

クラスリン被覆構造と PrP^{Sc} の細胞内輸送

研究分担者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究協力者：山崎 剛士 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究要旨

プリオン持続感染マウス神経芽腫細胞(ScN2a-3)における PrP^{Sc} の細胞内局在の特徴的な所見の一つとして、PrP^{Sc} が核近傍のリサイクリングエンドソーム(RE)やトランスゴルジネットワーク(TGN)に隣接した領域に観察される。各種マーカー分子と PrP^{Sc} の蛍光抗体二重染色により、核近傍に存在する PrP^{Sc} は、エンドソームから TGN への小胞輸送に関わる因子 Vacuolar protein sorting 35(Vps35)やクラスリン重鎖(CHC)と共局在したことから、PrP^{Sc} がレトロマーやクラスリン被覆小胞などの輸送小胞に存在するかについて検討した。N2a-3 および ScN2a-3 の除核画分を密度勾配超遠心により分画したところ、PrP と CHC が同じ画分から検出された。また、抗 CHC 抗体を用いてミクロソーム画分を免疫沈降すると、PrP^{Sc} が共沈降したことから、少なくとも一部の PrP^{Sc} はクラスリン被覆小胞に存在することが示唆された。エンドソームから TGN への輸送に関わることが知られているクラスリンアダプター蛋白質 Clint1 も抗 CHC 抗体と共沈降し、Clint1 も核近傍の PrP^{Sc} と一部共局在した。Clint1 の発現を siRNA の導入により抑制したところ、核の近傍で検出された PrP^{Sc} は細胞内に点在する像として検出されるようになった。以上の結果から、PrP^{Sc} の細胞内輸送経路の一つとして、Clint1 依存性のクラスリン被覆小胞を介するエンドソームから TGN への輸送経路が関与すると考えられる。

A. 研究目的

プリオンの増殖機構の解明は、プリオン増殖を標的としたプリオン病の予防・治療法を確立するために重要である。プリオンの主要構成要素である PrP^{Sc} の細胞内局在を明らかにすることは、プリオンの増殖機構を解明する一助となる。プリオン感染動物の中樞神経系組織やプリオン持続感染細胞で、PrP^{Sc} は初期/リサイクリングエンドソーム(EE/RE)、後期エンドソーム/多胞体(LE/MVB)、リソソーム、核近傍のコンパートメントなど、細胞内膜輸送に関係するオルガネラに存在することが報告されている¹⁻⁶⁾。

我々は、PrP^{Sc} が核近傍のオルガネラに存

在することに興味を持ち、エンドソームからトランスゴルジネットワーク(TGN)への物資の輸送に関与する分子や、TGN や RE に輸送される分子と PrP^{Sc} の共局在について解析を進めてきた。その結果、核近傍の PrP^{Sc} が、エンドソームから TGN への蛋白輸送に関与するレトロマーの構成要素やクラスリン重鎖と共局在することを見出した。そこで、PrP^{Sc} がレトロマーやクラスリン被覆小胞に存在するか否かを生化学的な手法を用いて解析するとともに、これらの細胞内蛋白輸送機構が PrP^{Sc} の細胞内輸送に関与するかについても検討した。

B. 研究方法

- 1) 蛍光抗体法：プリオン 22L 株および Chandler 株が持続感染したマウス神経芽腫細胞サブクローン (ScN2a3-22L および ScN2a3-Ch) を用いた。細胞を 4% sucrose を含む 4% paraformaldehyde-PBS を用いて 37°C で 10 分間固定した。0.1 M glycine-PBS を用いて残存する paraformaldehyde を中和した後、0.1% saponin-PBS を用いて細胞膜の透過処理を行った後、免疫染色を実施した。PrP^{Sc} の特異的検出のために、固定後の細胞を 5M GdnSCN で 10 分間処理した。抗 PrP 抗体として mAb 132 を用いた。
- 2) 密度勾配遠心法：N2a-3 および ScN2a-3-22L をダウンス型ホモジナイザーで破壊し、2,000 x g の遠心の上清を除核画分 (PNS) とした。PNS を、Optiprep を用いた密度勾配超遠心により 12 画分に分画した。分画後の画分を超遠心により沈殿させた後、イムノブロット法により解析した。
- 3) 免疫沈降法：N2a-3 および ScN2a-3-22L のマイクロソーム画分から各種抗体 (抗クラスリン重鎖 [CHC] 抗体、抗 Vacuolar protein sorting 26 [Vps26] 抗体、および抗 PrP 抗体 [mAb 31C6]) と protein G 結合磁性ビーズを用いて免疫沈降を行った。マイクロソーム画分は界面活性剤未処理および 2% Triton X-100 処理したものをを用いた。免疫沈降物をイムノブロット法により解析した。
- 4) siRNA による Clint1 遺伝子の発現抑制：35mm dish で培養した細胞に 1ml の OPTI-MEM を加えた。200nM の siRNA を含む OPTI-MEM と 28μg/ml の Lipofectoamine 2000 を含む OPTI-MEM を等量ずつ混合し、室温で 20 分間静置した。その後、250μl の混合液を細胞に添加した。24 時間後に培地を交換した。60 時

間後、mRNA 発現解析および WB 解析のためにサンプリングした。

蛍光抗体法に使用する場合は、Lab-Tek II CC2 eight-well chamber slide で培養した細胞に、siRNA を導入した。

(倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

PrP^{Sc} が ScN2a3-22L 内で、レトロマーあるいはクラスリン被覆小胞などの膜小胞に存在するかどうかを調べるために、細胞の除核画分 (PNS) を、Optiprep を用いた密度勾配遠心法により分画し、PrP がレトロマー構成要素 (Vps26) あるいはクラスリン被覆小胞の構成要素 (CHC) と同一画分に存在するかについて解析した (図 1)。その結果、相対的に蛋白量の少ない分画 4-6 で PrP、CHC、Vps26 がともに検出された。そこで、抗 CHC 抗体および抗 Vps26 抗体を用いてマイクロソーム画分を免疫沈降して、沈降物中の PrP を調べた (図 2)。この際、膜小胞を維持した条件 (界面活性剤未処理) と膜小胞を破壊した条件 (界面活性剤処理) で免疫沈降を行い、小胞との付随について検討した。プリオン非感染細胞である N2a3 の PNS を抗 Vps26 抗体で免疫沈降した場合、Vps26 は沈降物中に確認できたが、PrP^C は共沈降しなかった。一方、抗 CHC 抗体で免疫沈降した場合は、わずかに PrP^C が共沈降した。抗 PrP 抗体による免疫沈降では PrP^C は検出されないこと、また、マイクロソーム画分を界面活性剤処理した場合は、CHC と PrP^C の共沈降は起こらないが抗 PrP 抗体で PrP^C が免疫沈降されることから、僅かではあるがクラスリン被覆小胞に付随する PrP^C の存在が示唆された。

プリオン持続感染細胞 ScN2a3-22L のミ

クロソーム画分を抗 Vps26 抗体で免疫沈降しても PrP^{Sc} は共沈降しなかった。一方、抗 CHC 抗体で免疫沈降した場合は、PrP^{Sc} が共沈降した。界面活性剤で処理したマイクロソーム画分からは PrP^{Sc} は共沈降しなかったこと、および、抗 PrP 抗体で沈降してくる PrP は PrP^{Sc} 様のバンドパターンを示すことから、ScN2a3-22L 中に存在する PrP^{Sc} の一部はクラスリン被覆小胞に存在することが明らかとなった。また、抗 CHC 抗体で CHC のアダプター分子である Clint1 も共沈降することが確かめられた。

Clint1 はエンドソームから TGN への輸送に関わるクラスリン被覆小胞のアダプター分子である。蛍光抗体法で、Clint1 と核周囲の PrP^{Sc} が一部共局在したことから(結果は示さず)、Clint1 が PrP^{Sc} の細胞内輸送に関与するかについて検討した。Clint1 に対する siRNA を ScN2a3-22L に導入した場合、Clint1 の発現が低下した細胞では、PrP^{Sc} が顆粒状に細胞内に広く分散する像が認められた(図 3)。Clint1 の siRNA の導入により、エンドソームから TGN への輸送が障害されることは、Clint1 の発現抑制により細胞に添加した志賀毒素βサブユニットが、TGN へ輸送されずに細胞内に顆粒状に散在したことから確認できた(結果は示さず)。従って、PrP^{Sc} の細胞内輸送に Clint1 をアダプター分子として持つクラスリン被覆小胞が関与することが示唆された。

D. 考察

プリオン感染細胞から調整したマイクロソーム画分を用いた場合、界面活性剤非存在下では、PrP^{Sc} は CHC と共沈降した。この画分は蛋白分解酵素で処理していないにもかかわらず、N 末端が消化された PrP^{Sc} 様のバンドが検出されたことから、クラスリン被覆小胞に存在する PrP^{Sc} の多くは、既に内在性の蛋白分解酵素で N 末端が消化されていると考え

られた。一方、非感染細胞から調整したマイクロソーム画分を抗 CHC 抗体で免疫沈降しても PrP^{Sc} はごく僅か検出されるのみであった。従って、クラスリン被覆小胞は PrP^{Sc} の細胞内輸送にはそれほど関与していない可能性もある。このことは、クラスリン被覆小胞が関与する細胞内輸送系路は PrP^{Sc} の産生の場合として関与する可能性が低いことを示唆すると考えられる。

Clint1 の発現抑制により局在が変化した PrP^{Sc} は Lamp2 と共局在するようになったことから(結果は示さず)、Clint1 の発現抑制により PrP^{Sc} は LE/MVB に分布するようになったと考えられる。しかし、PrP^{Sc} 量は減少しなかった(結果は示さず)。Clint1 の発現抑制により、TGN からリソソームへの水解酵素の輸送が障害を受けていることも考えられる。この点を明らかにするために、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸レセプター等の細胞内動態を併せて解析する必要がある。

E. 結論

プリオン持続感染マウス神経芽腫細胞(ScN2a3-22L)の核近傍に存在する PrP^{Sc} は、クラスリン重鎖(CHC)および、エンドソームから TGN への輸送に関与するクラスリン被覆小胞に存在するクラスリンアダプター蛋白質 Clint1 と共局在した。また、密度勾配超遠心法および免疫沈降法により、クラスリン被覆小胞に PrP^{Sc} が存在することが確かめられた。Clint1 の発現を siRNA により抑制したところ、核近傍に存在 PrP^{Sc} は細胞内に散在するようになったことから、Clint1 依存性クラスリン被覆小胞は、エンドソームから核近傍への PrP^{Sc} の輸送に関与すると考えられる。

[参考文献]

- 1) Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected

- cultured cells. *J Cell Biol.* 110: 2117-2132, 1990
- 2) McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest.* 65: 622-630, 1991
 - 3) Jeffrey M, Goodsir CM, Bruce ME, McBride PA, Scott JR. Infection-specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie-infected mice. *Ann N Y Acad Sci.* 724: 327-330, 1994
 - 4) Pimpinelli F, Lehmann S, Maridonneau-Parini I. The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central-but not peripheral-derived neuronal cell lines. *Eur J Neurosci.* 21: 2063-2072, 2005
 - 5) Godsave SF, Wille H, Kujala P, Latawiec D, DeArmond SJ, Serban A, Prusiner SB, Peters PJ. Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J Neurosci.* 28: 12489-12499, 2008
 - 6) Veith NM, Plattner H, Stuermer CA, Schulz-Schaeffer WJ, Burkle A. Immunolocalisation of PrP^{Sc} in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol.* 88: 45-63, 2009
- G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)
1. 論文発表
 - 1) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J Virol.* 83: 3852-3860, 2009
 - 2) Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions *J Virol.* 83: 5918-5927, 2009
 - 3) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology.* 394: 200-207, 2009
 - 4) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol.* 91: 563-569, 2010
 - 5) Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., and Kinjo, M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009: in press.

F. 健康危険情報

本研究の実施に起因する、健康上の問題を生じた事例は発生していない。

2. 学会発表

- 1) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of

- mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
- 2) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 3) Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 4) Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y., and Ishiguro, N. PrPSc degradation pathway in macrophages. Prion2009, Porto Carras, Greece, 2009.9.23-25
 - 5) Horiuchi, M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, 2009.10.30
 - 6) 中満智史, 黒川彩, 山崎剛士, 瓜生匡秀, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン持続感染細胞における蛋白質分解酵素抵抗性 PrP の量的変動に関する因子の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009. 8.29-30
 - 7) 坂田啓司, 堀内基広, 高橋泉, 金城政孝. 蛍光相関分光法による可溶性 PrP オリゴマー形成過程の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009.8.29-30
 - 8) 酒井景子, 長谷部理絵, 宋昌絃, 堀内基広. Cd14 分子のプリオン病病態への関与. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009. 10.25-27
 - 9) 山崎剛士, 中満智史, 鈴木章夫, 堀内基広. クラスリン被覆構造は PrPSc のトランスゴルジネットワークへの輸送に關与する. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009. 10.25-27
 - 10) 宋昌絃, 長谷部理絵, 堀内基広. 骨髄由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に關与する因子の解析. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009.10.25-27
 - 11) 大澤夏生, 宋昌絃, 鈴木章夫, 堀内基広. 抗 PrP 抗体の末梢投与によるプリオン病の治療効果. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009.10.25-27
 - 12) 堀内基広. 異常型プリオン蛋白質の細胞内局在. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 2009「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」. 大阪. 2009. 7.13-14
 - 13) 堀内基広. 遺伝子を持たないプリオンは変異し得るか? 第 12 回日本進化学会. 札幌. 2009.9.2-4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

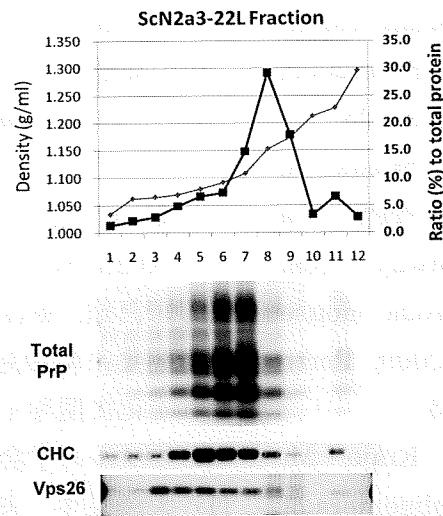


図1 ScN2a3-22Lの除核画分の密度勾配遠心による分画

グラフは各画分の密度(Density, 灰色)と各画分の蛋白質の総量を 100%としたときの蛋白質の相対量(Ratio to total protein, 黒色)を示す。各画分中の総 PrP(Total PrP)、クラスリン重鎖(CHC)、および Vacuolar protein sorting 26 (Vps26)をイムノブロット法により検出した

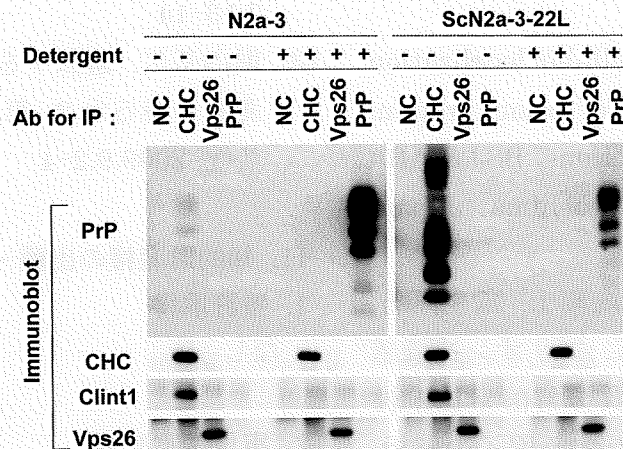


図2 クラスリン重鎖と PrP^{Sc}の免疫共沈

プリオン非感染 N2a3 および 22L 株感染 N2a3 細胞のマイクロソーム画分を写真上に示した抗体で免疫沈降した(Ab for IP)。沈降物を抗 PrP 抗体、抗 CHC 抗体、抗 Vps26 抗体、および抗 Clint1 抗体でイムノブロット法により解析した。

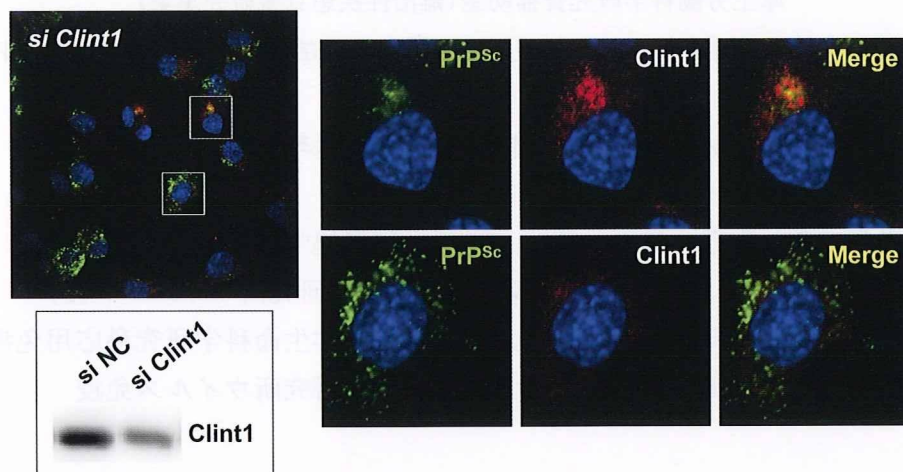


図3 Clint1 の発現抑制による PrP^{Sc} の局在の変化

ScN2a3-22L に Clint1 に対する siRNA を導入した。導入効率は約 50% であり、左上に示した弱拡大図には、Clint1 (赤) が強く染色される細胞と、弱い染色像を示す細胞が混在する。免疫ブロット法で Clint1 を定量したところ、陰性対象の siRNA (siNC) を導入した細胞に比べ Clint1 に対する siRNA (siClint1) を導入した細胞では、Clint1 の発現量は約 50% 程度に低下していた。Clint1 の発現が低下していない細胞では、PrP^{Sc} の蛍光は核周囲で強く認められたが (写真上段)、Clint1 の発現が低下した細胞では、PrP^{Sc} が細胞内に散在して認められた (写真下段)

プリオン病における酸化ストレス関与に関する研究

研究分担者：作道 章一 琉球大学医学部保健学科生体代謝

(大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫)

研究協力者：小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫

研究協力者：生田 和良 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫

研究要旨

最近の研究報告では、プリオン感染時の脳内では異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の増加と正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の減少が生じていることが示されつつあり、これにより脳内の酸化ストレス動態が変化することが考えられることから、感染時の脳内酸化ストレス動態の経時的解析と免疫組織学的解析を行った。その結果、DNA 酸化損傷、脂質酸化損傷、蛋白質酸化損傷のいずれの酸化ストレスマーカーについても、プリオン感染により感染後 20 日の初期から増加していることが明らかとなった。さらに、小脳と大脳の両方でプリオン蛋白質(PrP)の蓄積が確認され、PrP 蓄積細胞と脂質の酸化マーカー(4-Hydroxy-2-nonenal: 4-HNE)陽性細胞が一致していた。以上の結果から、プリオン感染時には酸化ストレス増大が起こることが示唆され、抗酸化ストレス制御の破綻が生じているものと考えられた。

A. 研究目的

これまでに我々はプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を樹立し、この HpL が無血清培地下においてアポトーシスを起こすとともに、PrP 遺伝子の再導入により抗酸化ストレス活性が上昇しアポトーシス抑制が観察されることを報告してきた^{1,2)}。さらに、最近の研究報告では、プリオン感染時の脳内では異常型 PrP(PrP^{Sc})の増加と正常型 PrP(PrP^C)の減少が生じていることが示されつつあり、PrP^C 欠乏による抗酸化能低下と PrP^{Sc} 蓄積による酸化ストレス増大が起きている可能性が考えられた。そこで、本研究では、プリオン感染動物脳内の酸化ストレス動態の解析を、ウェスタンブロッティングによる経時的解析と免疫組織化学染色による組織局在検索により行った。これらの解析から、プリオン病発症メカニズムにおける酸化ストレス代謝の関与につ

いて検討を行った。

B. 研究方法

マウススクレイピー(Chandler)感染脳ホモジネートを脳内接種後 0 日、20 日、40 日、80 日および発症期に脳を経時的に回収し、ホモジネートを作製後、DNA 酸化損傷マーカー(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG)、脂質酸化損傷マーカー(4-Hydroxy-2-nonenal: 4-HNE; hexanoyl-lysine: HEL)、蛋白質酸化損傷マーカー(dityrosine: DT; Methylglyoxal: MG)の変化をウェスタンブロッティングにより解析を行った。また、マウススクレイピー(Chandler および Obihiro)感染後発症期のマウス大脳および小脳については常法により浸漬固定、パラフィン包埋、組織標本(4 μm)の作製を行った後、抗 PrP 抗体(P8)、抗 8-OHdG 抗体および抗 4-HNE 抗体を用いて、組織切片の蛍光染色

を行った。

(倫理面への配慮)

プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセーフティー委員会および琉球大学医学部病原体等安全管理委員会の規定に従って行った。動物実験は大阪大学微生物病研究所動物委員会の規定に従って行った。

C. 研究結果

マウスへの Chandler プリオン感染後の脳内酸化ストレス動態解析の結果、DNA 酸化損傷マーカー8-OHdG、脂質酸化損傷マーカー(4-HNE、HEL)、蛋白質酸化損傷マーカー(DT、MG)のいずれについても、感染により増加していることが明らかとなった(図 1)。また、8-OHdG や 4-HNE について、大脳と小脳における陽性細胞の分布を調べた結果、いずれの部位もプリオン(chandler、Obihiro)感染により陽性細胞の割合および数が共に増加していた(図 2、3)。さらに、PrP 蓄積細胞と酸化ストレスマーカー陽性細胞の共染色を行った結果、4-HNE 陽性細胞に PrP 蓄積細胞と一致するものが多く観察された(図 3)。

D. 考察

プリオン感染脳において酸化ストレスマーカーの上昇が見られたことから、プリオン感染により酸化ストレス代謝の破綻が生じていることが考えられた³⁾。

E. 結論

最近の研究報告では、プリオン感染時の脳内では PrP^{Sc} の増加と PrP^C の減少が生じていることが示されつつあり、これにより脳内の酸化ストレス動態の変化が起こることが考えられる。

[参考文献]

1) Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A,

Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. Nature. 400: 225-226, 1999

2) Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. Mini-Rev Med Chem. 6: 589-601, 2006

3) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. Curr Med Chem. 16: 380-389, 2009

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. Curr Med Chem. 16: 380-389, 2009

2. 学会発表

- 1) 作道章一. 正常型プリオン蛋白質の機能解析. 第149回日本獣医学会学術集会. 東京, 2010.3.26~28
- 2) 阿野泰久, 作道章一, 梶村佳史, 生田和良, 小野寺節. スクレーピー感染マウス脳における酸化ストレス障害. 第147回日本獣医学会学術集会. 栃木, 2009.4.2~4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1

プリオン感染マウス脳での酸化ストレス動態

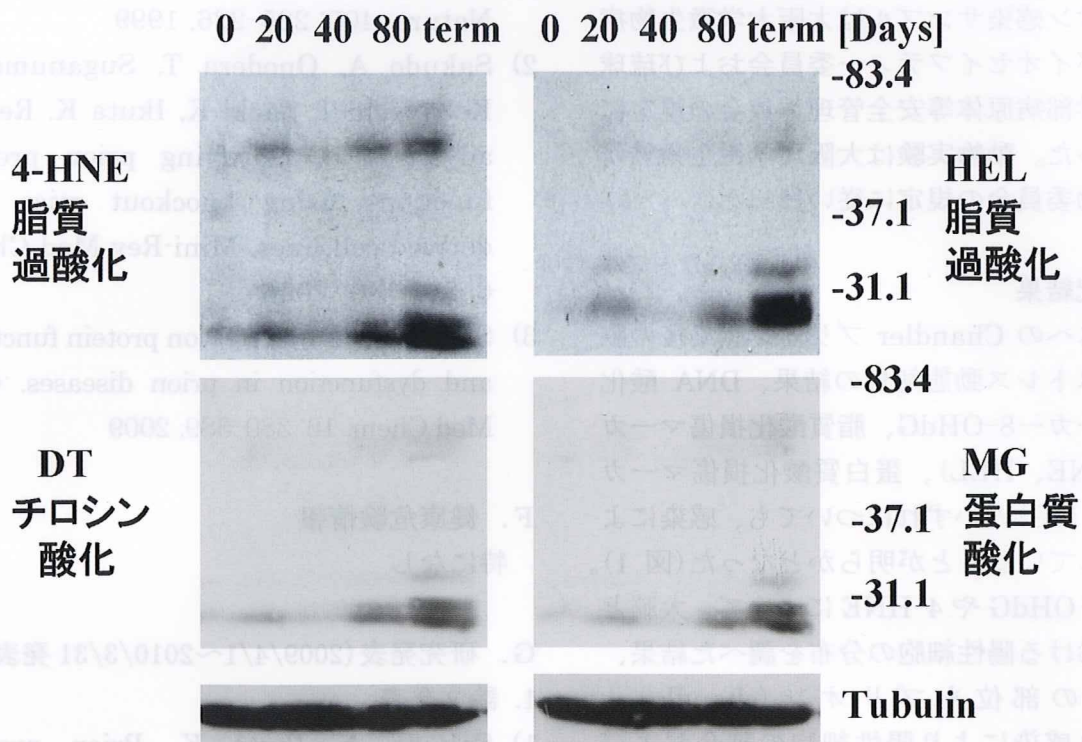
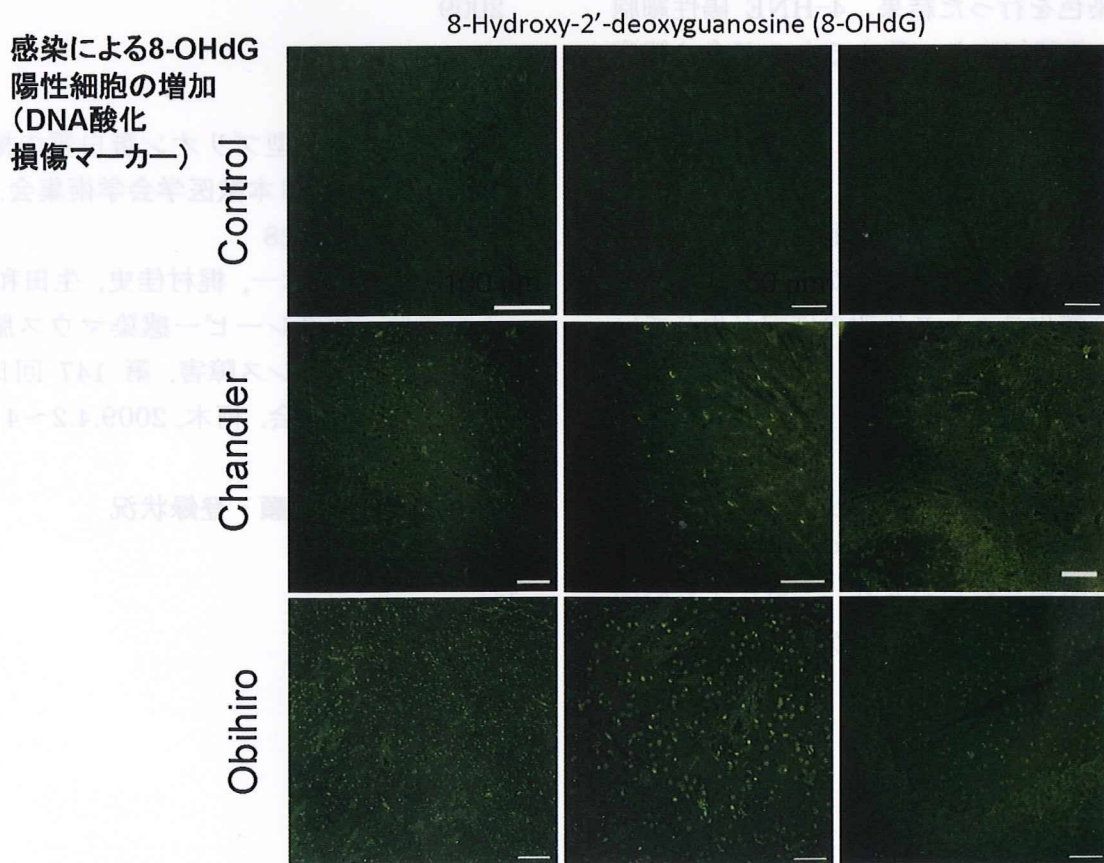


図2



進行性多巣性白質脳症(PML)診療、1年間の進歩 —生物学的製剤の関連およびメフロキンの位置づけに関して—

研究協力者：雪竹 基弘 佐賀大学医学部附属病院 神経内科

研究要旨

2009年に報告されたPMLの診断・治療に関する論文を中心に検索した。昨今注目されている Monoclonal antibody-associated PML と、メフロキン(Mefloquine)の抗JCウイルス作用、PML治療への可能性を中心に報告した。

生物学的製剤との関連では、Rituximab、Natalizumab、Alemtuzumab および Efalizumab でのPML発症が知られており、これらのモノクローナル抗体はそれ自体単剤でPMLの原因となることが示されている。

メフロキンの抗JCウイルス作用はPML治療における新しい薬剤としての位置づけが期待される。今後の症例の積み重ねとともに、エビデンスレベルの高い臨床研究の介入が望まれる。

A. 研究目的

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)は稀な疾患ではあるものの、HIV感染者の増加や免疫抑制剤などの適応拡大による汎用が行われている事や、近年のRituximab、Natalizumab Alemtuzumab や Efalizumab といった生物学的製剤投与との関連など日常診療においても留意すべき疾患となってきた。特に生物学的製剤との関連は Monoclonal antibody-associated PML 等の名称で論じられ始めている。

また、治療においてはマラリアの予防および治療に用いられるメフロキン(Mefloquine)に抗JCウイルス作用があることが In vitro のJCウイルス感染の実験系において2009年に発表された。

本研究では、PMLの現在の診断・治療を把握し、より効率の良い治療法の検討/新規治療法への可能性を模索するため、この1年間に発表されたPMLの診療に関する論文をレビューした。本年はその中で生物学的製剤と

PMLおよびメフロキンとPMLに焦点をあてて報告する。

B. 研究方法

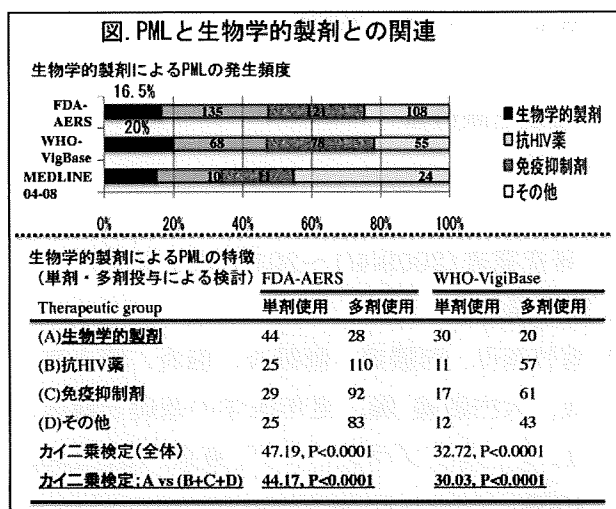
(倫理面への配慮)

主にPubMedを利用して、2009年に報告されたPMLの診断および治療に関する論文を検索した。

C. 研究結果

生物学的製剤との関連では、これまでに Rituximab、Natalizumab、Alemtuzumab および Efalizumab でのPML発症が知られている。他の免疫抑制剤等とともに、Rituximab、Natalizumab および Alemtuzumab を比較した報告では、他の古典的な免疫抑制剤や抗HIV薬使用時のPMLの場合、併用薬があるのに対して、これらのモノクローナル抗体はそれ自体単剤でPMLの原因として疑われるとされている(図)。特に自己免疫疾患にモノクローナル抗体を使用する場合、非常に強い

関連があると結論されている(1)。



また、Rituximab、Natalizumab および Efalizumab を比較した報告では、PML の発生率は Rituximab で 1/4000(SLE)、Natalizumab で 1/1000、Efalizumab では 1/400(3年以上治療の患者)とされている。また、死亡率はそれぞれ 89%(51/57)、23%(3/13)、66.6%(2/3)であった(表1)(2)。

表1. 各生物学的製剤におけるPML

	Rituximab	Natalizumab	Efalizumab
Target	Anti-CD20	Binds to the $\alpha 4$ -integrin	Anti-CD11
主な標的細胞	B細胞	T細胞	T細胞
PML発生数(死亡率)	57例(89%)	13例(10例は単剤投与)(23%)	3例(66.6%)
発生率	1/4000(SLE): 適応外使用	1/1000	1/400 (3年以上Efalizumabによる治療を受けた場合のもの)
	リンパ腫や関節リウマチでの率は示されていない。		

メフロキンと PML に関しては、In vitro の JC ウイルス感染の実験系において、2000 種類の薬剤等のなかから数種類の薬剤に著明な抗 JC ウイルス作用があることが認められ、その中で中枢神経への良好な移行を示すのはメフロキンのみであったことが報告されている。この報告では、メフロキンの抗 JC ウイルス作用はウイルスが細胞へ侵入することを防ぐのではなく、JC ウイルスが細胞内で増殖するのを阻害することされている(3)。

臨床において PML 治療にメフロキンを使

用した症例の論文はないが(報告書作成時点)、日本において数例の学会発表が行われている。どの例も非 HIV-PML である(表2)。概して効果が期待される報告であり、今後も症例の蓄積が期待される。

表2. PML治療にメフロキンを使用した症例(本邦例)

	43歳男性 (田中こずえら)	67歳男性 (川本未知ら)	60歳男性 (平山幹生ら)
基礎疾患	急性骨髄性白血病	全身性エリテマトーデス	基礎疾患なし
治療前の状態	ほぼ寝たきり 経口摂取困難	寝たきり 経口摂取困難	パーキンソン症候群
治療後の状態	反応性の改善 経口摂取可能	会話がスムーズ 見当識・記憶力の改善	軽度神経症状改善
頭部MRI等	画像異常の改善	病巣拡大の停止	-
効果の判断	改善	改善	-

D. 考察

生物学的製剤との関連では、Rituximab、Natalizumab、Alemtuzumab および Efalizumab での PML 発症が知られており、これらのモノクローナル抗体は単剤で PML の原因として示されていることが重要である。今後もこれらの薬剤は非腫瘍系疾患に広く使用される方向であり、PML に関しても厳重なモニタリングが必要と考えられる。

メフロキンの抗 JC ウイルス作用は PML 治療の本年における大きなニュースである。論文での PML に対するメフロキン治療の報告はまだないが、本邦の学会レベルでは報告が散見され始めている。概して効果が期待される報告であり、今後の症例の積み重ねとともに、エビデンスレベルの高い臨床研究の介入が望まれる。

E. 結論

2009年に報告されたPMLの診断・治療に関する論文を検索した。Rituximab、Natalizumab、Alemtuzumab および Efalizumab といった生物学的製剤との関連とメフロキンの抗 JC ウイルス作用は今後の PML 診療における新しい方向性を示す知見と考えられる。

[参考文献]

- 1) Piccinni C, et al. Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents. Eur J Clin Pharmacol. 2009; [Epub ahead of print]
 - 2) Carson KR, et al. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. Lancet Oncol. 10: 816-824, 2009
 - 3) Brickelmaier M, et al. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 53: 1840-1849, 2009
 - 4) 田中こずえら. 臍帯血移植後に発症した PML のメフロキン治療の試み(会). 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ワークショップ. 2009.7.17
 - 5) 川本未知ら. 全身性エリテマトーデス (SLE) に合併した PML の 1 例(会). 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ワークショップ. 2009.7.17
 - 6) 平山幹生ら. メフロキンで治療を試みた進行性多巣性白質脳症の 1 例(会). 神経感染症. 14: 161, 2009
- F. 健康危険情報
特になし。
- G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)
1. 論文発表
 - 1) 雪竹基弘. 脳膿瘍, 髄膜炎, 脳炎. 浦上克哉, 大内尉義 編, 老年医学の基礎と臨床 II. ワールドプランニング, 東京, 151-156, 2009
 2. 学会発表
なし。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

PML の治療としてメフロキンの使用経験 5 例

研究分担者：岸田 修二 東京都立駒込病院 脳神経内科

研究協力者：田中こずえ 東京都立駒込病院 脳神経内科

研究協力者：味澤 篤 東京都立駒込病院 感染症科

研究協力者：船田 信顕 東京都立駒込病院 病理科

研究協力者：鎌田 憲子 東京都立駒込病院 放射線科

研究協力者：平山 幹生 春日井市民病院 神経内科

研究協力者：川本 未知 神戸市立医療センター中央市民病院 神経内科

研究要旨

進行性多巣性白質脳症 (PML) の治療薬として抗マalaria薬メフロキンの有効性を検証する目的で、非 HIV 関連 PML 3 例ならびに HIV 関連 PML 2 例にメフロキン治療を試み、臨床、画像、髄液 JCV それぞれの経過観察を行った。HIV 関連 PML はメフロキン投与例と強力な抗レトロウイルス療法 (HAART) のみの症例と比較検討した。結果として、非 HIV 関連 PML ではメフロキン投与後早期から臨床的改善傾向が出現、画像は臨床に遅れて進行の停止を認めた。HIV 関連 PML ではメフロキン投与例が HAART のみに比し、在院日数の短縮と後遺症が軽度の傾向がみられた。髄液 JCV 負荷量はメフロキン投与後早期に減少していた。結論として、少数例での検討では、メフロキンは PML の治療薬として有望と思われるが、今後臨床、画像、髄液 JCV の推移など総合的に判断できるランダム化した多数例での解析を待つ必要がある。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症 (PML) は免疫不全を背景に JC ウイルス (JCV) の再活性化によって起こる死亡率の高い中枢神経脱髄疾患である。HIV 感染症の流行以前には極めて稀な疾患であったが、HIV 感染症が出現して以来発症頻度は劇的に増加し、HIV 感染者では約 4% に合併が認められている。最近では免疫を直接抑制せず、正常な免疫機能を傷害する生物製剤、natalizumab、efalizumab、rituximab などの monoclonal antibody に関連して PML が発症しており¹⁾、改めて注目されてきた。HIV 感染治療に強力な抗レトロウイルス療法 (HAART) が導入された後も、PML はほかの日和見感染症ほど発症頻度は

減少しておらず²⁾、HIV 感染者の増加、移植や自己免疫疾患などに対する免疫機能に異常を来す治療法の発達から、PML 患者は増加する可能性がある。JCV 感染から PML を発症する病態が十分解明されていないため、根本的治療や予防法は現在のところ認められていない。本症は非 HIV 感染者ではほぼ 3 ヶ月以内に致死的となる。HIV 感染関連でも HAART が導入される以前には 1 年以上生存する率は 10% 以下であった。HAART が導入され 1 年以上生存する率は約 50% にまで増加したが、ほとんどが高度な後遺症を残している。JCV 特異免疫の回復が重要であるが、非 HIV 感染にとっては免疫抑制剤ないし調整剤の中止は基礎疾患の増悪あるいは移植片の

排除を来してしまう。以上の観点から HIV、あるいは非 HIV いずれの場合でも JCV に特異的に作用する薬剤が必要であるが、これまで使用された ara-C、cidofovir などの薬剤による効果はいずれも一定した効果は認められていない。2009 年抗マラリア薬メフロキンが in vitro で抗 JCV 作用を持つことが明らかになり³⁾、PML に対して臨床試験が開始されようとしていたので⁴⁾、その有効性を確かめるために数例の HIV 関連、非 HIV 関連 PML に試用してみた。

B. 研究方法

非 HIV 感染ならびに HIV 感染に関連して発症した PML 症例を対象に、抗マラリア薬メフロキンの有効性を臨床経過、画像検査、髄液 JCV ウイルス検査から検討した。HIV 関連 PML に関しては HAART のみの群との相違を在院日数と後遺症の点から比較検討した。

メフロキンの投与量と投与計画は Biogen Idex の投与計画⁴⁾に準じたが、本邦ではメフロキンは 275mg/錠であるため、275mg/日×3 日連日投与、翌週から 275mg を週一回、6 ヶ月間の投与を 1 コースとした。但し症例 1 はまだ投与計画発表前であったので、マラリア治療に準じ初日に 1100mg 服用、その翌週から 275mg/週、一回投与で経過をみた。

症例の概略を述べる

症例 1. 67 歳男性(神戸市立医療センター中央市民病院症例)。SLE で prednisolone (PSL) 20mg/日内服中に、左下肢の筋力低下が出現した。脳 MRI 拡散強調画像で右前頭葉に高信号域が認められたため、脳梗塞と診断されたが、その後徐々に進行するため精査目的で入院した。入院時左下肢にのみ遠位優位の筋力低下を認めた。血液検査では CRP 2mg/dl、赤沈 1 時間値 54mm と軽度な亢進を認めたが、SLE の増悪を示唆する所見はな

かった。髄液検査では細胞数 11/3、蛋白 46mg/dl、糖 50mg/dl、細菌・真菌・結核菌培養陰性で、JCV を含め各種ウイルス PCR 検査は陰性であった。CNS ループス、多発性硬化症などを疑いステロイドパルスを行ったが、症状の増悪と病変の拡大を認めたため、開頭脳生検を施行した。病理組織像ならびに免疫染色所見、脳組織からの JCV-PCR 陽性所見から PML と診断した。診断後直ちに PSL の減量、risperidone、cidofovir、γグロブリンなどの投与を開始したが、病状は進行し、対側から脳幹にも病巣は広がり、四肢麻痺、球麻痺、高次脳機能障害を来し、寝たきり、経管栄養状態となった。そのためメフロキンを治療開始から一ヶ月目から追加(初日 1100mg、以後 275mg/週)したところ、投与開始 2 週目から症状の進行は停止し、覚醒時間が増加、右上下肢の麻痺が軽減した。その後も症状は改善傾向を示し、高次機能も改善が見られた。メフロキン開始一ヶ月後の MRI ではまだ病巣の軽度な拡大がみられたが、2 ヶ月後には病巣の拡大や新たな病巣の出現は見られなくなった。メフロキン長期使用に伴う副作用は見られず、7 ヶ月投与後中止したが、その後臨床、画像とも再燃の徴候はなく、高次脳機能障害はほぼ消失、介助歩行に至っている。

症例 2. 60 歳男性(春日井市民病院症例)

基礎疾患は明らかではない。入院 6 ヶ月前に左上肢、次いで下肢の振戦が出現し、3 ヶ月前に神経内科受診となった。初診時左上下肢の軽度な筋固縮と安静時振戦が見られたためパーキンソン症候群と診断されたが、抗パーキンソン病薬は無効であり、3 週間前から急速に歩行障害が悪化、左上肢が不自由になったために入院となった。入院時神経学的には中等度な左不全片麻痺と左上下肢の深部反射軽度亢進、左上下肢の振戦と軽度な筋固縮を認めた。検査では ALP 792 IU/L、抗 TPO 抗体

60 U/L 以上、抗 TG 抗体 100 U/L 以上、sIL2R 2371 U/L と高値を認めたが、抗 HIV 抗体、ATLA 抗体などは陰性であった。髄液検査では異常なく、JCV-PCR も陰性であった。脳 MRI T2 強調画像では右中心前回皮質下白質に高信号域を認めた。入院第 16 病日にステロイドパルス療法を施行したところ、一時的に左下肢の脱力が改善したが、第 20 病日右上肢の振戦出現、その後構音障害、左片麻痺の悪化を認めた。第 22 病日に行った MRI では、右中心前回皮質下白質の病巣は拡大し、さらに新しく右島白質、視床に新病巣が見られた。23 病日に再度ステロイドパルス療法を行い、一時的に左下肢の脱力が改善したが、第 29 病日の MRI では反対側にも病巣が出現した。この時点で PML が疑われ右前頭葉の脳生検を施行し、病理組織学的ならびに免疫組織学的、電子顕微鏡的に JCV を確認し、炎症反応を伴う PML と診断された。第 30 病日には左片麻痺は高度となり、その後右不全片麻痺が出現、無動無言状態となった。第 37 病日には見当識障害、構音障害の改善が軽度に見られた。第 48 病日の脳 MRI T2 強調画像では両側島白質、右前頭葉白質に広範な高信号域、左前頭葉白質に斑状の高信号域を認めた。第 49 病日からメフロキンを初回 275mg/日×3 日、その後週 1 回 275mg の投与を開始した。投与 3 日目から右上肢の脱力はやや軽減、5 日後中等度改善した。3 週後の脳 MRI では、既存の病変の拡大と左放線冠に複数の新しい病巣が出現したが、5 週後の脳 MRI では左放線冠の異常陰影は消失し、構音障害は軽度となり、その後右片麻痺は改善し、画像、臨床症状の再燃は見られていない。

症例 3 (図 1)。昨年度報告例 6 と同一である。43 歳男性。2002 年右脛骨に発生した肉腫に対して施行された治療関連の急性骨髄性白血病に対し、2007 年 7 月及び 8 月に臍帯血移

植が行われた。免疫抑制剤も中止された。移植前に急性白血病の中樞浸潤が認められていたため、Methotrexate /Ara-c/PSL の髄腔内投与を 12 回、移植後も Ara-c/PSL の髄腔内投与が 2008 年 7 月まで 8 回行われた。

2008 年 9 月傾眠がちとなり、10 月には異常言動が出現した。11 月施行した MRI から白質脳症が疑われ当院に紹介入院となった。入院時運動優位の失語がみられたが、意思疎通は可能であった。構音障害と右軽度片不全麻痺、右錐体路徴候陽性であったが、装具を利用しての歩行は可能であった。小脳障害は認められなかった。検査所見では CD4(+)リンパ球数は 419/μL とわずかに低下しており、可溶性 IL2 受容体 1084U/ml と上昇を認める以外には血算、生化学などに異常はなく、髄液検査では細胞数は 6/3、蛋白 35.2/mg、糖 54/mg と異常は見られなかったが、JCV-DNA は 911,175 コピー/ml であった。脳 MRI では、左前頭葉から側頭葉、右前頭葉白質に T2 強調ならびに FLAIR 画像で高信号を示し、腫瘤効果や造影剤増強効果のない病巣が認められた。以上の臨床、画像、髄液所見から PML と診断した。なお肝臓および腸骨に肉腫の再発転移の合併が認められた。入院後亜急性に右片麻痺の進行と活動性が低下し、傾眠傾向となり、経口摂取も困難となった。12 月中旬メフロキンを 275mg/日×3 日、その後週 1 回 275mg の投与を開始した。開始から 1 ヶ月を経過した頃に行った髄液検査では JCV-DNA は 743 コピー/ml と著減し、臨床的にも意識状態が改善し始め、経口摂取も可能となり始めた。脳 MRI では、しかし病巣の拡大がみられた。投与開始 2 ヶ月目以降の MRI 検査では病巣拡大はみられず新しい病巣も出現はなかった。3 ヶ月目に行った髄液検査では JCV は陰性化し、臨床症状の停止を認めた。メフロキン治療開始 5 ヶ月目、維持療法として 275mg/週を投与していた時期に、画像や臨床症状には再燃は見られな

ったが、髄液中で JCV が 192 コピー/ml と再び検出され、次いで 6 ヶ月目には 566 コピーと上昇したため、再度メフロキン 275mg/日×3 日、その後週 1 回 275mg 投与計画の二度目のコースを開始したところ、髄液中の JCV は陰性化、その後も臨床的、画像的に再燃無く、現在 PML を発症して 16 ヶ月現在平滑筋肉腫を担いながら自宅療養中である。

症例 4. 36 歳男性。2009 年 2 月カリニ肺炎を発症し HIV 感染と判明した。当時の CD4(+)T リンパ球数は 3 個/ μ L、HIV-RNA は 1.5×10^5 コピー/ml であった。5 月 HAART 療法が開始された。6 月中旬から徐々に左半身の運動障害が発症し入院となった。入院時神経学的には左上肢の軽度な運動麻痺、左小脳失調症状、左上下肢の深部反射亢進と Babinski 反射陽性を認めた。検査所見では CD4(+)T リンパ球数 42 個/ μ L、HIV-RNA < 400 コピー/ml、髄液では細胞数 13/3、蛋白 34mg/dl、糖 68mg/dl、JCV を含め各種ウイルス PCR は陰性であった。脳 MRI では左中小脳脚、右前頭葉、頭頂葉、左前頭葉皮質下白質に T2 強調、ならびに FLAIR 画像で高信号を示し、一部にガドリニウム造影効果を示す病巣が多発してみとめられた。免疫再構築症候群による PML を疑い、HAART 処方内容を変更し、さらにメフロキン 275mg/日×3 日、翌週から週 1 回 275mg の投与を開始した。投与開始 1 週後に左前頭葉の脳生検を施行、免疫再構築症候群を示す PML と診断した。7 月中旬からリハビリテーションを開始、一旦増悪した左片麻痺や歩行障害、高次機能障害は徐々に改善し、自立した日常生活可能となり、退院した。

症例 5. 45 歳男性。2006 年上部消化管検査の際に HIV 感染が判明し、経過を観察されていたが、途中通院しなくなった。2009 年 3 月顔面の皮疹を主訴に受診した。

梅毒陽性であり、治療を開始したが、自己中断してしまった。6 月末書字障害を訴え再受診、MRI で右前頭葉に T2 強調ならびに FLAIR 画像で高信号を示す病変を認められ、PML を疑い 7 月始め入院となった。入院時神経学的には左上下肢の軽度な運動麻痺が見られた。CD4(+)T リンパ球数 152/ μ L、HIV-RNA 7.1×10^4 コピー/ml、梅毒反応 RPR 566 R.U.、TPLA 468.6 T.U.。髄液検査では細胞数 7/3、蛋白 42.6mg/dl、糖 45mg/dl、JCV を含め各種ウイルス検査は陰性であった。梅毒 FTA-ABS は 80 倍、VDRL は 1 倍であった。臨床症状と画像所見から PML と診断し、直ちに HAART 療法とメフロキン投与を行い、梅毒に対する治療も開始した。臨床的に徐々に高次機能障害、片麻痺が増悪し、2 週後の画像でも病巣の拡大を示したが、免疫再構築症候を示唆する造影効果は見られなかった。HAART ならびにメフロキン投与開始後 5 週目の MRI では病巣の縮小傾向を認め、自覚症、左片麻痺の改善傾向を示し、62 日目に退院となった。退院時 CD4(+)T リンパ球数 256/ μ L、HIV-RNA < 50 コピー/ml と HIV 感染治療は良好にコントロールされていた。

(倫理面への配慮)

匿名化した報告であり、個人を特定できないので問題はないと考えられる。

C. 研究結果

①非 HIV 関連 PML 3 例にメフロキンを投与し臨床、画像、髄液 JCV の推移を観察した。HIV 関連 PML 2 例に対しては HAART 療法に併用してメフロキンを投与し経過観察を行った。臨床的には投与早期、早い例では 3 日後、遅くとも 6 週間後には症状の改善傾向を認め、また MRI 画像は臨床症状とかい離したが、一ヶ月遅れて病勢の停止を全例で認めた。②髄液で JCV の経過を追えた症例 3 (図) は、メフロキン投与後急速に JCV 負荷量の低

下をみ、検出限界以下となった。しかし維持療法5ヶ月後再度わずかに髄液で検出されたが、メフロキン2コース目の投与開始後即座に陰性化した。

HIV関連PML2例(症例4,5)では、HAART単独療法例に比べ、メフロキン併用群は前者で平均在院日数が256日、後方で72日と短縮傾向が伺われ、また日常生活での自立度は前者では1例であるに比べ、後者は全例であった(表1)。

すなわち今回行った少数例でのメフロキン投与試験は非HIV、HIV関連PML全例に有効であると思われた(表2)。

D. 考察

われわれは非HIV関連PML3症例、HIV関連PML2症例に対し、抗マラリア薬メフロキンを使用し、臨床、画像的に全例で有効性を確認した。また非HIV感染関連PMLの1例では髄液でJCVをモニターし、メフロキン内服治療でin vivoでもJCV増殖抑制作用のあることを確認した。

PMLの治療は現在のところ特異的治療法はなく、免疫抑制剤や調整剤、抗癌剤などPML誘発薬剤の投与を速やかに中止すること、HIV感染患者では3剤以上の抗HIV薬を用いるHAARTを行うこととなっている。HIV感染患者に伴うPMLにHAARTが延命に有効であることは、HAART導入後のコホート研究⁵⁾や自験例⁶⁾からも明らかである。しかしHAARTに関わらず約50%は無効であり、延命しても80%は高度の後遺症が残る。さらにHAART開始により早期に臨床像の悪化、放射線学的病巣数の増加や拡大、病巣に通常ではみられない造影剤増強効果や浮腫変化がみられるなど免疫再構築症候群が発症し、時に致死的となる症例も存在し、HAARTはHIV関連PMLに対して実質的有効性は少ない。一方非HIV感染に伴うPMLではHIV感染に比べ一般的に生命予後不良で、ほとん

どが9ヶ月以内に死亡するし、得にリンパ増殖性疾患では平均生存期間は3ヶ月、10ヶ月以上生存する率は12%に過ぎない⁷⁾。これまでこの予後不良疾患に対し、Ara-c、Cidofovirなど幾多の抗ウイルス剤が使用されたが、普遍的な効果は証明されていない。2004年、JCVがグリアに侵入する際にセロトニン受容体5-HT_{2A}を介することが報告され⁸⁾、5-HT_{2A}受容体拮抗薬のRisperidone、mirtazapineなど抗精神薬がPMLの新たな治療薬として登場したが⁹⁾、まだ多数例での有効性の報告はない。

2009年抗マラリア薬メフロキンがin vitroでJCVの増殖抑制作用があることが判明し³⁾、Biogen Idec社がPMLに対してその有効性を検証するスタディーが始まったのを受け、同社の許可のもとにほぼ同じ投与スケジュールで5例に使用してみた。なお適応外薬剤なので、患者家族ならびに院内倫理委員会にすべて承諾を得て行った。

症例1~3は非HIV感染症例で、特に症例2はサルコイドーシスが疑われているが基礎疾患が不明例である。症例1はPMLに対してcidofovir、risperidoneの投与にかかわらず悪化し、四肢麻痺、意識障害に至ったが、メフロキンを追加して、2週目には症状の進行停止、その後高次機能、四肢麻痺の軽快傾向を認めた。画像所見は臨床症状に遅れ、メフロキン投与2ヶ月目から進行が停止しており、再発がみられていない。症例2は左片麻痺から右片麻痺へと進行過程にあった時点でメフロキンを開始され、3日目頃から右片麻痺の改善傾向がみられ、画像も症例1と同様一旦臨床症状に反し悪化したが、5週目には画像でも改善がみられており、その後再燃はない。症例3に関しては右片麻痺、嚥下障害、意識障害へと進行過程から、メフロキン投与1ヶ月頃には意識の回復と症状の進行停止がみられ、画像でも2ヶ月後から全く進行停止が認められた。この症例ではメフロキン投与

によって投与前髄液 JCV 負荷量(911,175 コピー/ml)が1ヶ月で743 コピー/mLへと急速に低下、3ヶ月後には検出限界以下となっている。さらに維持量で経過観察中再度 JCV が少量検出されたが、再度メフロキンを増量投与することですみやかに陰性化している。この事実は、患者の免疫状態に変化が見られないことや、メフロキン以外の薬剤を併用していないことから、メフロキンの単独作用と考えられる。以上非 HIV 関連 PML に対して、臨床、画像的な観察に加え、髄液中の JCV 負荷量の推移はメフロキンの有効性を強く示唆する。

一方 HIV 関連 PML では、HAART との併用療法であり、HAART のみでも免疫再構築により病勢の進行停止、改善がみられる症例が存在するため⁶⁾、HIV 感染患者を対象としたメフロキンの効果判定は HAART 単独との延命あるいは機能的予後などを設定するべきと考えられる。従って、今回これまでに経験した HAART 単独治療例 6 例とリハビリテーションを含めた自宅退院までの在院日数と自立度を比較したところ、HAART 単独 6 例の平均在院日数 256 日に比べメフロキン併用 2 例は 72 日と著しく短縮していた。また自立度は HAART 単独では高度な後遺症のため 1 例を除き介助生活ないし死亡していたが、メフロキン併用例では全て自立生活可能なまでに回復した。これは非 HIV 感染例の JCV の推移から判断すると、メフロキンを早期から併用することにより、脳内の JCV の増殖が HAART 単独より早期に抑制、排除された結果であると思われる。

以上から非 HIV、HIV 関連 PML に対してのメフロキン使用例は全例、特に副作用も経験することなく、有効であったと判断した。しかし症例 3 の髄液 JCV 推移をみたとき、現在の投与計画では完全に脳内で JCV を押さえられない可能性があり、投与量や維持期間など再検討する必要があるかも知れない。

現在のところ PML に対するメフロキン試験は進行中であり、多数例での解析結果が待たれる。

E. 結果

非 HIV 感染に伴う 3 例の PML 患者、HIV 感染に伴う 2 例の PML 患者に対し、抗マラリア薬メフロキンを治療薬として使用してみた結果、臨床的に早期に症状の進行停止、改善がみられ、次いで MRI での画像所見でも病巣の拡大停止がみられ、その後再燃を見ていない。また髄液中の JCV 負荷量の推移を見ても明らかに増殖抑制が観察できた。以上少数例ではあるが、メフロキンは難治性の疾患である PML に対し治療薬として有望な薬剤として期待が持てる。今後多数例でのランダム化した臨床試験結果が待たれる。

[参考文献]

- 1) Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on Immunomodulatory Therapies. *Annu Rev Med.* 61: 35-47, 2010
- 2) Koralnik IJ. New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Opin Neurol* 17: 365-370, 2004
- 3) Brickelmaier M, et al. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vivo. *Antimicrobe Agents Chemother.* 53: 1840-1849, 2009
- 4) <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00746941?term=mefloquine>
- 5) Antinori A, et al. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative NeuroAIDS (IRINA). *J Neurovirol* 9(suppl.1): 47-53, 2003