

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 17 年度 総括・分担研究報告書

平成 18 年 3 月

主任研究者 片峰 茂

はじめに

平成 17 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 18 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. PrP の抗神経毒性作用領域についての検討

長崎大・院医・感染分子病態学 片峰 茂 9

### 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 13

### 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 17

### 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 23

### 5. クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者における診断マーカーの検討と キナクリン投与の治療成績とその問題点

長崎大・へき地病院再生支援 調 漸 27

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 35

## 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	長崎大学医学部・ 歯学部附属病院 へき地病院再生支援・ 教育機構	教 授	T095-849-7774 F095-849-7775

# 總 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

プリオン病関連遺伝子（プリオン蛋白遺伝子とプリオン類似蛋白遺伝子、プリオン増殖関連遺伝子）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。(1)正常型 PrP に結合し構造を安定化する新規化合物 GN8 を構造論的に予測し、*in vitro* と *vivo* で抗プリオン活性を確認した。GN8 の化学合成にも成功した。(2)プリオン感染細胞における遺伝子発現の網羅的検出によりプリオン複製に関与する宿主遺伝子候補 12 種類を見出した。(3)弱毒プリオン株が強毒プリオン株感染を干渉することを発見した。(4)プリオン類似蛋白 Dpl の異常型 PrP 様神経毒作用を正常型 PrP のアミノ末端 100 アミノ酸が抑制していることが半明した。

#### 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（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半明していない。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（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>\*</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>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。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学開発の試みは、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、RNA 干渉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ブ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 類以外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らが明らかにした。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 の構造に係るノイオ・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: 桑田はまず、細胞型プリオンの構造、ダイナミクス、安定性を実験的に調べることに、立体構造の不安定化に寄与する‘ホット・スポット’を同定した。さらに立体構造変換過程をシミュレーションすることにより、このようなホット・スポットに結合し、構造変換を抑制する薬剤の結合様式について調べた。さらに、*in silico* スクリーニングにより見出された抗プリオン薬(GN8)の抗プリオンメカニズムを実際に調べるため、以下の一連の実験を行った。①粗視化した分子動力学計算を用い、プリオンの正常型から異常型への立体構造変換過程を詳細にシミュレーションした。②細胞型の立体構造を有するプリオンの大量発現系を大腸菌を用いて構築した。また精製したプリオン蛋白が、細胞型であることを円二色性スペクトル、赤外スペクトルを用いて確認した。③GN8の有機合成ルートを構築し、実際に有機合成を行った。これにより、今後GN8に対し、自在に修飾を施すことが可能となった。④細胞型プリオンとGN8との相互作用を、種々の分光法やSPR等を用いて調べた。片峰はGN8の*in vivo*抗プリオン生物活性を感染マウスモデルを用いて調べた。

Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析: PrPのaa25-50を欠損させたPrPdelNとOR領域を欠損させたPrPdelOR、PrPのaa1-124とDplのaa58-179の融合蛋白fuPrP-Dplを発現するtransgeneをPCR法で作製した。構築したtransgeneをsyrian hamster promotorの下流に挿入してTgマウスを作製した(fig1)。また、当教室で既に作製していたDplを過剰発現するTgマウス(Tg(Dpl))を系統維持して使用した。

交配実験: PrPノックアウトバックグラウンドとしたTg(変位型PrP)PrP<sup>-/-</sup>とTg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>を交配させて、変位

型PrPとDplを共発現するマウスを作製した(Tg(変異型PrP/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>)。Dpl発現による神経細胞変性死を変位型PrPの導入で回復させることが出来るかどうかを発症日と病理をみることで半定した。

発症の評価: 動揺性歩行を呈する日を発症日とし、logrank testで有意差を検討した。

プルキンエ細胞の脱落の評価: ホルマリン固定した小脳を薄切し標本を作製した。抗spot35抗体を用いて切片を免疫染色し光学顕微鏡でプルキンエ細胞が脱落しているか否かを観察した。

shRNAを用いたプリオン増殖関連因子の探索: 細胞膜に発現する分子を主な標的とし、それぞれの遺伝子に特異的な配列21塩基を選択した。デザインしたDNAをプラスミドベクターに組み込み、shRNA発現用コンストラクトを得た。マウス神経芽細胞腫N2a細胞を宿主とし、2種のプリオン病原株にそれぞれ持続感染した培養細胞(ScN2a細胞およびN167細胞)、さらに非感染のN2a細胞に発現ベクターを導入した。遺伝子導入感染細胞の溶解液をプロテナーゼK処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクターのみを導入した細胞(mock)を対照とした。さらに、組換えマウスPrP(121-231)をビオチン標識しアビジン磁気ビーズに結合させ、PrPアフィニティカラムを作製した。非感染マウス神経芽細胞腫細胞(N2a)と感染細胞で異常型PrPが常時発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞(N2aSc)のタンパク質を生合成ラベルした後、細胞抽出液から密度勾配遠心法にてPrPを含むラフト画分を分画した。このラフト画分をPrPアフィニティカラムに結合させた。溶出は段階的に塩濃度を上昇させることによって行い(200、400、600、800 mM NaCl)、得られた溶出液を10% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって展開し、感染と非感染細胞間で比較した。

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索: DNAマイクロアレイ法を用いて、プリオン感受性マウス神経芽細胞腫細胞Neuro2a(N2a)サブクローンとプリオン非感受性N2aサブクローンの遺伝子発現比較解析を進め、プリオン感受性N2aで高発現する遺伝子の同定を実施した。N2aサブクローンN2a-3およびN2a-5、プリオン非感受性サブクローンのN2a-1を用いた。細胞からtotalRNAを回収し、one-cycle IVT labeling kit(Affymetrix)にてbiotin化標識cRNAを作製した。DNAマイクロアレイチップはmouse 430 2.0(Affymetrix)を使用し、GeneChip system(Affymetrix)を使用してデータを取付した。データは、GCOS

(Affymetrix) および Avadis (Standard genomics) を用いて解析した。遺伝子発現は Taq Man assay を用いて定量解析した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。siRNA は Damachom 社のライブラリーより購入し、トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。24 well プレートに細胞を播種後、24 時間後に siRNA (最終濃度 80 nM) をトランスフェクトした。60-72 時間後に細胞を回収して、PrP<sup>Sc</sup> および  $\alpha$ -tubulin をドットプロットにより半定量検出した。

#### (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。

### C. 研究結果

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：ミリ秒からマイクロ秒の遅いタイムスケールの揺らぎが、ヘリックス B と C に分布していることが明らかになり、これらの部位が、遺伝性のヤコブ病における変異部位と関連していることが確認された。郷モデルを用いた粗視化シミュレーションにより、細胞型 (NMR 構造) から異常型 (電顕構造) への構造変換過程をシミュレーションすることが可能となった。一般に、このような蛋白質のダイナミクス情報、或いは熱安定性情報に基づいて、低分子化合物の *in silico* スクリーニングを行う場合 (SBDD), ターゲットとなる部位を限定する必要がある (範囲を限定しない方法もある)。プリオンでは、正常型から異常型への立体構造変換が病原性発現のスイッチになるので、立体構造変換の初期に起きる構造変化を食い止め、正常型を安定化することにより、このスイッチが入らないようにすることが出来る可能性がある。NMR で明らかになった揺らぎの多い部位を、三次元立体構造上にマッピングすると、そのような残基はプリオンの特定部位に集中していることが分かった。これらの情報に基づき、我々は、ACDSC データベースを用い、*in silico* スクリーニングを行い、同部位に特異的に結合し、プリオンの構造変換を阻止する化合物、GN8 を発見することが出来た。

GN8 の作用メカニズムを明らかにするため、我々は細胞型の立体構造を有するリコンビナント・プリオンを作成した。さらに GN8 を有機合成し、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにより、GN8 であることが確認できた。さらに、細胞型プリオン蛋白質と、GN8 との結合実験を SPR 等

で行ったところ、その結合が確認できた。

このことにより、GN8 の作用メカニズムは、細胞型プリオンに結合し、その立体構造を安定化させるためであることが明らかとなった。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半明した。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、比較的に一致していた。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。

Dpl/PrPLP による神経変性死の分子機構の解析：Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>はプルキンエ細胞変性死に伴う動揺性歩行を呈した。一方、Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>に PrP<sup>Sc</sup> を共発現させたマウス Tg(PrP<sup>Sc</sup>/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>ではプルキンエ細胞は回復し、発症は Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>と比較して有意に遅延した。同様に、Tg(PrP<sup>Sc</sup>OR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>, Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>もプルキンエ細胞は回復し、有意な回復が認められた。

RNA 干渉を用いたプリオン増殖関連因子の探索：プリオン蛋白と相互作用すると既に報告されているシグナル伝達系蛋白分子 B のノックダウンでは、標的遺伝子発現の70%抑制が確認され、かつ ScN2a 細胞および N167 細胞両方において異常型プリオン蛋白量の産生阻害が見られた。遺伝子導入後72時間後、発現ベクター 0.4  $\mu$ g/穴の条件では、mock と比較して約70%の異常型プリオン蛋白発現抑制がみられた。その効果は用量依存性であった。また B 遺伝子発現抑制によって総プリオン蛋白発現の明らかな減少は無く、フローサイトメトリーによる N2a 細胞膜表面の正常型プリオン蛋白発現解析においても mock との明らかな変化はなかった。さらに必要に応じてプリオン蛋白遺伝子の発現解析を加えて、264遺伝子についてのスクリーニング解析を終了した。その結果、発現抑制により異常型プリオン蛋白の産生を阻害する12塩基配列群が同定された。その遺伝子産物の内訳は、細胞接着関連が2、神経系発達関連が1、脂質代謝関連が1、蛋白質代謝関連が3、シグナル伝達系などが5であった。

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索：DNA マイクロアレイ解析結果から、プリオン非感受性 N2a-1 に比べ、プリオン感受性 N2a-5



で2倍以上発現が高い遺伝子44種を選抜した(表1)。選抜した遺伝子のN2a-5およびN2a-1での発現を確認するため、定量PCR(Taq Man assay)を実施した。その結果、36遺伝子がN2a-5で2倍以上高発現していることが確認できた。Al, Fu2, Ap, N1, Ndl, M2, Dg, およびRgの8遺伝子では、N2a-5とN2a-1の間の発現量の差は2倍以内であり、DNAマイクロアレイの結果の再現性は得られなかった。siRNAを用いて、候補遺伝子の発現を抑制して、PrP<sup>Sc</sup>の産生への影響を検討するために、まず、各々のsiRNAをトランスフェクトした場合の標的遺伝子の発現低下について調べた。44の一次候補遺伝子のうち39遺伝子について、siRNAによる標的遺伝子発現低下を検討したが、38遺伝子で、陰性対照と比較して、40%以上遺伝子発現が低下することが確認できた。I4, Hb, およびFdは遺伝子発現の低下が認められなかった。プリオン感染N2a-5(ScN2a-5)にPrP遺伝子のsiRNAをトランスフェクトすると、PrP遺伝子の発現は、陰性対照の10%に低下し、PrP<sup>Sc</sup>の産生は1%程度まで減少した。この結果から、siRNAによる遺伝子発現抑制が、PrP<sup>Sc</sup>産生への影響を評価する試験系として機能することが確認できた。そこで、44の候補遺伝子のうち37遺伝子について、siRNAによる遺伝子発現抑制を実施して、PrP<sup>Sc</sup>の産生への影響について検討した。Fd, Al, Gb, C5の4遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合、PrP<sup>Sc</sup>の産生が陰性対照の40%以下に低下した。

プリオン株間干渉現象の発見：プリオン病病原体の実体にせまる手がかりとして多様なプリオン株(strain)の存在がある。先行するプリオン株感染が後続の異なるプリオン株感染を阻止するという現象が動物実験では報告されている。しかし免疫系の関与などその詳細は不明である。今回複数のプリオン株に感受性を示す培養細胞(GT1-7)の解析の過程で、プリオン株間の干渉現象を発見した。とくに、感染細胞中にほとんどプロテアーゼ抵抗性の異常プリオンタンパク(PrP<sup>Res</sup>)の蓄積を来さない弱毒株(SY)による強毒株(Chandler, 22L, Fukuoka-1)感染阻止効果を見い出した。Chandler感染細胞は後続のFukuoka-1感染に感受性であったが、22L感染はFukuoka-1感染を完全に阻止した。このことは、感染阻止現象が所謂ワクチン効果によるものではなく、感染細胞中での干渉機構によるものであることを強く示唆している。また、この干渉が株の組み合わせに規定されることも判明した。さらに、感染細胞中にほとんどPrP<sup>Res</sup>の蓄積を来さないCJD由来弱毒株(SY)が強力にChandler, 22L, Fukuoka-1など複数の強毒株(高レベルのPrP<sup>Res</sup>を有する)の感染を干渉することが明らかとなった。このことはPrP<sup>Res</sup>が干渉を規定する因子で

はないことを意味している。

#### D. 考察

プリオン病に対する治療薬を開発するためには、プリオンの立体構造変換過程を制御するための論理的創薬基盤を整えることが重要である。本研究により、粗視化モデルによるシミュレーションが有効であり、更に*in silico*スクリーニング、物理化学的測定、及びバイオアッセイを構造生物学的測定と分子動力学シミュレーションにより、抗プリオン化合物の作用メカニズムが原子レベルで明らかとなった。また、抗プリオン薬の化学構造の最適化を行うための論理的創薬に関する基盤を構築することが出来た。

プリオン類似蛋白PrPLP/Dplの神経細胞における細胞死誘導作用とPrP<sup>C</sup>のそれに対する拮抗的防御作用について、今回の結果と当教室以外からの報告を合わせて考察を加えると、構造的に類似するPrP C末とDplの球状構造はプルキンエ細胞毒性作用があり、PrP N末領域を球状構造部分と同居させることによって初めて細胞保護機能を呈する。つまり、PrPはそれ自体の蛋白構造に細胞保護領域とDpl類似の細胞毒性領域をもつ。今回の結果からは、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討でPrPのN末はDplに対する拮抗作用に重要な領域があることが示された。これは、PrPdel23-88が”拮抗”能力を欠損したことを支持するものである。PrPdel23-88の”拮抗”能力欠損と今回のTg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>とTg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討からPrPはaa25-50とaa51-90のどちらか一方があればDplの細胞毒性に対して”拮抗”作用が働くことを示した。すなわち、酸化作用や細胞保護作用があると報告されているOR領域(aa51-90)は酸化作用や細胞保護作用があると報告されているが、”拮抗”能力には必須ではなかった。また、PrPの細胞内移行に重要と報告されたcharged motif(aa23-28)領域もDplの神経細胞毒性に対する拮抗作用領域として必須でないことを明らかとした。

従来PrP<sup>C</sup>はCu<sup>++</sup>の細胞内取り込みや代謝に関与するとの説があったが、この領域はCu<sup>++</sup>結合部位とされるOcta-repeat領域に相当する。PrP<sup>C</sup>の神経変性防御作用にはCu<sup>++</sup>が関与することが示唆され、*in vitro*ではCu<sup>++</sup>がDplとPrPの拮抗作用の標的分子である可能性も考えられた。Cu<sup>++</sup>はradical oxygen species(ROS)の代謝に必須の分子であることはよく知られている。しかし、これまでの我々の実験ではCu/Zn-SOD活性を含めてNgsk-Pmp<sup>00</sup>神経細胞におけるROS代謝異常は認められていない。Dplの神経毒性と拮抗的PrP<sup>C</sup>の防御作用の分子機構解

明は今後の重要な課題である。

プリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子改析により今回同定した4遺伝子の産物は膜蛋白であるか、膜蛋白と予測されている。これらが PrP と直接会合して PrP<sup>Sc</sup> の産生に関与するか、あるいは間接的に PrP<sup>Sc</sup> の産生に影響するかは不明である。Fd および C5 はイオントランスポーターやイオンチャネルとして機能する膜蛋白質であることから、これらの機能低下が引き起こす細胞内微小環境の変化が、間接的に PrP<sup>Sc</sup> の産生に影響する可能性もある。今後、イオントランスポーターやイオンチャネルの阻害剤を用いた試験も実施する予定である。

一方、RNA 干渉を用いて同定した異常型プリオン蛋白量のみ阻害した12個の因子も、プリオン感染の成立や維持に関与している可能性が示唆される。その阻害効果については、同一の宿主細胞にそれぞれ感染したプリオン病原株の種類によって異なることが一部経験されており、今後の課題となっている。一方、総プリオン蛋白・正常型プリオン蛋白・プリオン蛋白遺伝子の発現を減少させたものもあり、これらは蛋白合成や分解へ直接の関係が推測された。

プリオン株間干渉現象の発見の意義は大きい。干渉の分子機構解明を通してプリオン病原体の本体を明らかにすることが今後の課題となる。PrP 以外の分子 (RNA など核酸を含む) を想定する蓋然性も十分にある。干渉現象がプリオン感染に付随することを考えれば、この未知分子は複製の実体 (病原体) を構成するという考え方にもつながる。また、無毒化プリオン株を用いた BSE などの強毒プリオン感染予防方策開発への途を開いた成果でもある。

#### E. 結論

- (1) 正常型 PrP に結合し構造を安定化する新規化合物 GN8 を構造論的に予測し、in vitro と vivo で抗プリオン活性を確認した。GN8 の化学合成にも成功した。
- (2) プリオン感染細胞における遺伝子発現の網羅的解析によりプリオン複製に関与する宿主遺伝子候補12種類を見出した。
- (3) 弱毒プリオン株が強毒プリオン株感染を干渉することを発見した。
- (4) プリオン類似蛋白 Dpl の異常型 PrP 様神経毒作用を正常型 PrP のアミノ末端100アミノ酸が抑制していることが半明した。

#### 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 実験施設内で行い、汚染物は135°C30分オートクレーブ処理した。実験室内感染、外部への病原体の核酸などの事故は発生していない。(堀内)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *J. Virol.* 79 (11): 7104-7112, 2005

Nishida N, Katamine S, Manuelidis L: Reciprocal interference between specific CJD and scrapie agents in neural cell cultures. *Science* 21 (5747), 493-496, 2005

Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M: Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136 (1), 281-287, 2005

Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine*. 2006 [Epub ahead of print]

片峰茂: プリオンの今日的概観「特集・プリオン病と BSE」化学療法の領域 22 巻 1 号、23—28、2006

古川ひさ子、片峰茂: プリオン病の診断法の進歩「特集・プリオン病と BSE」化学療法の領域 22 巻 1 号、81—86、2006

Hashimoto K, Kato Z, Nagase T, Shimozawa N, Kuwata K, Omoya K, Li A, Matsukuma E, Yamamoto Y, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Suzuki Y, Wanders RJ, Kondo N: Molecular Mechanism of a Temperature-Sensitive Phenotype in Peroxisomal Biogenesis Disorder. *Pediatric Research*. 58: 263-269, 2005

Soeda A, Nakashima T, Okumura A, Kuwata K, Shinoda J, Iwama T: Cognitive impairment after traumatic brain injury—a functional magnetic resonance imaging study using the Stroop task. *Neuroradiology*. 47: 501-506, 2005

桑田一夫: バイオインフォーマティクスによるプリオン病治療薬の開発. 化学療法の領域 22 : 87-93. 2006  
Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T. "Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals." *Acta*

- Neuropathol. 109: 263-271 (2005)
- Inanami, O., Hashida, S., Iizuka, D., Horiuchi, M., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Nakamura, H., Inagaki, F., and Kuwabara, M. "Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 785-792 (2005)
- Kurosaki, Y., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 321-323 (2005)
- Kataoka, N., Nishimura, M., Horiuchi, M., and Ishiguro, N. "Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 349-351 (2005)
- Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. "Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route." *Jpn. J. Vet. Res.* (in press)
- 堀内 基広 "BSE 診断法の開発と現状" *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 堀内 基広 "人獣共通感染症としてのプリオン病" *ウイルス* 55: 45-55 (2005)
- 堀内 基広 "動物由来感染症としてのプリオン病" *日本臨床* 63: 2213-2220 (2005)
- 堀内 基広 "異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達" *膜* 30: 78-83 (2005)
- Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* (in press), 2006
- Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K: Treatment options in patients with prion disease—the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In: *Prions-Food and Drug Safety.* (ed. Kitamoto T) Springer pp41-66, 2005
- 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.* 50(5):394-396, 2005
- Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 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.* Feb;31(1):80-87, 2005
- 逆瀬川裕二、堂浦克美：プリオン病の治療法の現状。 *医学のあゆみ* 215(11):901-905, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療—ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与—。 *神経内科* 63 (5) : 441-445, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療—経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状。 *Brain Medical.* 17(3):259-264, 2005
- ## 2. 学会発表
- Kazuo Kuwata: Drug discovery based on the structural dynamics of prion. Chem-Bio Informatics Society YEAR 2005. August 24-26, 2005 RIKEN Yokohama Institute.
- 桑田一夫、中村寛則、鎌足雄司、松本友治：Prion は Downhill Folder か? 生物物理日本生物物理学会第 43 回年会。平成 17 年 11 月
- 堀内 基広、品川 森一。"蛍光偏光分光法による未変性条件下での異常型プリオン蛋白質の検出。" 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 瓜生 匡秀、堀内 基広。"マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a のプリオン感受性は PrP<sup>C</sup> 以外の因子により規定される。" 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 金 チャンラン、堀内 基広。"培養細胞における正常プリオン蛋白質の新たな細胞内局在" 2005 年プリオン研究会 (25-26 Aug. 2005, 山形)
- 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
- 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：リコンビナントプリオン蛋白質を用いた蛋白質 unfolding 因子の探索。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJD の新しい治療法の試み—ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- 照屋健太、堂浦克美：GPI アンカー型プリオン蛋白質アナログの調製。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
- Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Amyloid imaging probes for detection of prion plaques and treatment of prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Hitachi Global Storage Technologies, San Jose, CA, November 3-5, 2005
- 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：The ATP-bound form of Hsp90 can unfold recombinant prion protein. 日本分子生物学会第 28 回年会大阪、2005 年 12 月 7 日-10 日
- ## 3. その他 (著書)
- K.Kuwata: "Semi-classical quantization of protein dynamics: Novel NMR relaxation formalism and its application to prion." T.Kitamoto(Ed.) PRIONS; Food and Drug Safety. Springer-Verlag Tokyo. 2005
- 桑田一夫：プリオンタンパク質，「タンパク質科学」，化学同人，315-330，2005

片峰茂：プリオンと遅発性ウイルス感染症 「標準微生物学 第9版」(平松啓一、中込治編集)、医学書院、pp556-560、2005

片峰茂：プリオンとプリオン病 「微生物感染学 ～新しい感染の科学～」(光山正雄編)南山堂、pp 294-301、2005

H知的所有権の出願・登録状況

1.特許取得

1)堂浦克美：プリオン病発症予防剤とそれを含む食品添加剤及び飼料添加剤。特願 2005-51999、2005年2月25日

2)堂浦克美、岡周作、弘田量二、角田正也：哺乳動物組織材料の前処理方法。特願 2005-293011、2005年10月5日

# 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

PrPの抗神経毒性作用領域についての検討

分担研究者 片峰 茂 長崎大学医歯薬学総合研究科・教授

研究協力者 吉川 大介、坂口 末廣（長崎大学医歯薬学総合研究科）

研究要旨

PrP は Doppel(Dpl)の神経細胞毒性に拮抗的に作用する。我々は既に、PrP の抗神経毒性作用に重要な領域が N 末アミノ酸(a.a.)23-88 に存在することを明らかにした。本研究では、Dpl の神経細胞毒性に対する PrP の N 末機能について、さらに詳細に検討した。その結果、抗酸化ストレス作用のあるといわれるオクタペプチドリピート(OR)領域と PrP の細胞内移行に重要と報告された charged motif 領域は Dpl の神経細胞毒性に対する拮抗作用領域として必須でないことを明らかとした。

A 研究目的

PrP の正常機能は未だ明らかにされていない。いくつかの PrP との結合分子は報告されているが、その結合分子を介した PrP の機能には一定の見解を得られていない。また、PrP との拮抗作用が生物現象として唯一認められるものは Dpl である。当研究室では、この PrP とその拮抗蛋白 Dpl を比較検討することで PrP の機能を解析している。

我々はこれまで、PrP の抗 Dpl 誘導神経毒性作用に重要な領域が N 末アミノ酸(a.a.)23-88 にあることを同定した。本研究では、Dpl の神経細胞毒性に対する PrP N 末領域の機能について、さらに詳細な検討を行った。

B 研究方法

トランスジェニック(Tg)マウスの作製：PrP の a.a.25-50 を欠損させた PrPdelN と OR 領域を欠損させた PrPdelOR、PrP の a.a.1-124 と Dpl の a.a.58-179 の融合蛋白 fuPrP-Dpl を発現する transgene を PCR 法で作製した。構築した transgene を syrian hamster promotor の下流に挿入して Tg マウスを作製した(fig1)。また、当教室で既に作製していた Dpl を過剰発現する Tg マウス(Tg(Dpl))を系統維持して使用した。

交配実験：PrP ノックアウトバックグラウンドとした Tg(変位型 PrP)PrP<sup>-/-</sup>と Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>を交配させて、変位型 PrP と Dpl を共発現するマウスを作製した(Tg(変異型 PrP/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>)。Dpl 発現による神経細胞変性死を変位型 PrP の導入で回復させることが出来るかどうかを発症日と病理をみることで判定した。

発症の評価：動揺性歩行を呈する日を発症日とし、logrank test で有意差を検討した。

プルキンエ細胞の脱落の評価：ホルマリン固定した小脳を薄切し標本を作製した。抗 spot35 抗体を用いて切片を免疫染色し光学顕微鏡でプルキンエ細胞が脱落しているか否かを観察した。

### C 研究結果

Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>はプルキンエ細胞変性死に伴う動揺性歩行を呈した。一方、Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>に PrPdelN を共発現させたマウス Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>ではプルキンエ細胞は回復し、発症は Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>と比較して有意に遅延した。同様に、Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>もプルキンエ細胞は回復し、有意な回復が認められた。

### D 考察

今回の結果と当教室以外からの報告を合わせて考察を加えると(fig2)、構造的に類似する PrP C 末と Dpl の球状構造はプルキンエ細胞毒性作用があり、PrP N 末領域を球状構造部分と同居させることによって初めて細胞保護機能を呈する。つまり、PrP はそれ自体の蛋白構造に細胞保護領域と Dpl 類似の細胞毒性領域をもつ。

今回の結果からは、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討で PrP のN末は Dpl に対する拮抗作用に重要な領域があるこ

とが示された。これは、PrPdel23-88 が”拮抗”能力を欠損したことを支持するものである。

PrPdel23-88 の”拮抗”能力欠損と今回の Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>と Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討から PrP は a.a.25-50 と a.a.51-90 のどちらか一方があれば Dpl の細胞毒性に対して”拮抗”作用が働くことを示した。すなわち、抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されている OR 領域(a.a.51-90)は抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されているが、”拮抗”能力には必須ではなかった。また、PrP の細胞内移行に重要と報告された charged motif (a.a.23-28) 領域も Dpl の神経細胞毒性に対する拮抗作用領域として必須でないことを明らかとした。

今後は、PrP の a.a.23 から a.a.90 に幅広く作用する因子が Dpl との相互作用を有している可能性が考えられ、”拮抗”作用の機序について検討予定としている。

### E 結論

PrP の charged motif 領域と OR 領域は、抗 Dpl 神経毒性作用領域として必須ではなかった。

### F 研究発表

#### 1 論文発表

**Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and**

biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures.

*J. Virol.* 79 (11): 7104-7112, 2005

Nishida N, Katamine S, Manuelidis L: Reciprocal interference between specific CJD and scrapie agents in neural cell cultures. *Science* 21 (5747), 493-496, 2005

Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M: Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136 (1), 281-287, 2005

Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S.: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine*. 2006 [Epub ahead of print]

片峰茂：プリオンの今日的概念「特集・プリオン病と **BSE**」化学療法の領域 22 巻 1 号、23—28、2006

古川ひさ子、片峰茂：プリオン病の診断法の進歩「特集・プリオン病と **BSE**」化学療法の領域 22 巻 1 号、81—86、2006

## 2 学会発表

吉川大介：プリオン蛋白の構造-機能研究と神経保護機能 第 28 回日本分子生物学会(2005,12/7-10,福岡)

G 知的所有権の出願・登録状況  
なし



Fig1) 変異型 PrP 発現トランスジェニック (Tg) マウス construct

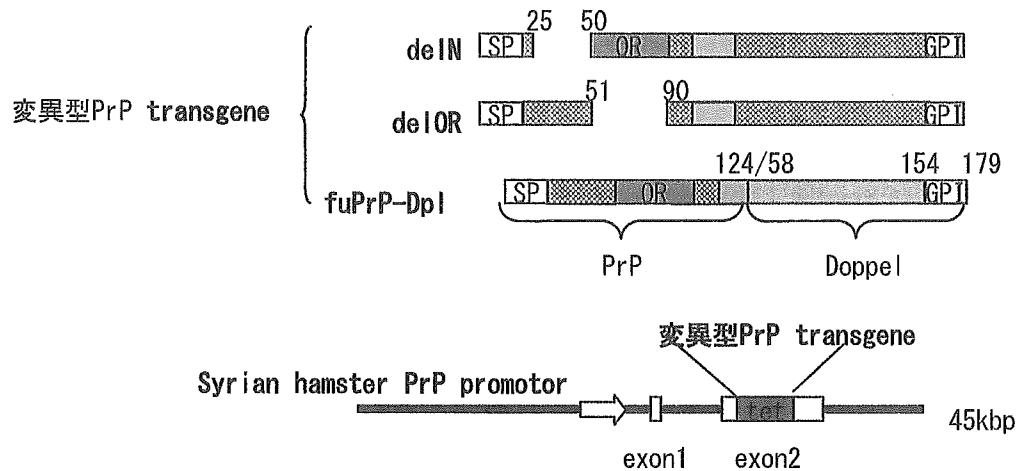


Fig2) これまでの 変異型PrPについての解析結果

	アミノ酸 2次構造	Tgマウス phenotype	抗Doppel誘導神経細胞毒性	
			vitro	vivo
<b>Wild PrP *</b>		---	yes	<b>Yes *</b>
PrPdel23-28		Not tested	no	
<b>PrPdel51-90 *</b>		<b>No phenotype *</b>	no	<b>Yes *</b>
PrP ORmu		Not tested	no	
<b>PrPdel25-50 *</b>		<b>No phenotype *</b>		<b>Yes *</b>
PrPdel23-88		No phenotype		no
PrPdel32-121		ataxic		---
PrPdel32-134		ataxic		---
<b>fuPrP-Dpl *</b>		<b>No phenotype *</b>		<b>Yes *</b>
<b>Doppel *</b>		<b>Ataxic *</b>		---

\* 今回の検討で得られた結果

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

新たな治療薬開発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株において RNA 干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングを行った。264 遺伝子の解析を終了し、12 候補を同定した。

A. 目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白の複製・増殖機構は未だ解明されておらず、治療法の開発が遅れている。昨年度に引き続き、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プリオン蛋白の異常化に関連する宿主因子の探索を行った。

B. 材料と方法

shRNA 発現ベクターの作製

細胞膜に発現する分子を主な標的とし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。デザインした DNA をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。

培養細胞への遺伝子導入

マウス神経芽細胞種 N2a 細胞を宿主とし、2 種のプリオン病原株にそれぞれ持続感染した培養細胞（ScN2a 細胞および N167 細胞）、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞

を継代した翌日にプラスミドベクターを細胞に導入した。必要に応じ培地交換や血清添加を行い、3 日間培養した。異常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテナーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクターのみを導入した細胞（mock）を対照とした。

総プリオン蛋白および正常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した培養細胞の溶解液に含まれる総プリオン蛋白量をウエスタンブロット法により検討し、mock と比較した。さらに N2a 細胞膜表面上の正常型プリオン蛋白の発現をフローサイトメトリーにより検討した。

標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

遺伝子を導入した細胞の全 RNA を抽

出し、オリゴ dT プライマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準  $\beta$ -actin を用いて相対的な定量を行った。

#### [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

プリオン持続感染細胞株 2 種において RNA 干渉を用いて任意の分子をノックダウンした。標的遺伝子の発現抑制を確認しながら、プロテナーズ K 抵抗性である異常型プリオン蛋白の産生量への影響を検討した。昨年度に引き続き、プリオン蛋白を直接の標的とした塩基配列（異常型プリオン蛋白を約 80% 発現抑制）を陽性対照とした。

プリオン蛋白と相互作用すると既に報告されているシグナル伝達系蛋白分子 B のノックダウンでは、標的遺伝子発現の 70% 抑制が確認され、かつ ScN2a 細胞および N167 細胞両方において異常型プリオン蛋白量の産生阻害が見られた。遺伝子導入後 72 時間後、発現ベクター 0.4  $\mu$ g/穴の条件では、mock と比較して約 70% の異常型プリオン蛋白発現抑制がみられた。その効果は用量依存性であった。また B 遺伝子発現抑制によって総プリオン蛋白発現の明らかな減少は無く、フローサイトメトリーによる N2a 細胞膜表面の正常型プリオン蛋白発現解析においても mock との明らかな変化はなかった。

さらに必要に応じてプリオン蛋白遺伝子の発現解析を加えて、264 遺伝子についてのスクリーニング解析を終了した。その結果、発現抑制により異常型プリオン蛋白の産生を阻害する 12 塩基配列群が同定された。その遺伝子産物の内訳は、細胞接着関連が 2、神経系発達関連が 1、脂質代謝関連が 1、蛋白質代謝関連が 3、シグナル伝達系などが 5 であった。

### D. 考察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、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。

これまで同定した異常型プリオン蛋白量のみ阻害した 12 個の因子は、プリオン感染の成立や維持に関与している可能性が示唆される。その阻害効果については、同一の宿主細胞にそれぞれ感染したプリオン病原株の種類によって異なることが一部経験されており、今後の課題となっている。一方、総プリオン蛋白・正常型プリオン蛋白・プリオン蛋白遺伝子の発現を減少させたものもあり、これらは蛋白合成や分解へ直接の関係が推測された。

RNA 干渉技術は未だ発展途上であり、遺伝子導入効率や塩基配列の特異性、更には試薬による細胞膜脂質組成への影響など検討すべき課題は多い。今回同定した遺伝子群については更に解析を進めるとともに、治療薬開発のターゲット分子となりうるか検討を進めていく。また、これまでの結果を踏まえ、異常型への構造変換が行われる微小環境を想定し遺伝子スクリーニングを進めていく。

#### E. 結論

治療薬開発の新たな標的となるプリオン増殖複製に関与する宿主因子を探索し、候補として12個の遺伝子を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* (in press), 2006
- 2) Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K: Treatment options in patients with prion disease—the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In: *Prions—Food and Drug Safety.* (ed. Kitamoto T) Springer pp.41-66, 2005
- 3) 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.* 50(5):394-396, 2005

4) Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 2005

5) 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.* Feb;31(1):80-87, 2005

6) 逆瀬川裕二、堂浦克美：プリオン病の治療法の現状。医学のあゆみ 215(11):901-905, 2005

7) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療—ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与—。神経内科 63 (5) : 441-445, 2005

8) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療—経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与方法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005

##### 2. 学会発表

- 1) 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