

「脳を守る」

平成11年度採択研究代表者

金子 清俊

(国立精神・神経センター 部長)

「プリオン複製に関与する新しい因子の同定と プリオン病治療法開発への応用」

1. 研究実施の概要

我々の研究の目的は、プリオン病という核酸を介さないユニークな機構による感染症に関与する新しい分子(プロテインX)を同定すること、及びそれらを通じて有効なプリオン病の治療法を可及的速やかに開発することにある。日本における乾燥硬膜移植による医原性プリオン病並びに英国における狂牛病とそれに伴うヒトへの伝播が大きな問題となっている現在、その重要性・緊急性は論を待たない。

これまでに、我々はこの新しい分子に関する様々な解析を試み、現在その同定に向けて2つのプロジェクトを進めている。ひとつは、感染性プリオンが生成されるCaveolae-like domains (CLDs)に存在する全分子に対する抗体を作成し、それを用いてプリオン生成を修飾する分子を同定するアプローチである。もうひとつのアプローチは、数個のプリオン斑というごく微量の脳内沈着物からその構成成分をすべて同定しようとする試みである。これには、超高感度の実験系が必要であるため、現在その実験系を開発中である。

今後2 - 3年以内に、プリオン病に対する少なくとも1つの治療法の臨床応用を開始できるよう努力中である。

2. 研究実施内容

目的

プリオン病発症に関与する新しい分子(プロテインX)を同定すること、及びそれらを通じて有効なプリオン病の治療法を可及的速やかに開発すること

方法

1. プロテインX候補蛋白質の同定

(1) CLDs局在蛋白質群に対する抗体カタログの作成

まず、CLDs画分を二次元電気泳動上に展開した後、Fab抗体のphage display libraryと反応させる。このlibraryは10の12乗程度のdiversityを有するものが既に作成されており、理論的にはあらゆる蛋白質上のエピトープに対応しうる抗体の混合物である。これらのphagemidは核酸情報を同時に保持す

るため、phagemidベクター内の共通シーケンスを標的として既に確立された核酸検出方法を用いて、各スポットを極めて高感度に検出できる。次に、同定された各スポット上に結合しているphagemidの、今度はFab抗体のCDR領域(主にCDR3)を標的にPCRを行ない、目的とする塩基配列を大量に複製する。この方法の利点は、標的とするCDR領域のサイズがほぼ一定であること、及びPCRに用いるprimerの配列は共通であることから、通常PCRによる複製を行なう際の大きな問題である、PCRによる増幅の不均一化が最小限に抑制できることである。その後、新たに発現ベクターに組み込んだ後(あるいはそのままの形で)大量に複製する。

(2) プリオン斑沈着蛋白質群の同定

プリオン病患者脳に存在するプリオン斑を、組織切片上でFab抗体のphage display libraryと反応させた後、標的となるプリオン斑のみをレーザー光線により切離し、PCRチューブに移す。次にFab抗体のCDR領域(主にCDR3)を標的にPCRを行ない、目的とする塩基配列を大量に複製する。その後、新たに発現ベクターに組み込んだ後(あるいはそのままの形で)、プリオン斑に特異的に反応するFab抗体を大量に複製する。これらをプローブとして用いて、cDNAの発現ライブラリースクリーニングを行い、まずプリオン斑を構成している蛋白質群を同定する。

2. プロテインX同定

上述のライブラリー化されたCLDs特異抗体群から、サブトラクション法を用いてヒトとマウスで異なるアミノ酸配列を認識する抗体群を同定し、これらをプロテインXを認識する抗体群の候補としてスクリーニングする予定である。単純計算によると候補となる蛋白質は250 - 300種程度と十分実現可能な範囲にある。また、プリオン斑に特異的に反応する抗体群も同様にスクリーニングの対象となる。既に抗体を用いたプロテインXのスクリーニング法はほぼ確立している。具体的には、PrP^{Sc}を持続産生するスクレイピー持続感染神経芽細胞腫に、(1)候補となる抗体をapplyしPrP^{Sc}産生を阻害するものを同定する、(2)それらの中で、従来知られているPrP^Cとの結合特性に合致するものを抽出する、(3)その候補蛋白のノックアウトマウスを作成し、PrP^{Sc}伝播が阻止されるかどうかを検討する。

3. CJD治療法開発への応用

プロテインXと高親和性を有する変異型PrP^Cが不可逆的にプロテインXと結合することによって、同時に発現している自然型PrP^CがプロテインXから隔離されPrP^{Sc}への変換も抑制される現象は、dominant negative効果と呼称されており、プリオン病の治療に応用し得る。現在UCSFにおいて、これらの変異型PrP^C

と自然型PrP^Cを同時発現させたトランスジェニックマウスを作成し、自然型PrP^CのPrP^{Sc}への変換が抑制されるかどうかを確認する実験が進行中である。これらの結果が確認され次第、次段階として人のCJDに対する遺伝子治療を試みることを視野に入れている。さらに、将来CJDを発症する恐れのある個人に対し、予防的にこれらの変異PrP^C遺伝子を導入することで、発症を予防する可能性も検索されている（変異型PrP^C自体は無害であることは既に証明されている）。しかし、極めて感染価の高い材料による医原性CJD（乾燥硬膜移植後のCJDなど）においては、たとえこれらの高親和性を有する変異型PrP^Cを発現させてもCJD発症を防止できない可能性もある。

また、PrP^Cと競合してプロテインXとより強く非可逆的に結合する薬剤をデザインし、結果的にPrP^CからPrP^{Sc}への変換を阻害する方法も検討されているが、実用的な効果を発揮しうるような薬剤は20万種類の薬剤をスクリーニングした結果においてすら得られていない。このように、プロテインXに高親和性を有する変異型PrP^Cが十分な阻害効果を発揮できない場合には、直接プロテインXを標的とした治療法を開発するのが一番有望である。PrP^C - PrP^{Sc}間の結合は極めて強固であるのに対し、プロテインX - PrP^C間の結合は遥かに脆弱であるため、その結合力に頼って古典的な方法論でプロテインXを同定するのは極めて困難である代わりに、PrP^CからPrP^{Sc}への変換阻害（＝プリオン病の治療）には最も適した標的である。

具体的にまず考えられるのは、抗プロテインX抗体そのものの治療への応用である。その他、プロテインXとPrP^Cの結合を阻害する薬剤の開発が戦略として考えられる。

結論

現在、プロジェクト発足後半年足らずであるため、未だ結論を得るにはいたっていない。しかしながら、上記のストラテジーを用いて可及的速やかにプリオン病治療法の開発を達成すべく努力中である。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

K. Kaneko, H. L. Ball, H. Wille, H. Zhang, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, J. Safar, and S. B. Prusiner, DeArmond SJ, Baldwin MA, and Cohen FE. A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice. Running title: A peptide causes Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Journal of Molecular Biology*, 295: 997-1007. 2000;

L. Zulianello, K. Kaneko, M. Scott, S. Erpel, D. Han, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *Journal of Virology*, 74: 4351-4360. 2000

S. B. Prusiner , P. Peters , K. Kaneko, A. Taraboulos , V. Lingappa , F. E. Cohen , and S. J. DeArmond . Chapter 9; Cell Biology of Prions. Prion Biology and Diseases (S. B. Prusiner ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, New York), p349-391. 1999

S. B. Prusiner S , K. Kaneko , F. E. Cohen , J. Safar and D. Riesner . Chapter 15; Some Strategies and Methods for the Study of Prions. Prion Biology and Diseases (S. B. Prusiner ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, New York), 653-715. 1999

金子清俊、宮武 正.

第3編感染症、第II部感染症と病態、薬物治療（薬物の選択と使用）5。「プリオン病」. 医療薬学Ⅲ免疫・がん・感染症. 東京化学同人（東京）, p326-329. 2000