

1. 論文発表

- 1) Nakajima M, Yamada T, Kusuhaara T, et al. Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17:158-163, 2004
- 2) 中島雅士、山田達夫:Creutzfeldt-Jakob 病治療の可能性- 最近の知見からみた治療への展望- . *神経内科* 57(5):413-418, 2002
- 3) 中島雅士、山田達夫:プリオン病治療の現状と今後の展望. *最新医学*. 58(5):94-98, 2003
- 4) 藤木富士夫、山田達夫:プリオン病. *臨床神経科学*. 21(8):926-928, 2003
- 5) 小林由佳、平田幸一、田中秀明、山田達夫:硬膜移植歴のあるクロイツフェルト・ヤコブ病患者に対するキナクリン投与の影響. *臨床神経学*. 43(7)403-408, 2003

2. 学会発表

- 1) 中島雅士、山田達夫:キナクリン治療結果とキニーネ治療の現況. 厚生労働省科学研究補助金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. 九州大学医学部. 2003, 1. 28
- 2) 古川ひさ子、高橋三津雄、中島雅士、楠原

智彦、堂浦克美、片岡泰文、山田達夫:尿中プリオン蛋白解析によるヒト・プリオン病早期診断の試み. 第 44 回日本神経学会総会. 横浜 2003, 5. 15-17

3) 古川ひさ子、調 漸、堂浦克美、高橋三津雄、山田達夫、辻畑光宏、片峰茂、丹羽正美:プリオン病早期診断における尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白解析の有用性に関する検討. 第 22 回日本痴呆学会. 東京 10. 3-4, 2003

4) Tsuboi Y: Effects and Safety of Quinacrine Treatment for Creutzfeldt-Jakob Disease. CASE CONFERENCE ON JONATHAN SIMMS, An Inter-disiplinary Meeting. Belfast UK. 2003, 9. 26.

5) 山田達夫、坪井義夫:クロイツフェルト・ヤコブ病患者におけるキナクリン治療の効果と安全性. 厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学研究事業「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. 平成 15 年度班会議および総括会議. 北里大学薬学部. 2003, 12. 19

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究協力施設及び研究協力者

国立療養所西奈良病院神経内科	松村隆介
獨協医科大学神経内科	小林由佳
東京都教職員互助会三楽病院	金田充博
静岡県立総合病院神経センター	金剛
東京都立神経病院神経内科	清水俊夫、釘尾由美子
小牧市民病院	内藤和行、勝野雅央
西神戸医療センター神経内科	柳原千枝
愛知光生会赤岩病院	市川雅祥
奈良県立医大付属病院	岡橋友美子
京都府立医科大学神経内科	吉川健治
市立函館病院	横山徳幸
川崎医科大学神経内科	宮石雅浩、黒川勝己
脳神経疾患研究所付属総合南東北病院	宮本智之、伊藤雅史、永島隆秀
国立名古屋病院神経内科	満間典雅
国立療養所三重病院	近藤昌秀、丹羽篤
北海道大学付属病院	宮崎雄生、田代邦雄、
東京都多摩老人医療センター神経内科	中島亜希子、木島祥一郎
市立池田病院神経内科	藤田千絵
大阪医科大学第一内科	杉野正一
日本循環器病院脳神経センター	政所広行
東京大学医学部付属病院	安芸直美、山本知孝
東海大学医学部付属病院神経内科	高橋裕秀
川崎市立井田病院神経内科	秋山久尚
順天堂大学脳神経内科	望月秀樹
天草中央病院	芹川聖章
福岡大学内科学第5教室	今村明子

表1. プリオン病臨床診断基準

<p>(1) 神経学的所 <u>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</u></p> <p>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</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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）</p> <p>プリオン病臨床診断</p> <ul style="list-style-type: none">• 孤発性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。ただし、遺伝性プリオン病をプリオン蛋白遺伝子解析で確認。• Lyodura 移植歴（1979-1992）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する。

表 2. 孤発性症例におけるキナクリン治療効果

効果	性別 男：女	年齢 (才)	発症から投 与までの期 間 (月)	開始時の認知機能		効果持 続期間 (週)
				レベル1-2 刺激に反応あ り	レベル3 無動性無言	
あり (N=9)	3:6	63.2±8.6	9.1±11.1	8	1	3.2± 3.5
なし (N=12)	4:8	64.6±10.1	7.3±6.3	2	10	0
p 値	ns	ns	ns	<0.001		-

ns: 有意差なし

表 3. 医原性症例におけるキナクリン治療効果

効果	No./性/年齢	硬膜移植/発症 (年)	発症から投 与までの期 間 (月)	開始時の 認知機能	効果持 続期間 (週)
あり	3/F/67	1987/2001	6	無動無言	4
あり	13/F/37	1983/2001	4	無動無言	4
なし	7/M/72	1987/2002	6	無動無言	0
なし	11/M/20	1983/1998	53	無動無言	0
なし	25/F/66	1986/2001	5	簡単な指示動作 が可能	0

表 4. 遺伝性プリオン病症例におけるキナクリン治療効果

効果	No./性/年齢	診断	発症から 投与まで の期間 (月)	開始時の認知機能	効果持 続期間 (週)
あり	20/F/59	GSS ^{102*}	72	自発語あるが意思疎通は不可	2
なし	9/M/64	CJD ²⁰⁰	3	無動無言	0
なし	14/F/54	CJD ²⁰⁰	4	無動無言	0
なし	23/F/64	CJD ²⁰⁰	3.5	呼びかけに対し反応よく、 「大丈夫」等自発語を認めた	0

*: 硬膜移植歴あり

表 5. キナクリン治療の効果とその内容

No./性/年齢	診断	投与後の認知機能その他の変化	効果持続期間 (週)
3/F/67	医原性 CJD	開眼時間の延長、発語の増加。	4
8/M/76	孤発性 CJD	自発開眼時間の延長。Eye to Eye コンタクトが可能。	1
12/M/63	孤発性 CJD	投与 2 週後に痛み刺激に検者への視覚注視が出現。	1
13/F/37	医原性 CJD	感情失禁。外部からの刺激に笑ったり泣いたり表情の表出。光・音・呼びかけに追視あり。自発運動の出現。PSD の消失、背景脳波の出現。	4
16/F/72	孤発性 CJD	痛覚刺激にて上肢の動きが出現。	4
18/F/64	孤発性 CJD	投与 1 週後で覚醒状態の改善が見られた。	1
19/F/62	孤発性 CJD	投与 1~2 週後で発語が少しみられ、意志疎通性が上昇した。自動運動の増加。	1
20/F/59	遺伝性 GSS ¹⁰²	投与 10 日~3 週後に意味のある発語が増加した。投与 10 日後で坐位保持可となったがすぐに不可となった。	2
21/M/46	孤発性 CJD	投与 4~5 日後には反射性ミオクローヌス減少。「うー」と唸り声が聞かれるようになり以後持続。投与 2~5 週後に音の方向を注視する反応あり。	3
24/F/68	孤発性 CJD	指示動作や挨拶が可能。	12
27/F/59	孤発性 CJD	追視、笑顔が見られた。四肢の自発運動は増加した。不随意運動も粗大な運動に変わったが、その後もとのミオクローヌスに戻った。	4
29/F/59	孤発性 CJD	投与 1 週後に呼びかけに反応。ミオクローヌスの減弱。家族の話しかけに笑顔。このような変化は 2 週間後にはもとに戻る。	2

表 6. キニーネ治療症例のプロフィール

No./性/年齢	診断	発症からの期間 (月)	投与量 (g) 1 日量/総量	投与日数	開始時認知機能	開始時運動機能	効果持続期間 (週)	治療中止	転帰
1/F/65	孤発性 CJD	4	1.5/84	57	3	3	+ (3)	中止	入院中
2/M/65	孤発性 CJD	4	1.5/160.5	107	2	2.5	-	完了	入院中
3/F/60	孤発性 CJD	3	1.5/72	48	2	2.5	-	中止	入院中
4/F/59	遺伝性 GSS ¹⁰²	72	1.5/33	22	2	2	-	中止	入院中
5/F/69	孤発性 CJD	36	1.5/126	84	3	2.5	-	完了	入院中
6/M/70	孤発性 CJD	3	1.5/135	90	3	2.5	+ (3)	完了	入院中

表 7. キニーネ治療の副作用

No./性/年齢	治療完了状況	痙攣・中枢神経症状	血液障害	肝機能障害	皮疹	その他
1/F/65	中止	-	+ **	++ *	-	-
3/F/60	中止	-	-	-	+ *	-
4/F/59	中止	-	-	++ *	-	-

*: 中止の原因となった副作用, **: 血小板減少

図1. キナクリン治療の完了症例数と中止症例数

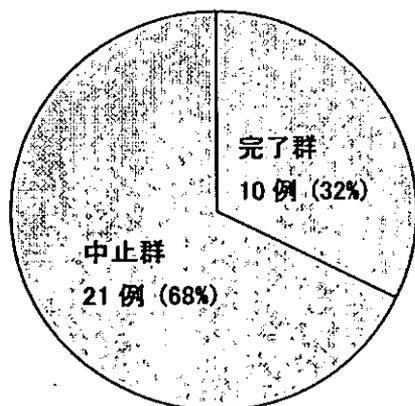


図2. キナクリン治療中止の原因

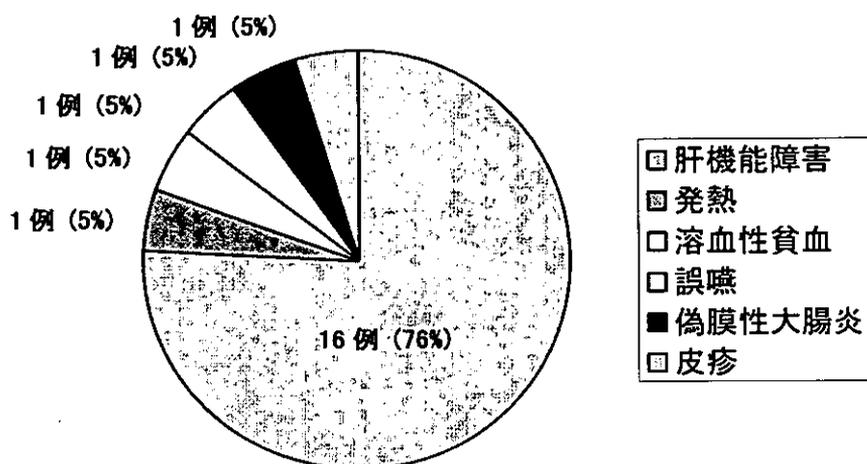
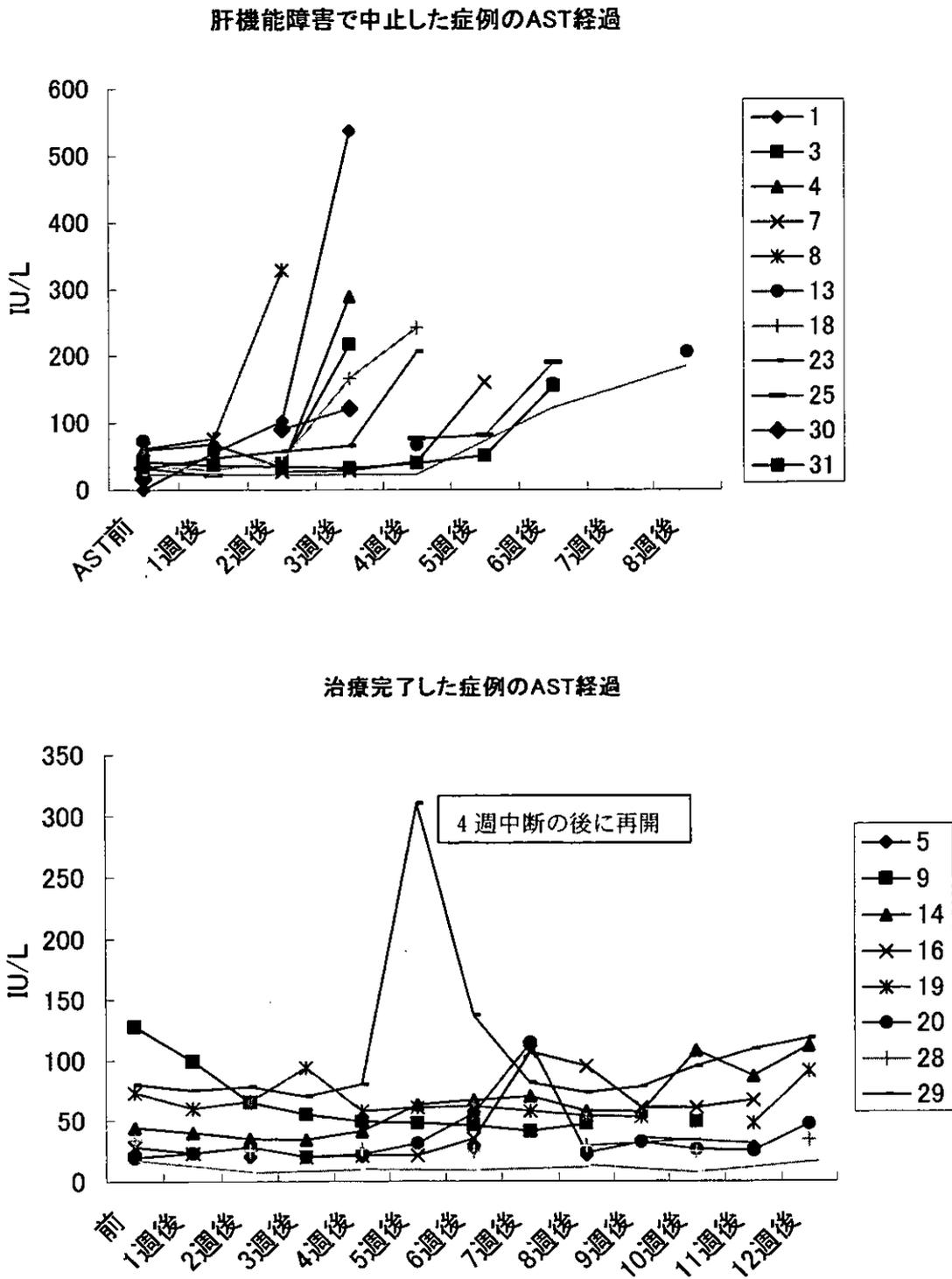


図 3. 各症例の AST の経過



金属特異的錯体形成能と抗プリオン活性との相関に関する研究

分担研究者：太田 茂 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

プリオン病治療薬として有効な化合物の条件は、Cu²⁺選択的キレート能を有すること、さらに Cu²⁺錯体となることで SOD 活性を持つこと、そして適度な脂溶性を持つことで治療における有効域を広く保つことであることが示唆された。従ってプリオン病治療薬のスクリーニング法として SOD 活性の検討が優れていると思われる。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病治療薬の開発のために、新規治療薬候補の合成を行い、薬効評価のための検体創出を目的とする。規範となる分子構造とその化合物が持つべき物理化学的性質について検討し、新規治療薬が有すべき条件を描出する。

B. 研究方法

生物活性評価を既に行った化合物群から活性の高いものとして複素環化合物に着目し、窒素の配位力に変化を付けるべく置換基を考慮して合成を行った。錯体形成能評価として、一定量の治療薬候補を計りとり、等量の金属イオン (Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ru²⁺, Pd²⁺, Ag⁺) を加えて UV スペクトルを測定した。SOD 活性は、それぞれの銅イオン錯体を用いて xanthine/xanthine oxidase 系で産生したスーパーオキシドの消失をテトラゾリウム塩からホルマザンへの変化を測定することで行った。

(倫理面への配慮)

今回行った研究は動物実験を行っておらず、倫理的には全く問題ないと判断している。

C. 研究結果

本研究により、次に示す4つのプリオン病治療薬として有効な化合物の条件を明らかにした。

(1) 多数の複素環化合物をスクリーニングし、プリオン変換抑制作用を有するものを見出した。プリオン病治療薬として有効な化合物の条件は、quinoline 骨格を有することであった。プリオン変換抑制作用が認められた化

合物は、quinoline 骨格の2位あるいは4位に含窒素側鎖（含窒素複素環・脂肪族アミノ基・芳香族アミン）を有するという共通点があり、quinoline 骨格の窒素原子と含窒素側鎖中の窒素原子がある一定の距離を保って配列することが、重要であると考えられた。側鎖の違いにより、プリオン変換抑制作用の増加・減少が起こり、2,2'-biquinoline のように、quinoline 骨格に対しより近い位置に他の含窒素側鎖（含窒素複素環・芳香族アミン）を持つ化合物は、強いプリオン変換抑制作用を示し、プリオン病治療薬として有効であることが示唆された。

(2) プリオン病治療薬として有効な化合物の条件は、Cu²⁺選択的キレート能を有することであると示唆された。quinoline 骨格もしくは Naphthyridine 骨格に比較的小さい置換基を持つ化合物のうち、プリオン変換抑制作用を有するものでは、Cu²⁺のみに共通した選択的キレート作用が認められ、細胞毒性が認められない濃度域でプリオン変換抑制作用を有さないものでは検討した全ての金属に対しキレート作用を示した。この金属選択性の有無が作用点解明の手掛かりになると考えられた。

(3) プリオン病治療薬として有効な化合物の条件の3つ目は、さらに Cu²⁺錯体となることで SOD 活性を持つことであると示唆された。quinoline 骨格に他の芳香環を持つ側鎖が置換している化合物は、非常に強い SOD 活性を持ち、プリオン変換抑制作用は密接に関与していると考えられた。Cu²⁺選択的キレート作用を持ち、さらにプリオン変換抑制作用と共に SOD 活性を持つ化合物がプリオン病治療薬開発への手掛りとなり得ることが考えられた。

(4) プリオン病治療薬として有効な化合物の条件の4つ目は、適度な脂溶性を持つことで治療における有効域を広く保つことであると示唆された。プリオン変換抑制作用及びSOD活性と分配係数の間にわずかながら負の相関が認められ、プリオン変換抑制作用及びSOD活性に化合物の脂溶性が関与していることが示唆された。一方、分配係数と細胞毒性、細胞毒性の組織選択性に相関は認められなかった。

D. 考察

プリオン病治療薬として有効な化合物の条件は、Cu²⁺選択的キレート能を有すること、さらにCu²⁺錯体となることでSOD活性を持つこと、そして適度な脂溶性を持つことで治療における有効域を広く保つことであると示唆された。そして、これらの条件をすべて満たし、細胞毒性も低い化合物2,2'-biquinolineを見出した。そこで、2,2'-biquinolineの誘導体である6,6'-dinitrobiquinolineを合成し、さらに作用機序について検討したところ、6,6'位のnitro置換基はより強いCu²⁺選択的キレート作用を持ち有効であると示唆された。

E. 結論

有効な治療薬が見つからないプリオ

ン病に対し、現在抗マラリア薬であるquinineを用いて、抗プリオン病薬としての臨床実験が行なわれている。quinineと比較しても、強いプリオン変換抑制作用(PrPres IC₅₀ 10 nM)を持つリード化合物2,2'-biquinolineを見出したことは、プリオン病治療薬開発に向けて手掛りを得たと考えられる。2,2'-biquinoline誘導体を用いた構造活性相関をもとに、今後より詳細なメカニズムを解明していくことが必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

福内友子ら：プリオン病治療薬候補物質の金属選択的キレート作用 日本薬学会年会 長崎 2003年3月

Fukuuchi, T. et.al: Metal chelations of candidate compounds for prion disease treatments AIMECS 2003 Kyoto Oct., 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ドッキング計算による異常型プリオン蛋白産生阻害化合物の 3 次元ファーマコフォアの同定と 3 次元化合物データベースに対する *in silico* スクリーニングに関する研究

分担研究者：広野修一 北里大学薬学部・教授
研究協力者：山乙教之、李 洪涛 北里大学薬学部

研究要旨

前年度までの研究の結果、HBOP による正常型プリオン蛋白上のリガンド結合部位の同定と市販のドッキングプログラムを用いた正常型プリオン蛋白-リガンド複合体のモデリングにより、異常型プリオン蛋白産生阻害活性に必要な条件として、small pocket に結合すること、及び、NH₂ 基の様な水素供与性基、SO₂ 基の様な水素受容性基、および、疎水性基として、ナフタレン環の様な大きな芳香環の 3 つのファーマコフォアが明らかとなった。3 次元化合物データベース検索を行った結果、これらの条件を満たす強い異常型プリオン蛋白産生阻害活性を持つと予測される化合物がいくつかヒットした。

A. 研究目的

前年度までの研究で得られた 3 次元ファーマコフォアに基づき、3 次元化合物データベース検索を行い、異常型プリオン蛋白産生阻害活性を示す新規化合物の探索を行った。

B. 研究方法

ChemACX-SC2000 データベースに登録されている約 51 万化合物の内、ナフタレン環、NH₂ 基および SO₂ 基の 3 つの検索条件を満たす化合物について、SYBYL FlexX を用いて、正常型プリオン蛋白に対するドッキングを行い、small pocket に結合しうる化合物の探索を行った。

（倫理面への配慮）

本研究には倫理面に配慮すべき内容は含まれていない。

C. 研究結果

ChemACX-SC2000 データベースに登録されている約 51 万化合物の内、3 つの検索条件を満たす化合物数は、309 化合物であった。現在、71 化合物について、ドッキング計算が終わったところであるが、既存の化合物と同等かそれ以上の異常型プリオン蛋白産生阻害活性を持つと予測される化合物が、6 化合物ヒットしている。

D. 考察

ヒットした化合物について検討した結果、正常型プリオン蛋白の small pocket 近傍に存在するフリーの水素結合性残基や疎水性残基と更なる相互作用を付加することで small pocket に対する結合能や選択性を増強する分子設計も可能であると考えられた。

E. 結論

異常型プリオン蛋白産生阻害活性に必須な 3 次元ファーマコフォアを持ち、small pocket に結合しうる化合物について、3 次元化合物データベース検索を行った結果、6 個の候補化合物を検出した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Akifumi Oda and Shuichi Hirono. Geometry-dependent atomic charge calculations using charge equilibration method with empirical two-center Coulombic terms. *Journal of Molecular Structure: (THEOCHEM)*, 634, 159-170 (2003)

2. 学会発表

山乙教之、李 洪涛、広野修一：疎水性

ポテンシャルを用いたプリオン蛋白質
上のリガンド結合部位の同定と複合体
立体構造の構築 第47回日本薬学会関
東支部大会(東京) 日本薬学会関東
支部 2003.10.4 [第47回日本薬学
会関東支部大会講演要旨集 p.47
2003.10]
山乙教之, 李 洪涛, 広野修一: 疎水性

ポテンシャルを用いたプリオン蛋白質
上のリガンド結合部位の同定と FlexX
を用いた複合体構造の構築 2003 年度
TRIPOS ユーザー会(東京) 2003.11.21

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ヘパリン中のプリオン蛋白質の異常化を阻害する部分構造の推定と
リード化合物の探索に関する研究

分担研究者：隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科・教授
研究協力者：穂丸舞、佐藤昌紀 鹿児島大学大学院理工学研究科
堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

本研究は、異常型プリオン蛋白質の成長抑制活性を持つヘパリン中の部分構造を決定し、その構造に基づいて新規薬剤開発のリード化合物を開発すること、さらに異常型プリオン蛋白質の迅速な測定系の開発を目的として行った。即ち、まず市販のブタ小腸由来のヘパリンから低分子化ヘパリンを多種調製し、それを用いて ScN2a 細胞中の異常型プリオン蛋白質の成長阻害実験を行った。その結果、ヘパリン中のある二糖構造が成長阻害活性に重要であることを見出した。次いでこの二糖構造を複数（4～8 単位）有する化合物を合成、現在この活性を確認中である。別途、この二糖構造を金チップに固定化した「シュガーチップ」を調製した。

A. 研究目的

異常型プリオン蛋白質の成長抑制活性を持つヘパリン中の部分構造を決定し、その構造に基づいて新規薬剤開発のリード化合物を開発すること、さらに異常型プリオン蛋白質の迅速な測定系の開発すること。

B. 研究方法

- 1) 多種の低分子化ヘパリンの調製
- 2) ScN2a 細胞中の異常型プリオン蛋白質の成長阻害実験による構造特異性の推定
- 3) 化合物の合成
- 4) 合成化合物を用いた構造特異性の確定
- 5) シュガーチップの調製

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

- 1) ヘパリン中のある二糖構造が成長阻害活性に重要であると推定できた。
- 2) 化合物の合成を達成した。
- 3) シュガーチップを調製した。

D. 考察

- 1) 合成化合物の活性を確認次第、血液脳関門の透過性向上など新薬開発に向けた研究を開始できるようになった。

- 2) 調製したシュガーチップを用いた異常型プリオン蛋白質の結合活性を表面プラズモン共鳴法によって迅速、簡便に測定できる系を確立した。

E. 結論

本研究は 1 年という短期間であったが十分に成果が得られ、今後の展望も開けている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suda Y, Arano A, Kusumoto S, Sobel M. Advanced Sugar Chips Immobilized with Clustered Heparin-derived Oligosaccharides and their Application for Surface Plasmon Resonance. Conference Abstract for IUMR-ICAM 2003, 135, 2003
- 2) Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M. Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides. Conference Abstract for IUMR-ICAM2003, 136, 2003
- 3) Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M. Sugar Chip: Advanced Analytical

System for the Biological Function of Oligosaccharides. Conference Abstract for 9th International Kyoto Conference of Organic Chemistry, 99, 2003

4) Suda Y. Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Elucidation of Biological Function of Oligosaccharides. Symposium Abstract for 2nd 21st Century COE, 7th SANKEN international Symposium, 34-35, 2004

2. 学会発表

1) Suda Y, Arano A, Kusumoto S, Sobel M: Advanced Sugar Chips Immobilized with Clustered Heparin-derived Oligosaccharides and their Application for Surface Plasmon Resonance, IUMRS-ICAM2003, Yokohama, Oct. 2003

2) Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides, IUMRS-ICAM2003, Yokohama, Oct. 2003

3) Suda Y, Arano A, Sato M, Uetani M, Kato Y, Kubo M, Teng H-H, Iwata H, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Sugar Chip: Advanced analytical system for the binding interaction of oligosaccharides at nanometer scale, 第76回日本生化学会大会, Yokohama, Oct. 2003

4) Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Biological Function of

Oligosaccharides, 9th International Kyoto Conference of Organic Chemistry, Kyoto, Nov. 2003

5) Suda Y: Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Elucidation of Biological Function of Oligosaccharides, 2nd 21st Century COE, 7th SANKEN international Symposium, Osaka, Jan. 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) PCT/JP03/11417、特願 2003-190568；リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法；発明者：隅田泰生，荒野明男，楠本正一，マイケル ソーベル；出願人：J S T、鹿児島大学長

2) PCT/JP03/09973、特願 2003-190637；多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法；発明者：隅田泰生，荒野明男，林秀樹，楠本正一，マイケル ソーベル；出願人：J S T、鹿児島大学長

3) 特願 2004-041994；2鎖又は3鎖の炭化水素誘導鎖から成る多岐構造を有するリガンド、リガンド担持体、および、そのリガンドを用いたタンパク質の分析方法発明者：隅田泰生；出願人：J S T、鹿児島大学長

4) 特願 2004-029562；リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法発明者：隅田泰生，荒野明男，楠本正一，マイケル ソーベル；出願人：J S T、鹿児島大学長

2. 実用新案登録

なし

抗プリオン化合物の特徴と *in vitro*/*in vivo* での作用に関する研究

主任研究者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者：川竹悟史、西村有起、石川謙介 東北大学大学院医学系研究科
久保郁子、岩城 徹 九州大学大学院医学研究院

研究要旨

抗プリオン化合物の作用機序の1つとして、正常型プリオン蛋白の代謝には影響しないものの正常型プリオン蛋白に強く作用し異常型プリオン蛋白産生阻害をもたらすことが明らかとなった。一方、*in vitro* で強い抗プリオン作用が見られ、脳移行が良好な化合物であっても、*in vivo* で期待した効果が見られないものがある。さらに、*in vitro* でも感染因子株や感染細胞の種類によって同じ化合物でも抗プリオン作用に差が見られることがわかった。このような効果の差の原因について検討を進めていく必要がある。

A. 研究目的

昨年度、我々は表面プラズモン共鳴法を用いて抗プリオン化合物の抗プリオン活性と組換え体プリオン蛋白 121-231 との結合親和性が相関することを明らかにした。このことは、抗プリオン化合物が正常型プリオン蛋白の代謝に影響する可能性を示唆しているため、今年度はその点を明らかにしようとした。次に、昨年度報告したチオフラビン類似化合物(置換インデン環化合物)などには、*in vitro* で極めて著明な抗プリオン活性を持ち、脳移行性が高く、末梢血管からの投与により脳内に蓄積した異常プリオン蛋白に結合するものが多数見られた。これらの化合物について *in vivo* での効果を検討した。さらに、抗プリオン化合物について、各種病原因子株への感受性について *in vitro* で検討を行った。

B. 研究方法

I. 正常型プリオン蛋白代謝に関する研究

プリオン持続感染細胞を抗プリオン化合物を加えた 35S メチオニン含有培養液で育て、細胞で発現している蛋白質を代謝標識(チェイスラベリング)した。正常型プリオン蛋白を細胞溶解液より免疫沈降法で回収し、SDS-PAGE で展開しオートラジオグラムで解析した。細胞膜上で発現している GPI アンカー型正常型プリオン蛋白は、抗プリ

オン化合物存在下で同様に代謝標識し、PIPLC で酵素処理したのち、免疫沈降法で回収し同様な解析をした。また、持続感染細胞よりライソゾーム画分を調整し、この画分に抗プリオン化合物と組み換えプリオン蛋白を加えて反応させ、反応産物をウエスタンプロット法で解析しライソゾームでの正常型プリオン蛋白分解に及ぼす抗プリオン化合物の影響を調べた。さらに、持続感染細胞よりラフト画分を調整し、この画分に抗プリオン化合物と組み換えプリオン蛋白を加えて反応させ、反応産物をウエスタンプロット法で解析しラフトでの正常型プリオン蛋白分解に及ぼす抗プリオン化合物の影響を調べた。

II. *in vivo* での薬剤効果に関する研究

Chandler (RML) 株プリオンに感染させた Tga20 マウスや 263K 株プリオンに感染させた Tg7 マウスの尾静脈より、0.05mg/kg 体重/回の抗プリオン化合物を 3~5 回投与し、潜伏期間への影響を観察した。

III. 病原因子株感受性に関する研究

病原因子株や細胞種が異なる 4 種類のプリオン持続感染培養細胞(ScN2a (RML 株-神経芽細胞種細胞), L1 (22L 株-神経芽細胞種細胞), Fu-1 (Fukuoka-1 株-神経芽細胞種細胞), GT22L (22L 株-視床下部神経細胞))において、各種抗プリオン化合物を様々な濃度で培養上清中に加えて異常型プリオン

蛋白産生阻害効果を調べた。

(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. 正常型プリオン蛋白代謝に関する研究

正常型プリオン蛋白への結合親和性が極めて高いコンゴレッドや硫酸多糖体を中心に解析した。これらの抗プリオン化合物は、代謝標識で解析した正常型プリオン蛋白代謝やターンオーバーには影響しなかった。また、GPI 結合型正常型プリオン蛋白の代謝にも影響しなかった。さらに、これらの抗プリオン化合物は、正常型プリオン蛋白の分解に関係しているライソゾーム活性やラフト上に存在する PrPase(s) 活性に影響しなかった。

II. in vivo での薬剤効果に関する研究

昨年度報告したチオフラビン類似化合物(置換インデン環化合物)のうち in vitro で極めて有効であった 3 種類の化合物について in vivo での効果を末梢血管から投与して検討したが、脳内に化合物が移行し異常プリオン蛋白と結合していることが確認されたにもかかわらず、有意な潜伏期間の延長は観察されなかった。

III. 病原因子株感受性に関する研究

ペントサンポリサルフェートやクロールプロマジン、フタロシアニン、スラミン、コンゴレッド、キナクリンなどは 4 種類の持続細胞のいずれでも異常型プリオン蛋白産生阻害活性があった。しかし、同一化合物で同じ種類の細胞であっても感染している病原因子株によって IC50 は異なっていた。また、同一化合物で同じ病原因子株が感染していても細胞の種類が異なると IC50 は異なっていた。一方、システインプロテアーゼ阻害剤、キニーネ、バイキノリンなどは、一部のプリオン持続感染細胞のみ異常型プリオン蛋白産生阻害活性があった。

D. 考察

正常型プリオン蛋白代謝に関する研究では、抗プリオン化合物の作用機序として正常型プリオン蛋白の代謝やターンオーバーに影響しないということが明らかとなった。調べた抗プリオン化合物はきわめて強く正常型プリオン蛋白と相互作用することが表面プラズモン共鳴法の研究より明らかとなっている。以上の結果を総合すると、これらの抗プリオン化合物は異常型プリオン蛋白の前駆体である正常型プリオン蛋白の寿命などに影響を及ぼし効果を発揮しているわけではなく、正常型から異常型への変換を阻害するように直接正常型と相互作用していることが推定された。

次に、in vivo での薬剤効果に関する研究では、当然 in vivo は複雑であり抗プリオン化合物の効果も in vitro と異なることは起こりえる。今回検討した化合物は in vitro では一桁ナノモルオーダーで異常型プリオン蛋白産生を阻害し、高い脳移行性が確認できており、かつ脳内の異常プリオン蛋白とも強力に結合することを証明できている化合物であった。それにもかかわらず in vivo では効果が見られなかった。この可能性としては、in vitro 実験で見られたような病原因子株による効果の差や同じ神経細胞でも種類による効果の差が影響しているのかもしれない。異常型プリオン蛋白産生にかかわる宿主因子がまったく解明されていないため、この分子メカニズムについてはまったく不明であり、今後の検討課題である。

E. 結論

抗プリオン化合物は、正常型プリオン蛋白代謝に影響しないことを明らかにした。また、脳に容易に移行し異常プリオン蛋白高親和性であっても in vitro と in vivo で治療効果にギャップのある化合物があることを明らかにした。さらに、in vitro でも抗プリオン作用が感染因子株や感染細胞の種類によって影響を受けることを明らかにした。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
(前出)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(前出)

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

書籍

著者	論文タイトル	書籍名	発行所	ページ	年
堂浦克美	プリオン病研究の進歩.	脳科学研究の現状と課題 杉田秀夫、高橋清久編集	じほう社、東京	311-315頁	平成15年9月

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	年
Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T	Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion.	J Virol		in press	2004
Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, et al.	A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: contamination with bacterial outer membrane proteins.	J Biol Chem		in press	2004
Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T	Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies.	J Gen Virol		in press	2004
Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T	Accumulation of prion protein in the degenerated muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: <i>in vivo</i> model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues.	Lab Invest		in press	2004
Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T	Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies.	J Virol	78	1281-1288	2004

Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M	Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics.	J Neuroimaging	14	63-66	2004
Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y	Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation.	Neurology	62	502-505	2004
Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K	A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo.	Lab Invest	83	1751-175 9	2003
Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T	Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Schein ker disease.	Acta Neuropathol	106	92-96	2003
Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K	Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions.	Intern Med	42	199-202	2003

Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, Doh-ura K, Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J	Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis.	Acta Neuropathol	105	462-468	2003
Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, et al.	Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease.	Dement Geriatr Cogn Disord	17	158-163	2004
Oda A, Hirono S	Geometry-dependent atomic charge calculations using charge equilibration method with empirical two-center Coulombic terms.	Journal of Molecular Structure (Theochem)	634	159-170	2003
Suda Y, Arano A, Kusumoto S, Sobel M	Advanced Sugar Chips Immobilized with Clustered Heparin-derived Oligosaccharides and their Application for Surface Plasmon Resonance.	Conference Abstract for IUMR-ICAM 2003		135	2003
Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M	Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides.	Conference Abstract for IUMR-ICAM2003		136	2003
Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M	Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides.	Conference Abstract for 9 th International Kyoto Conference of Organic Chemistry		99	2003
Suda Y	Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Elucidation of Biological Function of Oligosaccharides.	Symposium Abstract for 2 nd 21 st Century COE, 7 th SANKEN international Symposium		34-35	2004
堂浦克美	プリオン病治療薬の開発.	神経研究の進歩	47	109-118	2003
中島雅士、山 田達夫	Creutzfeldt-Jakob 病治療の可 能性- 最近の知見からみた治 療への展望-	神経内科	57(5)	413-418	2002
中島雅士、山 田達夫	プリオン病治療の現状と今後 の展望.	最新医学	58(5)	94-98	2003