

「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、正常型プリオン蛋白質分解酵素）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源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、4つのプロジェクトを進めている。

- (1) プロテインXの同定
- (2) 正常型プリオン蛋白質分解酵素の同定
- (3) CJD治療法開発への応用
- (4) 新規プロテオーム解析手法の開発

(1)に関しては、本年度は正常型プリオン蛋白質と共に発現量が変化する蛋白質を同定した。現在、この蛋白質とプロテインXとの関連について検討中である。(2)に関しては、既に候補蛋白質を得た。(3)に関しては、モデルマウスにおいて著明な発症阻害効果を有する変異型プリオン蛋白質を同定し、臨床応用に向けた基礎研究を開始した。(4)に関しても2件の特許を出願した。また、(1)から(4)の全ての項目において、現在論文準備中である。

これらの組み合わせにより、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、正常型プリオン蛋白質分解酵素）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

正常型プリオンから異常感染型プリオンへの変換に関与する分子シャペロン様の分子は、生理的にもプリオン蛋白と密接に関係していることが想定されている。最初のアプローチとして、我々は、正常型プリオン蛋白と共にその発現量が変化する蛋白質を検索してきたが、平成12年度にこの範疇に入る蛋白質を同定した。この分子は、次に述べる正常プリオン蛋白質分解酵素との関連も示唆され、現在その詳細を検討中である。現在までに得られた知見によると、この蛋白質の検討を進めることで、正常型プリオン蛋白質の生理機能、並びに海綿状変性の生じるメカニズム解明にもつながる知見が得られる可能性が示唆される。今後は、東北大学村本チームと共にモデル動物を用いた検討を行う予定である。

2. 正常プリオン蛋白質分解酵素の同定

平成12年度に、我々は二次元電気泳動上でのプリオン蛋白分解酵素活性の測定を可能にする系の確立に成功し、プリオン蛋白分解酵素の候補蛋白質を得た。現在、その候補蛋白質の酵素活性並びに生理機能を検索中である。これは、アルツハイマー病の原因に関わるAPP蛋白質代謝における α -Secretaseに相当する分子である。APPからの $A\beta$ 生成阻害における α -Secretaseの果たす役割と同様、正常型プリオン蛋白がこの分解酵素で消化されると、もはや異常感染型プリオンに変換できないため、本酵素はプリオン病の治療法開発を考える際にも重要である。今後は、本蛋白質が生理的条件下でも機能しているプリオン分解酵素であることを確認した後、更なる機能解析を行い、これをプリオン病の治療に応用するべく東北大学村本チームと共にモデル動物系での検討を開始していく予定である。

3. 新規プロテオーム解析手法の開発

- ・ ラフトあるいはCLDs構成タンパク質群に対する抗体カタログの作成

二次元電気泳動上に展開された、「ラフト」あるいは「カベオラ様ドメイン (CLDs)」画分に対応するファージミド抗体を分離し大量精製する手法を確立した (論文準備中、特許出願済)。今後、これらの抗体を用いて、これらの抗体とチップテクノロジーを組み合わせることで新たに抗体チップを作成し、より広範な応用の可能性を探索していく。

- ・ プリオン斑沈着蛋白質群の同定

既に、脳・筋肉組織切片より、プリオン斑などの標的を最小径1 - 2ミクロンというオーダーで切り離し回収する技術を、オリンパス光学との共同研究とにより確立した。このオーダーでの分離回収は、今回世界でも初めて可

能となった。本年度は、組織切片上でFab抗体のphage display libraryとの反応条件を詳細に検討する。現時点では、径数十ミクロン程度の陽性対象からは、ほぼ確実に陽性抗体クローンを回収できるところまで達成しているが(論文準備中)本年度はさらに1 - 2ミクロンオーダーの対象からの抗体分離同定を可能にすべく、さらに条件を検討していく。

4 . CJD治療法開発への応用

本チームとUCSFとの共同研究により、ヒトプリオン蛋白219番のグルタミン酸型/リジン型ヘテロのうち、リジンを発現させたトランスジェニックマウスにおいて、著名な発症遅延効果が証明された(論文準備中)。本年度は、この知見を本邦で大きな問題となっている硬膜移植後の医原性プリオン病の治療法に応用する試みを開始した。具体的には、人工的に汚染された硬膜を移植したマウスの動物実験系を用いて、リジン型プリオン蛋白の予防効果を検討していく予定である。硬膜移植後プリオン病は、今後5年間に新たに20 - 30名程度の患者の発生も予想されるため、西島チーム、村本チームと共に、現時点での知見を総動員して可及的速やかに治療法の開発に取り組む必要がある。

また、村本チームにおいては、ヒトプリオン蛋白219番アミノ酸多型のうちグルタミン酸型を認識しリジン型を認識しないモノクローナル抗体を用いて、219番をグルタミン酸型/リジン型ヘテロに持つヒトプリオン病患者脳組織内の異常プリオン蛋白がこの何れの多型であるかを解析した。

結論

- (1) 正常型プリオン蛋白質と共にその発現量が変化する蛋白質を同定した。
- (2) 正常型プリオン蛋白質分解酵素の候補蛋白質を得た。
- (3) プリオン病発症阻害効果を有する変異型プリオン蛋白質を同定し、実際の動物においてその顕著な効果を確認した。
- (4) 新規プロテオーム解析手法の開発を行った。

3 . 主な研究成果の発表(論文発表)

Perrier V, Wallace A, Kaneko K., Safar J, Prusiner SB, Cohen FE. : Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A, 97 : 6073-6078, 2000

Korth C, Kaneko K., Prusiner SB : Expression of unglycosylated mutant prion protein facilitates PrPSc formation in neuroblastoma infected with different prion strains. Journal of General Virology, 81 : 2555-2563, 2000

Kaneko K., Ball H. L. , Wille H. , Zhang H , Groth D , Torchia M , Tremblay P, Safar J , Prusiner SB , DeArmond SJ, Baldwin MA, 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

Fukasawa M, Nishizima M, Itabe H, Takano T and Hanada K : Reduction of Sphingomyelin Level without Accumulation of Ceramide in Chinese Hamster Ovary Cells Affects Detergent-resistant Membrane Domains and Enhances Cellular Cholesterol Efflux to Methyl- β -cyclodextrin. The Journal of Biological Chemistry (Vol.275, NO.44, 34028-34034, 2000)

Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T : Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neurosci Lett 2000, 288 : 179-182

Supattapone S, Nguyen HO, Muramoto T, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott M : Affinity-tagged miniprion derivatives spontaneously adopt protease-resistant conformations. J Virol 2000, 74 (24) : 11928-11934

Supattapone S, Muramoto T, Legname G, Mehlhorn I, Cohen, FE, DeArmond SJ, Prusiner, SB, Scott MR : Identification of two prion protein regions that modify scrapie incubation time. J Virol 2001, 75(3) : 1408-1413