

200/0655

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 堂浦 克美

平成14年 (2002)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究 堂浦克美	1
II. 分担研究報告書	
1. 培養細胞系における新たなプリオン病治療薬の探索 堂浦克美 久保郁子、石川謙介、岩城 徹、 田村和彦、片岡泰文、加留部善晴、高田二郎	7
2. 脳室内投与薬を用いたプリオン病治療臨床試験のための 基盤整備に関する研究 吉良潤一 村井弘之、堂浦克美	10
3. キナクリン経口投与によるプリオン病治療法確立に関する検討 山田達夫 古川ひさ子 中島雅士、楠原智彦、松永洋一、藤野泰祐 (資料) [別紙付録1] プリオン病臨床診断基準 [別紙付録2] 説明文と同意書 [別紙付録3] 同意書 [別紙付録4] 効果判定記録 [別紙付録5] 副作用監視 検査項目一覧(開始～4週間後) [別紙付録6] 副作用症状監視項目(開始～2週間後)	12
4. Computer-Aided Drug Design 手法によるプリオン蛋白 結合分子の探索 広野修一	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
「即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究」
班 会 議

平成13年12月21日（金）午後2時～5時
九州大学医学部図書館3階会議室

プログラム

1. 研究班のめざすところ
堂浦克美（九州大学脳研病理）
2. 脳室内投与薬を用いたプリオン病の臨床試験の基盤整備
吉良潤一、村井弘之、堂浦克美*（九州大学神経内科、*脳研病理）
3. キナクリン経口投与によるプリオン病治療法確立に関する検討
山田達夫、古川ひさ子*、中島雅士、楠原智彦、松永洋一、藤野泰祐
（福岡大学医学部第5内科、薬学部薬物治療学*）
4. 培養細胞系における新たなプリオン病治療薬の探索（1）
村上郁子、岩城 徹、堂浦克美（九州大学脳研病理）
5. 培養細胞系における新たなプリオン病治療薬の探索（2）
田村和彦、片岡泰文、加留部善晴*、高田二郎*、堂浦克美**
（福岡大学薬学部薬剤学、放射薬品学*、九州大学脳研病理**）
6. 培養細胞系における新たなプリオン病治療薬の探索（3）
石川謙介、岩城 徹、堂浦克美（九州大学脳研病理）
7. Computer-Aided Drug Design 手法によるプリオン蛋白結合分子の探索法
広野修一（北里大学薬学部創薬物理化学）

総括研究報告

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究

主任研究者 堂浦 克美 九州大学大学院医学研究院・助教授

研究要旨

硬膜移植後のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) が多発し、狂牛病が発生し変異型 CJD 感染勃発の脅威が迫っている本邦の現況では、即戦力的なプリオン病治療法が求められている。そこで、本研究では (1) 抗プリオン作用を持つ臨床薬剤を探索するとともに、第一世代型 CJD 治療法としてそれらの有効性を患者で検証する。(2) 次世代型治療薬の開発を行い臨床応用への基盤を築く。これらの基盤となる研究を本年度に実施した。その結果 (1) *in vitro* スクリーニングシステムを用いて、異常型プリオン蛋白産生阻害効果を持つ 8 種の化合物を新たに発見した。それらは、キノリン環をもつ化合物、キレート能を有する化合物、コンゴレッド関連化合物であった。これらのうち臨床薬剤であるキニーネについて *in vivo* での薬効評価を行い延命効果が見られることを明らかにした。(2) 第一世代型 CJD 治療法として、キナクリン経口投与を 6 例の CJD 患者に実施し、重篤な副作用なしに一過性ではあるものの進行例を除く 4 例で有効性が見られたことを明らかにした。また、脳内移行の悪いペントサンを用いた臨床試験に向けて脳室内投与を行うための安全性試験を実施し、有効濃度域と毒性濃度域が近いことより動物実験にてさらに詳細な安全性の確認を行う必要性を明らかにした。(3) コンピューター支援合理的医薬分子設計による次世代型治療薬の開発を行うため、正常型プリオン蛋白に対する治療薬候補となるリガンド分子の結合部位を解析し、2カ所の結合部位候補を明らかにした。以上の研究成果は CJD 即戦力的治療法開発の基盤となるものである。

分担研究者

吉良潤一 九州大学大学院医学研究院・
教授

山田達夫 福岡大学医学部・教授

広野修一 北里大学薬学部・教授

即戦力的治療法の確立に関する以下の 2 点の研究を行う。

(1) 他の目的に使用されている臨床薬剤の中で抗プリオン作用を持つ薬剤による第 1 世代型 CJD 治療法を確立するための臨床研究を行う。この研究は疾患モデル動物による *in vivo* 薬効評価の成果を踏まえたものであり、同薬効評価にて有効性を確認した臨床薬剤を患者に応用する。なお、脳血液関門を通りにくい臨床薬剤は CJD の標的臓器である脳への移行が悪いため脳内に持続投与する方法を確立する。

(2) 次世代型の治療薬候補化合物を *in vitro* 系スクリーニングで探索するとともに、発見した治療薬候補化合物をもとにより強力な抗プリオン作用を持ち脳移行の良い医薬分子をコンピュータを使った合理的

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は稀少な神経難病であるが、不幸にも本邦では多数のヒト乾燥硬膜移植後の CJD 患者が発生しており潜在的に危険な硬膜移植患者は 10 万人を越える。また、本邦でも狂牛病が発生し変異型 CJD 勃発の脅威が迫っている。このような急迫した状況にあり CJD の即戦力的治療法が至急に必要である。本研究では CJD の発症予防と発症患者の生命予後改善をめざし、

医薬分子設計技術を駆使して開発する。

本年度は、これらの研究の基盤を整備することを主な目的とした。

B. 研究方法

(1) 薬剤スクリーニング及び *in vitro/in vivo* 薬効評価 (担当: 堂浦)

in vitro システム (プリオン持続感染培養細胞) を用いて抗プリオン作用を持つ新規な臨床薬剤や化合物及びそれらの誘導体の探索を行った。特に、コンゴレッドやキノリン環を有する化合物と構造共通性を持つ化合物やキレート作用を持つ化合物を重点的にスクリーニングした。キレート薬に関しては研究協力者の加留部らが開発している種々の化合物を検討した。*In vitro* 実験で有効性が見られた代表的なものについて脳内投与による *in vivo* 薬効評価システム (ハムスター型プリオン蛋白過剰発現マウス(Tg7)と 263K 株病原因子よりなる動物疾患モデル) によりプリオン病治療効果の評価を行うとともに、脳への移行性を研究協力者の片岡らが開発した脳血液関門 *in vitro* 実験系を用いて検討した。

(2) 患者における臨床研究 (担当: 吉良、山田、堂浦)

末梢投与型薬剤の臨床試験としてキナクリンを用いた臨床試験を行った。薬剤の投与量・治療期間や治療効果判定のための評価方法や副作用について詳細な検討を加えた。

一方、脳内投与型薬剤の臨床試験については、ペントサンの脳内投与の安全性について治験薬の安全性検査に準じて動物実験で検討した。また、脳内投与は Ommaya チューブを用いて行うが、チューブ留置のための脳外科手術に関して、術場の汚染管理、術者の安全管理のためのプロトコール作製や環境づくりを行った。

(3) 次世代型治療薬の開発 (担当: 広野、堂浦)

これまでに発見している抗プリオン作用

を有する化合物のうち構造の全く異なる代表的な 6 個の化合物とプリオン蛋白の相互作用を原子レベルで解析するために、6 個のリガンド-プリオン蛋白複合体の立体構造を構築した。プリオン蛋白-リガンド複合体の立体構造の構築と定量的特性予測のため、1) 分子動力学法によるプリオン蛋白リガンド分子 (6 個) の立体配座サンプリングとクラスタリングによる代表配座集団の生成、2) プリオン蛋白質中の化合物結合サイトの探索を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。患者に対する臨床試験は福岡大学医に関する倫理委員会および同治験審査委員会の承認を得た。治療の施行にあたっては患者および家族に対し研究の目的・内容・危険性および得られたデータの取り扱いについて十分な説明を行い書面での同意を得た。

C. 研究結果

(1) *in vitro* スクリーニングシステムを用いて、100 種近い市販の化合物を調べ、8 種の化合物に病原性プリオン蛋白産生阻害効果があることを新たに発見した。これらのうち臨床薬剤であるキニーネについて *in vivo* 実験を終了し、延命治療効果を確認した。

また、発見した有効化合物にはキレート作用を有することが推定されるキノリン骨格を持つものが複数あったことより、そのキノリン骨格に着目しキレート作用が発現するように複数の化合物を分子設計した。また同様の趣旨で出来る限り多くの化合物を市販品からピックアップし、プリオン病治療薬として評価するためのライブラリーを構築した。

さらに、キレート作用を持つ化合物に抗プリオン作用のあることが推測されたため、市販のものに加えて研究協力者の福

岡大学薬学部の加留部らが開発している様々なキレート化合物を *in vitro* システムを用いてスクリーニングした。その結果、水溶性キレート化合物はいずれも効果が極めて低いかあるいは全く効果が見られないことが明かとなった。

また、化合物の脳移行性を検討するために、研究協力者の福岡大学薬学部の片岡らが開発している脳血液関門 *in vitro* 実験系をもちいて、臨床試験を開始したキナクリンについて、その脳移行性を検討した。その結果、キナクリンの脳移行性は必ずしも高くないことが判明した。

(2) 臨床薬のうちプリオン病への有効性を *in vivo* 実験で既に確認している臨床薬剤のうち、キナクリンについて治療プロトコルを作製し臨床試験を開始した。散発性 CJD4 例と硬膜移植後の CJD2 例に対し 300mg/日の経口連日投与を行った。このうち比較的早期に治療を開始しえたものと、発症から 1 年以上を経ているものでも進行が緩徐であったものでは一過性ではあるが症状の明らかな改善が得られた。しかし、進行例の 2 例では効果を認めなかった。副作用では 3 例で投与中に肝機能障害が出現し、全例に投与開始後 10 日前後から皮膚の黄染を認めたが、全身痙攣や骨髄抑制などの重篤な副作用は出現しなかった。

一方、ペントサンは脳内投与方法による臨床試験を開始すべく、ペントサン脳内投与の安全性の検討を動物実験で行った。0.2 mg/day/kg 以下の濃度の脳室内投与ではマウス・ラット・イヌに異常を生じなかったが、0.3 mg/day/kg 濃度ではイヌに毒性が認められた。マウスを用いた実験では最も延命効果が見られるペントサン濃度は 0.2 mg/day/kg であることより有効濃度と毒性濃度がかなり近いことが明かとなった。

(3) コンピュータによる合理的医薬分子設計のための準備として、6 種の有効化合物とプリオン蛋白の相互作用を原子

レベルで解析するために、まず、高温分子動力学法による分子の立体配座解析プログラム (CAMDAS) を用いて、正常型プリオン蛋白に対する 6 個のリガンド化合物の立体配座集団を得た。これらの配座集団の中に蛋白結合時のリガンドの立体配座が含まれていると考えられる。次に、核磁気共鳴装置による溶液構造解析により得られた正常プリオン蛋白の 3 次元座標 (PDB エントリ: 1QM3) を基に、プリオン蛋白表面の薬物結合部位を Site ID コンピュータプログラムを用いて探索した結果、結合部位候補として 2 カ所のサイトが検出された。

D. 考察

(1) 異常型プリオン蛋白産生阻害効果がある新たに発見した 8 種の化合物のうちキノリン環をもつ化合物は、極めて低濃度で有効であった。それらの IC₅₀ は 10 nM 以下であり、既報の有効化学物質と比較してもっとも低い値を示す。異常型プリオン蛋白産生阻害においてかなり特異的に作用している可能性が推測され、これらの化合物のうち比較的単純な化合物を中心に修飾・合成を行い構造活性相関を展開し、ファーマコフォア導出をめざす必要がある。

一方、効果が期待されながら無効であったピリジン骨格を持つキレート能を有する化合物の研究より、キレート能を有する化合物の効果発現には膜透過性が重要であることが示唆されたが、この点を明らかにするとともに異常型プリオン蛋白産生における金属イオンの関与についても明らかにする必要がある。

さらに、脳内移行性が良好なコンゴーレッド類似化合物に異常型プリオン蛋白産生阻害効果のあるものを発見したが、その機序として異常型プリオン蛋白と結合することにより新たな産生を阻害することが推測される。実際、組織切片上で異常型プリオン蛋白の沈着を病出することができることから、末梢投与型治療薬としてだけでなく

ヤコブ病の診断や病勢診断のためのプローブとして有用な可能性がある。

(2) キナクリンは経口投与で腸管から速やかにかつ高率に吸収され、投与から8～12時間で血中濃度が最高に達する。血中に入ってから24時間後には脳にも移行することが知られている。代謝機序については明らかにされていないが主に腎から排泄され、数ヶ月かけて緩徐に排泄されることが知られている。以上のことから今回の検討でキナクリンによる神経症状改善作用が比較的発症早期に治療を開始した症例と緩徐に進行しているものに限られ、また効果が一過性であった原因はキナクリンの代謝排泄によるものではなく、キナクリンの薬理作用が疾患形成過程のうち神経細胞の機能異常にとどまっている段階のものに効果を示しており、すでに器質的変化に至ったものについては作用できないためである可能性が示唆された。今後治療研究を継続する上で、薬剤の用量および投与期間などを再検討するとともに、より早期に確実に診断できる方法を取り入れる必要がある。

一方、脳室内投与による治療を予定しているペントサンは、0.2 mg/day/kg以下の濃度では実験動物で明らかな異常を起こさなかった。ただ、イヌを用いた実験では0.3 mg/day/kg濃度では半数以上が投与開始1週間以内に死亡しており、その原因の解明が早急に必要である。なお、実験に用いたペントサンは末梢投与薬として製剤化されているものであり、薬液中に含まれる保存剤などの添加物が脳室内投与の安全性データに影響している可能性を検討する必要がある。

(3) 結合部位候補として、2つのサイトが検出されたが、このサイトをさらに詳細に検討し、薬物リガンド分子-プリオン蛋白複合体の立体構造を構築するため、3Dデータベース検索法による結合候補配座の選択、蛋白質との結合相互作用エネルギー評価による結合配座と結合様式の決定、蛋

白質-化合物複合体の立体構造決定が必要である。また、理論計算的手法により求められる化合物とプリオン蛋白との相互作用を実験的に実証することが重要である。

E. 結論

(1) *in vitro* スクリーニングシステムを用いて、8種の化合物に異常型プリオン蛋白産生阻害効果があることを新たに発見した。それらは、キノリン環をもつ化合物、キレート能を有する化合物、コンゴレッド関連化合物であった。これらのうち臨床薬剤であるキニーネについて *in vivo* で薬効評価を行い延命効果が見られた。

(2) キナクリンの経口投与は、一過性ではあるがプリオン病に有効であり十分な観察下であれば比較的安全に用いることが示された。また、ペントサン脳室内投与については有効濃度域と毒性濃度域が近いことより、動物実験にてさらに詳細な安全性の確認を行う必要性を認めた。

(3) 正常型プリオン蛋白に対する治療薬候補となるリガンド分子の結合部位候補として2カ所のサイトが検出され、正常型プリオンと異常型プリオンの結合を阻害する分子設計の実現可能性が高まった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.: Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144, 2001

Sasaki K., Doh-ura K., Ironside J., Iwaki T.: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 103:199-208, 2002

H. Furukawa, M. Nakajima, T. Kusuhara, M. Takahashi, Y. Kataoka, K. Doh-ura, T. Yamada. A case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease treated with anti-malarial agent, quinacrine: A first clinical trial in Japan. (Submitting)

Tanaka M, Gomi T, Orii T, Hirono S
Pharmacokinetics of Vancomycin Hydrochloride(VCM) in Dialysis Patients
Jpn. J. Pharm. Health Care. Sci., 27(2), 175-182 (2001)

Gouda H, Yamazaki K, Hasegawa J, Hirono S
Refinement of NMR structures of α -conotoxin MI using molecular dynamics simulation with explicit solvent water and a full molecular force field
Chem. Pharm. Bull., 49(3), 249-252 (2001)

Radwan A. A. , Gouda H, Yamaotsu N, Torigoe H, Hirono S
Rational Procedure for 3D-QSAR Analysis using TRNOE Experiments and Computational Methods: Application to Thermolysin Inhibitors
Drug Design and Discovery, 17(3), 265-281 (2001)

Noriyuki Yamaotsu, Masaki Suga and Shuichi Hirono
Molecular Dynamics Simulation of Calmodulin-Trifluoperazine Complex in Aqueous Solution
Biopolymer, 58(4), 410-421 (2001)

Fumiko Yoshii , Tomoko Nakamura , Shuichi Hirono , Yumiko Shimizu ,Takashi Hoshi , Masayoshi Ando , and Hisahiro Hagiwara
Conformational Analysis and Selection of Odor-Active Conformers: Synthesis of Molecules Designed for the Lily-of-the-Valley (Muguet)-Type Odor
Helvetica Chimica Acta, 84, 2051-2063 (2001)

高瀬敬一郎、古谷博和、村井弘之、山田 猛、大八木保政、堂浦克美、岩城 徹、飛松省

三、吉良潤一 高齢で発症したGerstmann-Straussler-Scheinker症候群の一例、プリオン蛋白遺伝子多型の検討。臨床神経学 41:318-321, 2001

佐竹真理恵、成迫智子、法化図陽一、永松啓爾、堂浦克美 ヒト乾燥硬膜移植後に発症したと考えられたCreutzfeldt-Jakob病の1剖検例。大分県立病院医学雑誌 30:105-107, 2001

堂浦克美 プリオン病、治療薬開発の現状と早期診断法開発の重要性。医学の歩み 198:403-406, 2001

堂浦克美 プリオン病の分子病態と治療薬開発。最新医学 56:1644-1649, 2001

堂浦克美 プリオン蛋白、プリオン病感染因子の本体? CLINICAL NEUROSCIENCE 19:888-893, 2001

堂浦克美 家族性プリオン病、発症遅延薬開発研究の現状。内科 87:649-655, 2001

村井弘之、吉良潤一: Variant Creutzfeldt-Jakob 病とその現状. Clin Neurosci 19: 930-931, 2001

村井弘之、吉良潤一: 感染性 Creutzfeldt-Jakob 病の予防対策. 医療現場の立場から. Clin Neurosci 19: 936-937, 2001

2.学会発表

堂浦克美: プリオン病の診断と治療-治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、2001年、札幌

堂浦克美: ヒトプリオン病の診断と治療-現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、2001年、大阪

山田 達夫：プリオン病治療に向けて。高機能物質研究所研究成果報告会、2002年、福岡

古川 ひさ子、高橋 三津雄、堂浦 克美、山田 達夫：尿中プリオン蛋白検出の試み；プリオン病診断における有用性の検討。第4回七隈アルツハイマー病研究会カンファレンス、2002年、福岡

S.Hirono, I. Nakagome: THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS OF DRUGS THAT INDUCE A CARDIOVASCULAR SIDE

EFFECT; THE PROLONGATION IN THE QT INTERVAL. World Chemistry Congress, Brisbane, AUSTRALIA, 1-6 July, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

堂浦克美、村上郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」、特許願 2001-227093、整理番号 P0406T、2001年7月

2. 実用新案登録

なし

分 担 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)
分担研究報告書

培養細胞系における新たなプリオン病治療薬の探索

主任研究者 堂浦 克美 九州大学大学院医学研究院・助教授
研究協力者 久保 郁子、石川 謙介、岩城 徹 九州大学大学院医学研究院
田村 和彦、片岡 泰文、加留部 善晴、高田 二郎 福岡大学薬学部

研究要旨

第一世代型および次世代型の新たな治療薬の開発のため、*in vitro* スクリーニングシステムを用いて、100種近い薬剤および化合物を検討した。その結果、異常型プリオン蛋白産生阻害効果を持つ8種の化合物を発見した。それらは、キノリン環をもつ化合物、キレート能を有する化合物、コンゴレッド関連化合物であった。この中で臨床薬剤であるキニーネについて、至適有効濃度を *in vivo* 実験で検討し、臨床試験への基盤を整えた。

A. 研究目的：次世代型治療薬開発のため、*in vitro* 系で異常型プリオン蛋白の増殖（産生）を抑制する作用のある化合物を探索した。なお、異常型プリオン蛋白の産生阻害作用のあるキノリン環をもつ化合物の中には、キレート能を有する化合物が含まれていたため、様々なキレート能を有する化合物について異常型プリオン蛋白産生阻害作用の有無を検討した。また、コンゴレッド(CR)は強力な異常型プリオン蛋白の産生阻害剤であり、その類似化合物で脳内移行性の良好なものについて異常型プリオン蛋白産生阻害作用を検討した。

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 に1%263K（ハムスター病原体株）脳乳剤 20 μ l を脳内に接種後5週目に、Alzet®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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

B. 研究方法：

I. *in vitro* 実験

スクレイピー病原因子が持続感染している培養細胞を用い、confluent の1/10継代時に様々な濃度の化合物を培地中に加え培養した。4日後に細胞を回収し、細胞溶解液を proteinase K で処理した後に超遠心を行い異常型プリオン蛋白を抗プリオン蛋白抗体 PrP2B を用いて Western blot 法で解析した。キレート能を有する化合物は pH 調製を行い水溶液を作製した。それ以外の化合物は DMSO に溶解した。

II. *in vivo* 実験

C. 研究結果：

I. *in vitro* 実験

50種近いキノリン環をもつ化合物をスクリーニングした結果、以下の4種類の化合物において異常型プリオン蛋白の産生阻害作用を認めた。なお、コントロールと比較して異常型プリオン蛋白の産生を50%抑制した濃度を IC50、細胞毒性を認めた濃度を toxic concentration (TC) と表す。

1) Quinine

IC50: 10 μ M TC: 25 μ M

2) 2-pyridinecarboxaldehyde-8-hydroxy

quinoline-quinolylhydrazone

IC50: 10nM TC: 1 μ M

3) 2,2'-biquinoline

IC50: 10nM TC: >5 μ M

4) 2-carboxaldehyde-8-quinolyl
hydrazone

IC50: 10nM TC: 2.5 μ M

また、30種近いキレート能を持つ化合物の水溶液をスクリーニングした結果、以下の2つの化合物に効果が見られた。しかしながら、これらの類似化合物水溶液には効果は見られなかった。また、効果があることが推測されたピリジン骨格を持つ化合物の水溶液も無効であった。

1) N-hydroxy-2-quinolone

IC50: 10 μ M, TC: 25 μ M

2) α, α' -dipyridyl

IC50: 50 μ M, TC: 75 μ M

さらに、20種近いCR関連化合物を検討し、以下の2種類のCR関連化合物において異常型プリオン蛋白の産生阻害作用を認めた。

1) (trans,trans)-1-bromo-2,5-bis-
(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)
styrylbenzene (BSB)

IC50: 25 μ M, TC: >50 μ M

2) Alpha, alpha'- (1,4-phenylene
dimethylidene) bis (2'-hydroxy
acetophenone) (PDHA)

IC50: 250nM, TC: >10 μ M

II. in vivo 実験

様々な濃度のキノーネを検討したところ、延命効果は1.6 nmol/day をピークとするベル型のグラフとなった。1.6 nmol/day 投与群で対照群に比して21.2%の潜伏期間の延長が見られ、16 nmol/day 投与群では薬剤の毒性が観察された。

D. 考察：今回の実験より、キノリン環をもつ化合物が細胞培養モデルで異常型プリオン蛋白の生成阻害に極めて有効であることが証明された。キノーネ以外はいずれも

IC50が10 nM以下である。これらのIC50は、既報の化学物質の中でもっとも強力な作用を持つコンゴレッドのIC50に匹敵するものである。IC50が10 μ Mであったキノーネでもin vivo実験で21.2%の潜伏期間の延長が見られたことより、IC50が10 nM以下である化合物がin vivoでどの程度有効性を発揮するのか期待される。

一方、有効性を認めたキノリン環を持つ化合物の構造解析よりピリジン骨格を持つキレート化合物に効果が期待されたが、しかしそれらの化合物水溶液は無効であった。今回の検討ではそれらの化合物は水溶液として調整しており、この溶媒条件では、化合物はイオン型をとっていることが考えられる。溶媒にDMSOを用いた分子型の状態では、効果の見られているものがあることよりキレート能を有する化合物の効果発現に膜透過性が重要であることが示唆された。また、水溶液中のプロトンがキレート部位にイオン結合していることも考えられた。今後、これらの点を明らかにしていくとともに、さらに多数のキレート能を持つ化合物のスクリーニングを展開する。

コンゴレッドは培養細胞モデルにおいて非常に高い抗プリオン効果を有するとされるが、脳血液関門透過性、異常型プリオン蛋白への特異性や発癌性に問題がありin vivoでは用いられていない。今回のスクリーニングの結果、コンゴレッド類似化合物2種に新たに異常型プリオン蛋白の産生阻害効果を認めた。そのうちBSBは良好な脳内移行性が確認されておりアルツハイマー病に代表される神経変性疾患の脳内に沈着する異常蛋白質の描出用プローブとして注目されている化合物である。本研究の結果より異常型プリオン蛋白と結合することにより新たな産生を阻害することが示唆された。IC50に関してはBSB, PDHA共にコンゴレッドには及ばなかったが、診断用プローブとしてだけでなく末梢投与が可能な治療薬としても有用な可能性がある。

E. 結論：キノリン環をもつ化合物に、異常型プリオン蛋白の生成阻害作用を持ち極めて低濃度で有効なもの4種を発見した。これらのうち臨床薬剤であるキノーネについてin vivoで薬効評価を行い延命効果が見られることを明らかにした。また、キノリン環を持たないキレート能を有する化合物の中にも、異常型プリオン蛋白の生成阻害作用を持つもの2種を発見した。さらにコンゴレッド関連化合物の中で脳内移行性の良いものを検討し、2種に効果を認めた。これらは治療薬としてだけでなく診断用プローブとして有用である可能性がある。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.: Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144, 2001

Sasaki K., Doh-ura K., Ironside J., Iwaki T.: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 103:199-208, 2002

高瀬敬一郎、古谷博和、村井弘之、山田 猛、大八木保政、堂浦克美、岩城 徹、飛松省三、吉良潤一 高齢で発症したGerstmann-Straussler-Scheinker症候群の一例、プリオン蛋白遺伝子多型の検討。臨床神経学 41:318-321, 2001

佐竹真理恵、成迫智子、法化岡陽一、永松

啓爾、堂浦克美 ヒト乾燥硬膜移植後に発症したと考えられたCreutzfeldt-Jakob病の1剖検例。大分県立病院医学雑誌 30:105-107, 2001

堂浦克美 プリオン病、治療薬開発の現状と早期診断法開発の重要性。医学の歩み 198:403-406, 2001

堂浦克美 プリオン病の分子病態と治療薬開発。最新医学 56:1644-1649, 2001

堂浦克美 プリオン蛋白、プリオン病感染因子の本体？ CLINICAL NEUROSCIENCE 19:888-893, 2001

堂浦克美 家族性プリオン病、発症遅延薬剤開発研究の現状。内科 87:649-655, 2001

2. 学会発表

堂浦克美：プリオン病の診断と治療—治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、2001年、札幌

堂浦克美：ヒトプリオン病の診断と治療—現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、2001年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

堂浦克美、村上郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」、特許願 2001-227093、整理番号 P0406T、2001年7月

2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

脳室内投与薬を用いたプリオン病治療臨床試験のための基盤整備に関する研究

分担研究者：吉良潤一 九州大学大学院医学研究院・教授
研究協力者：村井弘之、堂浦克美 九州大学大学院医学研究院

研究要旨

第一世代型プリオン病治療法として脳血液関門を透過しないペントサンを用いた脳室内投与療法の臨床試験実施に向けて、その安全性試験を動物実験で行った。0.2 mg/day/kg 以下の濃度の脳室内投与ではラット・マウス・イヌで異常を生じなかったが、0.3 mg/day/kg 濃度ではイヌに毒性が認められた。一方、マウスを用いた実験では最も延命効果が見られるペントサン濃度は0.2 mg/day/kg であった。有効濃度と毒性濃度がかなり近いことより、動物実験にてさらに詳細な安全性の確認を行う必要性を認めた。

A. 研究目的

動物実験にて著明な延命効果が観察されたペントサンを用いた第一世代型プリオン病治療法を確立する上で、脳血液関門を透過しないペントサンを CJD の標的臓器である脳へ移行させるためには脳内に持続投与する方法の確立が必要である。ペントサンは末梢投与薬として臨床で使用されているものの、脳室内に持続投与されたことがないため、その安全性については不明である。したがってペントサンを用いた臨床試験を実施するためには、その脳室内持続投与の安全性について、治療有効濃度との関連を含めて検討する必要がある。本研究ではペントサン脳室内投与の安全性を動物実験において検討した。

B. 研究方法

I. 安全性試験

非げっ歯類として雑種犬（10～15kg、牡雌問わず）、げっ歯類として SD ラット（～400g、オス）と Tg7 マウス（～35g、オス）を用い、これらの動物の脳室内にペントサン溶液（イヌおよびラット実験では0、0.1、0.2、0.3 mg/day/kg、マウス実験では0、0.2、0.4、0.6 mg/day/kg）を Alzet®浸透圧ポンプを

用い2ヶ月間の持続投与を行った。なお、イヌでは各群4匹を、ラット・マウスでは各群5～10匹を用いた。投与開始前・投与開始後1ヶ月・同2ヶ月に血液を採取し、一般血液・凝固系・血清生化学検査をイヌおよびラットで行った。また、投与開始2週間および4週後に脳波・終日活動パターン・活動量をラットで測定した。

II. 至適有効濃度測定

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 に、1%263K（ハムスター病原体株）脳乳剤 20 μ l を脳内に接種後5.5週目に、Alzet®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ペントサン注入を行い、マウスが死亡するまでの潜伏期間への効果を調べた。0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/day/kg のペントサン濃度について検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

C. 研究結果：

I. 安全性試験

マウスにおける安全性: 0.2 mg/day/kg 以下の濃度ではマウスに異常を生じなかったが、0.4 mg/day/kg の濃度では50%のマウスが死亡した。

ラットにおける安全性: 検討した0.3 mg/day/kg 以下の濃度では生存率や一般血液・凝固系・血清生化学検査、さらに脳波・終日活動パターン・活動量に異常は見られなかった。

犬における安全性: 持続投与1ヶ月までのところでは、0.2 mg/day/kg 以下の濃度では生存率や一般血液・凝固系・血清生化学検査に異常は見られなかったが、0.3 mg/day/kg 濃度では半数以上のイヌが投与開始1週間以内に死亡した。

II. 至適有効濃度測定

濃度と延命効果をグラフ化すると0.2 mg/day/kg をピークとするベル型のグラフとなった。脳内感染後5.5週後の潜伏期後期の投与開始にもかかわらず0.2 mg/day/kg 投与群で対照群に比して42.6%の潜伏期間の延長が観察された。

D. 考察:

今回の実験より、0.2 mg/day/kg 以下の濃度ではマウス・ラット・イヌでは明らかな異常は観察されなかった。ただ、イヌを用いた実験では0.3 mg/day/kg 濃度では半数以上が投与開始1週間以内に死亡しており、その原因の解明が必要である。なお、実験に用いたペントサンは末梢投与薬として製剤化されているものであり、薬液中に含まれる保存剤などの添加物が脳室内投与の安全性データに影響している可能性を検討する必要がある。マウスを用いた実験では、最も延命効果が認められるペントサン濃度は0.2 mg/day/kg であることより有効濃度と毒性濃度がかなり近いこと

が明かとなった。したがって、病理学的解析などを加えさらに慎重に詳細な安全性の確認を行う必要がある。

E. 結論:

ペントサン脳室内投与の安全性についてマウス・ラット・イヌを用いて検討を行い、0.2 mg/day/kg 以下の濃度では明らかな毒性を認めなかった。しかし、有効濃度域と毒性濃度域が近いことより、動物実験にてさらに詳細な安全性の確認を行う必要性を認めた。

F.健康危険情報: 特になし

G.研究発表

1. 論文発表

高瀬敬一郎、古谷博和、村井弘之、山田猛、大八木保政、堂浦克美、岩城徹、飛松省三、吉良潤一: 高齢で発症した Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群の1例 — プリオン蛋白遺伝子多型の検討 — 臨床神経 41: 318-321, 2001

村井弘之、吉良潤一: Variant Creutzfeldt-Jakob 病とその現状. Clin Neurosci 19: 930-931, 2001

村井弘之、吉良潤一: 感染性 Creutzfeldt-Jakob 病の予防対策. 医療現場の立場から. Clin Neurosci 19: 936-937, 2001

2. 学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)
分担研究報告書

キナクリン経口投与によるプリオン病治療法確立に関する検討

分担研究者： 山田 達夫 福岡大学医学部・教授

研究協力者： 古川 ひさ子 福岡大学薬学部

中島 雅士、楠原 智彦、松永 洋一、藤野 泰祐 福岡大学医学部

研究要旨

正常型プリオン蛋白(PrP^C)の異常型(PrP^{Sc})への高次構造変換はプリオン病発症機序の主軸を成していると考えられ、治療法開発のターゲットの中心になっている。我々はこれまでに報告されている変換阻害作用を持つ物質のうち抗マalaria薬剤であるキナクリンと向精神薬のクロルプロマジンに着目した。この2剤は培養細胞での PrP^C の変換を強力に阻害することが明らかにされた臨床薬剤で、共に脳血液関門を通過する。我々はこの2剤の治療効果を検討するためにプロトコールを作成し、4例の散发性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)と2例の硬膜移植後の CJD 患者にキナクリンを経口投与した。2例の硬膜移植後 CJD を含む4例で神経症状の改善を一過性に認めたが、進行例2例では臨床的に効果は見られず3例で投与中に肝機能障害が出現した。全例に投与開始後 10 日前後から皮膚の黄染を認めたが、これまでに報告されている全身痙攣や骨髄抑制などの重篤な副作用は出現しなかった。本研究では、キナクリンは一過性ではあるがプリオン病に有効であり十分な観察下であれば比較的安全に用いることが示された。

A. 研究目的

CJD に代表されるプリオン病は治療法が確立されていない致死性の神経難病である。比較的稀な疾患群であるが、本邦ではプリオン病原体に汚染されたヒト死体由来乾燥硬膜移植による医原性プリオン病が重大な社会問題になっている。また牛海綿状脳症が国内で発症したことを受け、プリオン病に対する即戦力的な治療法の開発が求められている。本研究は臨床ですでに他の疾患に応用されているキナクリンについて、第一世代型プリオン病治療薬候補としてこれらのプリオン病治療効果を患者で検討する。

B. 研究方法

対象

プリオン病疑い例を対象とする。プリオン病の臨床診断には WHO の診断基準を参考として作成した「プリオン病臨床診断基準」を用いる。疑い例と診断された患者または家族のインフォームド・コンセントを

得て治療を行う。

方法

診断の手順；関連施設その他医療機関から紹介されたプリオン病疑い患者について検査入院の上、他疾患の除外のために血液・尿・髄液検査、画像および生理学的検査を施行する。その結果診断基準にて適応を満たす症例に対し詳しい説明を行い、インフォームド・コンセントによる同意を得た場合に治療を開始する。

キナクリンの製剤化；現在キナクリンは治療用薬剤としては生産されていないため、研究試薬として供給されているキナクリン 2 塩酸 (C₂₃H₃₀ClN₃O · 2HCl · xH₂O) (東京化成工業および和光純薬より) を 1 カプセル 100mg に製剤化したものを用いる。製剤化は福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 (片岡 泰文教授) が行う。

治療スケジュール；キナクリンを 300mg /day 分3 経口連日投与で 12 週間の投与を行う。

治療効果の評価；臨床症状（自覚的、他覚的）および検査所見を定期的に評価し、効果判定記録に記入する。

副作用の監視；現在までに報告されているキナクリンの副作用は頭痛、眩暈、胃腸障害、皮膚黄染、痙攣、骨髄抑制、血液障害、発疹性乾癬、急性肝細胞壊死、角膜混濁である。これらを早期に発見し対処するために副作用監視検査および副作用症状監視用チェックシートを作成しこれに従って監視する。

治療中止の基準；痙攣、骨髄抑制（WBC2,000/ μ l または好中球 1,000/ μ l または血小板 50,000/ μ l または Hb8.0g/dl 以下）、肝機能障害（AST,ALT 基準値上限の5倍以上）などの副作用が出現した場合に中止する。

評価委員会；評価判定委員会および安全性評価委員会を設置する。

（倫理面への配慮）

本研究のプロトコールは福岡大学医に関する倫理委員会および同試験審査委員会の承認を得ている。治療の施行にあたっては患者および家族に対し研究の目的・内容・危険性および得られたデータの取り扱いについて十分な説明を行い書面での同意を得た。

C. 研究結果

症例1：散発性 CJD 症例で、発症から2.5ヶ月後より治療を開始した。

治療経過：2週目より聴覚・視覚刺激に対し反応が見られるようになり、4週目には治療前に見られた左同名半盲が消失した。同時期に上肢ミオクローヌスの減少と脳波上周期性同期性放電(PSD)の減少を認めた。8週目より症状は再び増悪した。現在無動性無言状態である。

副作用：10日目より皮膚黄染が明らかになった。一過性の下痢を認めたが重篤な副作用は認めず12週間の治療を終了。

症例2：散発性 CJD 症例で、発症から

11ヶ月後より治療を開始した。

治療経過：外界刺激に反応せず、脳波上も治療によると考えられる変化はなく、無動性無言状態のまま経過している。現在投与開始10週目である。

副作用：皮膚黄染、下痢の他には特に認めず。経過中誤嚥による肺炎症状のため6週間の休業期間をとった。

症例3：散発性 CJD（緩徐に進行している非定型例）症例で、発症から約3年後より治療を開始した。

治療経過：2週目より呼びかけに対し合目的な返答をするようになった。また全身筋の固縮・痙縮が著明に改善した。9週目頃より再び反応性は低下し、筋固縮・痙縮傾向が出現した。12週目には呼びかけに対する反応は治療開始前とほぼ同程度になり、筋症状はやや改善状態を保った。

副作用：10日目頃より皮膚黄染が見られた。12週目に中程度の肝機能障害が出現した。

症例4：硬膜移植歴（1991年）のある CJD(緩徐に進行している非定型例)症例で、発症から約6年後より治療を開始した。治療経過：2週目より呼びかけに対し合目的な返答をし、治療開始時は常に右側臥位をとっていたものが頻りに仰臥位をとるようになった。筋固縮・痙縮傾向が改善し両側から支えれば数歩の歩行が可能になった。正座位保持可能になった。しかし5週目より症状は再び増悪している。

副作用：皮膚黄染は軽度である。現在6週目であるがその他に副作用は出現していない。

症例5：栃木県内の硬膜移植後の CJD 発症から比較的早期に治療を開始した症例。治療経過：神経症状の改善が認められている。

副作用：肝機能障害が出現している。

症例6：奈良県内の散発性 CJD の進行した症例。

治療経過：症状の改善は認められず。

副作用：肝機能障害が出現している。

なお、症例5、6は本研究のプロトコールに従って他の施設で独自に倫理委員会の審査を受けて治療を行った症例である。

D. 考察

Doh-ura ら(J Virol 74:4894-7, 2000)、Korth ら(Proc Natl Acad Sci USA 98:9836-41, 2001)が示したようにキナクリンは培養細胞において PrP^C から PrP^{Sc} への変換を強力に阻害するが、その機序は明らかにされていない。今回我々は散发性 CJD4 例と硬膜移植後の CJD2 例に対しキナクリン 300mg 経口連日投与を行った。このうち比較的早期に治療を開始しえたものと、発症から1年以上を経ている進行が緩徐であったものでは一過性ではあるが症状の明らかな改善が得られたが、進行例では効果を認めなかった。

キナクリンはアクリジン化合物の1つで、経口投与した場合腸管から速やかにかつ高率に吸収され、投与から8～12時間で血中濃度が最高に達する。組織への分布は良好で特に肝臓・脾臓・肺・副腎・皮膚・白血球・網膜色素上皮に高い親和性を持つ。脳への分布についてはサルに静脈内または子宮内投与すると24時間後に脳から検出され、脳血液関門を通過することが実験的に証明されている。代謝機序については明らかにされていないが主に腎から排泄され、数ヶ月かけて緩徐に排泄されることが知られている。以上のことから今回の検討で神経症状改善作用が比較的発症早期に治療を開始した症例と緩徐に進行しているものに限られ、また効果が一過性であった原因はキナクリンの代謝排泄によるものではなく、キナクリンの薬理作用が疾患形成過程のうち神経細胞の機能異常にとどまっている段

階のものに効果を示しており、すでに器質的変化に至ったものについては作用していないためである可能性が示唆された。

今後治療研究を継続する上で、薬剤の用量および投与期間などを再検討するとともに、より早期に確実に診断できる方法を取り入れる必要があると考えられた。

E. 結論

キナクリンの経口投与は、一過性ではあるがプリオン病に有効であり十分な観察下であれば比較的安全に用いることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

H. Furukawa, M. Nakajima, T. Kusuhara, M. Takahashi, Y. Kataoka, K. Doh-ura, T. Yamada. A Case of Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease treated with anti-malarial agent, quinacrine: A first clinical trial in Japan. (Submitting)

2. 学会発表

山田 達夫：プリオン病治療に向けて。高機能物質研究所研究成果報告会、2002年、福岡

古川 ひさ子、高橋 三津雄、堂浦 克美、山田 達夫：尿中プリオン蛋白検出の試み；プリオン病診断における有用性の検討。第4回七隈アルツハイマー病研究会カンファレンス、2002年、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙付録 1

プリオン病臨床診断基準

適応の決定

- 散発性 CJD (比較的早期) を疑う例では 1) 2) 3) 項目の合計が 9 点以上
- プリオン病の家族歴があるものは 9 点以上
- その他の家族歴があるものは 9 点以上を適応とする。
- ただし、Lyodura・移植歴 (1979-1991) を有する症例は 1) の神経学的所見のいずれか 1 つを有し、かつ他の疾患を除外できれば治療の適応とする。

1) 神経学的所見

進行性痴呆・大脳皮質症状 (歪視など視覚異常を含む)・運動失調・錐体路症状・錐体外路症状・ミオクローヌス

進行性痴呆または運動失調にミオクローヌスを伴う: 5 点

進行性痴呆または運動失調に大脳皮質症状を伴う: 3 点

進行性痴呆に錐体路または錐体外路症状を伴う: 2 点

進行性痴呆または運動失調のみ: 1 点

2) 補助検査

脳 MRI (特に拡散強調画像): 大脳皮質または大脳基底核の高信号、
または急速に進行する脳萎縮: 3 点

脳波: 約 1Hz 頻度の周期性同期性放電 (PSD): 5 点

脳脊髄液: 14-3-3 蛋白増加: 3 点

3) 他の疾患を除外 (必須: 3 点)

脳炎 (CSF で炎症所見がないこと)

脳血管障害、腫瘍、慢性硬膜下血腫など外傷、NPH (MRI で確認)

甲状腺機能低下症 (T4 低下、TSH 高値) 橋本病 (抗甲状腺ミクロソーム抗体陽性、TSH 高値)

肝性脳症、尿毒症などの代謝性脳症 (血液生化学)

ビタミン欠乏症 (ビタミン B1, B6, B12, ニコチン酸)

アルツハイマー病などの神経変性疾患 *

4) 家族歴

プリオン病 (5 点)

原因の明らかでない痴呆・失調・痙性対麻痺 (各 3 点)

補足) プリオン蛋白遺伝子解析について

早い段階で同意を得て、全例実施する。

末梢全血 (EDTA 添加) 20ml 採血→4°C 保存し九州大学脳研病理へ

同様の症状、失調症状 ¶ 痴呆 痙性対麻痺 ¶ いずれかの家族歴

Yes → 4) 既知の変異がなければシーケンス決定も。

No → 4) 正常多型、既知の変異スクリーニングまで。

ただし本人に ¶ の症状があれば Yes と同様に行う。