペプチドリピート領域がある。一方 C 末領域は、2 つの短い β シート構造と 3 つの α ヘリックス構造を有し球状構造を形成している。2 番目と 3 番目のヘリックスはジスルフィド結合で連結されている。また、N 型糖鎖結合が 2 カ所に存在する。 β 1 (アミノ酸 128~131) と β 2 (アミノ酸 161~164) は β シート構造領域を、 α 1 (アミノ酸 144~154)、 α 2 (アミノ酸 179~193) と α 3 (アミノ酸 200~217) は α ヘリックス構造領域を示している。数字はアミノ酸番号を示す。

2.2 プリオン蛋白質 (prion protein ; PrP)

PrP^C はグリコシルフォスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol ; GPI) を介して細胞膜表面に付着している糖蛋白質である (図 1)¹²⁾。ノックアウトマウスを用いた一連の研究から, PrP^C が学習・記憶や日内リズムといった脳の高次機能, 及び虚血やその他の神経障害から神経細胞を保護する機能に関与していることが明らかとなってきた¹³⁻¹⁷⁾。PrP^{Sc} は PrP^C の構造変化によって産生される。従って, 両者のアミノ酸構造は全く同じである。しかし, 両者の高次構造は明らかに異なる。PrP^C は α ヘリックス構造に富み, β シート構造が少ない (α ヘリックス, 42%; β シート, 3%)¹⁸⁾。また, PrP^C は易溶性で蛋白質分解酵素であるプロテアーゼ K にて完全に分解される。一方, PrP^{Sc} は α ヘリックス構造がわずかに減少し, β シート構造が著明に増加している (α ヘリックス; 30%, β シート; 43%)¹⁸⁾。また, PrP^{Sc} は難容性で凝集体を形成しやすい。さらに PrP^{Sc} は, PrP^C と比べて, プロテアーゼ K に対して抵抗性で消化されにくい。

2.3 プリオン感染様式 (図 2)

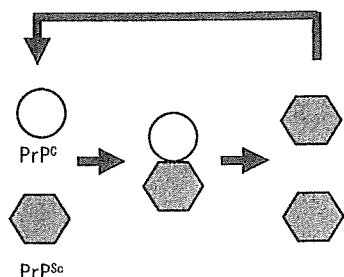
プリオンが体内に侵入すると, その主要な構成成分である PrP^{Sc} が細胞表面の PrP^C に結合し, PrP^C の高次構造を PrP^{Sc} と同じものに変化させる^{19, 20)}。こうして, PrP^C から新たな PrP^{Sc} が産生される。また, 新たに産生された PrP^{Sc} は次の PrP^C に作用し, 同様に PrP^{Sc} へと変換させる。プリオン感染脳内では, このような一連の反応が次から次へ起こり, PrP^{Sc} が次から次へと産生され, プリオンは増殖する。

2.4 発病メカニズム

プリオン病の発病メカニズムは十分に解明されていない。ノックアウトマウスにプリオンを接種しても発病しないことから, PrP^C から PrP^{Sc} の構造変換がプリオン病の発病には必要である²¹⁻²⁴⁾。また, 最近, GPI-less PrP (GPI 結合領域を欠損するために, 細胞膜に結合できず細胞外に分泌される) のトランスジェニックマウスを用いた興味深い報告がなされた²⁵⁾。これらのマウスにプリオンを感染させると, 脳内では GPI-less PrP が PrP^{Sc} に変換しプリオンの著明な増殖を起こす²⁶⁾。しかし, これらのマウスは発病しない²⁵⁾。つまりこれらの結果は, プリオンが病気を起こすためには, PrP が GPI を介して細胞膜に結合し, PrP^{Sc} へと変換することが必要であることを示した。

PrP^C が PrP^{Sc} に次から次へと変換すると, PrP^{Sc} が脳内に異常に蓄積する。従って, 脳内に蓄積した PrP^{Sc} が神経毒として機能し, 神経細胞死をもたらすと考えられる。しかし一方, PrP^C は変換により減少し, 正常機能に障害を来していると考えられる。従って, この PrP^C の機能障

A. ヘテロダイマーモデル



B. 核依存性重合モデル

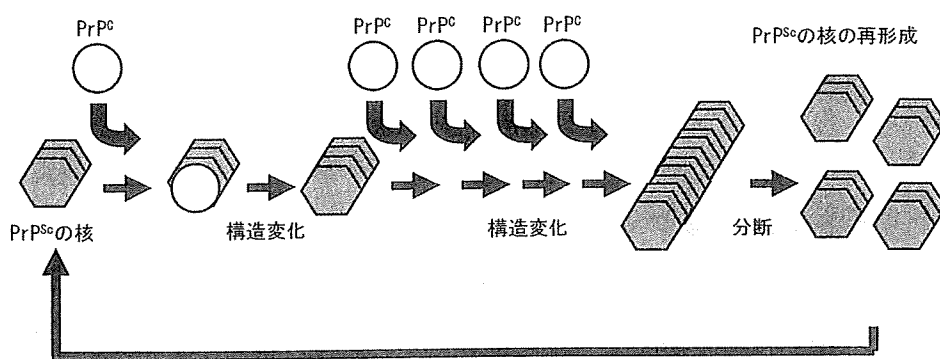


図2 PrP^c から PrP^{sc} への変換モデル

A. ヘテロダイマーモデル。1分子の PrP^{sc} が1分子の PrP^c とヘテロダイマーを形成し、PrP^{sc} の触媒的作用を通して PrP^c が構造変化を起こし、PrP^{sc} へと変換する。新しく産生された PrP^{sc} は、再び1分子の PrP^c を PrP^{sc} へと変換させる。このようにして、PrP^{sc} が産生され、プリオンは複製する。

B. 核依存性重合モデル。PrP^{sc} は複数個重合し、核 (seed) を形成する。PrP^c は、この核に順次重合 (polymerization) することにより、構造変化を起こし PrP^{sc} へと変換する。こうして出来た長い PrP^{sc} のポリマーは分断され、新たな PrP^{sc} の核が形成される。つまり、PrP^c は PrP^{sc} の核に重合することにより PrP^{sc} へと変換し、プリオンの増殖が起こる。

害がプリオン病の病態形成に関与している可能性が示唆される。実際、ノックアウトマウスがプリオン病の一部の病態と非常に類似した表現型 (記憶障害, 不眠, 日内リズムの異常, 脱髄など) を呈したことは、PrP^c の機能障害がプリオン病の病態形成に関与しているという考えを支持している。しかし、プリオン病の主要な病態である神経細胞死は、ノックアウトマウスでは観察されていない。

3 抗 PrP 抗体と抗プリオン活性

3.1 プリオン病の受動免疫

Whiteらは、プリオンをマウスの腹腔内に感染させた後、大量(2 mg)の抗 PrP モノクロナル抗体(ICS M 18 と 35)を感染7または30日後から375日まで1週間に2回、その後1週間に1回腹腔内に投与した²⁹⁾。その結果、抗体非投与マウス群が約190日程度でプリオン病を発病したにもかかわらず、抗体投与マウスは500日経過してもプリオン病の症状を呈しなかった²⁹⁾。これらの結果は、抗 PrP 抗体がプリオン病の予防に効果的であることを示し、プリオンワクチンの可能性を強く示唆した。一方、脳内に直接接種されたプリオンに対しては、抗 PrP 抗体が血液脳関門を通過できないために、何ら予防効果を示さなかった²⁹⁾。この結果は、プリオンが脳内に到達する以前に抗体を投与しなければ、抗体の予防効果が期待できないことを示した。

3.2 抗プリオン活性のメカニズム

抗 PrP 抗体がどのようなメカニズムでプリオン感染を阻害するのか、十分に解明されていない。抗 PrP 抗体を PrP^C と PrP^{Sc} の試験管内の反応液に混入すると、PrP^C から PrP^{Sc} への変換が阻害されることが報告されている^{27,28)}。この結果は、抗 PrP 抗体が PrP^C または PrP^{Sc} に結合することにより、PrP^C と PrP^{Sc} の結合を阻害し、PrP^C から PrP^{Sc} への変換を抑制する可能性を示した。また、抗 PrP 抗体が PrP^C と結合し、PrP^C の細胞内分解を促進するという報告もある²⁹⁾。従って、抗 PrP 抗体のプリオン感染阻止は、抗 PrP 抗体が PrP^C の分解を促進し、PrP^C から PrP^{Sc} への反応を抑制するためとも考えられる。また興味深いことに、抗 PrP 抗体は既にプリオンに感染し PrP^{Sc} を大量に産生している細胞にも効果を示し、PrP^{Sc} 及びプリオンの産生を阻害する^{30,31)}。従って、抗 PrP 抗体はプリオン感染の初期の段階を阻害すると共に、この初期の阻害機構を逃れて細胞に感染してしまったプリオンに対しても効果を示し、プリオン感染を抑制していると考えられた。

4 プリオンワクチン

4.1 免疫寛容

プリオンは細菌やウイルスなどの通常の病原微生物と異なり、宿主にコードされた PrP がその主要な構成成分となっている。従って、宿主は PrP に対して既に免疫寛容であり、プリオンを異物として認識できない。このために、プリオンが感染しても、宿主は免疫反応を惹起せず、抗体も産生しない。この点が細菌やウイルスをターゲットにしたこれまでのワクチンと異なり、