

Dohgu S, Takata F, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M.: The brain pericytes contribute to the up-regulation of the blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β (TGF- β)

production. Potsdam, Germany, Sep., 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
平成16年度 分担研究報告書

治療ネットワークの支援に関する研究

分担研究者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学・教授
分担研究者：山田 正仁 金沢大学大学院脳老化神経病態学・教授
分担研究者：児玉南海雄 福島医科大学脳神経病態学・教授

研究要旨

本研究は「プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究」における臨床研究に属して、日本神経学会、日本脳神経外科学会における啓発活動と適応症例の発掘を行うとともに、難治性疾患克服研究事業「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班においてプリオン病サーベイランスと協力して啓発活動と適応症例の発掘を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、「プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究」の臨床研究において、ペントサンプリサルフェートの脳室内投与の臨床治験を行うため、「プリオン病および遅発性ウイルス疾患に関する調査研究」班とくにCJDサーベイランス委員会、日本神経学会、日本脳神経外科学会と協力して啓発活動、統一のプロトコールの作成、適応症例の発掘を行うことである。

B. 研究方法

分担研究者がそれぞれ所属する日本神経学会、日本脳神経外科学会において、あるいは個別に依頼される研究会等においてペントサンプリサルフェートの脳室内投与などプリオン病治療に関する現状の啓発を行うとともに、適切な症例があれば治験への参加を推進する。同様に、難治性疾患克服研究事業「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班においてとくにCJDサーベイランス委員会と協力して啓発活動や症例の発掘を行い本臨床研究の推進を計る。

(倫理面への配慮)

「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班ではサーベイランスを行うに当たり委員長所属施設の倫理審査委員会の承認を得ており、倫理面について十分な配慮のもとで研究を推進している。

C. 結果

「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班のプリオン病に関するサーベイランスの結果、1999年4月から2004年9月までに全国で新規罹患として577人（男240人(42%)、女337人(58%)）が登録され、このうち455人(79%)が孤発性、46人(8%)が家族性、51人(9%)が硬膜移植歴を有するものであったが、変異型CJDは認められなかった。変異型CJDとの鑑別が問題になるのは主に視床型CJDであることが判明した。また、「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班と合同班会議を開催しペントサンプリサルフェートの脳室内投与を含むプリオン病の治療法について検討を行った。さらに、本研究事業によるプリオン病の市民公開講座に参加して啓発活動を行った。

D. 考察

関連学会ならびに「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班との連携により、プリオン病とくにその治療に関する啓発が着実に進展している。ペントサンポリサルフェートの脳室内投与の臨床治験はまだ1施設で始まったのみであるが、今後参加施設を増加させるように努力するとともに、適応症例を増やすためにも早期診断の推進に努める。

E. 結論

日本神経学会、日本脳神経外科学会ならびに「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班との協力により、ペントサンポリサルフェートの脳室内投与の臨床治験のための啓発を行い、適応症例のリクルート体制を構築した。

F. 健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Mizusawa H, Nakamura Y, Noguchi M, Furukawa Y, Ishida C, Kuji I, Mitani K, Murayama S, Kohriyama T, Katayama S, Yamashita M, Yamamoto T, Udaka F, Kawakami A, Ihara Y, Nishinaka T, Kuroda S, Suzuki N, Shiga Y, Arai H, Maruyama M, Yamada M : Clinical diagnosis

of MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 64:643-648, 2005

2. 学会発表

Sodeyama N, Nakamura Y, Yamada M, Satoh T, Kitamoto T, Mizusawa H. Duration between initial manifestation of CJD and detection of PSD, specific findings on MRI, CSF 14-3-3 protein, or CSF high NSE. International Symposium on Prion Diseases: Food and Drug Safety, October 31-November 2, 2004, Sendai Excel Hotel Tokyu, Sendai, Japan

Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Mizusawa H, Nakamura Y, Noguchi M, Furukawa Y, Ishida C, Kuji I, Mitani K, Murayama S, Kohriyama T, Katayama S, Yamashita M, Yamamoto T, Udaka F, Kawakami A, Ihara Y, Nishinaka T, Kuroda S, Suzuki N, Shiga Y, Arai H, Maruyama M, Yamada M. MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: clinicoradiologic features and clinical diagnosis. International Symposium on Prion Diseases: Food and Drug Safety, October 31-November 2, 2004, Sendai Excel Hotel Tokyu, Sendai, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

末梢投与可能な次世代型プリオン病治療薬開発に関する研究

主任研究者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

末梢投与でプリオン病治療効果および予防的効果がある4種類の薬剤において、それらの薬剤に共通する薬効成分について解析をすすめ、抗プリオン成分を同定することができた。より一層の有効性が得られるものを求めて構造活性相関研究を展開すると共に、その作用機序解明を開始した。

A. 研究目的

末梢投与可能な次世代型のプリオン病治療薬の開発を目指して、*in vitro*、*in vivo* アッセイで有効であった化合物・薬剤の中から、臨床応用が可能なものについて、さらに詳しく治療・予防効果を検討すると共に薬効成分の同定や作用機序解明を行い、前臨床試験の準備を整える。

B. 研究方法

治療・予防的効果の検討

これまでの *in vitro*、*in vivo* アッセイで有効であったものの中から、共通した薬効作用を持つことが推定される4つの薬剤について、複数の疾患モデルでの治療効果の検討、投与時期と治療効果の関係、投与量と治療効果の関係、予防的効果の有無について検討した。用いた疾患モデルは263K株プリオンを脳内感染させたTg7マウス、263K株プリオンを脳内感染させたシリアンハムスター、RML株プリオンを脳内感染させたTga20マウスである。治療・予防的効果は、感染から発症までの潜伏期間を指標にした。

薬効成分の同定

4つの薬剤の成分について各種の無機溶媒や有機溶媒の抽出物を *in vivo* アッセイで解析し、治療効果のある画分を同定した。次に、治療効果のある画分に含まれる成分を調べ、その各種

成分について *in vivo* アッセイで解析して薬効成分を同定した。

構造活性相関

薬効成分と同様な構造を持つ化合物について、*in vivo* アッセイで治療効果を調べ始めた。

作用機序の解明

プリオン持続感染細胞を用いた *in vitro* 実験系において、薬効成分の作用機序の解明を始めた。

(倫理面への配慮)

動物実験は東北大学医学系研究科動物実験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

治療・予防的効果の検討

4つの薬剤は、いずれも263K株プリオンを脳内感染させたTg7マウスにおいて、延命効果を発揮したが、感染早期での投与のほうが効果は高かった。4つの薬剤のうち薬剤Dが最も効果が高く、急性毒性を起こさない投与量の単回投与でさえ、脳内感染2週間以内であれば、対照群に比して潜伏期間が2倍以上にまで延長した。このような治療効果は、263K-Tg7マウス疾患モデルだけではなく、263K-シリアンハムスター疾患モデルでも同様に観察されたが、RML-Tga20マウス疾患モデルでは観察されな

った。

投与時期と治療効果を薬剤 D について調べたところ、脳内感染後時間が経てば経つほど治療効果が低くなった。263K-シリアンハムスター疾患モデルでの検討では、発症後の単回投与でも若干の延命効果が観察された。

投与量と治療効果を薬剤 D について調べた。急性毒性を起こさない単回投与量の半量までは投与量依存的に潜伏期間の延長が観察されたが、半量を超える単回投与量では治療効果が飽和状態にあった。また、単回投与と、それと同じ用量の複数回投与とを比較したが、複数回投与による加重効果はほとんど見られなかった。さらに、4つの薬剤の中で、各種のコンビネーションでの投与による効果を調べたが、コンビネーションによる加重効果はほとんど観察されなかった。

予防的効果について検討した。4つの薬剤のいずれにおいても、脳内感染させる2.5ヶ月以上も前に単回投与したのも、脳内感染時に単回投与したものと、ほぼ同様の延命効果を示した。

薬効成分の同定

4つの薬剤の各種の無機溶媒抽出物や有機溶媒抽出物を *in vivo* アッセイで解析したところ、いずれも水溶性溶媒で抽出した画分に治療効果が観察された。次に、治療効果のある画分に含まれる成分を調べ、その各種成分について *in vivo* アッセイで解析したところ、薬効成分を同定した。この成分は4つの薬剤に共通して含まれていた。

構造活性相関

プリオン病治療効果のある薬効成分と構造に類似性がある様々な化合物を、市販の化合物からピックアップし、*in vivo* アッセイを開始した。これまでに得られている結果からは、構造類似体に同等な薬効が得られているものはない。

作用機序の解明

プリオン持続感染細胞を用いた *in vitro* 実

験系において、正常型プリオン蛋白代謝への影響を調べたが、薬効成分は正常型プリオン蛋白代謝には影響を及ぼしていなかった。

D. 考察

In vivo で治療効果だけでなく予防的効果を発揮する4つの薬剤に共通する薬効成分が同定できた。この薬効成分の最適化と作用機序解明が今後の課題である。特に、作用機序解明については、この薬効成分の構造が既知の治療候補化合物と共通性がないこと、顕著な予防的効果を発揮すること、複数回投与による加重効果などが見られないこと、RML 株プリオン感染 Tga20 マウス疾患モデルでは治療効果がなかったことなどを説明できなければならない。

E. 結論

治療効果だけではなく予防的効果もある末梢投与可能な次世代型プリオン病治療薬候補となる化合物を発見した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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
- 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*. 44:855-6, 2004, Japanese
2. 学会発表
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
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
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
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

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. 知的財産権の出願・登録状況

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
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

膜貫通型プリオン蛋白の神経変性形成能に関する研究

分担研究者：村本 環 東北大学大学院医学系研究科・助教授

研究要旨

分担研究者はプリオン病における神経変性の機序を明らかにし、これに基づく新しい神経変性の抑制手段を開発するために、膜貫通型プリオン蛋白の異常化能、プリオン形成能、神経変性形成能を検討する。本年度はまず、種々のデザインの膜貫通型プリオン蛋白の異常化能を、プリオン感染培養細胞の系を用いてスクリーニングした。その結果、検討した膜貫通型プリオン蛋白の多くが異常化能を持つことが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病では、罹患個体の中枢神経内に海綿状変性と呼ばれる特異な神経細胞変性が生じる。神経変性を引き起こす原因因子は、本病態に伴って中枢神経内に蓄積する異常型プリオン蛋白（感染因子プリオンの主成分）であると推定されているが、これまでのところ、両者の因果関係に関する直接的証拠は乏しく、神経変性の発生機序も全く不明である。

プリオン病を治療する手段としては、異常型プリオン蛋白の増殖を抑制する手段が最も根本的である。しかし、個体の中枢神経内ですでにプリオンが発生または外部から侵入し増殖を開始した場合に、その後の病的過程を完全に抑止する薬剤はこれまでのところ開発されていない。このような状況にかんがみ、異常型プリオン蛋白の増殖を抑制する効果は持たないものの、神経変性の発生を特異的に抑制する薬剤がもし開発できるならば、その臨床的価値は十分に存在すると考えられる。

分担研究者は、自身の最近の研究において異常型プリオン蛋白、およびプリオンの増殖が脳組織内に起こるにも関わらず、海綿状変性が生じないという特異なプリオン病の病態を創出することに成功した。本病態は、分担研究者が作製した「プリオン蛋白を細胞膜に繫留してい

る GPI アンカー構造を欠損する変異プリオン蛋白を発現しているトランスジェニックマウス」にプリオンを接種した場合に観察された現象であるが、プリオン病の神経変性の機序を解明する上で極めて重要な所見と考えられる。これらの所見は、プリオン蛋白の構造・膜局在がプリオン病の表現型と深く関わっていることを示している。

今回、分担研究者はこの課題をさらに追求することにより、プリオン病の神経変性の機序を解明し、ひいてはこれを利用して神経変性を抑制する全く新しい手段を開発することを計画した。具体的には、膜貫通型の変異プリオン蛋白をデザインし、その異常化能、プリオン形成能、神経変性形成能を検討することを、その内容とした。プリオン蛋白を膜貫通型にすることは、さまざまな事象に影響を与えうる。その中には、プリオン蛋白の構造と膜局在（GPI アンカー型蛋白は細胞膜上のラフト分画へ集積するが、殆どの膜貫通型蛋白は非ラフト分画に局在する）はもちろん、プリオン蛋白の神経細胞内分布（apical な軸索側細胞膜への分布か、あるいは basolateral な樹状突起側への分布か）、相互作用する蛋白のレパートリー（GPI アンカー型蛋白は src 型非受容体型チロシンキナーゼとの相互作用が知られているが、膜貫

通型にするとこれが無くなる可能性がある：膜貫通型化することによる細胞内局在の変化は相互作用する蛋白の種類にも影響を与える）、細胞間での移動性（GPI アンカー型蛋白は、1つの細胞の細胞膜から隣の細胞の細胞膜へ移りうる事が示唆されているが、膜貫通型にするとこれは無くなると考えられる）等、病理所見および脳組織内での病的過程の広がりに影響を及ぼしうる種々の要素が含まれている。このような蛋白を発現するマウスにプリオンを接種し、同分子が異常化・プリオン化し脳組織内に蓄積した場合に、神経変性が生じるか否か、生じるとすればどのようなタイプか、またその分布にどのような特異性があるか等の命題に解答することは、プリオン病における神経変性の発生機序を解明することに大きく貢献し、画期的治療薬の開発に新しい道を切り拓くものである。

B. 研究方法

カルボキシル末端に膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを持つ数種類の膜貫通型蛋白のカルボキシル末端部分（膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）とマウスプリオン蛋白のアミノ末端部分（1-230番）の融合蛋白（図1）をコードする遺伝子を作製した。マウスプリオン蛋白部分には 3F4 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープタグ（Met109/Met111）を導入した。膜貫通型蛋白としては、インフルエンザウイルス HA 蛋白の HA2 サブユニット（HA）、マウス LDL 受容体（LDLR）、マウス LAT（Linker for activation of T cells）を用いた。HA および LAT はいずれも、細胞内ドメインへのパルミチン酸付加に伴い、ラフト分画へ高率に移行する性質が付与されることが知られている。HA および LDLR と PrP の融合蛋白（PrP-HA, PrP-LDLR）では、融合部分に HA および LDLR の細胞外ドメイン由来のアミノ酸配列（膜貫通ドメインの直前のアミノ酸配列）を 0 個から 4 個挿入したバリエーシ

ョン（types 1-5）を作製した。LAT と PrP の融合蛋白では、LAT の細胞内ドメイン全長を持つコンストラクト（PrP-LAT）と、LAT の細胞内ドメインのカルボキシル末端アミノ酸 196 個を欠損するコンストラクト（PrP-LATdel）の両者を作製した。これらの遺伝子を pSPOX 発現ベクターに組み込み、マウス神経芽細胞腫細胞株である N2a、および N2a をスクレイピー由来のプリオンに慢性感染させた細胞株である ScN2a に導入し、一過性発現させた。上記の各種蛋白を発現する N2a 細胞における発現蛋白のラフトへの移行性を、Naslavsky らの方法による floatation assay を用いて解析した。具体的には、10 cm 径培養プレート上に confluent な状態の細胞をリン酸バッファーで洗浄したのち氷冷し、400 μ l の冷溶解バッファー（TNE/1% triton X-100）で溶解した。30 分間、氷上に静置したのち、400 μ l の冷 70% Nycodenz 液（70% Nycodenz in TNE）を加え、溶解液を良く混ぜた後、480 μ l を氷冷した 2.2 ml 超遠心チューブに移した。Nycodenz の冷 step gradients（25, 22.5, 20, 18, 15, 12, and 8% in TNE）各 240 μ l を順に加えた後、超遠心（200,000 g, 4 $^{\circ}$ C, 4 hrs）した。遠心終了後、200 μ l の fraction 10 個をサンプルの上面から順にピペットで回収した（上から順に fractions #1-10）。各 fraction を 3F4 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。また、ラフトを含む fraction の同定には、HRP 標識 cholera toxin subunit B を用いた各 fraction のドットブロットを用いた。一方、上記の各種蛋白の異常化能を、各種蛋白を発現する ScN2a 細胞中の異常型プリオン蛋白を 3F4 抗体を用いたウエスタンブロット法で検出することにより解析した。具体的には、溶解バッファーを用いて ScN2a 細胞を溶解、回収した溶解液を低速遠心し、核 DNA を含む不溶成分を除き、上清（total lysate）を得た。Total lysate の一部をとり、それに Sarkosyl を 2% になるように、また proteinase K を 20 μ g/ml になるように

加え、37° C で 30 分間加温した。Pefabloc (Roche) を加え、proteinase K を失活させたのち、サンプルの超遠心 (100,000 g, 20° C, 1 hr) を行った。遠心終了後、pellet を回収して PrPSc fraction として 3F4 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

C. 研究結果

検討した全てのタイプの膜貫通型プリオン蛋白が、種々の程度にラフトへ移行した (図2)。PrP-LAT を除く全てのタイプの膜貫通型プリオン蛋白が異常化能を示した (図3)。PrP-HA および PrP-LDLR では、融合部に挿入された HA および LDLR の細胞外ドメイン由来のアミノ酸配列が異常化効率に影響することが観察された。

D. 考察

従来の報告では、膜貫通型プリオン蛋白は異常化能に乏しいとされていたが、デザインによっては異常化能を持つことが示された。全ての膜貫通型蛋白が種々の程度でラフトへ移行したため、ラフト移行性と異常化能の関係を明らかにすることは出来なかった。今回の結果は、来年度以降に予定している本計画の第二段階 (膜貫通型プリオン蛋白を発現するトランスジェニックマウスの作製と、同マウスへのプリオン接種実験) が有意義なものであることを示している。

E. 結論

分担研究者は、異常化能を持つ膜貫通型プリオン蛋白をデザインすることに成功した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

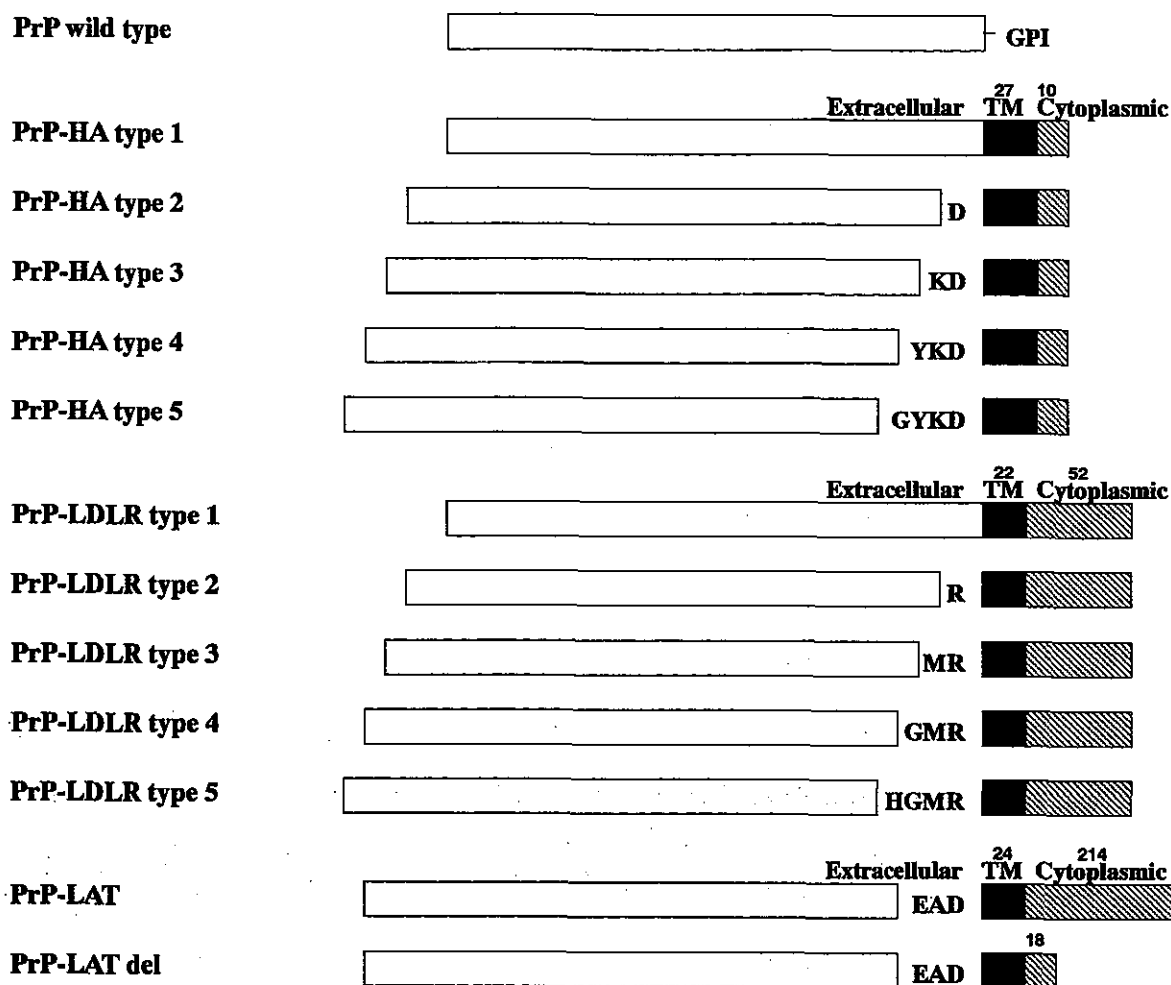


図1 プリオン蛋白コンストラクトの模式図

図中の白色の四角はプリオン蛋白ペプチドを、黒色の四角は膜貫通型蛋白由来の膜貫通ドメインを、斜線の四角は膜貫通型蛋白由来の細胞内ドメインをそれぞれ表す。白い四角と黒い四角の間のアルファベットは、膜貫通型蛋白の細胞外ドメイン由来のアミノ酸（一文字表記）を表す。膜貫通ドメイン (TM) および細胞内ドメイン (Cytoplasmic) を表す四角の上に書き入れられている数字は、各ドメインのアミノ酸の数を表す。全てのコンストラクトがプリオン蛋白のアミノ末端シグナルペプチドを持つが、図中では省略してある。

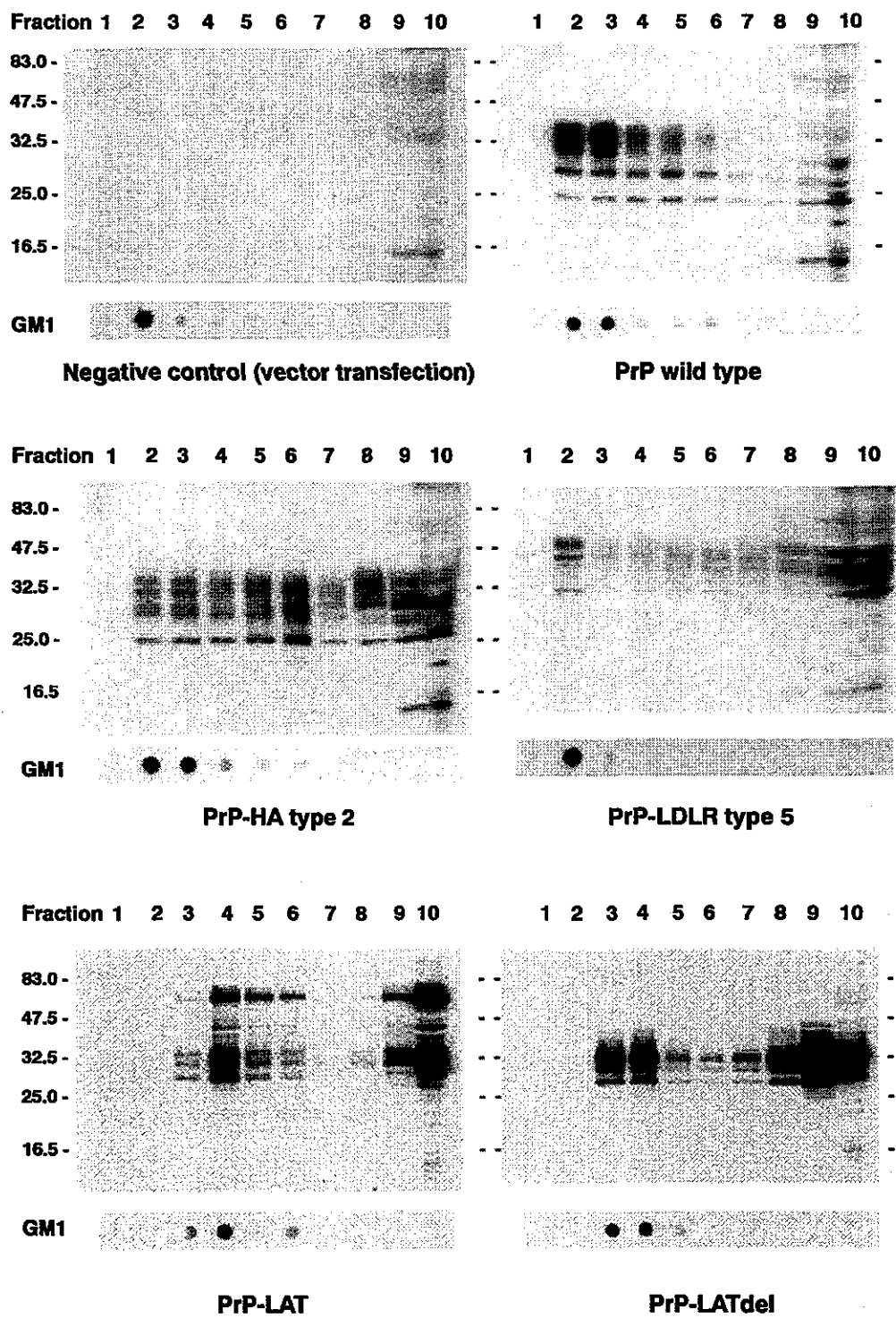


図2 各種膜貫通型プリオン蛋白を発現する N2a 細胞を用いた Floatation assay

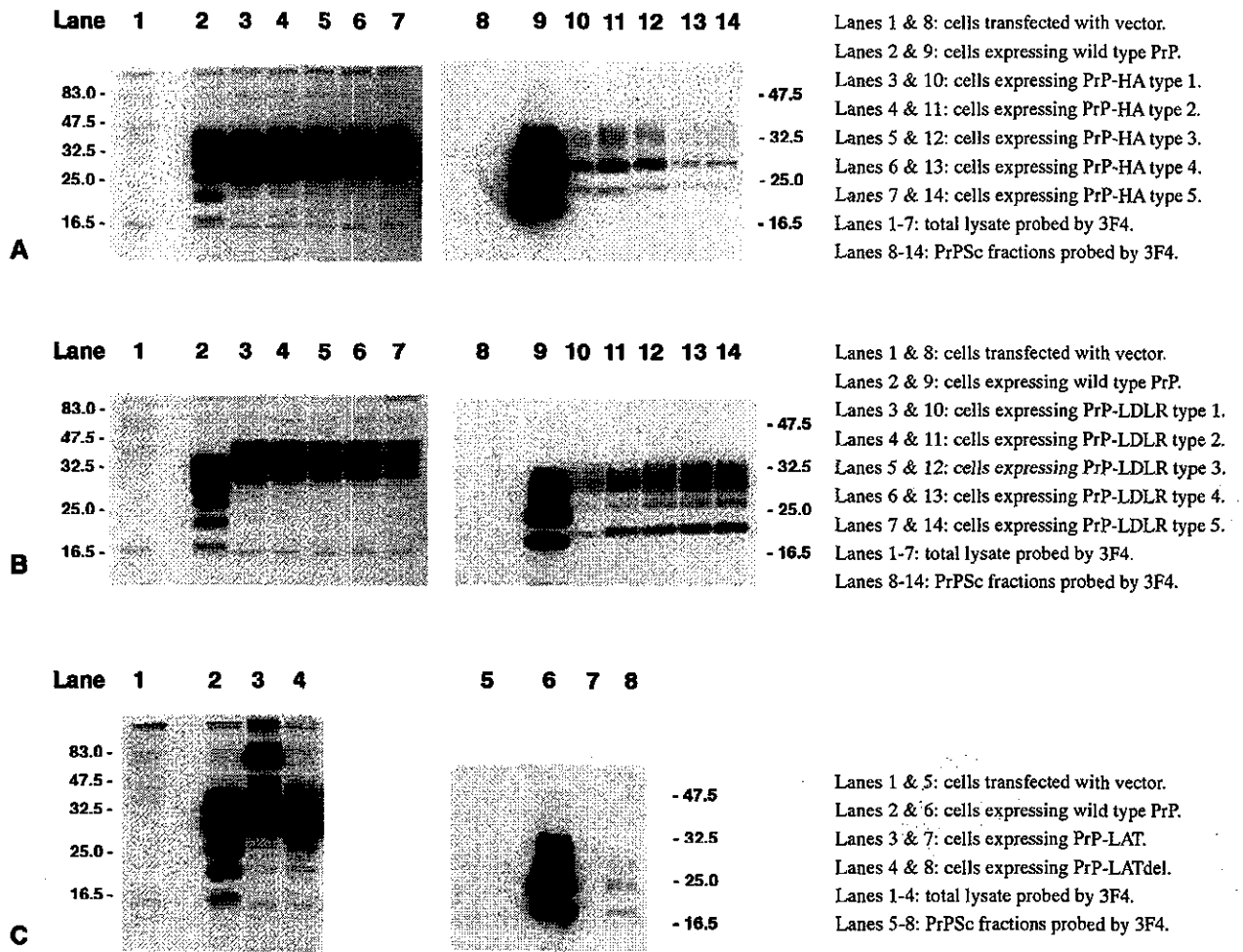


図3 ScN2a 細胞における各種膜貫通型プリオン蛋白の発現と異常化

新たな治療戦略としての病原体株間の干渉現象に関する研究

分担研究者：西田 教行 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・助手
研究協力者：川崎 真 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

プリオン病制圧のための研究は現在その殆どが、プリオン蛋白の翻訳後構造変換を阻害する新規薬剤の開発に集中している。この異常プリオン蛋白が病態の中心的役割を果たしていると考えられているが、神経細胞死の直接の原因であるかどうかは不明である。本研究では異なる視点から、プリオン病の病態解明を迫ると同時に、神経機能再生までを目指している。我々は異なるプリオン病原体株の重感染がときにワクチン様の効果を示すとの報告に注目し、本作用が真にワクチン様の免疫系を介する作用であるか、ウイルス学でいうところの干渉作用であるのかを培養細胞系を用いて調べた。その結果、プリオン株間において病原体の組み合わせによっては感染の干渉が起こることを見いだした。この機序をさらに明らかにすることで新たな治療戦略が生まれることが期待される。

A. 研究目的

性質のことなるプリオン病原体株の持続感染細胞モデルの構築と株間の相互作用の解析。

合培養を行った。

（倫理面への配慮）

本実験ではヒトサンプルの使用、実験動物の使用はない。

B. 研究方法

マウス神経系培養細胞 (GT1-7) を用いて、4種類のプリオン株 (ヒト由来のプリオン株である Fukuoka-1 株 (FK)、SY 株、スクレーピー由来である Chandler 株 (Ch)、22L 株) の持続感染細胞を樹立した。

細胞間感染を見るために、neo 抵抗性遺伝子 (pEGFP-neo, Clontech) を導入した非感染 GT1-7 細胞 (neoGT) を作成し、感染細胞を混合培養 (細胞比 1 : 1) を行った。後に感染細胞を G418 (500 μg/ml) を用いて除去 (約 3 週間) し、neo 抵抗性 GT 細胞への細胞間感染が成立したか否かを、ウェスタンブロッティング法にて検討した。

株間の相互作用を見るため、Ch 株あるいは 22L 株感染 neoGT 細胞と FK 感染 GT 細胞の混合培養と上記と同様の方法で行った。また、SY 感染 neoGT と Ch+GT、22L+GT、FK+GT の混

C. 研究結果

Ch, 22L, FK は混合培養により、既感染細胞から非感染細胞への細胞間感染が成立した。SY は持続感染が成立し 15 代継代時に一時的に異常 PrP を認めるも、その後異常 PrP を認めなかった。一方、既感染細胞への FK の感染は、FK 特異的 PrP 断片 (C13) の存在の有無で判定すると、Ch 株が FK との重感染を起こすのに対し、22L は FK の感染を阻止していると思われた。SY 感染は、Chandler, 22L, FK の重感染を不完全ながらも干渉していた。(表を参照)

Table 1. Summary of superinfection in vitro

agent		PrPres	
frist	challenge	PrPres (total)	C-13
Mock	FK1	+	+
Mock	22L	+	-
22L	FK1	+	-
Mock	Ch/RML	+	-
Ch/RML	FK1	+	+
SY	Mock	-	-
SY	FK1	-/+	-
SY	Ch/RML	-/+	-
SY	22L	-/+	-

D. 考察

プリオン株間ではその組み合わせによっては干渉作用を受けることがわかった。SY 感染細胞を用いた実験から、その干渉作用が異常 PrP によるものではないことがわかった。

プリオン株間のこのような干渉現象は、古くは 1960 年代の英国の Dickinson らの実験動物を用いた研究報告がある。また米国の Manuelidis らは SY 株がほとんど完全に FK 株の感染を阻止することを近年報告している。しかしこの *in vivo* の現象が、宿主の免疫系の関与によるものか、病原体間の干渉であるのか不明であった。われわれは複数のプリオン株に感受性の培養細胞を用いることで、これらの *in vivo* の現象が“干渉”であることを示すことに成功した。このことは感染因子がウイルスに近い性質を持つことを意味し、感染性病原体の本体が未同定のウイルスであることを強く示唆するものである。ウイルス感染における干渉は、(1) レセプターの *down regulation*,

(2) インターフェロンの誘導 (3) 低分子 RNA による mRNA 阻害, など知られているが、多くの場合機序は不明である。プリオンのレセプターは正常型 PrP であるとの見解もあるが、現在のところわかっていない。本実験に用いた感染 GT 細胞では正常型 PrP の発現は変化していない。プリオン感染によってインターフェロンが誘導されるとの報告はなく、逆に動物実験ではインターフェロンの投与は病態に影響しないとの報告がある。感染脳の遺伝子発現プロファイルを検索した研究では、興味深いことに、インターフェロンは発現していないもののインターフェロンによって発現誘導を受けるいくつかの遺伝子群の発現上昇が報告されている。この干渉現象のメカニズムは全くの不明であるが、その解明は新たな治療法の開発に多くのヒントを与えるものと思われる。

E. 結論

培養細胞系を用いて、プリオン病原体の感染における株間の干渉現象が起こりうることを証明した。この分子機序を明らかにすることであらたな治療戦略が見いだされるものと期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	年
山田正仁	プリオン病	松田博史 朝田 隆	痴呆の画像診断	永井書店	大阪	220- 233	2004

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌	巻号	ページ	年
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,	Amyloid imaging probes are	J Gen Virol	85	1785-	2004

Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T	useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies			1790	
Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono 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- 23667	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 Neuroimagin g	14	63-66	2004
Doh-ura K	Prion diseases : disease diversity and therapeutics	Rinsho Shinkeigaku	44	855-856	2004
Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T	Diffusion-Weighted MRI in Familial Creutzfeldt-Jakob Disease With the Codon 200 Mutation in the Prion Protein Gene	J Neurol Sci	in press		2005

Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi M, Yamauchi A, Kataoka Y	Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease	Dement Geriatr Cogn Disord	17	158-163	2004
Ishida C, Kitamoto T, Yamada M.	Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. Reply	Neurology	62	1239	2004
Ishida C, Okino S, Kitamoto T, Yamada M.	Involvement of the peripheral nervous system in human prion diseases including dural graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease	J Neurol Neurosurg Psychiatry	76	in press	2005
Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Mizusawa H, Nakamura, Y, Noguchi M, Furukawa Y, Ishida C, Kuji I, Mitani K, Murayama S, Kohriyama T, Katayama S, Yamashita M, Yamamoto T, Udaka F, Kawakami A, Ihara Y, Nishinaka T, Kuroda S, Suzuki N, Shiga Y, Arai H, Maruyama M, Yamada M	Clinical diagnosis of MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	Neurology	64	in press	2005
山田正仁	プリオン蛋白高次構造を標的としたプリオン病の分子治療	医学のあゆみ	208	463-468	2004
山田正仁	トピックス/クロイツフェルト・ヤコブ病	Infectious Diseases Report	No.14 (2004. 4. 7)		2004
山田正仁	孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の嗅上皮における異常プリオン蛋白の検出	Medical Briefs in Brain & Nerve	Vol.13, No.2, Article 6		2004

山田正仁	BSE 病原体に対する感受性の人種差	日本医事新報	4204	90-91	2004
Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y	Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production	Brain Res	1038	208-215	2005
Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N, 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
Dohgu S, Yamauchi A, Nakagawa S, Takata F, Kai M, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y	Nitric oxide mediates cyclosporine-induced impairment of the blood-brain barrier in coculture of mouse brain endothelial cells and rat astrocytes.	Eur. J. Pharmacol	505	51-59	2004
Yamauchi A, Dohgu S, Shuto H, Oishi R, Kataoka Y	Tacrolimus-induced neurotoxicity and nephrotoxicity is ameliorated by the administration in the dark period in rats.	Cell. Mol. Neurobiol	24	695-704	2004
Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Naito M, Tsuruo T, Higuchi S, Sawada Y, Kataoka Y	Transforming growth factor- α 1 supports maintenance of the blood-brain barrier function	Cell. Mol. Neurobiol	24	491-497	2004
Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito	Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier	Cell. Mol. Neurobiol	24	205-217	2004