

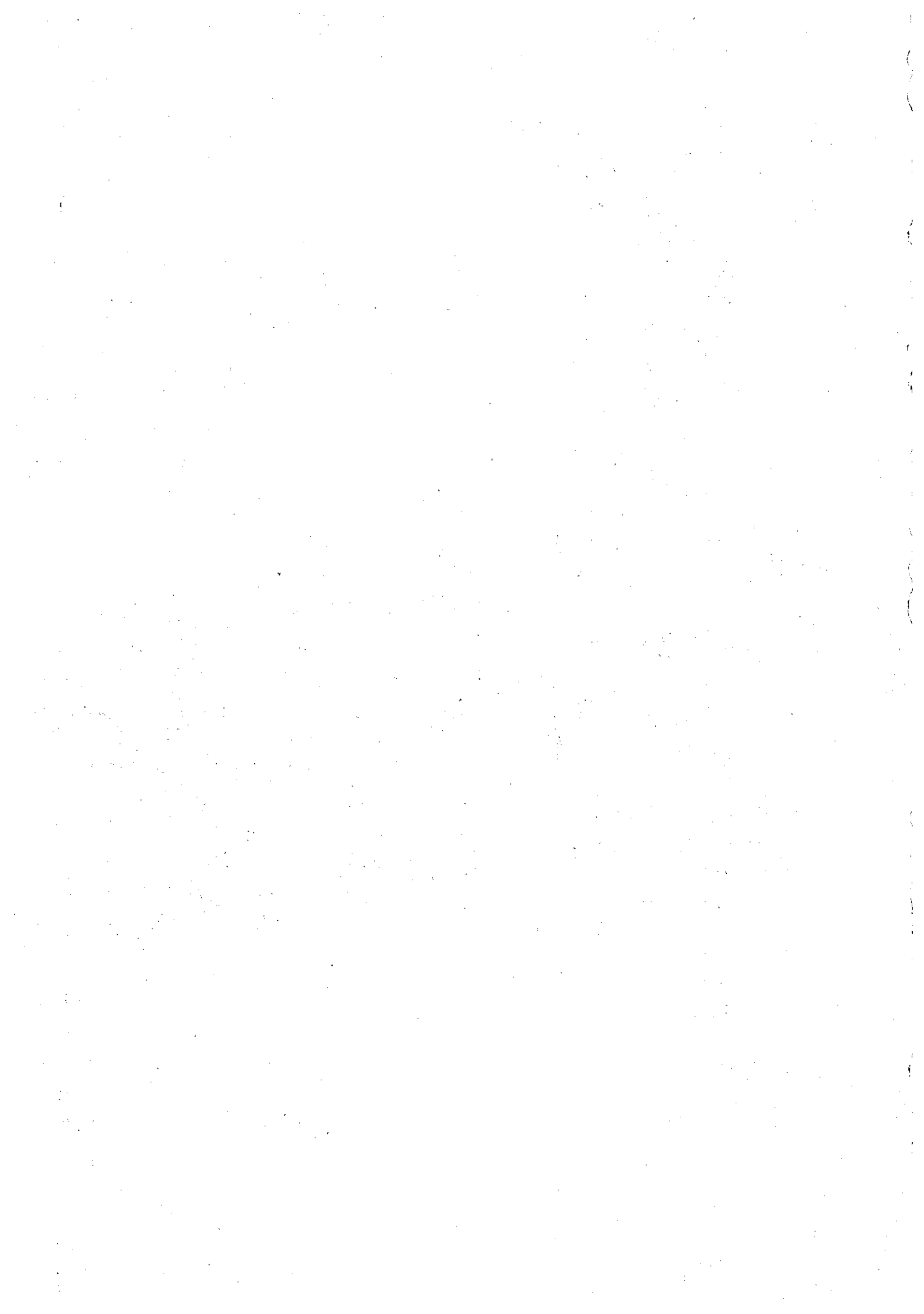
厚生労働科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の  
構造・機能に基づく診断・治療法の開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年3月

主任研究者 片峰 茂



厚生労働科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の  
構造・機能に基づく診断・治療法の開発

平成 16年度 総括・分担研究報告書

平成 17年3月

主任研究者 片峰 茂

はじめに

平成 16年度の「プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく診断・  
治療法の開発」の研究報告を公表する。

平成 17年 3 月

主任研究者 片峰 茂

## 目 次

### I. 総括研究報告書

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく  
診断・治療法の開発

長崎大・院医・感染分子病態学 片峰 茂 1

### II. 分担研究報告書

#### 1. 抗プリオン治療薬スクリーニング系としてのプリオン

感染培養細胞モデルの評価 ―プリオン株を中心にした解析―

長崎大・院医・感染分子病態学 片峰 茂 7

#### 2. 治療薬開発の標的となるプリオン増殖複製関連因子の探索

東北大・院医・プリオン蛋白分子 堂浦 克美 12

#### 3. プリオン増殖に関する遺伝子の探索

北海道大・院獣医・プリオン病学 堀内 基広 16

#### 4. NMR 構造に基づく抗プリオン薬の探索

岐阜大・人獣感染防御研究センター 桑田 一夫 21

#### 5. クロイツフェルト・ヤコブ病の診断マーカー の検討と治療薬開発に関する研究

長崎大・院医・第一内科 調 漸 24

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

## 研 究 班 構 成

区 分	氏 名	所属施設名	所属施設に おける職名	T E L F A X
主任研究者	片峰 茂	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子病態学講座	教 授	T095-849-7057 F095-849-7060
分担研究者	堂浦 克美	東北大学大学院 医学系研究科 プリオン蛋白分子	教 授	T022-717-8232 F022-717-8148
分担研究者	堀内 基広	北海道大学大学院 獣医学研究科 プリオン病学講座	教 授	T011-706-5293 F011-706-5293
分担研究者	桑田 一夫	岐阜大学 人獣感染防御研究 センター	教 授	T058-230-6240 F058-230-6241
分担研究者	調 漸	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 第一内科	助教授	T095-849-7261 F095-849-7270

# 総括研究報告

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく診断・治療法の開発

主任研究者：片峰 茂（長崎大・大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

プリオン蛋白質および関連遺伝子の構造・機能を解明し、診断治療法の開発に資することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。プリオン蛋白質 NMR 解析により著明な構造的揺らぎを示す残基群が、主に B 及び C ヘリックスに存在することが判った。薬剤スクリーニング系としての培養細胞感染モデルの評価や、臨床治験のための効果指標に関する研究も進展した。すでに、In Silico スクリーニングにより見出した不安定な残基に囲まれた部分に選択的に結合する薬剤の抗プリオン活性をプリオン感染培養細胞モデルにより評価することにより有望薬剤候補を得つつある。感染細胞において異常型プリオン蛋白質の発現量を制御する遺伝子の網羅的解析を開始した。RNA 干渉法により、異常型プリオン蛋白質の発現を抑制する 7 個の遺伝子と、亢進する 1 個の遺伝子を確認した。細胞クローン間のプリオン感染感受性の差に基づく DNA マイクロアレイ法により、プリオン感受性細胞で発現レベルが上昇している遺伝子が 40 個、非感受性細胞で上昇している遺伝子が 117 個にまで絞り込むことができた。さらに、プリオン類似蛋白 (PrPLP/Dpl) の神経毒性に及ぼす効果、抗プリオン効果を検査するため、種々の PrP と PrPLP/Dpl 変異体およびキメラ体の Tg マウスが作製されつつあり、次年度には解析に移ることができる。

分担研究者

堂浦 克美（東北大・大学院医学系研究科・教授）  
堀内 基広（北海道大・大学院獣医学研究科・教授）  
桑田 一夫（岐阜大・人獣感染防御研究センター・教授）  
調 漸（長崎大・大学院医歯薬学総合研究科・助教授）

A 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病には有効な臨床治療手段がないのが現状である。世界における牛プリオン病 (狂牛病) のヒトへの伝播をめぐるパニックに加え、我が国では不幸にも硬膜移植後の CJD 患者が多発し感染性プリオン病の脅威にさらされている。プリオン病分子機構の解明に基づく診断・治療法の開発が急務である。プリオン病はプリオン蛋白質 (PrP) の正常から異常への立体構造変換に起因することが明らかになっており、この構造変換の制御が治療法開発の眼目になる。しかし、プリオン増殖機構の全容は判明していない。従来よりその存在が推定されているプリオン増殖に関する宿主因子の同定や正常 PrP の機能、異常 PrP による神経変性機構の解明が重要課題である。最近、プリオン類似蛋白 (PrPLP/Dpl) をコードする遺伝子が同定された。当初より構造の類似性から PrP との機能的

関連が予想されたが、PrPLP/Dpl が正常 PrP と競合的に機能し、神経細胞では毒性を発揮することが明らかとなり、異常 PrP との機能的類似性が示唆されている。本研究はプリオン蛋白質 (PrP) の構造論的分子基盤に基づきプリオン病治療薬の開発を目指すとともに、プリオン関連宿主遺伝子・産物の同定と機能解明により治療のための新たな分子基盤を提案することを目的とする。具体的には以下の 3 研究プロジェクトを遂行する。

PrP の構造に係るバイオ・インフォーマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索：近年、NMR 構造解析により正常 PrP<sup>C</sup> の C 末側の球状構造に 3 つの  $\alpha$ -helix 領域 (A, B, C) と 2 つの短い  $\beta$ -sheet 領域 (S1, S2) が存在することが明らかとなった。一方、異常 PrP<sup>Sc</sup> の構造は不明の点が多いが大部分  $\beta$ -sheet 構造を有する。最近、研究分担者の桑田らは高圧 NMR 解析により中間体 (PrP<sup>I</sup>) の存在を証明し、A, B の 2 つの  $\alpha$ -helix 構造が消失していることを明らかにした。もし、PrP<sup>I</sup> の球状構造のゆらぎを制御し、PrP<sup>I</sup> への変換を抑制することができれば、有力な治療方策となる。現時点では、PrP の構造解析は世界の少数のグループにより行われ、有用なデータもごく限られたものである。したがって、PrP 構造解析データにもとづく薬剤開発の試みは、世界で未だ例のない先端的試みであると考えられる。



プリオン増殖に関する宿主因子の同定: PrP 以外の宿主遺伝子産物がプリオンの複製やプリオン病の病態に関与することは明らかであり、そのような宿主遺伝子 (プリオン病関連遺伝子) の同定に向けて国内外の研究者がしのぎを削っている。本研究におけるプリオン病関連遺伝子の探索のための実験系の特色は、動物に比べて解析が容易なプリオン感染培養細胞モデルを使用することである。培養細胞のプリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子探索と、ジーントラップ法によるアプローチを併用し、世界初のプリオン複製に関与する宿主遺伝子の同定を目指す。

遺伝子改変マウスを用いた PrP, PrPLP/Dpl の機能とプリオン増殖機構の解明: PrPLP/Dpl およびその遺伝子はプルシナー博士のグループと我々が数年前ほぼ同時に発見した新規蛋白 (遺伝子) である。PrP 類似の蛋白としては無論初のものであり、その機能には極めて興味もたれている。神経変性に関わる分子であることも申請者から明らかにした。本研究では種々の PrP と PrPLP/Dpl 変異体の Tg マウスを作製し、その PrPLP/Dpl の神経毒性に及ぼす効果、抗プリオン効果を検討するが、先駆的な成果を挙げる事が十分に期待できる。

## B. 研究方法

PrP の構造に係るバイオ・インフォマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索: 桑田は、<sup>15</sup>N ラベルしたリコンビナント・ハムスター・プリオン蛋白 (rPrP90-231) を用い、CPMG緩和時間分散法及び高圧NMR法により、各アミノ酸残基のグローバルなダイナミクス及び熱安定性を解析した。これらの情報に基づき、熱安定性の低い部位に選択的に結合し、抗プリオン作用を発揮する低分子化合物を、In Silico スクリーニングにより探索した。片峰はプリオン病治療薬開発のための生物学的スクリーニング系としてのプリオン感染培養細胞モデルの適合性と有用性を検証する目的で、培養細胞モデルにおけるプリオン株の解析を行った。マウス培養神経細胞株 (GT1-7) に感染・増殖した3プリオン株 (Fukuoka-1, 22L, Chandler) を接種したマウスの潜伏期、症状、病理変化など、株の生物学的個性を検討した。また、プリオン蛋白 (PrP) 変異の22LとChandlerの2株の増殖に及ぼす影響、及び株間の干渉現象についても調べた。さらに、新たにBSE由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試みた。調は、治療薬効果判定診断マーカーとしてCJD患者髄液の総tauの診断及び経過観察における意義について検討した。対象はCJD患者5例で発症又は入院時より3週間ごとに総tau、リン酸化tau、NSE、S-100蛋白、

14-3-3蛋白を測定した。また、既存薬剤の中でCJDの治療薬候補としてペントサンポリ硫酸 (PPS) は感染実験で有効性が知られ、一部で脳内持続注入がヒトプリオン病患者に試みられている。我々はPPSがin vitro血液脳関門モデル (BBB kit) 用いてPPSの低分子分画を分取し脳送達性の高い治療薬の開発を試みた。

プリオン増殖に関する宿主因子の同定: 堂浦は、RNA干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いて候補因子の探索を行った。細胞膜上に発現する分子を標的にし、siRNA発現コンストラクトを得た。異常型プリオン蛋白を持続的に発現しているマウス神経芽細胞種細胞 (ScN2a) に発現ベクター導入し、導入後6時間後に異常型プリオン蛋白の検出をおこない、その発現抑制あるいは増強効果のあるものを選別した。堀内は、プリオン感受性細胞と非感受性細胞の比較解析から、プリオン複製に関与する因子を同定することを目的とした。まず、マウス神経芽細胞Neuro2a (N2a) サブクローンを樹立し、プリオンに対する感受性を検討した。細胞にChandler株感染マウス脳乳剤を接種して9代連続継代後でもPrP<sup>Sc</sup>が検出できたクローンをプリオン感受性と判定した。プリオン感受性細胞と非感受性細胞のプリオン感受性細胞と非感受性細胞の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により比較解析した。

遺伝子改変マウスを用いた PrP, PrPLP/Dpl の機能とプリオン増殖機構の解明: 種々のPrPとPrPLP/Dpl変異体のTgマウスの作製に着手する。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。遺伝子解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。また臨床研究は長崎大学倫理委員会の承認を経て行われている (承認番号14042342)。

## C. 研究結果

PrP の構造に係るバイオ・インフォマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索:

(I) NMR測定により、マイクロ秒からミリ秒の遅いダイナミクス測定で著明な揺らぎを示す残基群が、主にB及びCヘリックスに存在し、病原性変異を示す残基群の分布に類似していることが判明した。さらに高圧NMRを用い、残基毎の熱力学的安定性を調べた結果、安定性の低い残基群は、B及びCヘリックスに存在していることが分かった。すなわち遅い揺らぎを示す残基群と低い熱安定性を示す残基群とは、比較的よく一致していた。

これは、B及びCヘリックス部分に特に不安定な残基が存在し、これらの変異によりプリオン蛋白質全体が一層不安定になることを示している。このようなプリオン立体構造の不安定性は、感染型への構造変換反応における遷移状態のエネルギーを低下させる可能性がある。

(2) 培養細胞モデルにおけるプリオン株の解析の結果、マウス培養神経細胞株 (GT1-7) に感染・増殖した3プリオン株 (Fukuoka-1, 22L, Chandler) は、潜伏期、症状、病理変化の全ての指標に関してマウス脳で継代された株の生物学的個性を再現すること、Q185R と Q218R の2つの変異プリオン蛋白が22L と Chandler の2株を識別しうること、株の組み合わせによりウイルス感染における干渉と類似する生物現象を呈することが判明した。また、新たにBSE由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試み、GT1-7への持続感染に成功した。(3) 引き続き、熱的に不安定な残基に囲まれた部分に選択的に結合する薬剤を、In Silico スクリーニングにより探索した。さらに、ヒットした化合物約100種類を入手し、プリオン感染培養細胞モデルにより抗プリオン活性を評価した。その結果、複数の化合物に、抗プリオン作用があることが確認された。

(4) 臨床マーカーとしての髄液中総tauは、検討したCJD患者5例では同様な経過をとり、発症初期から急激に上昇し6-12週後とピークになり、その後低下傾向を呈する一峰性の経過を示した。

(5) 限外濾過法で得られたPPS低分子分画は培養細胞系において、PrP<sup>Sc</sup>の細胞内蓄積を抑制し得る分画を特定した。これらの分画は蛋白分子量100kd以下、100-500kd、500-1000kdを透過させる条件で得られた分画は全て抗プリオン効果を保持し、我々が開発した血液脳関門再構築モデルを用いて脳移行性を検討したところ、一つの分画で脳移行性を示す結果が得られた。低分子PPSは異常プリオン持続感染細胞で異常プリオン蓄積を抑制し、BBB kitによる検討では脳内に移行できると考えられる。低分子PPSは有力なプリオン病候補薬剤であり、感染動物実験での効果確認が急がれる。

プリオン増殖に関する宿主因子の同定:

(1) RNA干渉による遺伝子発現抑制スクリーニングでは、190遺伝子についての第2次スクリーニングが終了し、異常型プリオン蛋白の発現を抑制する7個の遺伝子と、異常型プリオン蛋白の発現を亢進する1個の遺伝子を確認した。

(2) N2aサブクローンのプリオン感受性検討の結果、クローン中19クローンがマウススクレイパー-Chandler株に感受性であった。サブクローンのPrP<sup>C</sup>の発現を調べた

結果、プリオン非感受性のN2a-24では細胞膜上のPrP<sup>C</sup>の発現がN2aの1/10程度まで低下していた。一方、N2a-1はプリオン非感受性であったがPrP<sup>C</sup>はプリオン感受性クローンと同程度発現していた。プリオン感受性N2a-3、N2a-5、N2a-27、プリオン非感受性N2a-1、N2a-24、さらにプリオン感受性マウス視床核由来細胞GT1-7、プリオン非感受性マウス神経芽細胞NB41A3における遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により解析した。N2a-5とN2a-1間の発現比較解析を基盤に、他の細胞の遺伝子発現レベルを加味して、感受性細胞と非感受性細胞で発現レベルに2倍以上の差がある遺伝子を抽出したところ、プリオン感受性細胞で発現レベルが上昇している遺伝子が40個、非感受性細胞で上昇している遺伝子が117個にまで絞り込むことができた。

遺伝子改変マウスを用いたPrP、PrPLP/Dplの機能とプリオン増殖機構の解明: 種々のPrPとPrPLP/Dpl変異体およびキメラ体のTgマウスを作製中であり、次年度には解析に移る。

## D. 考察

同定したPrPのゆらぎの構造的中心に結合する薬剤により、ゆらぎを安定化することにより異常型への構造変換を阻止しうる可能性がある。実際、熱的に不安定な残基に囲まれた部分に選択的に結合する薬剤をIn Silicoスクリーニングにより探索し、プリオン感染培養細胞モデルにより抗プリオン活性を発揮する化合物を見出している。薬剤は、分子間相互作用による異常型への構造変換反応の遷移状態のエネルギーレベルを上昇させる役割を有する、と考えられる。我々はさらに、このような異常立体構造への変換過程をさらに効率的に抑制する薬剤を、分子モデリングにより、開発してゆく予定である。

プリオン感染培養細胞モデルで増殖するプリオン株は、接種マウスにおける潜伏期、症状、病理変化の全ての指標でそれぞれの株の生物学的個性を再現することが判った。細胞中に蓄積するPrP<sup>Sc</sup>の構造のうち、あるものは細胞種(環境)により規定され、他のあるものは株特異的であることが示唆された。株の個性が真にPrP<sup>Sc</sup>の構造にのみ規定されるのか、それ以外の分子が関与するのかが今後の課題である。その点、今回見出した株を識別する変異プリオン蛋白は有力な武器になりうる。

多くのウイルス感染同様、プリオン感染においても株間での干渉様現象が動物実験では

古くから知られている。今回の研究で、培養細胞系でも異なる株間で感受性細胞への感染が組み合わせに依っては干渉されることを示唆する成績を得た。さらに PrP<sup>Sc</sup> 低産生 CJ 株 (SY 株) が不完全ながらも他の株の感染を阻止することが分かった。GT/SY にはほとんど PrP<sup>Sc</sup> が検出されないため、PrP 以外の分子が干渉に関与する可能性も否定できない。

BSE 由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試み、GT1-7 への持続感染に成功した。BSE はその宿主域が広いことから極めて特殊な性質を持つプリオン株である。予防・治療薬の開発をふくめて今後の BSE 研究における有用性は高い。

来るべき臨床研究のため臨床効果判定マーカーの検討もおこなった。髄液中総 tau は臨床経過中一峰性の経過を呈し peak の後に無言性無動に陥ったことから、therapeutic window の end point を示唆している可能性がある。総 tau は早期診断、病態評価の生化学マーカーとして有用であると思われる。

異常型プリオン蛋白質の発現量を制御する遺伝子の網羅的解析を開始した。今回 RNA 干渉法により発見した異常型プリオン蛋白質の発現量に影響を与える遺伝子産物は、いずれも神経細胞特異的に発現している分子ではなく、ほぼどの細胞にも共通して発現している分子であった。異常型プリオン蛋白質の感染は感染因子となる異常型と正常型プリオン蛋白質との接触が必要だと考えられており、異常型プリオン蛋白質の複製増殖に関与する宿主因子としては細胞膜上に存在する細胞接着や糖鎖関連因子などが候補である可能性がある。さらに異常型プリオン蛋白質と接触することにより、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。また、プリオン蛋白質は細胞膜ラフトで異常型への変換反応が起こっていると考えられており、ラフトの構成成分であるコレステロールに関連したのも候補と考えられる。今後は、今回同定した 8 個の遺伝子とこれらの候補分子との関係について解析を進めるとともに、同定した 8 個の遺伝子産物が治療のターゲット分子となりえるかどうかについて検討を進めていく。また、更に遺伝子スクリーニングを進めていく。

他方、遺伝子発現の比較解析では比較対照が近縁であるほど、遺伝子発現の差が少なく、より標的となる遺伝子の同定に近づける可能性があると考え、N2a をサブクローン化して、プリオン感受性を判定した。プリオン非感受性クローンの中には PrP<sup>C</sup> の発現が著しく低いものが存在する一方、PrP<sup>C</sup> の発現に変化はないが非感受性の

クローンも存在した。これらの比較解析から、プリオン増殖に関与する PrP<sup>C</sup> 以外の宿主因子の探索が可能になると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Furukawa H 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* 279 (22), 23661-23667 (2004)

Yamaguchi N et al. : Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319 (4), 1247-1252, 2004

Dohgu S et al. : Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 24 (2), 205-217, 2004

Arima K et al. : Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *J. Virol.* (in press)

Satoh K et al. : Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of p-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol* 24 (6), 873-875, 2004

Atarashi R et al. : The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI J.* 3, 82-90, 2004

Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O' Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis* (in press), 2005

Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31:80-7, 2005

Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Mugikura S, Tamura H,

- Higano S, Takahashi S, Itoyama Y: Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 63:443-9, 2004
- Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T: Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest*. 84:828-35, 2004
- 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 in animal models. *J Virol* 78:4999-5006, 2004
- Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, 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* 85:1785-90, 2004
- Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Uono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: 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* 279:23661-7, 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
- Kim, C-L, Umetani, A, Matsui, T, Ishiguro, N, Shinagawa, M, and Horiuchi, M Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320: 41-52, (2004)
- Kim, C-L, Karino, A, Ishiguro, N, Shinagawa, M, and Horiuchi, M Cell surface retention of PrP<sup>C</sup> by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J. Gen. Virol.* 85: 3473-3482 (2004)
- Gombojav, A, Ishiguro, N, Horiuchi, M, and Shinagawa, M Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J. Vet. Med. Sci.* 66(10) : 1293-1295 (2004)
- Kazuo Kuwata, Yuji O Kamatari, Kazuyuki Akasaka and Thomas L. James :  
Slow Conformational Dynamics in the Hamster Prion Protein. *Biochemistry*. 43, 4439-4446, 2004
- KAZUYUKI HASHIMOTO, ZENICHIRO KATO, TOMOKO NAGASE, NOBUYUKI SHIMOZAWA, KAZUO KUWATA, KENTARO OMOYA, AILIAN LI, EIJI MATSUKUMA, YUTAKA YAMAMOTO, HIDENORI OHNISHI, HIDEHITO TOCHIO, MASAHIRO SHIRAKAWA, YASUYUKI YUZUKI, RONALD J. A WANDERS, AND NAOMI KONDO : Molecular Mechanism of a Temperature-Sensitive Phenotype in Peroxisomal Biogenesis Disorder. *Pediatric Research*, in press
- 桑田一夫: プリオン中間体と治療薬開発—分子感染機構と創薬抑制 蛋白質 核酸 酵素 49 (7), 1110-1112, 2004
- 桑田一夫, 副田明男, 岩間亨, 桑田弘美, 中島年彦: fMRIによる高次脳機能障害の診断法及び各種治療法の開発 岐阜脳医学研究会報告集 1, 2004
- 桑田一夫: 素数とプリオン—21世紀における生命科学の新表現理論への挑戦 数理科学 499, 45-53, 2005
- Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S and Matsuno H: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt - Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 in press
- Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N and Katamine S: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of p-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol*. 24:873-875, 2004
- Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Uono H, T Ito, Katamine S and Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine:contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Bio Chem*. 279:23661-23667, 2004
- 佐藤克也 調 漸 片峰茂 村本 環 北本哲之: 医原性クロイツフェルト・ヤコブ病 日本臨床 62:248-251, 2004
- 富田逸郎 佐藤克也 調 漸 長郷国彦 佐藤 聡 辻 畑光宏: 発症早期から MRI 拡散強調画像を経時的にこしらべた Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例. 臨床神経. 44:182-186, 2004

#### H 知的所有権の出願・登録状況

なし



# 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

抗プリオン治療薬スクリーニング系としてのプリオン感染培養細胞モデルの評価  
ープリオン株を中心にした解析ー

分担研究者 片峰 茂 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究協力者 西田教行、新竜一郎、有馬和彦（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）  
桑田一夫（岐阜大学人獣感染防御研究センター）

研究要旨

本研究事業の目的であるプリオン病治療薬開発のための生物学的スクリーニング系としてのプリオン感染培養細胞モデルの適合性と有用性を検証する目的で、培養細胞モデルにおけるプリオン株の解析を行った。その結果、(1) マウス培養神経細胞株（GT1-7）に感染・増殖した3プリオン株（Fukuoka-1, 22L, Chandler）は、潜伏期、症状、病理変化の全ての指標に関してマウス脳で継代された株の生物学的個性を再現すること、(2) Q185RとQ218Rの2つの変異プリオン蛋白（PrP）が22LとChandlerの2株識別しうること、(3) 株の組み合わせによりウイルス感染における干渉と類似する生物現象を呈することが判明した。マウス個体を用いた実験により判明しているプリオン株の特性がほぼ再現され、プリオン感染培養細胞のモデルとしての有用性が確認された。一方、プリオン病治療薬のスクリーニング系としては、株間の培養細胞モデルの感受性の差に留意する必要があることも示された。また、新たにBSE由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試み、GT1-7への持続感染に成功した。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）には、現在のところ有効な臨床治療手段が存在しない。いくつかの薬剤の臨床試験が行われているが、効果はきわめて限定的である。また、抗体、硫酸多糖体などが試験管内では高い抗プリオン効果を発揮するが、血液脳関門の非通過性など臨床応用までの壁はまだ高い。

プリオン病病態の中心は正常型プ

リオン蛋白（PrP<sup>C</sup>）の異常型（PrP<sup>Sc</sup>）への立体構造変換であることから、この変換の制御が治療法開発の最大の眼目となる。近年、NMR構造解析によりPrP<sup>C</sup>のC末側の球状構造に3つの $\alpha$ -helix領域（A, B, C）と2つの短い $\beta$ -sheet領域（S1, S2）が存在することが明かとなった。一方、PrP<sup>Sc</sup>の構造は不明の点が多いが大部分 $\beta$ -sheet構造を有すると考えられている。最近、研究分担者の桑田らは高圧NMR解析によ

り中間体 (PrP<sup>\*</sup>) の存在を証明し、A, B の2つの  $\alpha$ -helix 構造が消失していることを明かにした。もし、PrP<sup>c</sup> の球状構造のゆらぎを制御し、PrP<sup>\*</sup> への変換を抑制することができれば、有力な治療方策となる。

これまでプリオン複製の実験モデルが動物個体以外に存在せず、感染実体の生化学的解析が困難であった。数年前米国の Cauchey らにより開発された無細胞系の試験管内 PrP 立体構造変換モデルが注目されたが、この系では未だプリオン感染価を再構成できていない。培養細胞モデルもこれまで感染複製効率の低さが致命的な欠陥であったが、最近我々は仏グループと共同で培養神経細胞に遺伝子導入により PrP を過発現することにより高効率でプリオン感染とその複製が起こることを示した。

このプリオン感染培養細胞モデルのプリオン病治療薬開発のための生物学的スクリーニング系としての適合性と有用性を検証する目的で、培養細胞モデルにおけるプリオン株の解析を行った。

## B. 研究方法

プリオン株の生物学的個性：脳で継代された生物学的個性（発症までの潜伏期、症状、病理変化）の異なる3プリオン株（Fukuoka-1, 22L, Chandler）を2種の培養細胞株（1C11, GT1-7）に感染・増殖させ、培養細胞中でも株の個性が維持されるか否かを、ddyマウス脳に感染細胞抽

出液を接種することにより検討した。潜伏期は、段階希釈法により求めたLD50単位当たり換算して比較した。株特異的PrP立体構造の指標として、proteinase K (PK) 消化後糖鎖付加パターンをウエスタンブロットにより比較した。また、PK抵抗性のC末断片のペプチドサイズを比較するため、PNGase処理後SDS-PAGE上の移動度を比較した。

PrP アミノ酸残基置換のプリオン株増殖への影響：PrP 変異体の PrP<sup>Sc</sup> への変換効率と、正常型プリオン蛋白 (PrP<sup>c</sup>) の PrP<sup>Sc</sup> への変換に及ぼす各変異体の抑制作用 (Dominant-negative 効果) について、Chandler 株と 22L 株の間での比較検討を持続感染培養細胞を用いて行った。マウス PrP を過剰発現させた N2a 細胞 (N2a58) に Chandler あるいは 22L を感染させ、PrP<sup>Sc</sup> を持続的に産生するクローン (Ch-N2a58, 22L-N2a58) を得て、それらを使用した。内在性のマウス PrP と区別するために、マウス PrP を認識しない抗体である 3F4 のエピトープ部分 (3F4 タグ) をマウス PrP に挿入した MHM2-PrP を発現するベクター (pcDNA3.1) を上記の細胞に遺伝子導入した。3F4-PrP タグを有する、6 種のマウス PrP 変異体 (Q97R, Q167R, Q171R, Q185R, Q216R, Q218R) 発現ベクターも同時に作製した。変異体 PrP それ自身の PrP<sup>Sc</sup> への変換を見る場合は単独で、MHM2-PrP から PrP<sup>Sc</sup> への変換に対する Dominant-negative 効果をみる場合は MHM2-PrP と同時に遺伝子導入した。遺伝子導入 72 時間後、導入 PrP



発現量及び PrP<sup>Sc</sup> 量を 3F4 による Western Blot により測定した。

プリオン株間干渉現象の解析：複数のプリオン株に感受性を示す培養細胞 (GT1-7) を用いあらかじめ neomycin 抵抗性遺伝子を導入した。スクレーピー株の Chandler, 22L を先行感染させ継代培養を繰り返し、感染成立していることを確認した後、Fukuoka-1 株が感染している neomycin 感受性 GT 細胞 (GTFK1) と細胞比 1 : 1 で混合培養し (2 日間)、その後 G418 添加培地を用いて 3 週間以上継代培養をすることで GTFK1 を除去したのち、PrP<sup>Sc</sup> のタイピングを行い、Fukuoka-1 感染成立の有無を判定した。

マウス BSE 持続感染培養細胞系の樹立：英国 BSE を接種後発症したマウス (RIII, 動衛研) の脳乳剤を ddY マウスに継代接種した。10% 脳乳剤を接種した ddY マウスは約 160 日にて発症した。この脳乳剤を用いて GT1-7 細胞への *in vitro* 感染を試みた。

### C. 研究結果

プリオン株の生物学的個性：2 種の培養細胞株 (1C11, GT1-7) に感染・増殖した 3 プリオン株 (Fukuoka-1, 22L, Chandler) は、潜伏期、症状、病理変化の全ての指標に関してマウス脳で継代された株の個性と一致した。株の個性は培養細胞中でも維持され、宿主因子ではなく病原体に規定されることが明らかとなった。一方、糖鎖付加パターンは環境 (宿主) に規定されることが判明した。糖鎖除去後の proK 抵抗性ペプチドの電気泳動

上の移動度は、同じ株でも宿主間 (脳組織か培養細胞か) で異なり、また同じ宿主においても株間で差が認められた。

PrP アミノ酸残基置換のプリオン株増殖への影響：MHM2-PrP は Ch- and 22L-N2a58 細胞内で PrP<sup>Sc</sup> に同等レベルに変換された。しかし Q97R, Q167R, Q171R, Q216R 変異 PrP は両株いずれによっても PrP<sup>Sc</sup> に変換されなかった。また両プリオン株に対して同等の Dominant-negative 効果を示した。一方、Q185R は 22L では PrP<sup>Sc</sup> に変換されないが、Chandler 感染細胞内では変換された。Q218R-PrP は逆に 22L により変換され、Ch-N2a58 細胞では MHM2-PrP の PrP<sup>Sc</sup> 変換に対して強い dominant-negative 効果を示したが、22L-N2a58 細胞ではほとんど効果を示さなかった。

プリオン株間干渉現象の解析：Fukuoka-1 感染特異的に出現する PrP の C 末断片 (以下 C-13 と記す) を指標に、スクレーピー株が Fukuoka-1 株の感染を干渉するかどうかを培養細胞感染モデルを用いて検討した。その結果、Chandler 先行感染は Fukuoka-1 の感染を干渉せず Chandler パターンに新たに C-13 を認めた。一方 22L では C-13 は認められなかった。この実験から異なる株間で感受性細胞への感染が組み合わせに依っては干渉されることが示唆される。さらに PrP<sup>Sc</sup> 低産生 CJ 株 (SY 株) の感染 GT 細胞を用い同様の実験を行った。この細胞に 22L, Chandler, Fukuoka-1 の感染を試みたところ、SY 株は不完全ながらも 22L, Ch, Fukuoka-1 の感染も阻止することが分かった。GT/SY には

ほとんどPrP<sup>Sc</sup>が検出されないため、PrP以外の分子が干渉に関与する可能性がある。

マウス BSE 持続感染培養細胞系の樹立：BSEはその宿主域が広いことから極めて特殊な性質を持つプリオン株であるが、いまだ感染細胞モデルは確立していない。マウス細胞での感染系を樹立するため、我々は英国 BSE を接種後発症したマウス脳乳剤を用いて GT1-7 細胞への *in vitro* 感染を試みたところ、10 継代以上、継代培養した細胞でも PrP<sup>Sc</sup> の産生を認め、また抗 PrP<sup>Sc</sup> 薬剤投与によってそのシグナルが減弱することから、確かに持続感染が成立したものと思われる。

#### D. 考察

プリオン感染培養細胞モデルで増殖するプリオン株は、接種マウスにおける潜伏期、症状、病理変化の全ての指標でそれぞれの株の生物学的個性を再現することが判った。細胞中に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> の構造のうち、あるものは細胞種（環境）により規定され、他のあるものは株特異的であることが示唆された。プリオン仮説が提案するように、株の個性が真に PrP<sup>Sc</sup> の構造にのみ規定されるのか、それ以外の分子が関与するのかが最大の興味である。その点、今回見出した株を識別する変異プリオン蛋白は有力な武器になりうる。

多くのウイルス感染同様、プリオン感染においても株間での干渉様現象が動物実験では古くから知られている。

しかし *In vivo* 実験では免疫系の関与は否定できず、真に病原体間の干渉が起こっているのか不明である。今回の研究で、培養細胞系でも異なる株間で感受性細胞への感染が組み合わせに依っては干渉されることを示唆する成績を得た。さらに PrP<sup>Sc</sup> 低産生 CJ 株 (SY 株) が不完全ながらも 22L、Ch, Fukuoka-1 の感染も阻止することが分かった。GT/SY にはほとんど PrP<sup>Sc</sup> が検出されないため、PrP 以外の分子が干渉に関与する可能性も否定できない。

BSE 由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試み、GT1-7 への持続感染に成功した。BSE はその宿主域が広いことから極めて特殊な性質を持つプリオン株である。予防・治療薬の開発をふくめて今後の BSE 研究における有用性は高い。

とにかく、培養細胞系がプリオン感染モデルとしての確であることを確認できた。われわれは既にマウス PrP<sup>C</sup> の球状構造に結合しうる化合物を 30 万個以上の ACD データベースより *In Silico* Screening により 59 個選択し、更にプリオン感染培養細胞モデルにより抗プリオン活性を調べ、強力な活性物質 1 個 (GN8420) を得ている。PrP<sup>C</sup>-GN8420 複合体の構造解析により、GN8420 は PrP<sup>C</sup> の helix A-S2 領域と helix B-C 末端側領域に存在する 2 つのアミノ酸を共有結合により架橋し、立体構造のゆらぎを安定化させていることが示唆された。

## E. 結論

プリオン感染培養細胞モデルで増殖するにおけるプリオン株の解析を行い、(1)接種マウスにおける潜伏期、症状、病理変化の全ての指標で株の生物学的個性を再現すること、(2) 22L と Chandler の 2 株を識別しうる変異プリオン蛋白 (PrP) が存在すること、(3) 株の組み合わせによりウイルス感染における干渉と類似する生物現象を呈することが判明した。また、新たに BSE 由来のプリオン株感染培養細胞モデルの樹立も試み、GT1-7 への持続感染に成功した。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Furukawa H 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* 279 (22), 23661-23667 (2004)

Yamaguchi N et al.: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319 (4), 1247-1252, 2004

Dohgu S et al.: Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the

blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 24 (2), 205-217, 2004

Arima K et al.: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *J. Virol.* (in press)

Satoh K et al.: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of p-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol* 24 (6), 873-875, 2004

Atarashi R et al.: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI J.* 3, 82-90, 2004

## H. 知的所有権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

治療薬開発の標的となるプリオン増殖複製関連因子の探索

分担研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科教授  
研究協力者 西村有起、石川謙介 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

新たな治療薬の標的となるプリオン複製増殖に関連する宿主因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞において RNA 干渉を用いた遺伝子スクリーニングを行った。190 個の遺伝子の 2 次スクリーニング解析を終了し、候補となる 8 個の遺伝子を同定した。

A. 研究目的

プリオンすなわち異常型プリオン蛋白の複製増殖の機構は未だ解明されておらず、そのためより効果的な治療法の開発が遅れている。そこで、プリオンの複製増殖に関与する宿主因子の同定をめざして、RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いて候補因子の探索を行った。

B. 研究方法

siRNA 発現ベクターの作製

細胞膜上に発現する分子を標的にし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。選択配列のセンス配列とアンチセンス配列の間にループ配列を挿入し、さらに 3' と 5' 末端側に制限酵素配列を付けた二本鎖オリゴ DNA を作製した。DNA を siRNA 発現用ベクターに組み込み、siRNA 発現コンストラクトを得た。プリオン持続感染細胞への遺伝子導入  
異常型プリオン蛋白を持続的に発現し

ているマウス神経芽細胞種細胞 (ScN2a) を 10% で 6 穴ディッシュに植継ぎ、翌日に発現ベクター 0.4  $\mu\text{g}$  /穴を細胞に導入した。導入後 6 時間後に培地中の血清濃度を 15% にし、導入から 3 日間培養した。

異常型プリオン蛋白の検出

培養後の細胞を溶解し、溶解液に PK 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加えて 37° C で消化したものを SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写した。プリオン蛋白の検出は SAF83 抗体 (SPIbio) を用いた化学発光法 (CDP-star, アマシヤムファルマシア) で行い、X 線フィルムに感光した。得られたイメージは NIH Image を用いて数値化し、ベクターのみを導入した細胞 (mock) での異常型プリオン蛋白の発現を 100% とした相対比較を行った。

標的遺伝子 mRNA の定量的解析

細胞に 0.5 ml ISOGEN (ニッポンジーン) を加えて全 RNA を抽出し、SuperScript III (インビトロジェン) を