Ny kunnskap om Creutzfeldt-Jakobs sykdom kan gi terapeutiske muligheter

Sammendrag

Bakgrunn. Creutzfeldt-Jakobs sykdom er en sjelden, neurologisk sykdom. Den gir alltid dødelig utgang, ofte i løpet av noen få måneder etter symptomdebut. Sykdommen ble aktualisert i 1990-årene, da det ble rapportert om mennesker som var smittet av mat fra storfe med kugalskap. Forskning de senere år har vist oppløftende resultater innen behandling av sykdommen. Vi gir her en oversikt over de mest lovende funnene.

Materiale og metode. Artikkelen er basert på ikke-systematiske litteratursøk i PubMed med et skjønsmessig utvalg av artikler. Vi har også tatt en gjennomgang av referanselistene i disse artiklene.

Resultater. Sykdommen oppstår når det naturlige prionprotein, PrP^C, blir omdannet til den sykdomsbetingede scrapievarianten, PrP^{Sc}. Mus som var genmanipulert slik at de ikke produserte PrP^C, utviklet ikke tegn til sykdom etter eksponering for scrapiesmitte. Behandling med antistoffer mot PrP^C og redusert genekspressjon av PrP^C med RNA-interferens-teknikk økte overlevelsestiden i museforsøk. Pentosanpolysulfat infusert intraventrikulært forlenget tiden fra smitteoverføring til kliniske symptomer fra 51 til 123 dager i et museforsøk. Dette er et medikament mot interstitiell cystitt som har gitt lovende resultater for overlevelsestid i tester på pasienter med Creutzfeldt-Jakobs sykdom.

Fortolkning. Ved å benytte nye angrepsvinkler og behandlingsmetoder har man oppnådd resultater som kan gi håp om kurativ behandling i fremtiden.

Torger Stølsmark

tst070@student.uib.no
Det medisinske fakultet
Universitetet i Bergen
Postboks 7800
5020 Bergen

Ole-Bjørn Tysnes

Neurologisk avdeling
Haukeland universitetssykehus
Bergen

Creutzfeldt-Jakobs sykdom (CJD) er en prionsykdom med en incidens på kun rundt 1–2 per en million per år (1). Likevel har den fått mye oppmerksomhet fordi den potensielt kan være smittsom. Sykdommen er alltid dødelig, og døden inntreffer ofte i løpet av noen få måneder etter symptomdebut. Klinisk debutterer den ofte med symptomer som kan forveksles med depresjon. Humørsvingninger og hukommelsestap er også vanlig. Etter hvert får pasientene problemer med balanse og koordinasjon. Innen døden inntreffer, mister de evnen til å snakke og bevege seg. Vanlige dødsårsaker er hjertesvikt, respirasjonsvikt eller pneumoni.

Creutzfeldt-Jakobs sykdom kan enten opptre sporadisk (84 %), gjennom arv (10 %) eller i en ervervet form (6 %) (1). Sistnevnte skyldes overføring av prioner via bl.a. corneaimplantat eller nevrokirurgiske inngrep (2). I 1990-årene dukket det opp en ny type av den ervervede formen, kalt variant Creutzfeldt-Jakobs sykdom (vCJD). Til nå er ca. 200 personer i verden blitt rammet av vCJD (3), mest sannsynlig pga. inntak av mat fra storfe med kugalskap. Selv om faren for en epidemi med denne varianten ser ut til å være over, er det de senere år blitt rapportert noen tilfeller av smitte gjennom blodtransfusjoner (4). I Norge er det bare dokumentert to sikre tilfeller av den arvelige typen, to søstre bosatt på Vestlandet (5).

Prionprotein (PrP) finnes naturlig i membranen til de fleste celler i kroppen, uten at man er sikre på dets biologiske funksjon (6). Ifølge prionhypotesen oppstår sykdommen når det naturlige, cellulære prionprotein (PrP^C) blir omdannet til den sykdomsrelaterte scrapievarianten (PrP^{Sc}). Dette involverer hovedsakelig en strukturforandring, fra overvekt av α -helikser til høy andel β -flak. Denne formen for PrP er mer proteaseresistent og vil derfor akkumuleres.

Omformingen fra PrP^C til PrP^{Sc} skjer ifølge prionhypotesen ved at det patologiske

PrP^{Sc} virker som en form eller modell for å omdanne naturlig PrP^C til PrP^{Sc} (7) – uten at noen annen infeksjons partikkel er involvert. Ved den arvelige formen av Creutzfeldt-Jakobs sykdom blir prionet dannet ved en genmutasjon, ved den ervervede formen blir det tilført utenfra, mens ved den sporadiske formen vet man foreløpig ikke hvordan prionet først oppstår (7). Når prosessen først er kommet i gang, vil den fortsette som en kaskadereaksjon og føre til opphopning av PrP^{Sc} og til slutt celledød av nevroner.

Vi går her inn på tre ulike områder innen forskningen på behandling av Creutzfeldt-Jakobs sykdom som vi mener har vist de mest lovende resultatene.

Materiale og metode

Artikkelen er basert på ikke-systematiske søk i PubMed. Vi valgte ut originalartikler som vi syntes rapporterte om interessante og relevante resultater, i tillegg til oversiktsartikler. Referanselistene til disse artiklene ble også gjennomgått for å komplettere grunnlaget.

Reduksjon av PrP^C-mengden

Siden Creutzfeldt-Jakobs sykdom mest sannsynlig skyldes at PrP^C blir omdannet til PrP^{Sc}, som så akkumuleres, er en nærliggende løsning å fjerne eller redusere mengden av PrP^C. Det er to ulike måter å gjøre dette på: Man kan skru av ekspresjonen av prionproteingenet eller man kan hindre at proteinene blir dannet etter at genet er avlest, ved såkalt RNA-interferens (RNAi).

Genmanipulasjon

Denne metoden er blitt testet ved at man bruker mus som er genmanipulert slik at nevronene sluttet å produsere PrP^C ca. ti uker etter

Hovedbudskap

- Nyere forskning på Creutzfeldt-Jakobs sykdom i musemodeller viser oppløftende resultater på behandling fra ulike angrepsvinkler
- Blant de mest lovende metoder er genregulering, immunisering og medikamentell behandling
- Pentosanpolysulfat har vært utprøvd på pasienter med Creutzfeldt-Jakobs sykdom, men det er uklart om behandlingen hjelper

fødsel. De utviklet seg normalt, uten tegn til patologi (8). Forskjellen kom til syne da man en uke etter fødselen utsatte disse musene og en kontrollgruppe normale mus for scrapiesmitte. I kontrollgruppen døde samtlige mus av prionsykdom innen 12–18 uker, mens ingen av musene uten prionprotein var døde eller hadde fått kliniske tegn på sykdom etter 52 uker (9).

Tidlige tegn på Creutzfeldt-Jakobs sykdom kan være kognitiv svikt og endret sosial atferd. Mus som fikk fjernet ekspresjonen av prionproteinet etter at de var smittet med scrapie og hadde utviklet sykdomstegn, fikk bemerkelsesverdig reversert den kognitive svikten (6).

RNA-interferens

Her bruker man en type dobbeltstrengt RNA (dsRNA) for å oppnå en sekvensspesifikk, posttranskriptorisk «gensupprime-

ring». Metoden er relativt ny og kan benyttes når det er enkelte gener det er fordelaktig at ikke blir uttrykt, i dette tilfellet prionproteingenet. Det finnes flere ulike måter å få RNA-et inn i cellen på, men lentivirus har vist seg å være blant de best egnede, da de også kan integreres inn i genomet i celler som ikke deler seg (f.eks. nevroner) (10) (fig 1). En studie viste at lentivektormediert RNAi reduserte ekspresjonen av PrP^C og hindret opphopningen av PrP^{Sc} i en infisert neuroblastomcellelinje (11). I tillegg viste den at mus som var genmodifisert slik at deler av cellematerialet allerede inneholdt dsRNA, levde i gjennomsnitt 214 dager etter eksponering for prioner, mot 167 dager i kontrollgruppen. Overlevelsestiden samsvarte også med graden av genmodifisering, slik at jo større andel av cellene som produserte dsRNA, desto lenger levde musene.

White og medarbeidere utviklet nylig en

teknikk der de injiserte lentivirus med dobbeltstrengt RNA inn i hippocampus på mus som var smittet med scrapie intracerebralt (12). Disse musene levde i gjennomsnitt 105 dager etter infeksjon, mot 85 dager i kontrollgruppen (fig 2). I tillegg fikk de mindre spongiose forandringer, nevrontap og opphopning av PrP^{Sc}. Dessuten uteble også de første atferdsforandringene forbundet med sykdommen. Disse resultatene kom etter kun én fokal injeksjon av dsRNA i hippocampus, og post mortem-undersøkelse viste mindre degenerative forandringer i nettopp hippocampus, sammenliknet med resten av hjernen. Effekten kan med andre ord mest sannsynlig økes ved gjentatte injeksjoner på ulike steder i hjernen. Forsøk gjennomføres for å forandre lentiviruset med kapselproteiner, slik at det kan foreta retrograd transport langs aksoner (13), i tillegg til bedre mekaniske metoder for injiseringen (14). Begge deler kan føre til bedre spredning av lentiviruset, og dermed antatt bedre effekt.

Antistoffer

Man kunne tenke seg å bruke immunsystemet til å bekjempe prionsykdommer enten ved hjelp av passiv immunisering (overføring av antistoffer) eller aktiv immunisering (tilføre antigen som en vaksine). Generelt vil aktiv immunisering være mest effektivt, men det har vist seg vanskelig å få til pga. den store immuntoleransen som finnes for prionproteinet. Ett unntak var en japansk studie som viste at mus som var immunisert med modifisert prionprotein fra storfe fikk forlenget tiden fra overføring av prionsmitte til utvikling av sykdom, sammenliknet med kontrollgruppen (15).

White og medarbeidere utsatte vanlige mus for scrapiesmitte, for deretter å behandle dem med gjentatte injeksjoner av antistoffer mot PrP^C og PrP^{Sc} (16). Det mest effektive antistoffet hadde større affinitet for PrP^C enn for PrP^{Sc}, noe som er med på å styrke teorien om at PrP^C kan være det beste angrepspunktet for prionbehandling. Man antar at antistoffene virker ved å binde seg til PrP^C og dermed hindrer at det kan omdannes til PrP^{Sc}. Gjennomsnittlig overlevelsestid for kontrollgruppen var på ca. 200 dager, mens musene som fikk antistoff overlevde mer enn 500 dager. Man så heller ingen kliniske tegn til prionsykdom på noe tidspunkt hos de musene som fikk antistoff. Den store forskjellen på denne studien i forhold til andre, er at man her så god effekt opptil 30 dager etter smitte, på et tidspunkt da sykdommen hadde etablert seg og mye PrP^{Sc} allerede var dannet. Tidligere studier oppnådde kun effekt når man startet behandlingen før eller samtidig med smitteoverføringen, noe som mest sannsynlig bare avspeilet nøytralisering av smitteagens.

Passiv immunisering hadde ingen effekt sent i sykdomsforløpet, etter at de kliniske symptomene hadde brutt ut, muligens på grunn av manglende kryssing av antistoff

Figur 1 RNA-interferens (RNAi) er en relativt ny metode der man kan redusere ekspresjonen av spesifikke gen og hindre bestemte proteiner i å dannes. Man bruker genmodifiserte virus som implanterer en dobbeltstrengt RNA-sekvens (dsRNA) i cellene. RNAi virker ved at enzymet Dicer kutter opp dsRNA til mindre biter av siRNA (small interfering RNA). Disse igjen går inn i og aktiverer RISC (RNA-induced silencing complex), som binder til og gir degradering av mRNA (messenger RNA). Pfeifer og kolleger brukte denne teknikken til å supprimere den naturlige, cellulære versjonen av prionproteinet (PrP^C) i nerveceller som var infisert med scrapieprioner (PrP^{Sc}) (11). Dette hindret avleiring av PrP^{Sc} og førte til økt overlevelse da de overførte metoden til en musemodell

over blod-hjerne-barrieren (16). Det kan tyde på at denne behandlingsformen vil være bedre egnet til profylakse etter eksponering for prioner enn til behandling av prion-sykdommer. Eventuelt kan det være mulig å oppnå effekt ved intratekal administrasjon av antistoffene.

Antistoff direkte rettet mot PrP^C kan føre til flere mulige problemer. For det første er PrP^C til stede i celler i så utstrakt grad i kroppen at PrP^C-antistoffer kan føre til uttalt destruksjon av ulike cellyper. En studie har også vist at antistoffer mot PrP^C i hjernen ga apoptose av hjerneceller (17).

Medikamentell behandling

Screening er blitt utført for en rekke ulike stoffer og medikamenter både i celleløse system og i cellekulturer (18). Man ser etter stoffer som kan stabilisere PrP^C, gjøre PrP^{Sc} mer ustabil, hindre omdanning av prionproteinet eller på andre måter redusere mengden av PrP^{Sc}. Problemet har ofte vært å overføre resultatene fra laboratoriet til dyr som man har smittet intracerebralt. Dette kan blant annet skyldes at medikamentene ikke klarer å krysse blod-hjerne-barrieren.

Doh-ura og medarbeidere omgikk problemet ved å tilføre ulike medikamenter til mus intraventrikulært (19). Det var imidlertid kun pentosanpolysulfat (PPS), et medikament mot interstiell cystitt, som signifikant forlenget inkubasjonstiden. Hos mus som fikk pentosanpolysulfat, gikk det i gjennomsnitt 123 dager før de utviklet kliniske tegn på sykdommen, mot 51 dager i kontrollgruppen. Effekten var best ved høy dose og tidlig oppstart av behandling, selv om man også så effekt ved lavere doser og oppstart av behandling oppmot 40 dager etter smitteoverføring. Medikamentet virker ved å binde seg til PrP^C og fører til endocytose av prionproteinet (20). Slik reduserer det tilgjengeligheten av PrP^C til å bli omdannet til scrapievarianten.

Humanstudier

Pentosanpolysulfat er blitt gitt intraventrikulært til en rekke pasienter med prionsykdommer (21), deriblant sju pasienter fra Storbritannia som inngikk i en intervensjonsstudie (22). Det ble ikke benyttet kontrollgruppe, men overlevelsestiden viste seg å være lenger for samtlige sju pasienter enn gjennomsnittet for ubehandlede pasienter (16–64 måneder mot 13 måneder) (23). I tillegg overlevde to av pasientene med vCJD lenger enn det lengste som har vært rapportert hos ubehandlede pasienter med denne tilstanden (50 og 57 mot 39 måneder), og disse to var fremdeles i live når forsøket ble avsluttet. Selv om det var en del komplikasjoner i forbindelse med plasseringen av kanylen, så man ingen nevneverdige bivirkninger av pentosanpolysulfat. På den kliniske siden så man en forverring av allmenntilstanden under behandlingen, selv om det lave antallet pasienter og upresise måle-

Figur 2 Behandling med lentivirus som uttrykker anti-PrP dsRNA forlenger overlevelsen i mus med etablert prionsykdom. Mus ble infisert med prioner (RML) én uke gamle. Etter åtte uker ble de behandlet med bilaterale injeksjoner i hippocampus med enten modifisert lentivirus (LV-MW1), vanlig lentivirus (LV-Tom) eller ingen virus. Mus behandlet med det modifiserte lentiviruset fikk signifikant forlenget overlevelsestid sammenliknet med kontrollmusene ($p < 0,0001$, t -test). Figuren er originalt publisert i PNAS (12). © 2008, National Academy of Sciences, USA

toder gjorde det vanskelig å si hvor bra eller dårlig behandlingen virket.

Diskusjon

Flere av studiene retter seg mot å svekke eller nøytralisere det naturlig forekommende prionproteinet (PrP^C), forstadiet til det sykdomsfremkallende PrP^{Sc}. Mallucci og medarbeidere viste at mus uten PrP^C ikke utviklet sykdom etter eksponering for scrapiesmitte (9). Spørsmålet blir da om dette kan gjøres trygt og uten bivirkninger. Mens enkelte studier viste at mus uten PrP^C er levedyktige og med tilnærmet normal funksjon (8, 24), rapporterte Criado og medarbeidere at musene uten PrP^C hadde problemer med å lære romfølelse og hadde redusert kort- og langtidssynaptisk plastisitet i gyrus dentatus (25). Dette tyder på at PrP^C er nødvendig for normal hippocampusavhengig læring. Man fant ikke disse forandringene hos yngre mus født uten PrP^C i alderen 25 dager – fire måneder (26), noe som kan støtte hypotesen om at PrP^C er med på å beskytte nevronene mot oksidativt stress (27). På tross av potensielle alvorlige bieffekter kan man argumentere for behandlingsforsøk på mennesker, siden Creutzfeldt-Jakobs sykdom er en raskt dødelig sykdom.

Mange av medikamentene virker dårlig når behandlingen starter sent i sykdomsforløpet. Dermed kan det bli vanskelig å oppnå god effekt hos mennesker, ettersom pasientene først oppsøker medisinsk hjelp etter at de nevrologiske symptomene har debutert. Slik vil også forbedring av diagnostiske metoder kunne spille en viktig rolle for behand-

lingsresultatet. Foreløpig er det kun hos dem med den arvelige varianten av Creutzfeldt-Jakobs sykdom, der man kan påvise en genetisk mutasjon, at man i teorien kan starte behandling før det har oppstått uttalt nevrologisk celledød. Eksperimentell behandling på klinisk friske personer vil likevel være etisk vanskelig. Siden menneskehjernen er såpass mye større enn museshjernen, er også tilstrekkelig distribusjon i vevet et problem som må løses.

Tolking av resultatene fra kliniske forsøk med pasienter med Creutzfeldt-Jakobs sykdom kan også by på problemer, da overlevelsestiden ubehandlet i så stor grad varierer individuelt, fra få måneder til flere år. Når man i tillegg har et tynt pasientgrunnlag, vil usikkerheten ved resultatene fort bli stor. I noen tilfeller vil også livskvaliteten og bevissthetsnivået være så sterkt nedsatt at videre livsforlengende behandling ikke kan rettferdiggjøres.

Konklusjon

Forskningen på behandlingsmetoder for Creutzfeldt-Jakobs sykdom har gjort store fremskritt de siste årene. Tidligere fokuserte man mye på å screene for ulike medikamenter som kunne ha effekt, uten å oppnå noen særlige resultater. I det siste har man ved hjelp av ulike former for genterapi, RNAi, immunisering og intraventrikulært injiserte medikamenter oppnådd gode resultater i forsøksdyr (6, 12, 19). I enkelte forsøk har alle dyrene som ble behandlet holdt seg friske gjennom hele deres forventede levetid (9, 16). Man har også overført en av behand-

lingsmetodene, medikamentet pentosanpolysulfat, til pasienter med Creutzfeldt-Jakobs sykdom, med lovende resultater (22).

Selv om ingen har klart å finne eller utføre en helbredende behandling for pasienter med Creutzfeldt-Jakobs sykdom, finnes det nå teknikker og kunnskap som gir et godt grunnlag for videre forskning.

Oppgitte interessekonflikter: Ole-Bjørn Tysnes har mottatt honorar for forelesninger og fagmøter samt reisestøtte fra de fleste aktører innen farmasøytisk industri som er knyttet til fagfeltet nevrologi. Torger Stølsmark har ingen oppgitte interessekonflikter.

Litteratur

1. Ladogana A, Puopolo M, Croes EA et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 2005; 64: 1586–91.
2. Will RG. Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 2003; 66: 255–65.
3. Pocchiari M. Prevalence of variant CJD in the UK. *BMJ* 2009; 338: b435.
4. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363: 417–21.
5. Farbu E, Tysnes OB, Mork S et al. Two Norwegian sisters with late onset Creutzfeldt-Jakob disease caused by the E200K mutation. *J Neurol* 2007; 254: 262–3.
6. Mallucci GR, White MD, Farmer M et al. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron* 2007; 53: 325–35.
7. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13363–83.
8. Mallucci GR, Ratte S, Asante EA et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J* 2002; 21: 202–10.
9. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J et al. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 2003; 302: 871–4.
10. Li CX, Parker A, Menocal E et al. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 2006; 5: 2103–9.
11. Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S et al. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 3204–10.
12. White MD, Farmer M, Mirabile I et al. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10238–43.
13. Kato S, Inoue K, Kobayashi K et al. Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 1141–51.
14. Oh S, Odland R, Wilson SR et al. Improved distribution of small molecules and viral vectors in the murine brain using a hollow fiber catheter. *J Neurosurg* 2007; 107: 568–77.
15. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N et al. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 2007; 25: 985–92.
16. White AR, Enever P, Tayebi M et al. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 2003; 422: 80–3.
17. Solforsoli L, Criado JR, McGavern DB et al. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 2004; 303: 1514–6.
18. Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R et al. New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol* 2003; 77: 10288–94.
19. Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I et al. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 2004; 78: 4999–5006.
20. Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL et al. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the prion protein, PrP^C, in cultured cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 30221–9.
21. Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P et al. Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 713–26.
22. Bone I, Belton L, Walker AS et al. Intraventricular pentosan polysulphate in human prion diseases: an observational study in the UK. *Eur J Neurol* 2008; 15: 458–64.
23. Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA et al. Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 2004; 127: 2348–59.
24. Roesler R, Walz R, Quevedo J et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^C. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 71: 349–53.
25. Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B et al. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 2005; 19: 255–65.
26. Curtis J, Errington M, Bliss T et al. Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP⁰ null mice. *Neurobiol Dis* 2003; 13: 55–62.
27. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B et al. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 1997; 146: 104–12.

Manuskriptet ble mottatt 22.11. 2008 og godkjent 7.1. 2010. Medisinsk redaktør Trine B. Haugen.