

研究課題別評価

1 研究課題名: プリオン病の治療とワクチン開発のための基盤構築

2 研究者氏名: 坂口 末廣

研究員: 山中 仁木 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

研究員: 石橋 大輔 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

プリオン病は感染性神経変性疾患である。現在、有効な治療法及び予防法はない。本研究では、プリオン病の治療及びワクチン開発のための基盤構築を目標とした。そのための一つとして、正常プリオン蛋白(PrP^C)の生理学的機能を明らかにし、プリオン病の病態を解明することである。また二つ目は、プリオン蛋白特異抗体や siRNA による異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})の産生抑制と治療法への応用の研究である。そして最後には、レコンビナント PrP(rPrP)を用いたプリオンワクチンの研究である。

4 研究成果:

PrP^Cの正常機能解析

我々は、独自に作製した PrP^C 欠損(Ngsk PrP^{-/-})マウスがプルキンエ細胞死を起こし、PrP^Cがプルキンエ細胞の長期生存に必要であることを報告した。しかし、他の研究室で作製された Zrch I PrP^{-/-}ではこのような異常が認められなく、どうしてこのような違いが生じるのか長年謎であった。最近我々は、PrPのC末領域と非常に高い類似性を有する PrP 類似蛋白(PrPLP/Dpl)が Ngsk PrP^{-/-}マウスの脳特異的に異所性に過剰に発現していることを見出した。そこで我々は、プルキンエ細胞死における PrP^Cと PrPLP/Dpl の役割について検討するために、Zrch I PrP^{-/-}マウスバックグランドに PrPLP/Dpl を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、これらのマウスは、PrPLP/Dpl の発現量に比例してプルキンエ細胞死をきたした。しかし、Zrch I PrP^{+/-}バックグランドではプルキンエ細胞は遅れて死に、Zrch I PrP^{+/+}バックグランドではプルキンエ細胞死がほとんど観察されなかった。これらの結果は、PrPLP/Dpl は神経変性作用を有し、PrP^Cは PrPLP/Dpl の神経変性作用と機能的に拮抗しプルキンエ細胞の生存維持に関与していることを示した。

また我々は、一過性前脳虚血による海馬神経細胞の細胞死における PrP^Cと PrPLP/Dpl の役割について解析した。Zrch I PrP^{-/-}マウスに脳虚血を行うと、雄では強い神経細胞死が認められたが、雌では神経細胞死が認められなかった。このことは、PrP^Cの機能が性差により異なることを示した。しかし、雄に女性ホルモンを投与しても神経細胞死は軽減されず、この性差は性ホルモンに関係ないことが示唆された。一方、Ngsk PrP^{-/-}マウスでは、性差による違いは認められず、雌も雄と同様に強い細胞死を示した。興味深いことに、Ca²⁺チャンネル拮抗薬の flunarizine を Ngsk PrP^{-/-}マウスに投与すると、雌では神経細胞死が緩和された。雄でもその傾向が認められたが有為な効果は認められなかった。これらの結果は、PrPLP/Dpl が Ca²⁺の負荷を増し神経細胞死を来していることを強く示唆した。また PrP^Cは、PrPLP/Dpl の機能と拮抗することから、Ca²⁺の負荷を軽減することで神経細胞を保護していると考えられた。

siRNA 及び抗 PrP 抗体による PrP^{Sc}の産生抑制

我々は、PrP 翻訳領域内の異なる 5カ所の部位を標的にした PrP-siRNA#1~5 を作製し、プリオン感染神経芽細胞(ChN2a-58)を用いて、これらの PrP^{Sc}の産生抑制効果について検討した。その結果、PrP-siRNA#3 を除いて全ての PrP-siRNA において、PrP^{Sc}産生の抑制が認められた。特に、PrP-siRNA#1 は最も強い抑制効果を示した。これらの効果は、異なるプリオン株に感染した細胞を用いても、同様であった。つまり、siRNA による PrP^{Sc}産生の抑制は、全てのプリオン感染において有効であることを示した。次に、PrP-siRNA#1 をプリオン感染マウスの脳内また脾臓に導入し、*in vivo*における siRNA の効果を検討した。その結果、siRNA の脳内デリバリーの効率が悪く、脳内における PrP^{Sc}の減少は観察されなかった。しかし、感染脾臓では、コントロール siRNA と比較して、有意に PrP^{Sc}の減少が認められ、siRNA が *in vivo*でも効果的に PrP^{Sc}産生を抑制できることを示した。

抗 PrP モノクロナル抗体 Sh3.9 をプリオン感染神経芽細胞(ChN2a-58)の培養上清に混入すると、その機序は不明であるが、PrP^{Sc}の産生を抑制する。そこで我々は、Sh3.9 抗体を感染マウスの脳室内に浸透圧ポンプを用いて持続投与を行い、その治療効果について検討した。感染後期の 13 週目から Sh3.9 抗体を投与しても、有意な治療効果は認められず、PrP^{Sc}の脳内蓄積の減少も認められなかった。しかし、感染中期の 8 週目から投与すると、潜伏期の延長は認められなかったが、脳内の PrP^{Sc}の蓄積は半分ほどに減少した。このことは、Sh3.9 抗体が脳内における PrP^{Sc}の蓄積を抑制するが、生命予後に重要な部位に到達出来ないために治療効果が認めら

れなかった可能性を強く示した。したがって、siRNA の場合と同様に、いかに効率良く Sh3.9 抗体を脳内にデリバリーするかが今後の課題である。

レコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) によるプリオンワクチンの開発研究

我々は、マウス、ハムスター、ウシ、ヒツジ、ヒトのレコンビナントプリオン蛋白 (rPrP) を作製し、BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、それぞれの抗原性について検討した。その結果、マウス rPrP は免疫寛容のため極めて弱い抗体反応を惹起したのみであったが、すべての異種の rPrP は高い抗原性を示し高い抗体産生を起こした。興味深いことに、異種 rPrP を免疫して得られたこれらの抗血清はマウス rPrP と程度の差はあるが交叉反応性を示した。このことは、異種 rPrP がマウスにおける PrP に対する免疫寛容を破綻させ、PrP に対する自己抗体を産生させる活性を有していることを示した。さらに興味深いことに、ウシとヒツジの rPrP を免疫したマウスにマウスプリオンを感染させると、マウス rPrP を免疫したマウスや非免疫のマウスと比べて、有意に潜伏期が延長することを見出した。これらの結果は、異種 rPrP が免疫寛容を破綻させるメカニズムを解明することにより、さらに強力なプリオンワクチンの開発が可能であることを示した。

プリオンの感染経路は不明であるが、最も有力なルートとして経口感染が考えられており、粘膜免疫によるプリオンワクチンの開発が重要である。そこで我々は、マウス及びウシ PrP の C 末領域 (121-231) を大腸菌のエンテロトキシンの易熱性毒素 (LT) の B サブユニットと融合したレコンビナント蛋白を作製し、マウスに経鼻接種することにより粘膜免疫の可能性について検討した。非融合のマウス PrP121-231 を経鼻接種しても自己抗体の産生は認められなかったが、LTB と融合すると僅かであるが有意に自己抗体を誘導した。このことは、LTB と融合することにより、抗原性が高められ免疫寛容を破綻させることができることを示した。また、異種 rPrP の腹腔内免疫と同様に、非融合のウシ PrP121-231 を経鼻免疫しても、マウス PrP と交叉反応性を示す抗体を誘導した。非融合のウシ PrP121-231 を免疫したときよりも、LTB 融合ウシ PrP121-231 は効率良く IgG 及び IgA を誘導した。しかし、自己抗体の産生能は増強されなかった。これらの結果は、LTB との融合が PrP の粘膜抗原性を高めることを示し、プリオン粘膜ワクチンの開発に役立つと考えられた。

5 自己評価:

PrP^C が PrPLP/Dpl や虚血による神経細胞死からの保護に重要であることを明らかにすることができ、PrP^C の正常機能の解明に貢献できたと考えている。またこれらの結果は、プリオン病でも PrP^C から PrP^{Sc} への変換による PrP^C の機能障害が、神経細胞死に関与していること示唆し、意義ある成果だと考えている。しかし、分子レベルにおける PrP^C の機能解析が進まず、プリオン病の病態と PrP^C の機能との関係に明確な解答を出すことが出来なかったことがこれからの課題として残された。

PrP^{Sc} の産生を抑制する siRNA を作製できたことはこの研究の成果の一つと考えている。また、感染マウスの脾臓に直接投与することにより、*in vivo* でも siRNA が PrP^{Sc} の産生抑制に効果があることを世界ではじめて示すことができた。しかし、脳内への効率良いデリバリーができず、siRNA の治療効果等について検討できなかったのは残念である。これからもこの研究をすすめ、ウイルスベクター等の脳内デリバリーシステムを検討していきたいと考えている。

siRNA と同様に脳内デリバリーの問題のため、抗 PrP 抗体による治療効果についても、最終的な結論が出せなかったのは残念である。現在、マイクログリアを用いた抗 PrP 抗体の脳内デリバリーシステムを開発中であり、今後ともこの研究は継続していきたいと考えている。

異種 rPrP を免疫することにより、PrP に対する免疫寛容が破綻し、高い抗体産生が得られ、プリオン病の発症を有意に遅延させることができた。この結果は、本研究の大きな成果の一つと考えている。異種 PrP が免疫寛容を破綻させたのは、分子擬態 (molecular mimicry) メカニズムによると考えられる。つまりこれらの結果は、もっと高い分子擬態性を示す分子やペプチドの開発または同定により、もっと有効なプリオンワクチンの開発が可能であることを示唆し、今後さらに発達させるべき分野だと考えている。

6 研究総括の見解:

本研究は正常プリオン蛋白の生理学的機能の解明と、プリオン蛋白特異抗体や siRNA による異常プリオン蛋白の産生抑制、およびレコンビナントを用いたプリオンワクチンの開発を目的として行われた。その結果、正常プリオンの生理学的機能として、虚血による細胞死から神経細胞を保護することに重要であることを明らかにした。また異常プリオンの産生を抑制する siRNA の作製に成功した。さらにレコンビナントを用いたプリオンワクチン開発の基礎データとして、異種レコンビナントプリオン蛋白を免疫することによって、プリオン蛋白に対する免疫寛容が破綻して高い抗体産生が得られプリオン病の発症を有意に遅延させることを証明した。これらの成果は、当初の研究目標を達成したとは言えないものの、今後の研究の発展の道筋を呈示した貴重なものである。

7 主な論文等:

論文

1. Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* (in press)
2. Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M: Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136, 281-287, 2005
3. Sakaguchi S: Prion protein, prion protein-like protein, and neurodegeneration. *Neurodegeneration and Prion Disease* edited by David R. Brown, 167-193, 2005, Springer
4. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures. *Journal of Virology*, 79, 7104-7112, 2005
5. Atarashi R, Sakaguchi S, Shigematsu K, Katamine S: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI Journal*, 3: 82-90, 2004
6. Sakaguchi S: Antagonistic roles of prion protein and prion protein-like protein in neurodegeneration. *Recent Research Developments in Experimental Medicine* edited by S.G. Pandalai, 1: 47-61, 2004
7. Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 1247-1252, 2004

特許

坂口末廣、石橋大輔、山中仁木: ワクチンと免疫方法 (出願番号 2005-157931)

招待講演等

1. Sakaguchi S: Roles of PrP and PrP-like protein (Doppel) in neurodegeneration. Keystone Symposium, Molecular Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases). Colorado, USA 2003
2. Sakaguchi S, Ishibashi D, Yamanaka H: Efficient Induction of Prophylactic Antibodies against Prion Disease in Mice. 24th International Congress of Chemotherapy. Symposium 34: Emerging and re-emerging infectious diseases in the Western Pacific. Philippine International Convention Center, Manila, Philippine, 4-6 June, 2005
3. Sakaguchi S: Prion protein and prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, November 3-5, 2005. San Jose, CA.
4. 坂口末廣: プリオン蛋白とプリオン病. 第20回日本環境感染学会総会 アフタヌーンセッション 11、神戸、2005年2月