

用いて oligo d(T)<sub>20</sub> により cDNA を合成し、リアルタイム PCR システム (7300、アプライドバイオシステム) を用いて定量的解析を行った。mock での mRNA 発現を 100% として相対比較した。なお、内部標準として G3PDH、 $\beta$ -actin を用いた。

(倫理面への配慮)

倫理面に配慮する実験を含んでいない。

### C. 研究結果

マウスプリオン蛋白遺伝子の発現抑制効果が確かめられている 21 塩基配列 (GGGCCTTGGTGGCTACATGCT; Biochem Biophys Res Commun., 2003, 305 (3) :548-51.) を用いた異常型プリオン蛋白の発現抑制をポジティブコントロール (PrPsi) とした。遺伝子導入 72 時間後の結果では、ベクターのみ (mock) ではプリオン蛋白が発現しているのに対し、PrPsi では総プリオン蛋白量では約 60%、異常型プリオン蛋白量では約 80% の発現抑制効果が認められた。この時のプリオン蛋白の mRNA 量は約 90% 抑制されていた。

異常型プリオン蛋白検出の迅速化を狙い、従来のウエスタンブロット法に代わり、ドットブロット法での検出系を検討した。ドットブロット法では培養容器も 96 穴プレートを用いるため、一度に多くの遺伝子がスクリーニング出来、操作も簡便であった。PrPsi を作用させた場合の異常型プリオン蛋白の発現抑制効果 (タンパク質レベルで 80%) の判別が十分に可能であった。

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。

### D. 考察

今回発見した異常型プリオン蛋白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の感染には感染因子となる異常型と正常型プリオン蛋白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も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連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。

### E. 結論

新たな治療薬の標的となるプリオン複製増殖に関与する宿主因子を探索し、候

補として 8 個の遺伝子を同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) Doh-ura K: Prion diseases: disease diversity and therapeutics. Rinsho Shinkeigaku. 44:855-6, 2004, Japanese 2. 学会発表

1) 堂浦克美: プリオン病: 遺伝子異常と臨床像・病理像及び治療薬開発の展望。第45回日本神経学会総会、東京、2004年5月13日

2) 堂浦克美: 治療開発の現状と展望。市民講座「ヤコブ病の対策の現状と克服へ向けての歩み」、仙台、2004年10月31日

3) Sasaki K, Doh-ura K, Iwaki T: New pretreatment method for immunohistochemistry for abnormal prion protein. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct. 31-Nov. 2, 2004

4) 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. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct. 31-Nov. 2, 2004

5) Miyamoto T, Sadatomi R, Tanaka H, Higuchi R, Kawatake S, Doh-ura K: Can Forage Grasses inhibit Prion Replication? International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct. 31-Nov. 2, 2004

6) Ishikawa K, Kudo Y, Doh-ura K: Inhibition of abnormal PrP formation by amyloid-imaging probes in vitro. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct. 31-Nov. 2, 2004

7) Tsuboi Y, Fujiki F, Yamauchi A, Doh-ura K, Kataoka Y, Yamada T: Treatment with Anti-malaria Agents, Quinacrine and Quinine, for Creutzfeldt-Jakob disease patients. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct. 31-Nov. 2, 2004

8) 堂浦克美: アミロイド結合化合物のプリオン病診断・治療への応用。第2回東北アミロイド研究会、仙台、2004年12月17日

9) 堂浦克美: プリオン病治療法の開発。第7回生命化学研究会シンポジウム、仙台、2005年1月21日

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 横田博, 堂浦克美: 体外診断キット及び体外診断方法。特願2004-216510、2004年7月23日

2) 竹中繁織, 野島高彦, 大塚圭一, 堂浦克美: 異常プリオンの電気化学的検出方法。特願2004-287562、2004年9月30日

プリオン増殖に関する遺伝子の探索

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

本研究で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。その結果、クローン中 19 クローンがマウススクレイピー 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株由来細胞 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準に、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。今後、siRNA により候補遺伝子の発現を抑制してプリオン感受性におよぼす影響を検討する予定である。

A. 研究目的

プリオンの複製に関与する宿主因子の同定、およびプリオン複製機構の解明は、プリオン複製過程を標的としたプリオン病治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。最近カルパイン、ラミニンレセプター/ラミニンレセプター前駆体など幾つかの宿主蛋白がプリオンの複製に関与することが報告されているが、プリオンの複製に関与する宿主因子は他にも存在すると考えられる。そこで本研究では、プリオン感受性および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の発見・同定を目的とした。

B. 研究方法

Neuro2a(ATCC:CCL131)は ATCC から購入した。限界希釈により N2a のサブクローンを樹

立した。

PrP<sup>C</sup> の発現はウエスタンブロット(WB)およびフローサイトメーター(FACS)により定量的に解析した。細胞の増殖は WST-1 法により調べた。

プリオンの感受性は以下の方法により判定した。Chandler 株感染マウス脳乳剤を最終濃度 0.7%になるように細胞に接種し、24 時間培養した。その後メディアムを交換し、連続継代した。3, 6, 9 代目に PrP<sup>Sc</sup> の検出を行い、9 代目まで PrP<sup>Sc</sup> が検出されるものを感受性と判断した。

細胞から totalRNA を回収し、Affinityx genechip (Mouse 430) DNA マイクロアレイにより、遺伝子発現の網羅的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

プリオン感染培養細胞は北海道大学の BSL2

実験施設にて行なった。

### C. 研究結果

31 個の N2a サブクローン回収し、プリオン感受性/非感受性を判定した結果、19 個が感受性、12 個が非感受性であった。9 代目まで PrP<sup>Sc</sup> が検出されたものをプリオン感受性と判断したが、このうち、さらに連続継代を続け 50 代以上の連続継代後も安定して PrP<sup>Sc</sup> 陽性となったサブクローンは N2a-3 および Na2-5 の 2 個であった。プリオン非感受性と判断したサブクローンでも、3 代目ですでに PrP<sup>Sc</sup> が検出されなかったもの、3 代目では検出されるが、6 ないし 9 代目で検出されなくなったものが存在した(図 1)。

N2a サブクローンの細胞膜上の PrP<sup>C</sup> の発現を FACS で調べた結果、N2a-24 では親株である N2a の 10%以下であった(図 2)。このことは WB でも確かめられた。従って、Na2-4 の PrP<sup>C</sup> 発現量が低いことが、プリオン非感受性と関連することが示唆された。一方では、N2a-1 のように、PrP<sup>C</sup> の発現量は親株の N2a やプリオン感受性サブクローンである Na2-3, N2a-5 と同程度であるが、プリオン非感受性のサブクローンが存在した。この結果は PrP<sup>C</sup> 以外にプリオン感受性に関与する因子が存在することを示すと考えられたことから、プリオン感受性および非感受性 N2a サブクローンの遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

プリオン感受性 Na2-3, N2a-5, N2a-27、プリオン非感受性 N2a-1, N2a-24、及びプリオン感受性 GT1-7、プリオン非感受性 NB41A3 の遺伝子発現を解析した。N2a-24 は PrP<sup>C</sup> の発現が低かったが、N2a-24 では DNA マイクロアレイ法でも他のサブクローンと比較して PrP 遺伝子の発現は 1/4 程度であった。

主に N2a-1 と N2a-3 および N2a-5 の間で遺伝子発現パターンを比較した。DNA マイクロアレイで 2 倍以上の変化を示す遺伝子を選抜した。これに加えて、GT1-7 で N2a-3 および N2a-5 と同様の発現パターンを示す遺伝子、NB41A3 で N2a-1 と同様の発現パターンを示す遺伝子をさらに絞りこんだ結果、プリオン感受性細胞で発現の高い遺伝子が 40 個、プリオン非感受性細胞で発現の高い遺伝子が 117 個抽出できた。絞りこんだ遺伝子のうち既知のものについ

ては特定の機能のクラスターに収束する傾向は認められなかった。しかし、プリオン感受性細胞で高発現する遺伝子の中には、細胞膜・分泌系に関与する遺伝子が 13 個、ライソソーム/エンドソームに関連する遺伝子が 1 個、蛋白分解に関与する遺伝子が 1 個存在した。また、プリオン非感受性細胞で高発現する遺伝子の中には、細胞膜・分泌系に関与する遺伝子が 27 個、ライソソーム/エンドソームに関連する遺伝子が 2 個、細胞内蛋白分解に関与する遺伝子が 1 個存在した。今後は、これらの遺伝子発現の差を定量 PCR で解析するとともに、遺伝子の発現を siRNA により発現をノックダウンして、プリオン増殖に及ぼす影響を調べる予定である。

### D. 考察

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。

PrP<sup>Sc</sup> の細胞への結合がプリオン感受性に関連するかを検討するために、N2a-1 と N2a-5 への PrP<sup>Sc</sup> の結合を調べたが、結合した PrP<sup>Sc</sup> の量に差は認められなかった(結果は示さず)。また、感受性のサブクローンに Obihiro 株および G1 株を接種したが、持続感染細胞を得られなかった(結果は示さず)。N2a サブクローンの比較解析からプリオンの増殖に関与する遺伝子の同定することが本研究の主目的であるが、今後、生化学的、細胞生物学的手法を用いて、プリオン感受性の差に関与する現象の解析も実施していく予定である。

### E. 結論

N2a サブクローンを樹立し、プリオン感受性/非感受性を区別した。非感受性サブクローンの中には、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ものが存在した。一方、PrP<sup>C</sup> の発現は変化しないがプリオン非感受性

クローンも存在した。プリオン感受性/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解析した結果、プリオン感受性細胞で発現レベルが高い遺伝子が 40 個、非感受性細胞で高発現している遺伝子が 117 個にまで絞り込むことができた。

#### F. 健康危険情報

感染性を有するプリオンを使用した実験は、BSL2 実験施設内で行ない、汚染物は 800 度以上の焼却処理、あるいは、135℃30 分のオートクレーブ処理により不活化した。実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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)

##### 2. 学会発表

金チャンラン、堀内 基広：抗 PrP 抗体によ

る培養細胞レベルでの PrP<sup>Sc</sup> 産生抑制機構の解析 第 52 回日本ウイルス学会 (2004, 11/21-23, 横浜)

山口 聡子、宮澤 孝幸、堀内 基広：人工合成硫酸化糖アナログによる PrP<sup>Sc</sup> 産生抑制 第 52 回日本ウイルス学会 (2004, 11/21-23, 横浜)

Horiuchi, M. : Inhibition of protease-resistant prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies, The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (2004, 7/8, Sapporo)

Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H. Comparative analyses of three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)

Horiuchi, M., Kim, C-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M. Cell surface retention of PrP<sup>C</sup> by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)

Motohiro Horiuchi: BSE screening in Japan, The animal prion disease and USE (2004, 10/14-16, Ames, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
該当なし

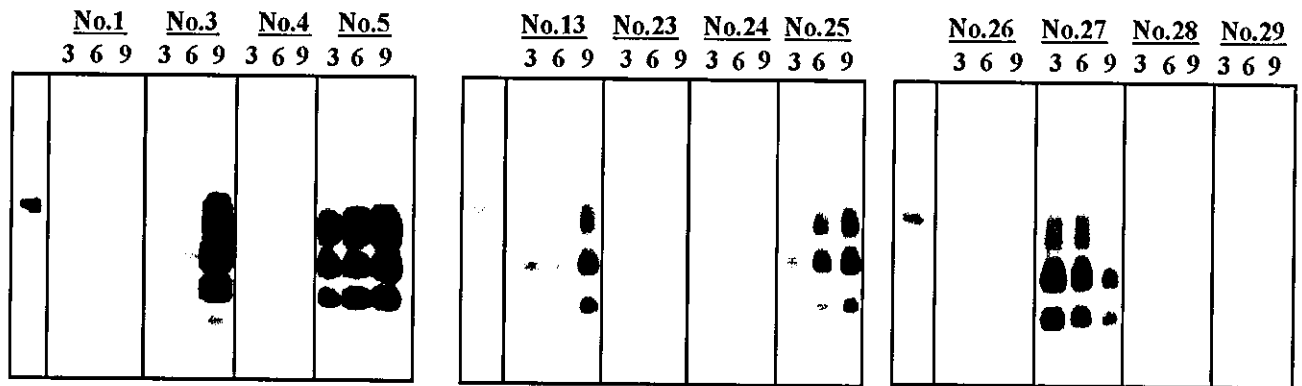
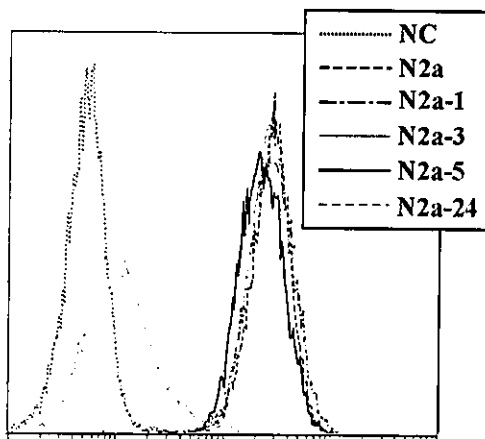


図1. N2aサブクローンのプリオン感受性

N2aサブクローンにChandler株感染マウス脳乳剤を接種し、3, 6, 9代継代時にPrP<sup>Sc</sup>をウエスタンブロットにより検出した。合計31クローンについて実施し、19クローンが9継代目でもPrP<sup>Sc</sup>陽性となった。図には代表例を示した。



	N2aに対する蛍光強度 (Av ± SD)	プリオン感受性
N2a	1	感受性
N2a-1	1.14 ± 0.06	非感受性
N2a-3	1.28 ± 0.07	感受性
N2a-5	1.02 ± 0.06	感受性
N2a-24	0.07 ± 0.01	非感受性

図2. N2aサブクローンのPrP<sup>C</sup>発現

N2aサブクローンの細胞膜上でのPrP<sup>C</sup>発現をFACSにより調べた。左図には代表例を示した。右表には親株であるN2aのPrP<sup>C</sup>発現に対する相対値、およびプリオン感受性を示した。N2a-24は、親株や他のサブクローンと比較して、PrP<sup>C</sup>の発現が1/10以下であり、プリオン非感受性であった。一方、N2a-1はPrP<sup>C</sup>の発現は親株や他のサブクローンと差がないが、プリオン非感受性であった。



## NMR 構造に基づく抗プリオン薬の探索

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

### 研究要旨

NMR 構造及びダイナミクス情報に基づき、プリオンの正常型構造を安定化し、異常型構造への変換を阻止する薬剤の探索を行った。まず、ハムスター・プリオンにおけるグローバルな揺らぎと熱力学的安定性とを原子分解能で特徴づけ、構造が大きく揺らぐ部位に選択的に結合する低分子化合物を、In Silico で探索した。ヒットした低分子化合物を、異常プリオン産生培養神経細胞株に投与した結果、数種類の化合物において、異常プリオン産生抑制作用が見られた。

### A. 研究目的

本研究は、プリオン蛋白の正常型の立体構造及びダイナミクスに基づき、感染型への構造変換を阻止する薬剤を論理的に設計することを目的とする。

### B. 研究方法

<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明らかにする。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する。さらに、ヒットした化合物を実際に入手し、プリオン感染モデル（培養細胞、マウス）により抗プリオン活性を評価することにより、新規薬剤を開発する。

### (倫理面への配慮)

NMR 測定においては、正常プリオンを対象とするため、危険性はない。プリオン感染モデルによる Ex Vivo スクリーニングは、P3 レベル実験室で行う。また、実験動物を用いないので、特に倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

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。

我々はそのような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、プリオン感染モデル（培養細胞、マウス）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。

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（桑田一夫，蛋白質核酸酵素，2004）。

#### D. 考察

NMRにより正常型プリオンの立体構造が決定されてからおよそ10年経過したが、病原性を形成する立体構造変換に関わるメカニズムは未だ理解されていない。本研究により、正常プリオンの立体構造安定性が、異常型への構造変換と深い関わりがあることが明らかになった。また、グローバルな揺らぎ及び熱安定性に関わる情報を、原子分解能で得ることにより、プリオン病治療薬開発が実際に可能であることが示された。このことは、今後の論理的抗病原体薬開発全般に対し、大きな影響を与える、と考えられる。

#### E. 結論

正常プリオンの立体構造不安定性が、異常プリオンへの構造変換と深い関わりがあることが分かった。今後、さらに正常構造の不安定性に関わる情報を収集するとともに、より効果的な治療薬開発に取り組むことにより、日本社会の安全・安心を確立する事が重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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制御. *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

##### 2. 学会発表

Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Susumu Shirabe and Shigeru Katamine : The-35 discovery of a new drug capable of inhibiting PrP\* and PrPRes formation. First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion. Paris, France, 2004

Kazuo Kuwata : Slow conformational dynamics of prion protein revealed through NMR measurement. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, 2004

Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine : Drug discovery for prion diseases based on the structural dynamics of prion protein. Neuro 2004—Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience

Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Osaka, Japan, 2004

Kazuo Kuwata : Slow dynamics of prion protein.  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM PRION DISEASES FOOD  
AND DRUG SAFETY. OCTOBER 31-NOVEMBER 2, 2004  
Sendai Excel Hotel Tokyu SENDAI JAPAN

Kazuo Kuwata : Pressure-induced conformational  
change of mouse prion . Dialysis-related  
amyloidosis: from molecular mechanisms to  
therapies. 1st Italian-Japanese Workshop,  
December 9-13, 2004, University of Pavia, Italy

桑田 一夫 : 『プリオン病の基本メカニズムの解  
明と治療薬開発』～21世紀における新創薬パラダ  
イス～. 社団法人 岐阜県獣医師会 平成 16 年 11  
月 12 日 美濃加茂シティホール

桑田 一夫 : 「感染する異常たんぱく質ープリオ  
ン複製の謎ー」独立行政法人 科学技術振興機構  
平成 16 年 11 月 18 日 岐阜県健康科学センター

桑田 一夫 : 「蛋白質の立体構造とダイナミクス  
に基づく論理的創薬法及びそれによる抗プリオ  
ン薬の開発」 国立感染症研究所学友会 平成 17  
年 2 月 14 日 国立感染症研究所戸山庁舎

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

分担研究者 調 漸 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨

I. 診断マーカーの検討

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者での髄液中の診断マーカーとしてNSE、S-100蛋白、14-3-3蛋白などがある。我々は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。検討した5例では同様な経過をとり、総tauは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。

II. 治療薬開発

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剤の開発を試みた。BBB kitを用いた検討ではPPSはそのままの状態でも一部が血液脳関門を透過し得ることが示唆された。そこで、血液脳関門を透過し高プリオン効果を発揮する分画を同定するために限外濾過膜による透析法で低分子分画を分取した。その結果、複数の低分子分画が分取でき、プリオン持続感染細胞 (GTFKとGT22L細胞) を用いて異常プリオンの産生抑制能を検討した。

A. 研究目的

I. 生化学的病態評価法の開発としてt-tau、リン酸化tau、NSE、S-100B蛋白、14-3-3蛋白を経時的に測定する。

II. 既存薬剤 (PPS) を改変し新規プリオン病治療薬として PPS の脳内送達性を高める目的で低分子分画 PPS の開発を行なう。

B. 研究方法

I. 生化学マーカーによる髄液診断と病態評価の目的でプリオン病患者の患者、または家族に十分に説明した上で合意を得て、長崎大学倫理委員会規定に則って髄液を3週間毎に採取し総tau、リン酸化tau、NSE、S-100B蛋白、14-3-3蛋白を測定した。総tau、リン酸化tau、NSE、S-100B蛋白はELISAで測定し、定量化した。14-3-3蛋白はウエスタンブロット法で検討した。

II. PPS-Na原末を用いて透析膜による限外濾過法で低分子分画を採取した。低分子分画は異常プリオン持続感染細胞 (GTFK、GT22L) を用いてin vitroでの異常プリオン産生抑制効果を検討するためにプロテイナーゼK処理による異常プリオン量をウエスタンブロット法で半定量的に検討した。脳移行性は初代培養星状膠細胞、周細胞、血管内皮細胞の共培養によるin vitro血液脳関門モデル (BBB kit) を用い二層培養槽の下層の培養液をもって脳内に移行した薬物と考えた。

(倫理面への配慮)

本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

I. 生化学的病態評価法の開発については総tau、リン酸化tau、NSE、S-100B蛋白、14-3-3蛋白を継時的に測定したところ、14-3-3蛋白を除いて全ての生化学マーカーは発症後最初に得られた髄液で陽性であった。これらの髄液は発症後2か月以内に得られたものである。これらの生化学マーカーの中ではt-tauが最も感度、特異度が優れていた。経過を観察した5例で同様な経過をとり、t-tauは発症初期1200-5000pg/mlだが、急激に上昇し6-12週後8000-20000pg/mlとピークになり、13週後より低下傾向を示した。これらのマーカーは一例を除いて全例でpeakを呈した。

II. 既存薬剤の改変による脳内送達性を向上させた薬剤の創薬の試み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、PrPSc 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唆する結果が得られた。

#### D. 考察

- I. 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。
- II. 低分子PPSは有力なプリオン病候補薬剤であり、感染動物実験でのどうか確認が急がれる。

#### E. 結論

- I. 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た。
- II. 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。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Furukawa H., Doh-ura K., Okuwaki R., Shirabe S., Yamamoto K., Uono H., 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
- 4) 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
- 5) 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しらべた Creutzfeldt-Jakob 病の1例. *臨床神経.* 44:182-186, 2004

##### 2. 学会発表

- 1) INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PRION DISEASES FOR FOOD AND DRUG SAFETY (Kitamoto T. Sendai Excel Hotel JAPAN. Oct 31 Nov 2004) Satoh K: Comparative analysis of chronological data of total tau protein in CSF, serial studies of MRI (DWI, and FLAIR) and staging of clinical features in patients with sporadic CJD.
- 2) INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PRION DISEASES FOR FOOD AND DRUG SAFETY (Kitamoto T. Sendai Excel Hotel JAPAN. Oct 31 Nov 2004) Shirabe S., Satoh K., Eguchi., Niwa M., Nishida N., Yamauchi A., Kataoka Y., Katamine S: Clinical trials of oral pentosan polysulfate (PPS) for Prion diseases and new design of low molecular-weight PPS as a candidate of therapeutic agent for CJD.
- 3) 第22回日本神経治療学会総会 (真野行生, 北海道大学学術交流会館・百年記念会館, H16. 6月24-25) 調 漸, 佐藤克也, 辻野 彰, 西浦義博, 江口勝美, 片岡泰文: Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) における quinacrine による治療の試み.
- 4) 第45回日本神経学会総会 (水野美邦, 新高輪プリンスホテル, H16. 11月11-14日) 調 漸, 佐藤克也, 辻野 彰, 西浦義博, 江口勝美, 片峰 茂, 丹羽正美, 片岡泰文: クロイツフェルト・ヤコブ病のペントサンポリ硫酸とその改変薬剤による治療の試み.
- 5) 第45回日本神経学会総会 (水野美邦, 新高輪プリンスホテル, H16. 11月11-14日) 佐藤克也, 調 漸, 辻野 彰, 江口勝美, 竹尾 剛, 井手芳彦, 辻畑光宏: 発症早期でのクロイツフェルト・ヤコブ病患者における髄液検査と画像診断の有用性
- 6) 第9回日本神経感染症学会 (松永宗雄, 弘前市総合学習センター, H16. 10月8-9日) 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美, 木下 郁夫, 福留隆泰, 松尾秀徳, 富田逸郎, 辻畑光宏: Codon180 変異遺伝性 Creutzfeldt-Jakob 病の MRI と SPECT による検討

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 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

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
桑田一夫	21世紀は“蛋白質”の時代—BSEの感染因子“プリオン”の衝撃—		長寿社会を支える健康食「食の安全性」その現状と将来展望	東京教育情報センター		2004	31-44

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono 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 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, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa M, Kataoka Y	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, 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 (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	80-87	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	443-449	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	828-835	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	1785-1790	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
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
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

Doh-ura K	Prion diseases : disease diversity and therapeutics	Rinsho Shinkeigaku	44	855-856	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 PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation.	J. Gen. Virol.	85	3472-3482	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	1293-1295	2004
Kazuo Kuwata, Yuji O. Kamatari Kazuyuki Akasaka Thomas L. James	Slow Conformational Dynamics in the Hamster Prion Protein	Biochemistry	43	4439-4446	2004
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制御	蛋白質核酸酵素	49(7)	1110-1112	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	2004
Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S and Matsuno	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		in press	2005
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しらべたCreutzfeldt-Jakob病の1例	臨床神経	44	182-186	2004



## 研究成果の刊行物・別刷