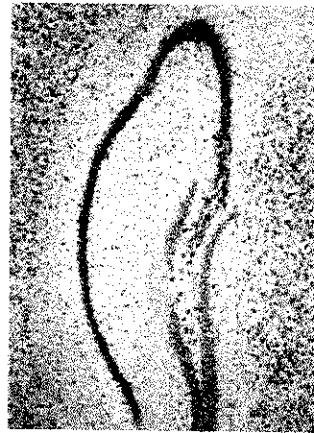


海馬領域



小脳

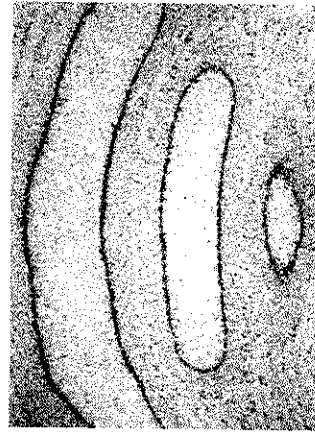


図3： Ngsk *Prnp*^{0/0}マウス（20週）脳における
PrPLPの異所性発現

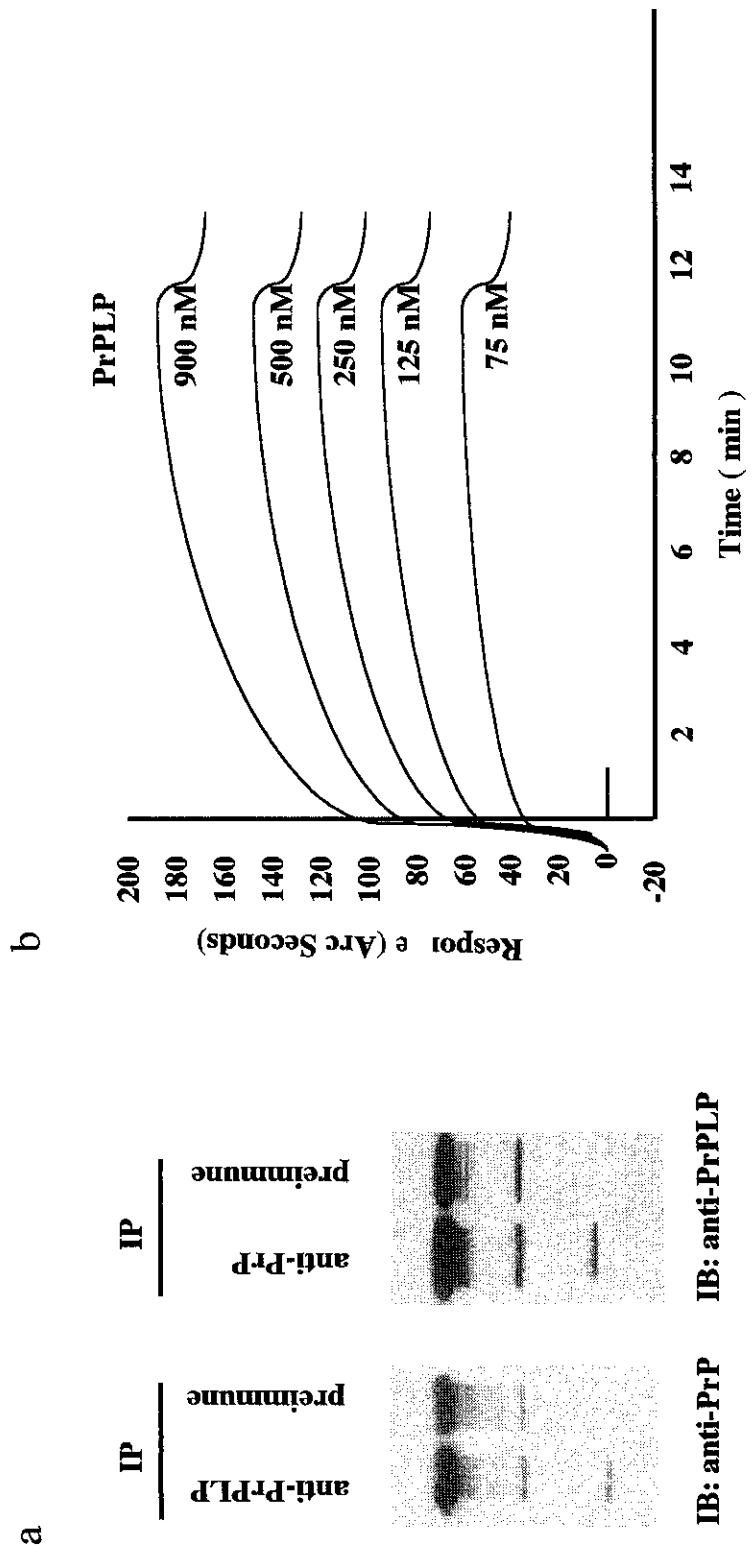


図4：免疫共沈法 (a) およびIA_{sys}法 (b) によるPrPLPとPrPとの物理的結合

プリオン病の発病阻止

班 員：北 本 哲 之（東北大・院医・病態神経）

〔研究要旨〕

プリオン病の治療、発病予防を目指して、トランスジェニック・マウスを用いた動物モデルで種の異なる正常プリオン蛋白が、別の種類のプリオン蛋白の異常化への変換を定量的に抑制することを初めて示した。具体的には、flagシリーズのトランスジェニックで抑制的な効果を得られ、異常化が起こらないプリオン蛋白分子はその存在そのものが抑制的な働きをするのではないかという仮説のもとに、ヒト型のトランスジェニックマウスへヒト・プリオンを投与し、マウスの正常プリオン蛋白がない状態（ablated background）、1つある状態（hemizygous or +/-）、2つある状態（wild）で比較したところマウスのプリオン蛋白の発現量に応じて発病の抑制効果が認められた。今後、この異常化の起こらないプリオン蛋白をもっと有効なものにデザインすることによってプリオン病の遺伝子治療への道筋が有望なものとなる。

〔研究目的〕

家族性及び外因性（感染性）プリオン病の発病阻止を目標として、以下のような研究計画を立てた。まず、培養細胞の系では、有効な薬剤等のアッセイ系としての有用性は認めるものの、その薬剤がヒト・プリオン病にとって発病阻止をするかどうかにはギャップがある。一つのギャップは、副作用の評価が細胞死でのみの評価である点である。その他にもBBBを通過するだけの有効濃度が得られるのかも不明である。スクリーニングには適していても、これだけで有効か否かを判断するのは難しいというのが現状である。そこで、我々はモデル動物を使ってプリオン病の発病阻止が可能かどうかを検討することを主な目的とした。今年度は、新しいトランスジェニックマウスであるflagシリーズとヒト型のトランスジェニックであるChW（129Met）、129Valシリーズの結果を提示する。

〔研究方法〕

1) 感染実験は、動物実験計画書を提出し承認されたものである。flagシリーズのトランスジェニックプリオン蛋白のシグナル・シーケンス後のLys-Lys-

Arg (KKR) の後に 8 個のアミノ酸よりなる flag シークエンスを導入し、もう一つの epitope tag として 3F4 認識配列を導入したトランスジェニック・マウスを作製した。作製したトランスジェニック・マウスはその発現量に応じて高いものから順に、flag#11>#7>#6 という系統の樹立に成功した。flag シリーズは、それぞれ ablated background としたものの、またはマウスの野生型プリオン蛋白遺伝子を持つ wild background のマウスも用意した。まず、wild background のものに対してマウス CJD 株である福岡一株を頭蓋内投与した。

2) ヒト型のトランスジェニックプリオン蛋白の N 末から BestEII サイトまでを、ヒト型としコドン 129Met 型の ChW シリーズ、コドン 129Val 型の 129 シリーズのトランスジェニックマウスを作製した。作製したマウスに関しては、flag シリーズと同様に ablated background、wild background を用意したが、それに加えて +/- の hemizygous background も用意した。それぞれの系統へ、sporadic CJD の発病脳を頭蓋内投与した。ヒト型のトランスジェニックマウスの発現量に関しては、ChW#30 が 0.6 倍、129#12 が 2 倍、129#21 が 4 倍、ChW#59 が 9 倍、ChW#69 が 18 倍の野生型マウスプリオン蛋白と比較したそれぞれのレコンビナント蛋白の発現量を有した。ヒト・プリオンの投与に関しては、今年度は ChW#30 と 129#12 の感染実験の結果を提示する。

トランスジェニックのベクターは、上流より 3 ないし 5Kbp が 129SV 由来、エクソン 1、2 およびイントロン 2 の BamHI fragment が I/Ln 由来、イントロン 2 の BamHI サイトからエクソン 3 そして下流の SalI サイトまでが 129SV 由来のゲノムを利用した。トータルのベクター長は 23 ないし 25Kbp の長さである。

〔結果と考察〕

1) flag シリーズ

flag シリーズでは、レコンビナント・プリオン蛋白の発現量は、flag#11>#7>#6 という系統の順であった。これは、野生型と比較したものではない。wild background のトランスジェニック・マウスで、マウスのプリオンである福岡 1 株を投与したところ、潜伏期間が flag#6 で 169 日、#7 で 176 日、#11 で >260 日であった。これは、予想外の結果で、レコンビナント・プリオン蛋白の発現量の多いものの方が潜伏期間が延長する、つまりレコンビナント・プリオン蛋白の発現が抑制的に働いている可能性を示唆するものであった。そこで、実際にレコンビナント蛋白に異常化への変換が起こっているか否かを Western blot で検討した。まず、それぞれのトランスジェニックマウスの脳の異常プリオン蛋白の量を比較したが 3 系統のマウス脳に差はなかった。次に、レコンビナント蛋白の異常化を 3F4 モノクローナル抗体を使って検討したところ、flag#11、#7、#6 ともに発現量に応じ

た異常レコンビナント蛋白の存在を確認した。つまり、flagレコンビナント蛋白で異常型への変換が観察され、この変換への効率の悪さが潜伏期間の延長として観察された可能性が出てきたわけである。そこで、もし異常化への変換がもっと起こりにくい、または起こらない分子が発現している状態ではこの抑制効果が顕著にみられるのではないかという仮説のもとに、次の実験を行った。

2) ヒト型シリーズ

従来からのヒト・プリオン病の野生型マウスへの伝播実験では約2年間という長期間の観察期間の後、20—40%程度の発病率であることから1-3)、以下のような実験を計画した。

ヒト型のトランスジェニック・マウスの内、あまり発現量の多くないChW#30と129#12の系統を用いて、ablated、hemizygous、wild backgroundと野生型マウスのプリオン蛋白の発現量を調整することによってほとんど異常化が起こらないと考えるマウスプリオン蛋白の抑制効果が観察可能かどうかを検討するものである。ChW#30において、潜伏期間はablatedが平均154日、hemizygousが215日、wildが367日であった。一方、129#12においては、ablatedが平均172日、hemizygousが259日、wildが319日であった。当初の予想通りに、マウスのプリオン蛋白はヒト化プリオン蛋白の異常化への変換をdose-dependentに抑制するという結果が得られた。今後は、この現象がwild backgroundのトランスジェニック・マウスへマウス・プリオンを投与しても同じような結果が得られるのかを検討する予定である。また、可能性は少ないとはいえ、ヒト・プリオンに対してマウスのプリオン蛋白分子も2年間という長い期間をかければ異常化への変換が認められるのは前述の通りである。この研究のfinal goalとしては、異常化の全く起こらない、観察されない分子を用いると感染性（外因性）プリオン病は、防御可能であることを示唆している。さらに興味有る事として、今年度はヒトのプリオン蛋白の異常化をマウスのプリオン蛋白が抑制することのみを示したが、家族性のプリオン病の発病も抑制するのは本研究の最終目標とも関係して今後積極的に検討しなければならない課題であると考えている。

〔結 論〕

2種類のプリオン蛋白を共に発現しているトランスジェニックマウスを用いて、ヒト・プリオン蛋白の異常化への変換が、マウスの正常型のプリオン蛋白によってdose-dependentlyに抑制されることを明らかにした。

[参考文献]

- 1) Tateishi J, Kitamoto T, Hoque MZ, Furukawa H. Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology* 46: 532-537, 1996
- 2) Tateishi J, Kitamoto T. Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathol* 5; 53-59, 1995
- 3) Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, et al. First experimental transmission of fatal amilial insomnia. *Nature* 376: 434-435, 1995

ヒト・プリオン病発症遅延薬物の評価

班 員：毛利 資 郎（九州大・院医・動物実験施設）

〔研究要旨〕

昨年選出したプリオン病発症遅延薬剤の候補のうち、アムフォテリシン B (AmB) とクロロキン (CQ) について、外来性プリオン病モデルとしてヒト由来のマウス順化CJD (GSS) 株であるF1株と感受性の高いマウス系統であるNZWマウスの組み合わせで、発症遅延マウスの動物モデルによる評価を行った。その結果、プリオン脳内接種、AmB腹腔内投与で明らかな発症遅延と潜伏期間の延長が認められた。このAmBの効果は感染初期にのみならず、プリオンの脳内蓄積が起きていると考えられる中期以降の投与においても潜伏期間が延長することが判明した。これはCJDのモデルでは最初であり、臨床応用の道が開かれた。一方、CQについては濃度を3段階に設定し、感染前から投与したが、いずれも潜伏期間の延長は認められなかった。遺伝性プリオン病における薬剤評価のためのTgモデルは作製中である。

〔研究目的〕

プリオン病発症遅延薬剤を検索、評価するために、我々は外来性プリオン病マウスモデルと家族性プリオン病モデルを作成し、それぞれに対応したプリオンを接種し、伝播実験モデルに対していくつかの発症遅延（潜伏期間を延長する）薬剤を検索する。ホルモン製剤、硬膜移植によって医原性に起こる外来性プリオン病に関しては、ヒトプリオン病のマウス順化株をマウスに接種して発症させる外因性プリオン病動物モデルを通して発症遅延薬剤を検討し、評価する。また、遺伝性プリオン病は、家族性プリオン病の一つである家族性致死性不眠症 (FFI) のモデルとしてFFI変異型D178N (Mo-FFI) を発現し、かつ内因性マウスプリオン蛋白遺伝子をもたない (Prnp^{0/0}) 完全FFI型遺伝子導入マウスを作製する。このFFI型Tgマウスを遺伝性プリオン病のモデルとして伝播実験を行い、発症遅延薬物を評価する。

〔研究方法〕

1. 外来性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

前年度文献的に選択し、候補薬剤として報告した(A)アムフォテリシンB Amphotericin B (AmB)、(B)クロロキンChloroquine (CQ)、(C)ポルフィリン Tetrapyrrole (TP)、(D)マンノサミン D-mannosamine (MA) について以下の方法で生物検定を開始した。このうち本年度に結果が得られたAmB,CQの一部について報告する。AmBについては1) プリオン接種7日前にAmB投与(以下、-7AmB群)、2) プリオン接種後60日よりAmB投与(以下、+60AmB群)、CQについては3) プリオン接種14日前よりCQを飲料水に添加し、経口的に投与(以下CQ群)をそれぞれ設定した。

1) -7AmB群

- ①プリオン接種前7日前よりAmB、3mg/kg・B.W./dayを腹腔内(i.p.)に週5日投与、安楽死まで続ける。
- ②プリオン接種7日前より蒸留水0.15mlをi.p.週5日投与、安楽死まで続ける。
- ③プリオン非接種、AmBのみ3mg/kg・B.W./dayを週5日安楽死まで投与。
- ④プリオン非接種、蒸留水のみ0.15mlをi.p.週5日、安楽死まで続ける。

2) +60AmB群

- ①プリオン接種60日後よりAmB、3mg/kg・B.W./dayを腹腔内(i.p.)に週5日投与、安楽死まで続ける。
- ②プリオン接種60日後より蒸留水0.15mlをi.p.週5日投与、安楽死まで続ける。
- ③プリオン非接種、AmBのみ3mg/kg・B.W./dayを週5日安楽死まで投与。
- ④プリオン非接種、蒸留水のみ0.15mlをi.p.週5日、安楽死まで続ける。

3) CQ群

- ①プリオン脳内(i.c.)接種のみ。
- ②プリオン接種14日前からCQ10mg/kg/day投与
- ③プリオン接種14日前からCQ30mg/kg/day投与
- ④プリオン接種14日前からCQ100mg/kg/day投与
- ⑤CQ100mg/kg/dayのみ投与

接種プリオン材料はヒトCJD(GSS)由来のマウス順化株(Fukuoka 1株:F1)を用い、マウスはF1に感受性の高い近郊系マウスNZW/Qdaを用いた。潜伏期間の測定はプリオン接種日を0日とし、典型的なマウスプリオン病の症状を呈して状態が悪化した時点で安楽死をさせ、接種から安楽死までの期間を潜伏期間として測定した。すべてのマウスは、安楽死後、脳をホルマリン固定、組織学的検索を行いプリオン病の確認を行った。

2. 遺伝性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

家族性プリオン病の一つである家族性致死性不眠症 (FFI) のモデルマウスとしてFFI変異型D178N (Mo-FFI) を導入遺伝子としたTgマウス (TgMo-FFI・Prn^{w/w}) を作製し、内因性マウスプリオン蛋白遺伝子を持たないマウスに戻し交配を行い、FFI変異型遺伝子導入マウス (TgMo-FFI・Prn^{0/0}) を作製する。このTgマウスに、マウス順化ヒトFFI株プリオンのマウス脳10%乳剤を脳内接種 (ic) し、発症の有無、臨床経過、潜伏期間、病理変化、PrP^{Sc}の沈着について検査する。

〔結果と考察〕

1. 外来性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

F1株プリオンを接種し、蒸留水のみを投与した対照マウスは、プリオン接種後100日頃から体重の減少が認められ、120日以降急激に減少し (図1)、潜伏期間は平均146日であった。プリオン接種7日前からAmBを投与した-7AmBマウスでは130日頃より体重の減少が始まったが、最初は比較的緩やかな減少であった。潜伏期間は平均180日となり対照マウスに比べて34日の延長が認められた (表1)。一方、プリオン接種後60日を経過してAmB投与を開始した+60AmBでは投与によりわずかな体重減少が認められたが、蒸留水のみ投与マウスほど急激な減少とはならず (図2)、潜伏期間は平均161日で対照マウスに比べて15日間の延長が認められた (表1)。潜伏期間測定の後、すべてのマウスは脳の組織学的検索を行って確かめた結果、体重減少などのマウスプリオン病を呈した個体はF1株特有の組織像を呈し、免疫染色にて異常なプリオン蛋白の沈着を確認した。潜伏期間の延長がみられた個体と短い潜伏期間の個体間で脳における異常プリオン蛋白の沈着に差はほとんど認められなかった。

アムホテリシンBの抗プリオン作用については、これまでスクレーピー263K株感染ハムスター^{1, 2)}、およびC506M3株感染マウス³⁾で明らかにされてきたが、スクレーピーの株によっては、139株のようにアムホテリシンBの影響を受けないものも認められた⁴⁾。実際にCJD患者の治療にアムホテリシンBで治療を行ったが成功しなかったという報告はあるが、ヒトから分離された株への有効性に関しては、モデル動物で感受性を検討した報告はない。この成果はCJDに関しては唯一の成績である。

また、これまでアムホテリシンBは感染初期でなければ効果がないといわれてきたが、C506M3株を用いた試験で、スクレーピー接種から80-140日後に投与を開始した場合も、生存期間の延長、異常プリオン蛋白の集積、およびglial fibrillary acidic protein (GFAP) 発現の遅延化が認められたという報告がある⁵⁾。実

験的マウスCJDでは脳内接種後150日程度で発病する場合、すでに接種後60日で100%のマウス脳に異常なプリオン蛋白の沈着がみられることが報告されている⁶⁾。したがって、我々のCJDの系でも接種後60日ではすでに脳内に沈着が始まっていると考えられ、その後に投与しても潜伏期間が延長することから、AmBの効果はプリオン感染初期のみならず、すでに脳にプリオン沈着の後でも抑制効果があることが示唆された。

一方、クロロキン (CQ) については、接種前14日からCQ投与を始めたにもかかわらず、脳内接種後の潜伏期間の延長は全く認められなかった(図3、表2)。これはクロロキンの投与量の不足、あるいは脳関門を越えて脳内への分布が不十分であることも考えられ、その有効無効についてこれだけで結論を出すのは早計である。より高濃度のCQによる追試験が必要であると考えている。候補にあげたそのほかの薬剤については現在実験中である。

2. 遺伝性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

家族性プリオン病の一つである家族性致死性不眠症 (FFI) のモデルマウスとしてFFI変異型D178N (Mo-FFI) を導入遺伝子としたTgマウス (TgMo-FFI・Prnpw/w) 1系統が作製されたが、その遺伝子発現量が多すぎ、いわゆるover expression syndromeによる後肢麻痺を呈し、繁殖に障害があった。従って、さらに新たに遺伝子導入マウスの作製を行い、2系統の Tgマウス (TgMo-FFI・Prnpw/w) を作製した。現在、このマウスをPrnp0/0マウスに戻し交配をし、TgFFI・Prnp0/0を作成中である。また、2系統の T g FFI・Prnpw/wにマウス順化ヒトFFI株を接種し、経過観察中であるが、200日を経過しても変化は認められていない。

〔結 論〕

- (1) アムフォテリシンBはCJDモデルマウスの潜伏期間を延長し、CJDの発症遅延の効果があることが示唆された。
- (2) クロロキンについては低濃度では、CJDモデルマウスの発症遅延効果は認められなかった。

〔倫理面への配慮〕

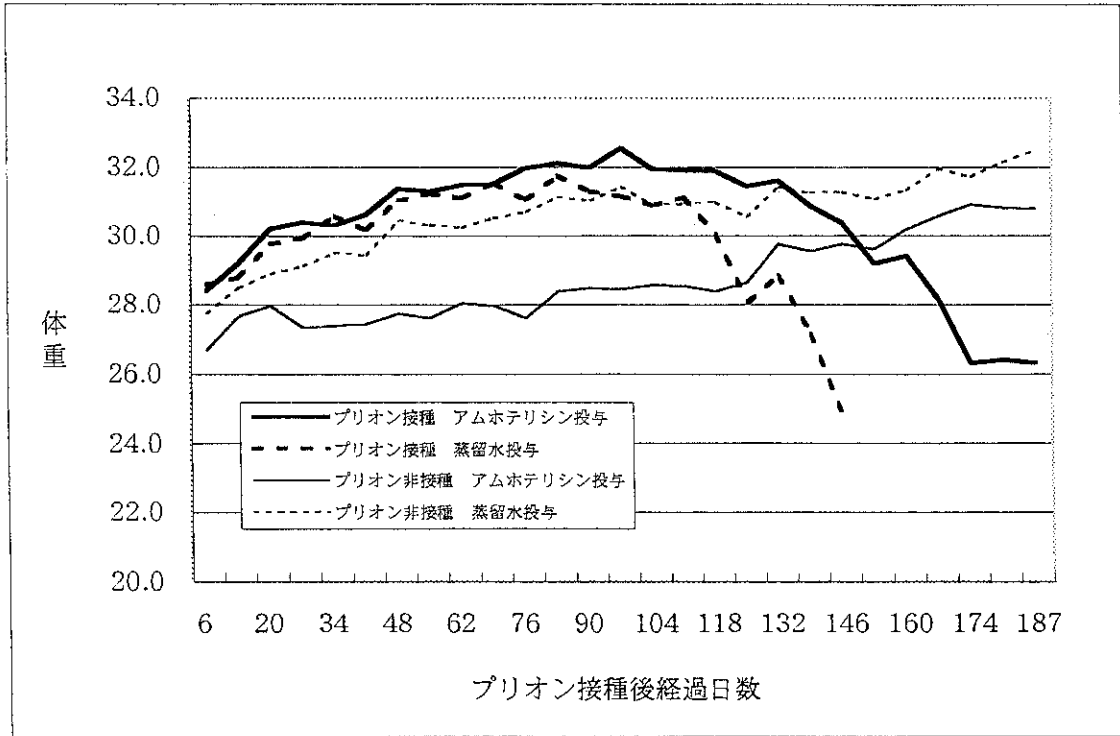
全ての繁殖、感染実験は九州大学医学部動物実験指針に従い、実験計画書は九州大学医学部動物実験委員会の審査を受け承認されている(課題名:家族性プリオン病及び外因性プリオン病の発症遅延方策に関する介入研究、審査番号10-018-0)。

動物の苦痛排除・軽減のための具体的方策として接種はエーテル麻酔下で行い、発症した動物に関しては終末期に至る前にエーテル麻酔下で断首により安楽死させた。

〔参考文献〕

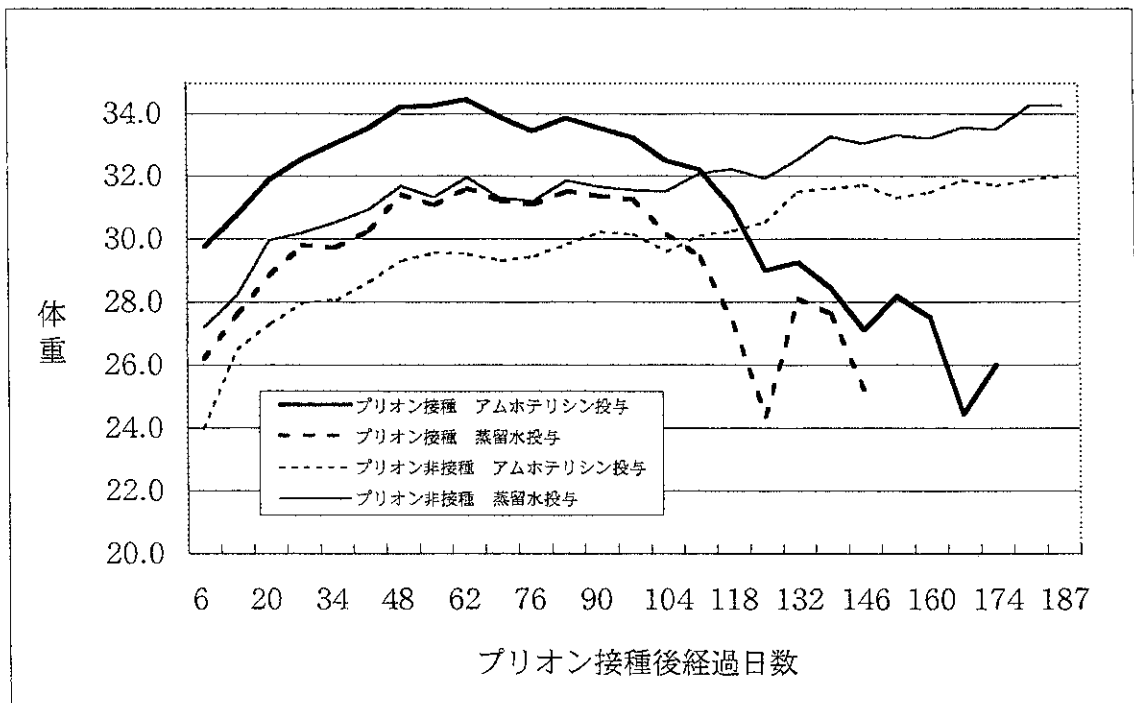
- 1) Casaccia, P., Ladogana, A., Xi, Y.G., Ingrosso, L., Pocchiari, M., Silvestrini M.C., and Cittadini, A.: Measurement of the concentration of Amphotericin B in brain tissue of Scrapie-infected hamsters with a simple and sensitive method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 1486-1488, 1991
- 2) Pocchiari, M., Schmittinger S., and Masullo C.: Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in Intracerebrally inoculated Hamsters . *J Gen Virol*. 68: 219-223, 1987
- 3) Demaimay, R., Adjou, K., Lasmezas, C., Lazarini, F., Cherifi, K., Seman, M., Desleys J.-P., and Dormont D.: Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamstar scrapie. *J Gen. Virology*. 75: 2499-2503, 1994
- 4) Xi, Y.G., Ingrosso L., Ladogana, A., Masullo C., and Pocchiari, M.: Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature*.356: 598-601, 1992
- 5) Demaimay, R., Adjou, K.T., Beringue V., Demart, S., Lasmezas, C.I., Deslys, J.-P., Seman, M., and Dormont D.: Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *Journal of Virology*. 71: 9685-9689, 1997
- 6) Muramoto T., Kitamoto T., Tateishi T. and Goto I. : The sequential development of abnormal prion protein accumulation in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *A.J.P.* 140: 1411-1420, 1992.

図1. アムホテリシンB (AmB) 投与 -7AmB の体重変化



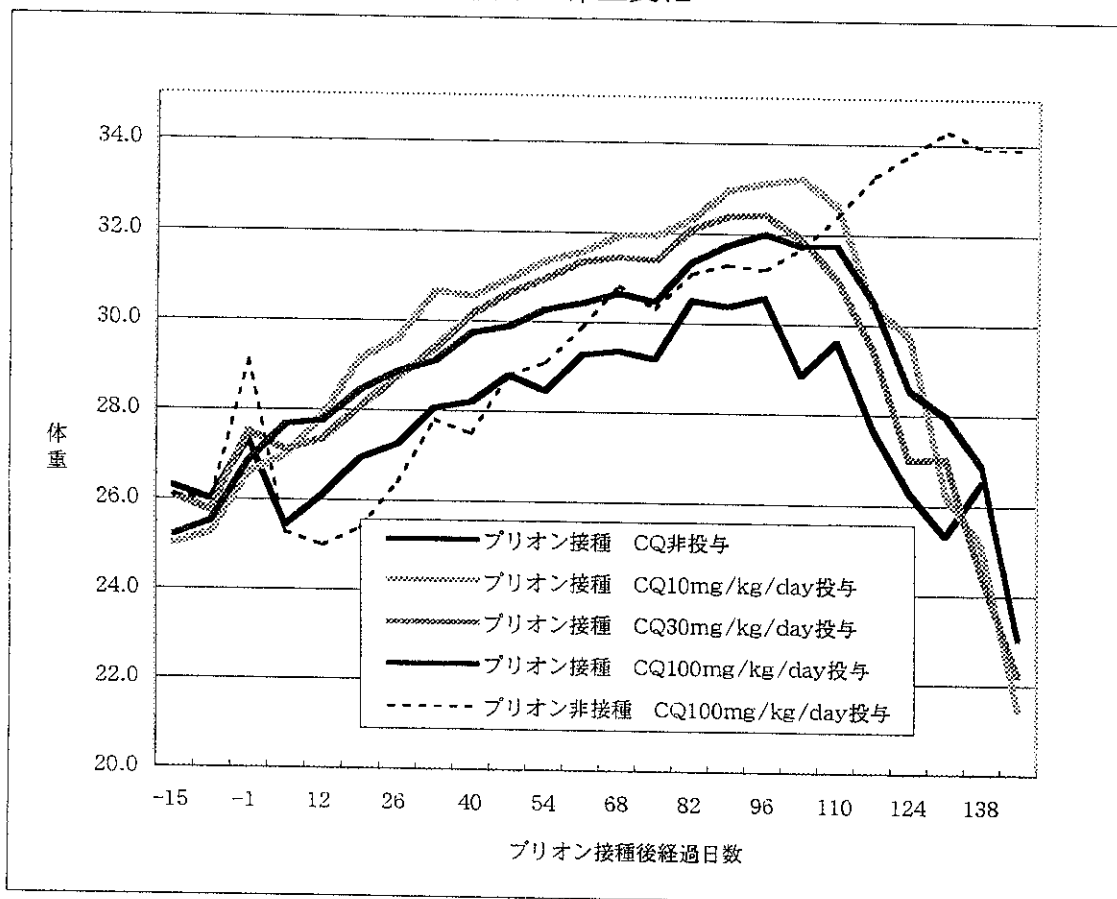
プリオン接種 (i.c.) 前7日より AmB 投与を継続

図2. アムホテリシンB (AmB) 投与 +60AmB の体重変化



プリオン接種 (i.c.) 後 60 日(矢印↑)より AmB 投与を継続

図3. クロロキン (CQ) 投与の体重変化



プリオン接種 (i.c.) 前 14 日より CQ 投与を継続

表1. Effect of Amphotericin B on Incubation periods of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Treatment* (number)	Incubation period days ± SD	Delay days
untreated (9)	146 ± 4.0	
7days pre ic (5)	180 ± 5.1	34
60days post ic (5)	161 ± 11.6	15

* injected with 3mg/kg B.W. per day into intraperitoneal every 5days/week

表2. Effect of Chloroquine on incubation periods of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Group treatment*	Incubation period days ± SD
untreated	137 ± 4.6
10mg/day	141 ± 7.1
30mg/day	145 ± 6.3
100mg/day	148 ± 3.1

* Administer CQ via oral with drinking water

ライソゾーム修飾薬剤による感染型プリオン蛋白の沈着阻害

班 員：堂 浦 克 美（九州大・院医・脳研病理）

〔研究要旨〕

プリオン病の治療薬剤開発の基礎研究として、これまでの研究成果を踏まえライソゾーム機能を修飾する化学物質の中で臨床応用可能なものについて、プリオン病持続感染培養細胞を用い感染型プリオン蛋白の産生沈着阻害効果を調べ、その阻害機序について検討を行った。ライソゾーム嗜好性薬剤のquinacrineやシステインプロテアーゼ阻害剤のE-64dが低濃度で阻害効果を示したが、特にE-64dは有効濃度範囲が広く極めて有効であった。これらの薬剤は、正常型プリオン蛋白の代謝に影響せず、正常型プリオン蛋白から感染型プリオン蛋白への転換反応にも影響しなかったことより、間接的に感染型プリオン蛋白の産生を阻害しているかあるいはその半減期を短縮しているものと推定された。E-64dは本邦においてヒトの治験薬剤として用いられたことがあり、その有効性が動物実験で確認できれば早期にヒトへの臨床応用が可能である。

〔研究目的〕

プリオン病患者の生命予後を改善するための治療薬剤開発の基礎研究として、スクレイピー持続感染細胞を用いて感染型プリオン蛋白質（PrPres）の産生沈着を阻害する化学物質の探索を行った。特に、臨床で使用されている薬剤もしくは使用可能な化学物質の中から有効であるものを探した。PrPresが神経細胞内に蓄積する機序についてはまだ十分には解明されていないが、スクレイピー持続感染細胞においてはカベオラあるいはクラスリン被包小胞内で正常型プリオン蛋白質（PrPsen）からPrPresへの構造変化が起こり、PrPresはライソゾームに蓄積することが明らかとなっている。我々は、昨年度までに (1) ライソゾームに存在する蛋白分解酵素の発現が、PrPresの蓄積と相関してプリオン病罹患脳で増加すること、(2) ライソゾームの機能を抑えることによりPrPresの蓄積が抑えられることを明らかにしている。そこで、ライソゾームの機能を修飾する化学物質に焦点を絞り感染型プリオン蛋白の産生沈着阻害効果を調べ、その阻害機序について検討を行った¹⁾。

〔研究方法〕

細胞培養 米国NIHロッキー山脈研究所で樹立されたスクレイピー持続感染神経芽細胞腫細胞を10%FBS加MEM培地で培養した。confluent細胞数の10分の1の細胞を播き、試薬を培地中に加え、4日間培養を続けた。細胞をPBSで洗浄したのち、生細胞数を数え細胞のviabilityの指標とした。

PrPresの解析 培養細胞をlysis buffer (0.5% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, PBS)で溶かしDNAなどの不溶性成分を低速遠心で除いた。25mg/ml Proteinase Kを加え、37°C 30分反応させたのち、PMSFで反応を止めた。330,000×g, 20°C, 1時間遠心し、得られた沈殿をSDS-PAGE, Western blot法で解析した。抗体はマウスプリオン蛋白のAA89-103, AA218-232の合成ペプチドを兔に免疫して得られた2種を用いた。化学蛍光法によるシグナル検出をMolecular Dynamics社のStormで行い、シグナルを定量した。

PrPsenのmetabolic labeling confluentな細胞をPBSで洗浄し、1%FBS加MEM (Met-, Cys-)を加え30分間培養した。試薬とTrans 35S-labelを加え100分間培養したのち、10%FBS加MEMと試薬を加え18分から8時間のchaseを行った。細胞をPBSで洗浄したのち、lysis bufferで溶解した上清を用いて免疫沈降を行った。免疫複合体の沈殿をSDS-PAGEとautoradiogramで解析した。一方、細胞膜上のGPIアンカーを持つPrPsenは、同様なmetabolic labelingを行った細胞をPBSで洗浄後に1.6mmol/ml PIPLCで37°C 30分反応させ、反応液に免疫沈降法を行い同様に解析した。

PrPのcell-free conversion反応

スクレイピー感染ハムスター脳より精製したPrPresと35Sでmetabolic labelingを行ったGPIアンカーのない組み換え型ハムスターPrPsenを用い、グアニジン塩酸を用いる方法と用いない方法でcell-free conversion反応を文献2)に従い行った。

〔結果〕

ライソゾーム嗜好性薬剤の効果

表1に示すように、IC50(50% inhibition concentration)が25 uM以下でPrPresの蓄積阻害効果が認められたのはquinacrine, Tilorone, chloroquine, suramine, sulmazoleであった。この中ではquinacrineのIC50は0.4 uMと低濃度であった。しかし、これらの薬剤はいずれも細胞増殖に影響をおよぼす濃度(maximal toxic concentration; MC)とIC50の濃度に大きな開きがなく、阻害効果の認められる有効濃度範囲は狭かった。

システインプロテアーゼ阻害剤の効果

表1に示すように、IC50が25 uM以下でPrPresの蓄積阻害効果が認められたのはE-64d, E-64, leupeptinであった。この中ではE-64dのIC50は0.5 uMと低濃度であ

った。また、これらの薬剤はいずれもMC濃度とIC50濃度に大きな開きがあり、阻害効果の認められる有効濃度範囲は極めて広がった。

PrPsen代謝への影響

これらの薬剤によるPrPres産生沈着阻害が、PrPsenの産生や代謝を変化させた結果である可能性についてPrPsenのmetabolic labelingにより検討した。quinacrine、E-64dをそれぞれ50 uM (IC50の100倍、67倍)を培地中に加え18分から8時間のchaseを行ったが、これらの薬剤による全般的な蛋白質の代謝への影響は明らかではなかった。また、これらの薬剤によるPrPsenの代謝への直接的な影響は認められなかった。さらに、細胞膜上に発現しているGPIアンカーを持つPrPsenについて、同様にmetabolic labelingと PIPLCを用いて調べたが、これらの薬剤による変化は観察されなかった。

cell-free conversion反応への影響

これらの薬剤によるPrPres産生沈着阻害が、PrPsenやPrPresにこれらの薬剤が直接結合しPrPsenからPrPresへの転換反応を阻害することによるものかどうかをcell-free conversion反応を用いて検討した。quinacrine、E-64dをそれぞれ2.5 mM (IC50の5000倍、3350倍)を反応系に加えその効果を調べたところ、グアニジン塩酸を用いる方法と用いない方法のどちらにおいても、これらの薬剤はPrPsenからPrPresへの転換反応を阻害しなかった。

[考 察]

本年度の研究により、ライソゾームの機能を修飾する化学物質の中に、比較的 low 濃度でPrPresの蓄積を抑えかつその阻害効果の有効濃度範囲が広いものがあることが判明した。それらの中で特に有効と考えられるのはE-64dである。この薬剤は本邦の薬品会社により開発されたもので、1980年代後半に本邦において進行性筋ジストロフィーの治験に用いられたことがある。筋ジストロフィーの実験モデル動物では有効性が確認されたが、ヒトの進行性筋ジストロフィー患者では残念ながら無効であった³⁾。このことより、E-64dは今後動物実験にてその有効性が確認されればヒトに早期に臨床応用できる薬剤である。ただし、プリオン病の標的臓器は中枢神経系であるがE-64dの中枢神経系への移行は限られており、drug deliveryに工夫が必要である。

一方、ライソゾームの機能を修飾する化学物質によるPrPresの蓄積阻害がPrPsenの代謝への影響でないこと、PrPsenからPrPresへの転換反応への直接的影響でないことを明らかにした。この阻害のメカニズムを解明することにより感染性を持つPrPresの産生に関する分子機序を明らかにできると考えられ、新たな治療戦略が生まれるものと期待される。

〔結 論〕

ライソゾーム嗜好性薬剤のquinacrineやシステインプロテアーゼ阻害剤のE-64dが、低濃度でプリオン病持続感染培養細胞において感染型プリオン蛋白の産生沈着を阻害することを明らかにした。特にE-64dは有効濃度範囲が広く極めて有効であった。これらの薬剤は、正常型プリオン蛋白の代謝に影響せず、正常型プリオン蛋白から感染型プリオン蛋白への転換反応にも影響しなかったことより、間接的に感染型プリオン蛋白の産生を阻害しているかあるいはその半減期を短縮しているものと推定された。

〔参考文献〕

1. Doh-ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey. 2000. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.* (in press)
2. Caughey, W. S., L. D. Raymond, M. Horiuchi, and B. Caughey. 1998. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12117-12122.
3. Satoyoshi, E. 1992. Therapeutic trials on progressive muscular dystrophy. *Internal Med.* 31: 841-846.

表1. ライソゾーム嗜好性薬剤およびシステインプロテアーゼ阻害剤によるPrPresの沈着阻害

	IC50 (uM) a	MC (uM) a
ライソゾーム嗜好性薬剤		
Quinacrine	0.4±0.02	2.0±0.25
Tilorone	1.3±0.21	9.2±1.44
Chloroquine	2.3±0.53	42.±1.44
Suramine	12.3±2.30	>50b
システインプロテアーゼ阻害剤		
E-64d	0.5±0.11	>100b
E-64	2.0±0.30	>625b
Leupeptin	25.2±4.12	>125b

a 平均±標準偏差

b 検索最大濃度

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者名	論文標題		
Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli C., Erpel S.P., Nakaoke, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Katamine, S	A mouse prion protein (PrP) transgene rescues Purkinje cell degeneration and demyelination in mice deficient for PrP.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Lab. Invest.	79	1999	689-697
著者名	論文標題		
Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pastermak, S.H., Chrishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F.A., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., and Westaway, D.	Ataxia in prion protein (PrP) deficient mice associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
J. Mol. Biol.	292 (4)	1999	797-817
著者名	論文標題		
Deli, M. A., Niwa, M., Katamine, S., and Abraham, C. S.	Pentosan in transmissible spongiform encephalopathies.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Lancet	353	1999	1272
著者名	論文標題		
Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoke, R., Moriuchi, R., Niwa, M., and Katamine, S.	Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
J. Virol.	74	2000	411-417
著者名	論文標題		
片峰茂	クロイツフェルトーヤコブ病		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
生体の科学「病気の分子細胞生物学」	50巻5号	1999	502-503