

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780277

研究課題名（和文） 新規免疫原を用いたプリオン病ワクチンおよび免疫学的治療法開発のための基盤構築

研究課題名（英文） Basic study for development of prion vaccines and immunotherapeutic methods using the newly immunogens

研究代表者 山中 仁木 (YAMANAKA Hitoki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30533921

研究成果の概要（和文）：

プリオン病はヒトや動物にみられる致死性且つ難治性の中枢神経変性疾患である。有効な治療法は無く、ワクチンや治療法の開発が望まれている。本研究は、新たなプリオンワクチンあるいは免疫学的治療法開発に繋がる基礎的知見を得ることを目的とし、正常型あるいは試験管内増幅法により作成した異常型プリオン蛋白を用いてマウスにおける免疫反応について調査した。得られた結果から、これらのプリオン蛋白はワクチンおよび治療法開発への礎となり得る有用なツールとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Prion diseases in humans and animals are fatal neurodegenerative disorders and no effective therapeutic methods for prion diseases were developed. In this study, to acquire the basic information for development of prion vaccine and immunotherapeutic methods, recombinant proteinase-sensitive (rPrP-sen) and -resistant prion protein (rPrP-res), were prepared by the real-time quaking-induced conversion method. The immunoresponses were evaluated by immunization to mice with these materials. The results from this study suggest that these materials, rPrP-sen and -res, are useful tools as a newly immunogen for development of prion vaccines and therapeutic methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：人獣共通感染症学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症・プリオン

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、生体内に細胞膜結合タンパクとして存在する正常型プリオン蛋白 (Proteinase-sensitive Prion Protein: PrP-sen) が主に脳内において構造変換により異常型へと変化しそれが蓄積することにより、神経細胞死が誘導され空砲変性およびグリオシスという病理学的所見を示す致死性の中枢神経変性疾患である。現在のところ

る病原体は、PrP-sen と比較して β -sheet 含量が多くタンパク分解酵素に対して抵抗性を示す異常型プリオン蛋白 (Proteinase-resistant Prion Protein: PrP-res) とするプリオン単独仮説が有力である。プリオン病は、ヒト(クロイツフェルト-ヤコブ病: CJD、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインカー病: GSS など)のみならず、ウシ(牛海綿状脳症: BSE)、ヒツジ(スクレイピー)、シカ

(慢性消耗病：CWD)などの家畜や野生動物でも確認されている。自然界における感染経路の詳細は不明であるが、ヒト-ヒト、動物-動物、動物-ヒト間の末梢からの経路が疑われる人獣共通感染症として認識されており、治療法はもちろん予防法の開発が望まれている。

近年、プリオン蛋白に対する抗体を実験的プリオン感染マウスに投与することにより脳内の PrP-res の蓄積が抑制され、生存期間が延長することが報告された(White et al., *Nature* 2003, 422 (6927): 80-83)。これを発端として抗体産生誘導による様々なワクチン開発が検討された。しかし、乗り越えなければならない大きな問題として、生体内に PrP が存在していることから免疫寛容が働いている点が挙げられる。そのため、寛容を破綻させる目的で抗原性を高める研究が幾つかかなされている中、我々は各種動物がもつ PrP-sen のアミノ酸配列の相違(相同性 87-94%)に着目し、異種動物由来リコンビナント PrP(rPrP)の粘膜または腹腔免疫により有意に抗体産生を誘導し、発症までの期間を延長させることに成功した(Yamanaka et al., *Vaccine* 2006, 24:2815-23; Ishibashi et al., *Vaccine* 2007, 25:985-992)。しかしながら、我々の研究を含めたこれまでの報告では、発症を止めるまでには至っていない。一方、人工的に β -sheet 含量の多い rPrP を作成し免疫することでマウスにおいて免疫寛容を破綻させ(Kaiser-Schulz et al., *J. Immunol.* 2007, 179:2797-2807)、更に別の研究グループは β -sheet 含量の多い rPrP に対する免疫反応が正常の rPrP の場合と比較して異なることを示した(Khalili-Shirazi et al., *J. Immunol.* 2005, 174:3256-3263)。つまり、免疫原となる rPrP の構造を人工的に変換させ PrP-res 様にする事で抗原性を向上させる新たな可能性が示された。

当研究室の新らは、プリオン感染動物の試料を種(seed)として、rPrP-sen を rPrP-res へと人工的に増幅させる rPrP-res 試験管内増幅法およびその改良法(QUIC 法)を開発した(*Nat. Methods* 2007, 4:645-650; *Nat. Methods* 2008, 5:211-212)。この方法は、特異的早期診断法などへの応用が期待される一方、seed が存在しない場合でも反応液中の変性剤を変える等反応条件を変えることで rPrP-res を多量に増幅させることが可能で

あることが分かった。

2. 研究の目的

本研究は、新たな免疫原となり得る rPrP-res を作成し、その構造と抗原性および防御能との関連を明らかにすることで、生体内における PrP-res への変換とその蓄積を効率よく抑制するための基礎的情報を示し、免疫反応を精査することにより、プリオン病に対するワクチンおよび免疫学的アプローチによる治療法の開発のための基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

<平成 21 年度>

(1) 各種動物 rPrP の作成・精製

各種動物の rPrP を作成するため、マウス、ハムスター、ヒツジ、ウシおよびヒトのアミノ酸配列を含む発現プラスミドを作成中した。タグが融合されていない rPrP の精製方法は、PrP の N 末端側(アミノ酸 50-90)にある金属イオン結合領域の存在を利用した金属キレートアフィニティークロマトグラフィー法により精製した。

(2) rPrP-res の増幅条件の検討

QUIC 法を用いた増幅反応液中の成分(変性剤、seed の有無など)を組み合わせることで、高抗原性あるいは特異免疫反応誘導能を有する rPrP-res を作成する反応条件を検討した。rPrP-res の性状は、Proteinase K 処理後の Western blotting によるバンドパターンとの相違により観察した。

<平成 22 年度>

(3) 高抗原性あるいは特異免疫反応誘導能を有する rPrP-res のスクリーニング

得られた rPrP-res をマウスに免疫し、マウスにおける抗体産生誘導能(誘導される IgG 価および IgG サブタイプの比較)を指標としてその抗原性を評価した。

4. 研究成果

<平成 21 年度>

(1) 各種動物 rPrP(マウス、ハムスター、ウシ、ヒツジ、ヒト)の作製

各種動物の rPrP を作成するため、マウス、ハムスター、ヒツジ、ウシおよびヒトのアミ

ノ酸配列を含む発現プラスミド(pET11a ベクターを使用)を作製した。

タグが融合されていない rPrP の精製方法は、IPTG 誘導によりタンパク発現した大腸菌を溶解し、封入体分画を精製した。これをグアニジン塩酸存在下で溶解し、Ni カラムと結合させた後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで勾配をかけ rPrP を refold させ、イミダゾールにより溶出した。イミダゾールは透析により除去した。透析後に精製度は SDS-PAGE にて確認した。図 1 は、その内のマウス rPrP 精製時の SDS-PAGE 像を示す。

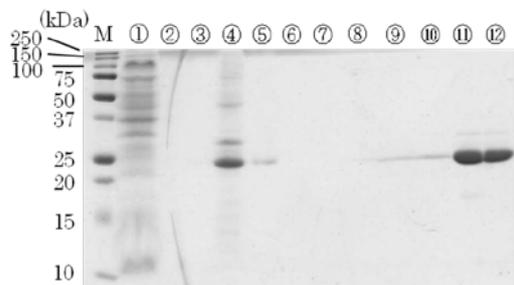


図1. マウスrPrP精製における各分画と精製確認 (SDS-PAGE像)。①~③: 大腸菌の封入体精製までの上清、④⑤: 封入体、⑥~⑫: 溶出分画。⑪⑫の分画でマウスrPrPが溶出されている。

(2) グアニジン塩酸存在下における rPrP-res 増幅および保存条件の検討

作製した rPrP を用いて QUIC 法により rPrP-res の作製を行った。ハムスター rPrP を用いて rPrP-res を作製した場合、グアニジン塩酸存在下において fibril 形成が顕著であったため、グアニジン塩酸存在下におけるマウス rPrP を用いた rPrP-res 増幅条件と保存方法について検討した。

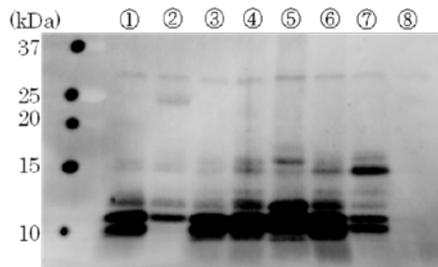


図2. マウスrPrP-res増幅条件の検討 (ProteinaseK処理後のWestern blot像)。①②: 1Mグアニジン塩酸添加、③④: 0.5M、⑤⑥: 0.1M、⑦⑧: 0.05M。(増幅反応: 40°C、48時間)

その結果、ハムスターrPrP が 40°C で 24 時

間の 1400rpm の振とう培養で rPrP-res が安定して発現するのに対し、マウス rPrP の場合は 48 時間振とう培養しなければならなかった。この結果は、アミロイド蛋白に結合するチオフラビンの結合量を検討した場合も同様に、48 時間培養で安定した rPrP-res の増幅が確認された。また、グアニジン塩酸の濃度は 0.1M (~0.5M) が適当であることが分かった(図 2)。また、マウスに免疫することを想定して一度に大量に rPrP-res を作製できることが望まれるため、QUIC 法における反応スケールについて検討した。振とう培養時の反応スケールでは、0.5ml の試験管に対し 100 μ l、あるいは 1.5ml 試験管に対し 500 μ l 以下の反応スケールで、rPrP-res 増幅効率が高かった。更に、rPrP-res 増幅反応後の保存処理方法では、増幅反応後に PBS を用いて透析し塩酸グアニジンを除去することにより、増幅した rPrP-res が消失せずに保存されることが分かった(図 3)。

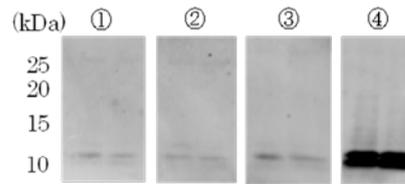


図3. rPrP-res増幅後の保存条件の検討。①4°C、②40°C、③30°C、④PBSで透析(4°C)でそれぞれ保存した場合(ProteinaseK処理後のWestern blot像)

<平成 22 年度>

(3) 高抗原性あるいは特異免疫反応誘導能を有する rPrP-res のスクリーニング

① リコンビナントマウス (rmo)PrP-res の抗体誘導能の検討

グアニジン塩酸存在下で作成した rmoPrP-res の免疫反応誘導能を調べるため、野生型マウス (BALB/c マウス) に 5 回腹腔内接種し (20-40 μ g/回)、その後の血中の特異抗体価を ELISA 法により測定した。ELISA で用いるプレートには、rmoPrP-sen と rmoPrP-res をコーティングしたウェルを用意し、それぞれに対する特異抗体価を測定することにした。その結果、rmoPrP-sen と rmoPrP-res の両者に反応する IgG が高力価ではないが検出され、免疫寛容機構の破綻が弱いながらも認められた。更に rmoPrP-res を免疫すること

により誘導される IgG について調査するため、PrP 欠損マウスに腹腔内接種し、その後の血中の特異抗体について調査した。その結果、rmoPrP-sen および rmoPrP-res の両方、あるいは主に rmoPrP-sen に反応する高力価の IgG を検出することができた。IgG サブクラスは、抗 rmoPrP-res 特異的 IgG は、ほとんどが IgG2b であった。それに対し、抗 rmoPrP-sen 特異的 IgG は、IgG2b が主の個体、あるいは IgG1 と IgG2b の両方が主に産生誘導されている個体など、マウス個体によって IgG サブクラス反応が異なっていた。IgG2a に関しては他のサブクラスに比べて低力価であった。誘導される IgG サブクラスの違いが、PrP-res の増殖抑制にどのような影響がみられるのか今後の検討課題である。

また、マウス個体によって産生された特異 IgG の認識部位が異なることから、更にペプチドを用いて認識部位を調べた。rmoPrP-res 免疫による産生誘導された IgG は、抗プリオンエピトープとして知られている、PrP のアミノ酸 90-109、131-154 および 219-231 の各ペプチドのいずれとも強く反応しなかった。このことは、rmoPrP-res 免疫により誘導された特異 IgG が抗プリオン活性を示さないことも考えられるが、逆に rmoPrP-res 特異的なエピトープを認識する高効率の抗プリオン活性を示す可能性もある。これらのことについて、プリオン持続感染細胞系を用いたプリオン増殖抑制活性の比較検討は今後の検討課題である。

更に、rPrP-res の免疫反応誘導能について、原子間力顕微鏡 (DFM) あるいはフーリエ変換赤外線分光分析装置 (FTIR) を用いてタンパク構造との関連を調査することも検討課題の一つとして考えられる。

② rmoPrP-sen の抗体誘導能の検討

rmoPrP-res と同様に、rmoPrP-sen について野生型および PrP 欠損マウスに免疫することにより、その免疫誘導能について検討を行った。野生型マウス (BALB/c) に腹腔内接種した場合、免疫寛容により特異抗体価は検出されないとの予想に反し、非常に高い特異 IgG 価を検出した。これらの特異抗体は rmoPrP-res には強く反応せず、主に rmoPrP-sen と強い反応を示した。同時に rmoPrP-sen を腹腔内接種した PrP 欠損マウス

から得た抗血清を用いて、IgG サブクラスと認識エピトープについて調査した。IgG サブクラスについて調べた結果では、主に IgG1 と IgG2b が産生誘導され、IgG2a も低力価ではあるが検出された。また、これらの IgG はアミノ酸 131-154 および 219-231 と強く反応した。これらの結果は、今回用いた rmoPrP-sen が効率良く抗プリオン活性を持つ特異抗体を誘導することから、ワクチンあるいは免疫学的治療法に応用できる可能性を示唆している。

以上より、新たに作成した rPrP-res および rPrP-sen を免疫原として得られた免疫学的な基礎的知見は、今後の方向性や検討課題を提示し、抗プリオン抗体などの免疫反応誘導によるプリオンワクチンおよび治療法開発に途を開く礎となるものである。

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 3 件)

- ① Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*, 17(2):175-178, 2011. 査読有
- ② 山中 仁木. ペスト DNA ワクチン開発の検討. *九州実験動物雑誌*, 26:1-17, 2010. 査読無
- ③ Yamanaka H, Hoyt T, Yang X, Bowen R, Golden S, Crist K, Becker T, Maddaloni M, Pascual DW. A parenteral DNA vaccine protects against pneumonic plague. *Vaccine*, 28(18):3219-3230, 2010. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Yamanaka H, Arita M, Ohsawa M, Mizushima M, Kubo N, Takagi T, Yamamoto N, Ohsawa

K. Distribution of unidentified *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract and the hepatobiliary system of laboratory mice. The 4th AFLAS Congress Meeting, 2010年11月9-11日, 台北(台湾).

〔図書〕 (計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 仁木 (YAMANAKA Hitoki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 30533921

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し