

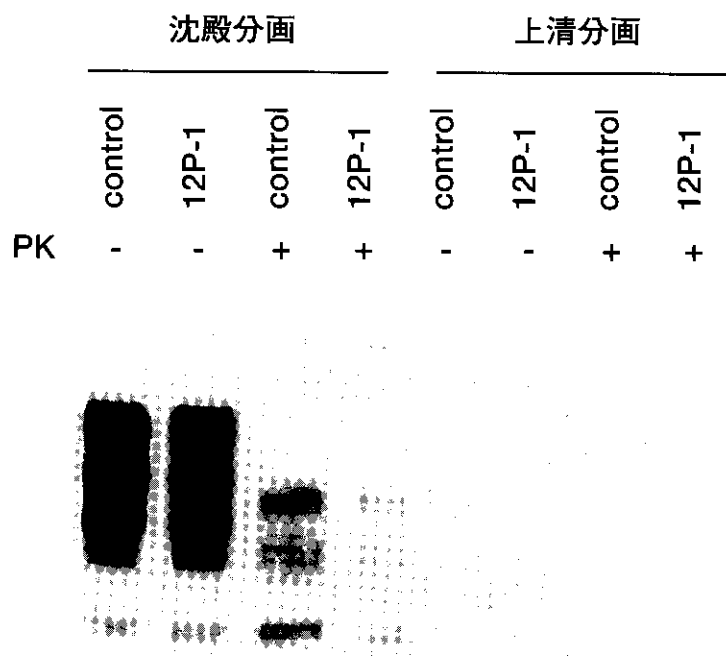


図 3： 逆変換反応にて産生されたPrPの界面
活性剤溶解性

プリオン病の遺伝子治療の基礎的研究

班 員：北本哲之（東北大・院医・病態神経）

〔研究要旨〕

レコンビナント・プリオン蛋白の遺伝子導入マウスを用いて、感染実験を行った結果以下の点が明らかとなった。1) 導入したレコンビナント・プリオン蛋白に、異常化が成立するプリオン蛋白と成立しないプリオン蛋白が存在する。2) 異常化が成立する・しないに関らず、レコンビナント・プリオン蛋白が存在することによって共存するプリオン蛋白の異常化が抑制される。3) 異常化が成立しないプリオン蛋白の方が、抑制力が強い傾向がある。という3点の結果が得られた。プリオン病は、一度発病すると有効な治療法が存在しない神経疾患である。外因性および家族性プリオン病の効果的な治療は、発病阻止つまり発病予防方策の確立である。本研究の報告によって、異常化の成立しないレコンビナント・プリオン蛋白を分子設計し、そのレコンビナント・プリオン蛋白を導入することによって新しい治療法が可能となる。

〔研究目的〕

プリオン病のなかで、家族性および外因性のプリオン病の治療を目指した研究として発足した重点領域研究であるが、我々のグループはヒト・プリオン感染に高い感受性マウスを作製する遺伝子操作マウスの感染実験で、また、家族性プリオン病モデルマウスの作製中に、プリオン病の治療につながる結果を見出した。治療につながる結果の要点は、異種動物のプリオン蛋白や変異を導入したプリオン蛋白と本来持っているマウスのプリオン蛋白の共存下では、著しく潜伏期間が延長するという結果である。導入したレコンビナント・プリオン蛋白が異常になり得るかどうかで、Conversion competentとConversion incompetent prion protein (PrP)に分類し、将来の遺伝子治療の可能性を考察する。

〔研究方法〕

1) ヒト・マウスキメラ型プリオン蛋白を導入したトランスジェニックマウスとして、Tg-ChM#30（コドン129Metタイプ）、Tg-ChV#12,#21（コドン129Valタイプ）の感染実験を行った。また、これらのトランスジェニックマウスは理論的にDoppelの発現が見られるであろうノックアウトマウスとの交配によって、マウス

のプリオン蛋白のablated background (0/0)、hetero-zygous background (W/0)、wild background (W/W)のトランスジェニックマウスを作製し、感染実験を行った。発現量を野生型マウスの発現量と比較したところ、Tg-ChM#30が0.7倍、Tg-ChV#12が2倍、Tg-ChV#21が4倍の発現量を示した。

2) ヒト型のトランスジェニックマウスは上記の通りであるが、今回は新たにマウスのプリオン蛋白遺伝子を改変したTg-flag (シグナルペプチドのあとのN末端KKの後にflag tagを挿入し、また3F4 epitope tagも導入したトランスジェニックマウス)とTg-FFI (マウスのプリオン蛋白遺伝子のコドン177AspをAsnに変更したもので、ヒトのFFIの変異に相当する変異を導入したトランスジェニックマウス)の感染実験を行った。

3) 感染実験に使用したヒトの脳乳剤は、孤発例古典型CJDの一例で、プリオン蛋白遺伝子には変異がなくコドン129M/M、コドン219E/Eであり、異常プリオン蛋白はタイプ1型である。また、マウスのプリオン株としては、福岡1株を主に使用し、FFI型のトランスジェニックマウスにおいては、ヒトFFIより分離したマウス・FFIプリオン株も使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、動物実験委員会の審査を受け行った。

[考 察]

1) ヒト型プリオン蛋白とマウスプリオン蛋白の共存状態での感染実験

ヒト型のトランスジェニックマウスでは、野生型のマウスプリオン蛋白が同時に発現しており、同じ神経細胞内にレコンビナントプリオン蛋白とマウスプリオン蛋白が共存しているという状態が作り出せる。このトランスジェニックマウスとプリオン蛋白のノックアウトマウスを交配することによって、野生型のマウスのプリオン蛋白の発現量を調節することも可能である。そこで、まずTg-ChM#30に関するヒト・プリオンによる感染実験の結果は、0/0バックグラウンドでは150日±15.2日、W/0バックグラウンドでは215日±30.8日、W/Wバックグラウンドでは375日±45.5日という結果であった。これは、0.7倍に発現しているレコンビナント・ヒト型プリオン蛋白の異常化を野生型のマウスプリオン蛋白が発現量依存性に阻害していることを示している。接種材料を、マウス株である福岡1株にした場合は、Tg-ChM#30 W/Wでは190日±21.0日となり、W/0では390日±11.7日、0/0では539日±20.2日となった。驚くべきことに、ヒト型レコンビナントプリオン蛋白はマウス・プリオンに関してもConversion competentであるという事実が明らかになり、マウスプリオン蛋白の異常化に関しても、conversion competentであるヒト型プリオン

蛋白が抑制的に働いていることも明らかとなった。

それでは、ヒト型の別の系統のトランスジェニックマウスでも同様の抑制効果が得られるであろうか。ヒト・プリオンを使用して検索した結果、Tg-ChV#12 0/0では182日±17.7日、W/0では259日±15.9日、W/Wでは319日±25.4日という結果であった。また、Tg-ChV#21では、0/0においては192日±4.0日、W/0では250日±16.2日、W/Wでは352日±8.7日と、全く同様にマウスプリオン蛋白の存在がヒト型プリオン蛋白の異常化に対して抑制的に働いているという結果が得られた。

2) 野生型マウス・プリオン蛋白とflag/3F4 tagを導入したマウス・プリオン蛋白でも抑制的に働くのか。

プリオン蛋白の動態を観察する目的で、マウスのプリオン蛋白に2つのエピトープタグを導入したトランスジェニックマウスを作製した。1つは、マウスのプリオン蛋白のN末端のLys-LysとArgの間に8個のアミノ酸からなるflagを導入し、もう一つはプリオン蛋白の中ほどに3F4のエピトープを導入する目的で2つのアミノ酸をMetに変更したレコンビナントプリオン蛋白である。トランスジェニックマウスは3系統得られ、発現量の多い順に#11>#7>#6と系統を樹立した。さて、W/Wバックグラウンドで、このTg-flagシリーズの感染実験を行ったところ、マウス・プリオンの福岡1株に対する潜伏期間は、Tg-flag#6が172日±8.1日、Tg-flag#7が182日±11.0日、Tg-flag#11が249日±8.8日であった。また、0/0バックグラウンドでも感染が成立したので、flag/3f4のレコンビナントプリオン蛋白はconversion competentであることも確かめられ、conversion competentのプリオン蛋白の共存が、発現量に応じて潜伏期間を延長することが確かめられた。

3) 変異導入マウスプリオン蛋白でも、抑制効果は存在するのか。

家族性プリオン病の解析のために、マウスのプリオン蛋白のコドン177のAspをAsnに変換したFFI型のトランスジェニックを作製した。また、マウス型の過剰発現で、感染性のプリオン病の解析のために、野生型マウスプリオン蛋白を導入したトランスジェニックマウスも作製し、感染実験を行った。Tg-FFIは、発現量の多い#17と野生型の20%程度の発現量の#48の系統が樹立でき、Tg-Mo（野生型）も2系統の樹立中であるが、現時点で感染性を観察しているのは、Tg-FFI#48とTg-Mo#23だけである。Tg-Mo#23は、ほぼ野生型の発現量に等しい発現量を示す。さて、感染実験の結果は、Tg-Mo#23 W/Wは平均97日の潜伏期間を呈して、感受性の高さを証明したが、Tg-FFI#48（発現量 0.2倍） W/Wで福岡1株を用いて感染実験を行ったところ潜伏期間は274日±14.0日であった。この潜伏期間の延長を比較するために、ヒト型で発現量0.7倍を示すTg-ChM#30 W/Wで福岡1株の潜伏期間を再提示すると190日±21.0日となる。わずか0.2倍の発現量のマウス変異型プリオン蛋白（FFI型変異）の方が、種を越えたヒト型プリオン蛋白よりも抑制効果が高かった

わけである。さて、FFI型トランスジェニックマウスは、家族性プリオン病のモデルとして開発したが、現時点では自然発症は認められず、また0/0バックグランドでの福岡1株とマウスのFFI株による感染成立も観察されていない。つまり、現時点ではconversion incompetentのプリオン蛋白である。このconversionincompetentのプリオン蛋白が、感染の抑制に有効であることを示す一つの典型例であると考え

〔結 論〕

プリオン蛋白のトランスジェニック・マウスを用いて、導入したプリオン蛋白がたとえconversion competentであっても、共存することによってプリオン病の発病を抑制することが明らかとなった。また、conversion incompetentなプリオン蛋白の導入は将来の遺伝子治療を視野に入れた新しい治療法として有用である。

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Konaka K, Kaido M, Okuda Y, Aoike F, Abe K, Kitamoto T, Yanagihara T. :Proton magnetic resonance spectroscopy of a patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neuroradiology*. 42(9), 662-665, 2000
- 2) Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, Sato T.: Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. *Epidemiol Infect*, 125(1), 201-205, 2000
- 3) Kitamoto T. : Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 20 Suppl, S52-54, 2000
- 4) 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*. 21, 288(3), 179-182, 2000

ヒト・プリオン病発症遅延薬物の評価に関する研究

班 員：毛利 資郎（九州大・院医・動物実験施設）

〔研究要旨〕

一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 (Amphotericin B、AmBと略)、クロロキン (Chloroquine、Cqと略)、フタロシアニン (Phthalocyanin、Phcと略)、マンノースアミン (D-mannosamine、Mnと略) について、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マウスの実験系を外来性ヒトプリオン病モデルとして、発症遅延効果について評価を行った。

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有意に延長することが判明した。

Cqについては濃度を3段階に設定し、感染前、あるいは感染60日後から投与した。高濃度で感染前より投与された群のみ僅かに効果が認められたが、感染後投与では効果は認められなかった。PhcとMnについては効果なしと判定された。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、伝搬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。そして、ホルモン製剤、硬膜移植によって起こったと考えられている医原性、外因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ヒトプリオン病動物モデルを通して発症遅延薬剤を検討し、臨床応用を目指すことがこの研究の目的である。

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) のモデルとしてマウスのFFI変異型D177N (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 (Prnp0/0) 完全FFI型遺伝子導入マウスを作製し、このFFI型Tgマウスを遺伝性プリオン病のモデルとして、発症遅延薬物を評価することを第2の目的とする。

〔研究方法〕

1. 外来性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

文献的に選択し、候補薬剤として選出したアムフォテリシン B (Amphotericin B、AmBと略)、クロロキン (Chloroquine、Cqと略)、フタロシアニン (Phthalocyanin、Phcと略)、マンノースアミン (D-mannosamine、Mnと略) いて以下の方法で生物検定を開始した。

1) プリオン脳内接種 (i.c.) による評価

基本的にAmB、Mn、Phc、については、プリオン接種7日前に投与を開始 (-7)、プリオン接種後60日よりAmB投与 (+60)、Cqについては、プリオン接種14日前よりCqを飲料水に添加し、経口的に投与し (-14)、プリオン接種後60日後 (+60) から投与を開始する群をそれぞれ設定した (図1)。また、それぞれの薬物の濃度については、体重に変化のない範囲の最大量を目指して投与量を変化させたことにより、それぞれの薬物で異なるために、結果の表に記載した。

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) プリオン腹腔内接種 (i.p.) による評価

末梢からの伝達モデルとして腹腔内接種 (i.p.) による評価の基本的な接種、薬物投与の基本的なプロトコールを図2に示した。

接種材料、接種量、潜伏期間の算定方法、確定診断の方法は脳内接種による評価方法に準じた。

2. 遺伝性プリオン病モデルマウスの確立

遺伝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D177Nのマウスプリオン蛋白遺伝子 (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欠損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、PrPFFIの沈着について検査する。

(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。

〔結 果 と 考 察〕

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、潜伏期間は平均146日±4.0であった。プリオン接種7日前からAmBを投与したマウス(－7)では潜伏期間は平均180日±5.1となり対照マウスに比べて34日の延長が認められた。一方、プリオン接種後60日を経過してAmB投与を開始したマウス(+60)では、潜伏期間は平均161日±11.6で対照マウスに比べて15日間の延長が認められた (Table 1)。脳の組織学的検索の結果から、マウスプリオン病を呈した個体はすべて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の影響を受けない株の存在も知られている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CJD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く、この成果が唯一の成績である。

また、これまでAmB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、今回のCJDの系でも同様に接種後60日ではすでに脳内に沈着が始まっていると考えられる。その後のAmB投与により潜伏期間が延長していることから、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発症遅延効果があることが示唆された。

クロロキン (Cq) についても、脳内接種前14日からCq投与を始めたグループのなかで100mg/Kgdayと最も濃度の高い投与群のみ、有意に延長 (18日) した (Table 2)。Cqの投与量100mg/Kgdayというのは予備実験の結果、マウスが自発的に採取する最大量であり、大量であると考えられるので、Cqの効果がそのまま臨床に応用できる可能性は低い、クロロキンのリソゾーム機能阻害作用による、抗prion効果が考えられる⁷⁾としたら、プリオンの蓄積部位やそのメカニズムについて興味を持たれる。

また、PhcやMnでは投与量を変化させても潜伏期間に影響がなく、今回の濃度範囲では全く効果がなかった (Table 3, 4)。しかしながら、接種後、薬物が脳関門を越えて標的組織である脳内に分布したかどうかについても甚だ疑問であり、脳内に分布しやすい薬物の構造を模索するか、血液脳関門を破壊するような操作が必要である。したがって、無効であった薬物に関しては、その効果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、あるいは脳内に浸潤しやすい構造の異性体などによる更なる試験が必要であると考えている。

2) の末梢からの伝達モデルとしての腹腔内接種 (i.p.) による評価に関しては、現在、接種実験中であるが、末梢からのプリオン接種では潜伏期間が長いために、まだ、結論が出ていない。

2. 遺伝性プリオン病発症遅延薬剤の生物検定

遺伝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 D 177 N (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。

そこで、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#48, TgMo-FFI#17を得た。それぞれPrnp0/0マウスに戻し交配をし、TgMo-FFI#48・Prnp0/0、TgMo-FFI#17・Prnp0/0が樹立でき、それぞれFFIマウス順化株とF1 株に対する感受性試験を開始した。途中経過をTable5に示したが、FFIマウス順化株を接種されたTgMo-FFI#17・Prnp0/0がきわめて短い潜伏期間で発症した。しかし、この系統は本来、過剰発現による衰弱が激しく、過剰発現による衰弱死であることが病理組織検査で確認された。TgMo-FFI#48・Prnp0/0は560日を経過してもまだ発症していない。これらの途中経過から考えて、いずれもFFIマウス順化株に対して感受性がないか、きわめて低いと考えられる。また、F1株を接種されたTgMo-FFI#48・Prnpw/wの潜伏期間は平均274日であったが、これは病理組織検査の結果、マウスのワイルド型プリオン蛋白がF1株によりコンバートされた病変であると判断された。

これらの結果から、この2系統について家族性ヒトプリオン病のモデル動物としては必ずしも適当でないと結論せざるを得ない。

〔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高濃度でのみ、CJD モデルマウスの発病遅延効果が認められた。
- (3) フタロシアニン、マンノースアミンを含めて末梢からのプリオン接種については実験継続中である。
- (4) 家族性ヒトプリオン病の動物モデルの確立については幾つか試作されたが、更なる工夫が必要である。

〔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 hamster 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.
- 7) Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB.: Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, p. 16188-16199, 1992

図 1. 脳内接種による遅延評価方法

<test substance> AmB, Cq, Phc, Ma

<proin> Human originated F1 strain

<animal> NZW

<route> i.c.

<doses>

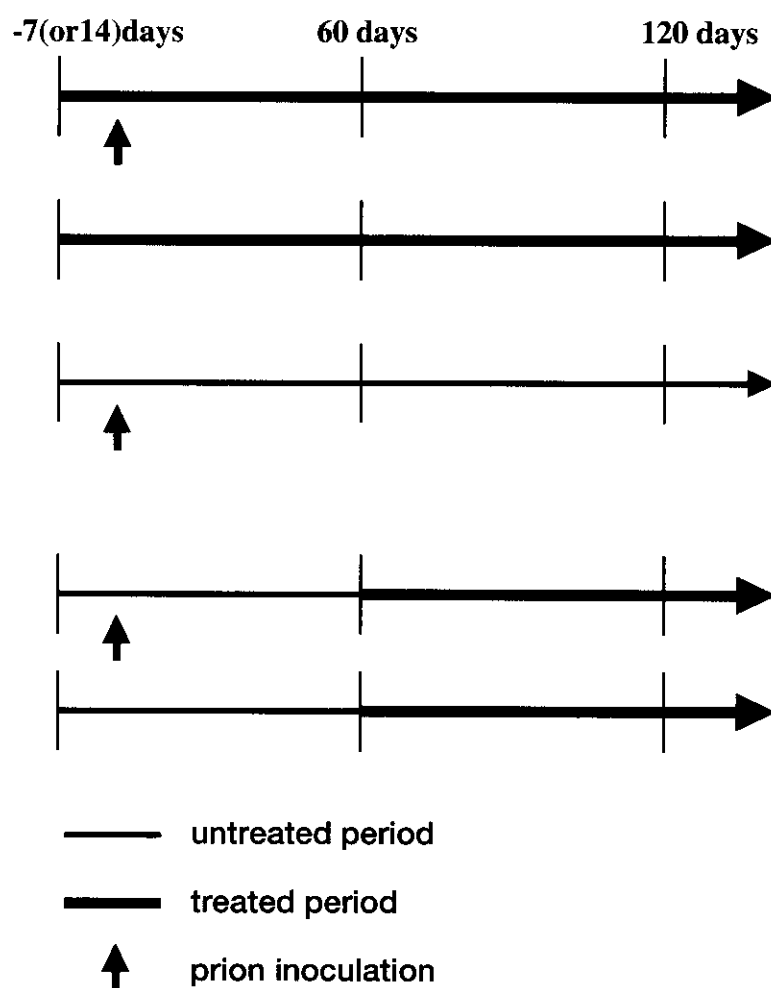


図 2. 腹腔内接種による遅延評価方法

<test substance> AmB, Cq, Phc, Ma

<proin> Human originated F1 strain

<animal> NZW

<route> i.p.

<doses>

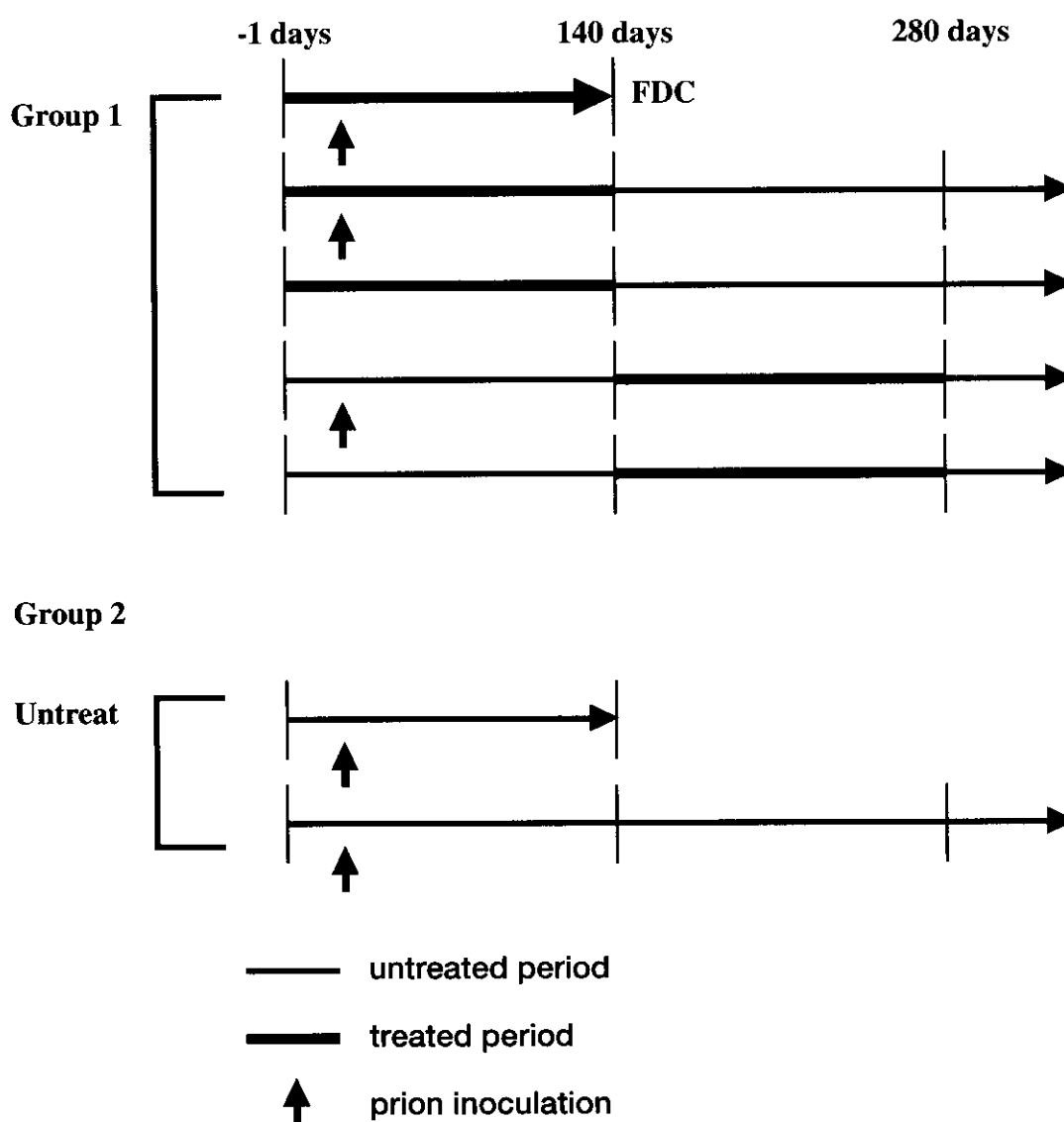


Table 1. Effect of Amphotericin B(AmB) on Incubation periods
of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Group		Incubation period	Delay
Treatment*	(duration)	days $\pm$ SD	days
untreated		146 $\pm$ 4.0	
3mg/day	(-7)	180 $\pm$ 5.1	34
3mg/day	(+60)	161 $\pm$ 11.6	15

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

Table 2. Effect of Chloroquine(Cq) on incubation periods
of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Group		Incubation period	
Treatment*	(duration)	days $\pm$ SD	
untreated		137 $\pm$ 4.6	* *
10mg/Kgday	(-14)	142 $\pm$ 6.5	
30mg/Kgday	(-14)	146 $\pm$ 6.4	
100mg/Kgday	(-14)	155 $\pm$ 12.0	* *
100mg/Kgday	(+60)	145 $\pm$ 10.0	

* Administratio Cq via oral with drinking water

* * Statistically significant difference($p < 0.05$)

Table 3. Effect of Phthalocianin(Phc) on incubation periods
of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Group Treatment*	(duration)	Incubation period days±SD
untreated		149±10.7
0.1mg/Kgday	(-7)	149
1.0mg/Kgday	(-7)	151±7.7
10mg/Kgday	(-7)	151±9.4

* Injection with Alminium Phthalocyanine tetrasulfonate
into intraperitoneal every 5days/week

Table 4. Effect of Mannosamine(Mn) on incubation periods
of mice infected with CJD Fukuoka1 agent

Group Treatment*	(duration)	Incubation period days±SD
untreated		149±10.7
10mg/Kgday	(-7)	152±6.6
100mg/Kgday	(-7)	152±6.4
1000mg/Kgday	(-7)	150±6.6

* Injection with D-mannosamin
into intraperitoneal every 5days/week

Table 5. Transmission test to Tg-FFI mouse

Strain	Genotype	Incubation Periods(days)	
		FFI	F1
TgMo-FFI#48			
	Tg • w/w	>560	274±14.0
	Tg • 0/0	>200	untested
TgMo-FFI#17			
	** Tg • 0/0	131±16.6	>148

* Injection with 10% homogenate of mouse brain
into intracerebrum

* * appearance over expression syndromes

スクレイピー早期発症マウスと脳内持続注入器具を用いたin-vivo薬剤評価システムの開発

班 員：堂浦 克美（九州大・院医・脳研病理）

〔研究要旨〕

スクレイピー持続感染細胞を用いた治療薬剤スクリーニングにおいて新たに reactive green と quinine が有効であることを発見した。その作用機序に関しては reactive green は病原性プリオン蛋白への変換を直接阻害していることが判明した。一方、in vivo での薬剤効果を検定するため、比較的短期間に薬剤の絶対的効果を確認できるシステムをプリオン病早期発症マウスと脳内持続注入器具を用いて開発した。本システムを用いてこれまでに in vitro で有効性が確認出来た薬剤について in vivo での有効性を検討した。その結果 quinacrine, reactive green, quinine の投与で発病時期の遅延が観察された。とくに quinacrine と quinine は脳内感染で潜伏期間の約 7 分の 5 が経過した時点の投与でも有効であった。今回の研究により標的臓器である中枢神経系への直接の薬剤注入によりプリオン病の発症遅延が可能であることが示された。

〔研究目的〕

これまで我々はプリオン病の発症遅延や予後改善をめざしてプリオン病化学療法剤開発の基礎研究として、in vitro において病原性プリオン蛋白質 (PrPres) の生成を阻害する薬剤を臨床応用可能な薬剤の中から探索してきた。今年度は昨年度に引き続き in vitro で有効な薬剤を探索すると共に、これらの薬剤が実際に in vivo で有効であるかどうかを短期間で絶対的に評価できる in vivo 薬剤評価システムを作製し、in vitro で有効性を確認した薬剤について in vivo での有効性について検討を行った。

〔研究方法〕

in vitro における薬剤探索 スクレイピー持続感染神経芽細胞腫細胞を用い昨年度報告した方法1)にて細胞培養上清に加えた薬剤の PrPres 生成阻害効果を解析した。

薬剤作用機序の解析 正常型 PrP への影響を代謝標識法で解析した。さらに、PrP への直接的作用については PrP cell-free conversion 反応法で解析した2)。

in vivo 薬剤評価システムの作製 ハムスター型プリオン蛋白を発現する遺伝子改変マウス Tg7 は世界で最短の潜伏期間を示す動物であり 1 %263K (ハムスター病原体

株) 脳乳剤20ulを脳内に接種すると約7週間で死に至る。Tg7マウスに1%263K脳乳剤20ulを脳内に接種後1.5週目または5週目にAlzet(r)浸透圧ポンプをマウス皮下に埋め込み脳内にカニューレを留置することにより脳内への持続的な薬液注入を4週間行い、マウスが死亡するまでの潜伏期間への効果を検討した。各種薬剤につき2-3種の異なる濃度を検定した。各濃度群につき4匹前後のマウスを用いて実験を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験審査委員会の指針の範囲内で行った。

[結 果]

in vitroで有効性が確認された新たな薬剤

reactive green

硫酸基を持つ酸性化合物が病原性プリオン蛋白生成阻害作用を持つことは知られているが、そのような化合物の中で身近な存在の化合物であるreactive dyeについて検討したところ、reactive dyeの中でもreactive green 19が培養細胞で病原性プリオン蛋白の生成を阻害する効果が高いことが判明した。そのIC₅₀は100 ng/ml前後と推定された。reactive greenはcell-free conversion法で異常型プリオン蛋白の生成を阻害した。また、reactive dye-agaroseを用いてプリオン蛋白への結合能を検討したところ、reactive greenは正常型とも異常型とも高い結合能を有していることがわかった。これらのことからreactive greenの生成阻害作用は、プリオン蛋白への直接的作用であることが推定される。

quinine

既報の有効薬剤とは全く構造に共通性が見られないquinineに病原性プリオン蛋白生成阻害作用があることが培養細胞の検討から明かとなった。そのIC₅₀は10 uM未満であることがwestern blotの結果より推定された。この薬剤の作用機序に関しては検討中である。

in vivo薬剤評価システムの作製

Alzet(r)浸透圧ポンプを用いた脳内持続注入マウスモデルを作製した。Alzet(r)浸透圧ポンプの設置によるマウスへの毒性を生食を充填したAlzet(r)浸透圧ポンプの設置後4ヶ月にわたり観察しているが、マウスへの明らかな毒性は観察されていない。次に、1%263K脳乳剤接種後1.5週目または5週目に生食を充填したAlzet(r)浸透圧ポンプの設置群と未設置群を比較したところ潜伏期間に有為な差は見られず、いずれも接種後52日前後で死亡した。

各種薬剤の評価

我々がこれまでに細胞培養系を用い病原性プリオン蛋白生成阻害作用があること

を明らかにしているE-64d、quinacrine、reactive green 19、quinineについてin vivoにおける有効性を検討した。結果を表にまとめた。

E-64dは3.2 nmol/day x 4 weeks投与群では1 %263K脳乳剤接種後5週目より脳内持続投与を開始しても対照群に比して発症遅延する傾向が見られ対照群の死後10日間以上生存したものもいたが統計学的には対照群と有意差は認められなかった。8 nmol/day x 4 weeks投与群では対照群に比して生存期間が延長するものは観察されなかった。

quinacrineは、1 %263K脳乳剤接種後1.5週目より脳内持続投与を開始した群では有意な生存期間の延長は観察されなかったが、脳内接種後5週目より投与を開始したものでは0.3 nmol/day x 4 weeks投与群でも1.6 nmol/day x 4 weeks投与群でも対照群に比し6日間（52日→58日）の有意な発症遅延効果が見られた。

reactive green 19は0.4 ug/day x 4 weeks投与群では対照群と有意差が見られなかったが、4 ug/day x 4 weeks投与群では1 %263K脳乳剤接種後1.5週目より脳内持続投与を開始したものでは対照群に比して10日間（52日→62日）の有意な発症遅延効果が見られた。また、同濃度群で脳内接種後5週目より投与を開始したものでは対照に比し5日間程度の発症遅延が見られたが統計的には対照群と有意差は見られなかった。

quinineはいずれも脳内接種後5週目より脳内持続投与を開始したが、1.6 nmol/day x 4 weeks投与群では対照群に比して11日間（52日→63日）の有意な発症遅延効果が見られた。しかし、それよりも高濃度群では発症遅延効果は見られず、16 nmol/day x 4 weeks投与群ではむしろ対照群に比し若干早く死亡する傾向にあり、高濃度群では薬剤の毒性があらわれている可能性があった。

〔考 察〕

今回、培養細胞を用いた病原性プリオン蛋白生成阻害剤の探索よりreactive green 19とquinineを新たに有効な薬剤として発見した。reactive greenはこれまでに有効性が報告されている硫酸基を有する酸性化合物に属し、その作用機序も既報の薬剤と同様にプリオン蛋白に直接作用するものであった。一方、quinineはその作用機序については検討中でありまだ結論が得られていないが、薬剤の構造からは既報の有効薬剤と共通性が見られず新しいタイプの薬剤である。

また、今回これまでの薬剤探索・評価システムに加えて、in vivoで比較的短期間に薬剤の絶対的効果を判定するためのシステムを作製した。本システムはプリオン病の標的臓器である脳への薬剤の移行性に煩わされることなく薬剤の絶対的効果を判定することができる方法として優れている。reactive green、quinineに加えてE-64d、quinacrineについて本システムで有効性を検討したが、quinacrine, reactive

green, quinineの投与は対照に比し有意に発病時期の遅延をもたらした。とくに quinacrineとquinineは脳内感染で潜伏期間の約7分の5が経過した時点での投与であっても有効であった。また、脳内持続投与の期間が4週間と限定されていたにもかかわらず薬液の注入が終わった後も生存するマウスが少数ながら観察された。一方、統計学的には有意差が見られなかったE-64d投与群にも明らかに延命を示すものがあり、実験手技の習熟とより多数のマウスを用いた検定によりこれらの薬剤の *in vivo*での効果がより明かとなる可能性がある。今回の研究により標的臓器である中枢神経系への直接の薬剤注入によりプリオン病の治療が可能であることが確認された。

最後に、今回開発した *in vivo*薬剤評価システムはハムスター型プリオン蛋白発現個体とハムスター病原因子の組み合わせによる薬剤評価システムであり、薬剤の有効性がこの組み合わせ以外の他の宿主と病原因子の組み合わせにも有効であることを検討しておく必要があると考えられる。

〔結 論〕

病原性プリオン蛋白の生成を阻害する薬剤としてreactive greenとquinineを新たに発見した。reactive greenはプリオン蛋白に直接作用していた。quinineは既報の有効薬剤と共通性はなかった。一方、*in vivo*での薬剤効果を検定するためプリオン病早期発症マウスと脳内持続注入器具を用いて *in vivo*薬剤評価システムを開発した。これまでに *in vitro*で有効性が確認出来た薬剤について本システムを用いて検討した。その結果quinacrine, reactive green, quinineに発病遅延効果が観察された。今回の研究により標的臓器である中枢神経系への直接の上記薬剤注入がプリオン病の発症を遅延させることを確認した。

〔参考文献〕

1. 堂浦克美 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. 厚生省特定疾患調査研究事業「家族性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」平成11年度研究報告書 pp26-30、平成12年3月
2. Doh-ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. J. Virol. 74: 4894-4897, 2000

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) 古川ひさ子, 堂浦克美: ヒト・プリオン蛋白単量体はより可逆的にfibrillogenic

- conformationへ変換. MEDICAL BRIEFS IN Brain & Nerve. 10(3), 13, 2000
- 2) 古川ひさ子, 堂浦克美: 分子医学的・臨床病理学的解析に基づく散発性クロイツフェルト・ヤコブ病の新分類. MEDICAL BRIEFS IN Brain & Nerve. 10(4), 5-6, 2000
 - 3) 川島敏郎, 堂浦克美: プリオン病の分子医学. 現代医療 32, 100-103, 2000
 - 4) 川島敏郎, 堂浦克美: クロイツフェルト・ヤコブ病. 脳の科学2000年増刊号, 371-374, 2000
 - 5) 堂浦克美: プリオン病の現状と治療薬開発の動向. BIO Clinica 15, 932-936, 2000
 - 6) Doh-ura K., Iwaki T., Caughey B.: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. J. Virol. 74, 4894-4897, 2000
 - 7) Doh-ura K., Mekada E., Ogomori K., Iwaki T.: Enhanced CD9 expression in the mouse and human brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 59, 774-785, 2000
 - 8) Kawashima T., Doh-ura K., Torisu M., Uchida Y., Furuta A., Iwaki T.: Differential expression of metallothioneins in human prion diseases. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 11, 251-262, 2000
 - 9) Taniwaki Y., Hara H., Doh-ura K., Murakami I., Tashiro H., Yamasaki T., Shigeto H., Arakawa K., Araki E., Yamada T., Iwaki T., Kira J.: Familial Creutzfeldt-Jakob disease with D178-129M mutation of PRNP presenting as cerebellar ataxia without insomnia. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 68, 388, 2000