

平成21年3月13日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790613
研究課題名（和文） 実用化に向けた新規プリオンワクチンの開発
研究課題名（英文） Development of newly prion-vaccine for practical application.
研究代表者
石橋 大輔（Ishibashi Daisuke）
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10432973

研究成果の概要：

プリオン病はヒトを含む各動物種に見られる難治性の中枢神経変性疾患である。現在、ヒトやウシにおける感染、ウシからヒトへの感染が大きな社会問題となっており、世界中でプリオンワクチンおよび治療法の開発が行われているが、実用化までには至っていない。なぜなら正常型プリオン蛋白（PrP）は生体内の宿主蛋白であり、免疫寛容という大きな問題点があるためである。本研究では、実用化に向けたプリオンワクチンの開発を検討し、有用性のある免疫抗原の作製に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態生化学

1. 研究開始当初の背景

プリオン病はヒトを含む各種動物に見られる空砲変性及びグリオーシスなどの脳内病理変化を伴う難治性の中枢神経変性疾患である。ヒトではクロイツフェルトヤコブ病（CJD）と称され、ヒツジではスクレイピー、さらにウシにおける牛海綿状脳症（狂牛病：BSE）など一連のこの疾患は、同一の病原

体により発症すると考えられている。これまで病原体（プリオン）は、正常型プリオン蛋白質（PrP）の構造変換によって作られる異常型プリオン蛋白質と推測されているが確定はしていない（プリオン仮説）。また、病原体の感染経路は不明な点が多いが、実験的にはプリオンに暴露した臓器の経口、腹腔および脳内接種により感染が成立する。現在、

ヒトからヒトおよびウシからウシへの感染（同種感染）やウシからのヒトへの感染（異種感染）が問題となっており、様々な治療法および予防法の検討が行われているが、実用化までは至っていない。近年、in vivo (1, 2, 3)、in vitro (4, 5, 6, 7) の実験系で抗PrP抗体のプリオン病発症遅延作用や異常型プリオン蛋白質への構造変換抑制作用などの報告が多数見られ、世界中でプリオンワクチンおよび治療法の開発が精力的に進められている。しかしながら、報告の大半は抗体を投与する受動免疫によるものであり、能動免疫の報告はほとんど無い。なぜならPrPは生体内の宿主蛋白であるため、自身のPrPを免疫しても**免疫寛容 (immune tolerance)**が生じるという**大きな問題点**があり、このことが今日までプリオンワクチンの開発を遅らせている理由なのである。

PrPのアミノ酸一次構造は動物種の間で相同性が87-94%となっており、種によってアミノ酸が少しずつ異なる(図2)。我々は、この構造の違いに着目し、マウスに対し異種動物のPrPを免疫したところ、免疫マウスでは抗血清におけるマウスPrP認識抗体の発現が上昇し、さらに免疫マウスではプリオン病の発症が遅延しており、この免疫方法がプリオン感染に対して予防効果があることを報告した(8)。この能動免疫によるプリオン感染抑制の検討は、数少ないプリオンワクチン研究の成功例といえる。

近年、アルツハイマー病のワクチン療法において過度の能動免疫による髄膜脳炎の発現が問題となっている。これは、アジュバントによる細胞障害性T細胞の活性化が原因とされており、中枢神経疾患におけるワクチン療法は細胞性免疫と液性免疫とのバランスが重要であると考えられる。また、ウイルスベクターやDNAワクチン(10)を

用いた免疫では、元来のアジュバントを用いたワクチンとは異なり、抗原に対する抗体価は低いが、髄膜脳炎などの副作用が生じない(11)との報告もあり、プリオン病に対するワクチン療法においても免疫投与方法の確立は重要な因子と考えられる。

(参考文献)

- (1) White AR, et al. *Nature*. 2003. 422. 80-83.
- (2) Heppner FL, et al. *Science*. 2001. 294. 178-182.
- (3) Sigurdsson EM, et al. *Neurosci Lett*. 2003. 336.185-187.
- (4) Beringue V, et al. *J Biol Chem*. 2004. 279. 39671-39676
- (5) Peretz D, et al. *Nature*. 2001. 412. 739-743.
- (6) Perrier V, et al. *J Neurochem*. 2004. 89. 454-463.
- (7) Enari M, et al. *PNAS*. 2001. 98. 9295-9299.
- (8) Ishibashi D, et al. *Vaccine*. 2007. 25. 985-992.
- (9) Yamanaka H, Ishibashi D, et al. *Vaccine*. 2006. 24. 2815-2823.
- (10) Fernandez-Borges N, et al. *J Virology*. 2006. 80. 9970-9976.
- (11) Okura Y, et al. *PNAS*. 2006. 103. 9619-9624.

2. 研究の目的

これまでのプリオンワクチンの研究では、抗原にPrP自身を用いていたが、実用化に向けて副作用またはコストの面を考えると免疫に用いる抗原の選択や免疫の投与方法などの点において、まだ改善の余地があると考えられる。そこで本研究では、以下の計画に沿って研究を行い、実用化に向けたより効果の高いプリオンワクチンの開発を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

<平成 19 年度>

新規プリオンワクチンに用いる抗原の決定および免疫方法の確立

(1) 免疫抗原の作製

プリオン感染に抑制効果のある抗 PrP 抗体の認識エピトープつまり 3 群 (A. A. 91-110, 132-155, 220-231 のエピトープ) のプリオン中和エピトープに相同性のあるウイルス、細菌の構成蛋白である約 11 種類の蛋白分子を精製した。

(2) 免疫したマウスの抗血清におけるマウス PrP に対する抗体価の測定

Balb/c マウスなどの宿主 PrP を持つマウスに対して作製した抗原を免疫し、免疫回数と抗体価を ELISA 法にて検討し、プリオンワクチンとして使用可能な最適な条件を探索する。

(3) 免疫マウスの抗血清における認識エピトープの探索

免疫マウスの抗血清におけるマウス PrP の認識エピトープを 8-10 アミノ酸に分割したペプチドを抗原として ELISA 法にて確認する。

<平成 20 年度>

免疫したマウスの抗血清におけるプリオン感染に対する影響

(1) プリオン感染に対する抑制効果についての検討 (プリオン感染実験)

免疫したマウスに 10% マウスプリオン株脳乳剤 (Fukuoka-1 株) のプリオン病原体を腹腔内 (i. p.) に感染させ、プリオン病の発症までの潜伏期間及び生存期間について検討した。

(2) 免疫したマウスの抗血清における異常型プリオン蛋白質に対しての効果

我々の研究室で樹立されているプリオン持続感染細胞 {N2a-FK; CJD (FK; Fukuoka-1) 由来プリオン株持続感染 Neuro-2a 細胞} に

免疫したマウスの抗血清を添加して、Proteinase K 抵抗性異常型プリオン蛋白質の発現およびその影響について Western blot 法を用いて検討した。

4. 研究成果

<平成 19 年度>

(1) 免疫抗原の作成において、マウスプリオン感染に対し抑制効果のある抗 PrP 抗体の認識エピトープつまり、マウス PrP アミノ酸配列の 91-110、132-155、220-231 のエピトープに相同性のあるウイルスや細菌由来の蛋白 7 種類を合成および作製した。目的のリコンビナント蛋白の作製には、pQE30 ベクターに目的の配列を挿入し、大腸菌にて蛋白発現させ、ニッケルカラムにて精製を行った。さらに、マウスに対し異種となるヒト PrP の 132-155、220-231 のエピトープのペプチドを KLH のキャリアーと付加させて合成した。

(2) 作製したリコンビナント蛋白およびペプチドを 4 週齢の雄の Balb/c マウスにフロイントアジュバントと共に各週で 3 回から 5 回免疫を行った。それぞれの時期に血清を採取し、免疫に用いた抗原およびマウス PrP (交差性の検討) に対する抗原抗体反応をエライザ法にて検討した。血清は、自身の抗原に対して、高い抗体価を示した。これらの免疫したマウス群では、抗プリオン効果を示す可能性が高いことが示唆された。

<平成 20 年度>

(1) 免疫後の血清をヒト由来のプリオン株を感染させたプリオン持続感染細胞に添加し、異常型 PrP の発現について検討したところ、抗体価が高い血清ほど異常型 PrP の発現を減少させた。

(2) 免疫したマウスにヒト由来のプリオン病原体を感染させ、発症までの潜伏及び生存期間について調べた。免疫したマウス群では

潜伏、生存期間ともに延長の傾向が見られたが、有意な差はなかった。

3) 各抗原の免疫により、マウス PrP に交差性のある抗体が発現しても、早期に死亡するマウスなどはなかったことから、安全性の面でも有用であると示唆された。

以上のことより、まだ研究レベルの域を出ないプリオンワクチンではあるが、本研究の結果がプリオンワクチンの実用化に向けた大きな一歩となり、不治の病であるプリオン病の予防及び治療法の一つになることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Daisuke Yoshikawa, Naohiro Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Hitoki Yamanaka, Nobuhiko Okimura, Yoshitaka Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Hironori Miyata, Kazuto Shigemats, Sigeru Katamine, Suehiro Sakaguchi, Dominant-negative Effects of the N-terminal Half of Prion Protein on Neurotoxicity of Prion Protein-like Protein/Doppel in Mice. The Journal of Biological Chemistry. 査読の有. 283(35). 2008. 24202-24211

[学会発表] (計 7 件)

①中垣岳大、プリオン病における Tacrolimus の治療効果、第 33 回長崎感染症研究会、平成 21 年 2 月 28 日、長崎大学医学部 (良順会館)

②新 竜一郎、PMCA 法によるマウスプリオン株の高効率の増幅、第 56 回日本ウイルス

学会学術集会、平成 20 年 10 月 28 日、岡山コンベンションセンター

③布施 隆行、異常型 PrP (PrPres) の感染性、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月 28 日、岡山コンベンションセンター

④中垣 岳大、プリオン病における tacrolimus の治療効果、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会、平成 20 年 10 月 4 日、熊本大学医学部附属病院山崎記念会館

⑤石橋 大輔、プリオン持続感染細胞におけるウイルス感染に対して働く自然免疫機構関連因子の関与、第 32 回長崎感染症研究会、平成 20 年 3 月 29 日、長崎大学医学部 (良順会館)

⑥石橋 大輔、プリオン感染成立における自然免疫機構の関与 A role of Innate immunity in Prion pathogen infectious formation. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会、平成 19 年 11 月 20 日、東京 (グランドプリンスホテル新高輪)

⑦石橋 大輔、ウイルス感染に対して働く自然免疫機構関連因子とプリオン感染との関与、第 55 回ウイルス学会学術集会、平成 19 年 10 月 21 日、札幌

⑧布施隆行、異常型プリオンタンパク質高産生感染細胞の樹立、第 55 回ウイルス学会学術集会、平成 19 年 10 月 21 日、札幌

[図書] (計 1 件)

山口 尚宏、株式会社 最新医学者、最新医学 新興・再興感染症 (前篇) 3 月増刊号「ヒトのプリオン病の病態」、2008、565-584

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 大輔 (Ishibashi Daisuke)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号： 10432973

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し