

2) 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

3) 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJD の新しい治療法の試み - ペントサンプ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

4) 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

5) 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

6) 逆瀬川裕二、渡邊光太、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

G. 知的所有権の出願・登録状況

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

プリオン増殖に関連する遺伝子の探索

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

我々はこれまでに、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てきた。感受性サブクローン N2a-5 と非感受性サブクローン N2a-1 を比較して、N2a-5 で 2 倍以上発現が高い 44 遺伝子を一次候補として選抜した。これら遺伝子の発現を TaqMan probe を用いた定量 PCR により調べた結果、36 遺伝子で DNA マイクロアレイの結果と一致した。これら遺伝子の産物が PrP^{Sc} の産生に関与する可能性について検討するために、siRNA による標的遺伝子の発現抑制を行った。プリオン感染 N2a-5(ScN2a-5)に標的遺伝子の siRNA プール(Dharmacon 社)をトランスフェクトして、PrP^{Sc} および PrP^C をドットプロットにより定量解析した。調べた 38 遺伝子中 4 遺伝子で、siRNA による遺伝子発現抑制により、PrP^{Sc} が 40%以下に低下することが判明した。これら 4 遺伝子の発現抑制は PrP mRNA の発現、および PrP^C の発現を有意に低下させないことから、その遺伝子産物が直接あるいは間接的に PrP^{Sc} の産生に影響することが示唆された。今回遺伝子のノックダウンにより絞り込まれた 4 遺伝子については、これらをプリオン非感受性 N2a-1 に発現させ、N2a-1 がプリオン感受性へと転換するかを検討することで、プリオン増殖への関与を最終的に判断する予定である。

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、カテプシン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。

プリオン増殖を許容する環境と許容しない環境の比較解析は、プリオンの複製に関与する宿主因子および微小環境を同定するアプローチの一である。比較の対象はより近縁であるほど、比較が容易になることから、我々は、マウス神経芽腫細胞 Neuro2a (N2a) からサブ

クローンを多数樹立し、プリオン感受性および非感受性サブクローンを同定した。この N2a サブクローンを詳細に比較解析することで、プリオンの複製に関与する宿主因子および微小環境の一端を明らかにできると考え、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現比較解析を実施してきた。本研究では、遺伝子発現比較解析から選抜された遺伝子について、PrP^{Sc} 産生との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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 Torizlo 試薬 (Invitrogen) により 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) を使用してデーターを取得した。データーは、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。Total RNA から First strand cDNA synthesis kit (Amersham) を用いて cDNA を合成した。TaqMan probe は Gene Expression Analysis (Applied Biosystem) のライブラリーから購入し、ABI7900 リアルタイム PCR 装置を用いて Taq Man assay を実施した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。まず、標準曲線法により標的遺伝子の増幅を確認し、その後 $\Delta\Delta C_T$ 法により遺伝子発現の比較定量解析を実施した。

siRNA は Darmachom 社のライブラリーより購入した。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撒後、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^{Sc} および α -tublin の検出を行った。

PrP^{Sc} および α -tublin の検出はドットプロットにより行なった。細胞を 200 μ l の lysis buffer に溶解し、低速遠心により除核した。上清を DNase I で処理した後、 α -tublin の検出用に、100 μ l の lysate を Bio-dot (Bio-Rad) にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。残りの 80 μ l の lysate は Proteinase K (20 μ g/ml) で 37°C、1 時間処理後に、Pefabloc を終濃度 5 mM になるように加えた。これを Bio-dot にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。 α -tublin は抗 α -tublin モノクローナル抗体 (mAb) により検出した。PrP^{Sc} の検出には、PVDF 膜を 3M GdnSCN で処理した後、ブロッキングし、mAb 31C6 により検出した。抗原抗体複合体は ECL Western blotting detection system (Amersham bioscience) を用いて化学発光法により検出した。検出には LAS-3000 (Fuji film) を使用し、定量解析を行なった。

(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

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 N2a5 で 2 倍以上高発現していることが確認できた。A1, Fu2, Ap, N1, Nd1, 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 (表 1)。

siRNA を用いて、候補遺伝子の発現を抑制して、PrP^{Sc} 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 (表 2)。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^{Sc} の産生は 1% 程度まで減少した (表 2)。この結果から、siRNA による遺伝子発現抑制が、PrP^{Sc} 産生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^{Sc} の産生への影響について検討した。Fd, A1, Gb, C5 の 4 遺伝子の siRNA をトランスフェクトした場合、PrP^{Sc} の産生が陰性対照の 40% 以下に低下した (表 2)。

図 1 に Fd の遺伝子発現抑制を代表例として示した。Fd, PrP の siRNA をトランスフェクトした場合、PrP^{Sc} は陰性対照の 30% および 4% まで減少した。一方、ノーマライズに使用した α -tublin の量は顕著な差が認められなかった。PrP の siRNA により、PrP^C の発現は陰性対照の 10% 程度まで低下するのに対し、Fd の siRNA をトランスフェクトした場合、PrP^C の発現が陰性対照の 75% になり、若干低下させる傾向

が認められる程度であった(有意差認められない)。また、PrP および Fd の siRNA は、それぞれの標的である PrP および Fd の遺伝子発現を約 10%程度にまで低下させたが、Fd の siRNA は PrP mRNA の量を陰性対照の 78%と、若干低下させる傾向が認められるにとどまった。

D. 考察

プリオン感受性細胞と非感受性細胞の遺伝子発現の比較解析から、プリオン感受性細胞で高発現する遺伝子を絞り込んだ。これら遺伝子の産物の PrP^{Sc} 産生への関与を検討するために、候補遺伝子の発現を siRNA でノックダウンして、PrP^{Sc} の産生への影響を解析した。その結果、Fd, A1, Gb, C5 の 4 遺伝子に対する siRNA が PrP^{Sc} の産生を低下させたことから、これらの遺伝子が直接あるいは間接的に PrP^{Sc} の産生に関与することが示唆された。今後、これら遺伝子をプリオン非感受性の N2a-1 に発現させ、N2a-1 がプリオン感受性に転換するかを検証する必要がある。

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^{Sc} の産生に関与するか、あるいは間接的に PrP^{Sc} 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^{Sc} 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。

E. 結論

プリオン感受性サブクローン N2a-5 と非感受性サブクローン N2a-1 を比較して、N2a-5 で 2 倍以上発現が高い 44 遺伝子を一次候補として選抜した。これら候補遺伝子の発現を siRNA により抑制し、PrP^{Sc} の産生に及ぼす影響について検討した結果、調べた 38 遺伝子中 4 遺伝子で、siRNA による遺伝子発現抑制により、PrP^{Sc} が 50%以下に低下することが判明した。これら 4 遺伝子の発現抑制は PrP mRNA の発現、および PrP^C の発現を有意に低下させないことから、その遺伝子産物が直接あるい

は間接的に PrP^{Sc} の産生に影響することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)

2. 学会発表

- 1) 堀内 基広, 品川 森一. "蛍光相関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)
- 2) 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^C 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)

- 3) 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)

1.特許出願

本年度は該当なし

2.実用新案登録

本年度は該当なし。

3.その他

本年度は該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. プリオン感受性N2a-5と非感受性N2a-1における遺伝子発現の比較

Gene	Relative expression to N2a5 ¹⁾		Gene	Relative expression to N2a-5 ¹⁾	
	Microarray (Log ₂)	Taq Man assay		Microarray (Log ₂)	Taq Man assay
F2	-2.4	0.06 ± 0.01	Pb	-2.7	< 0.05
K8	-1.8	<0.05	Nm1	-2.6	0.19
A1	-1.5	0.77 ± 0.28	R3	-2.5	0.07
Fu2	-1.5	0.55 ± 0.13	Sg	-2.3	0.25 ± 0.21
SB	-1.3	0.46 ± 0.08	I5	-2.3	0.20 ± 0.01
A2	-1.2	0.40 ± 0.11	Fb	-2.3	0.25
Gb	-1.1	0.24 ± 0.03	S3	-2.1	0.15
T2	-1.1	0.31 ± 0.10	G3	-2.1	0.15
H1	-1.1	0.48 ± 0.38	Rf	-2.0	0.28
W5	-1.1	0.39 ± 0.12	Fb2	-1.9	0.27
Ap	-1.1	0.64 ± 0.31	F1	-1.5	0.2
C5	-1.1	0.36 ± 0.14	Cu	-1.8	< 0.05
N1	-1.1	1.61 ± 0.61	M1	-4.3	0.14
L2	-5.4	< 0.05	I9	-3.6	0.18
Nd1	-5.1	0.87	Fd	-3.5	<0.05
I4	-4.2	0.10 ± 0.04	P3	-2.7	0.07
S2	-4.2	0.17	Dg	-2.7	0.78
W1	-3.4	< 0.05	T7	-2.7	0.09
B	-3.4	0.15 ± 0.08	St2	-2.6	0.14
Hb	-3.3	0.26 ± 0.21	P3	-2.5	0.17
P2	-3.2	0.13	Rg	-2.4	UD
M2	-2.9	0.79 ± 0.07			
Ad1	-2.7	0.14			

¹⁾N2a-5に対するN2a1の遺伝子発現を示した。DNA Microarrayの結果はLog₂で、Taq Man assayの結果はN2a-5における発現を1とした時の相対値で示した。

表 2. siRNAによる標的遺伝子の発現抑制とPrP^{Sc}産生に及ぼす影響

Gene	Target gene expression ¹⁾	PrP ^{Sc} (%) ²⁾	Gene	Target gene expression ¹⁾	PrP ^{Sc} (%) ²⁾
F2	0.13	32 ± 8	Pb	0.32	65 ± 30
K8	0.06	44 ± 17	Nm1	0.34	85 ± 42
A1	0.14	58 ± 10	R3	0.09	66 ± 26
Fu2	0.11	104 ± 46	Sg	0.13	58 ± 49
SB	0.22	82 ± 23	I5	0.25	61 ± 54
A2	0.50	27 ± 8	Fb	0.16	80 ± 40
Gb	0.54	30 ± 10	S3	0.08	56 ± 19
T2	0.35	60 ± 43	G3	0.14	41 ± 30
H1	0.57	43 ± 23	Rf	0.26	144 ± 42
W5	0.13	66 ± 25	Fb2	0.32	51 ± 25
Ap	0.17	38 ± 16	F1	0.11	73 ± 24
C5	0.08	26 ± 7	Cu	0.10	68 ± 50
N1	0.11	64 ± 27	M1	0.51	54 ± 20
L2	0.38	48 ± 16	I9	0.24	125 ± 48
Nd1	NT	NT	Fd	0.83	NT
I4	0.62	NT	P3	0.30	96 ± 43
S2	0.15	54 ± 21	Dg	NT	NT
W1	0.27	101 ± 84	T7	NA	NA
B	0.23	87 ± 30	St2	0.30	46 ± 27
Hb	0.86	NT	P3	NT	43 ± 24
P2	0.20	39 ± 13	Rg	NT	NT
M2	0.56	108 ± 61	PrP	0.1	1.44 ± 0.01
Ad1	0.36	52 ± 14			

¹⁾siRNAによる標的遺伝子の発現抑制を、陰性対照siRNAをトランスフェクトした場合を1として、相対値で示した。

²⁾siRNAをトランスフェクトした時のPrP^{Sc}の産生量を、陰性対照siRNAをトランスフェクトした場合を100%として、相対値で示した。

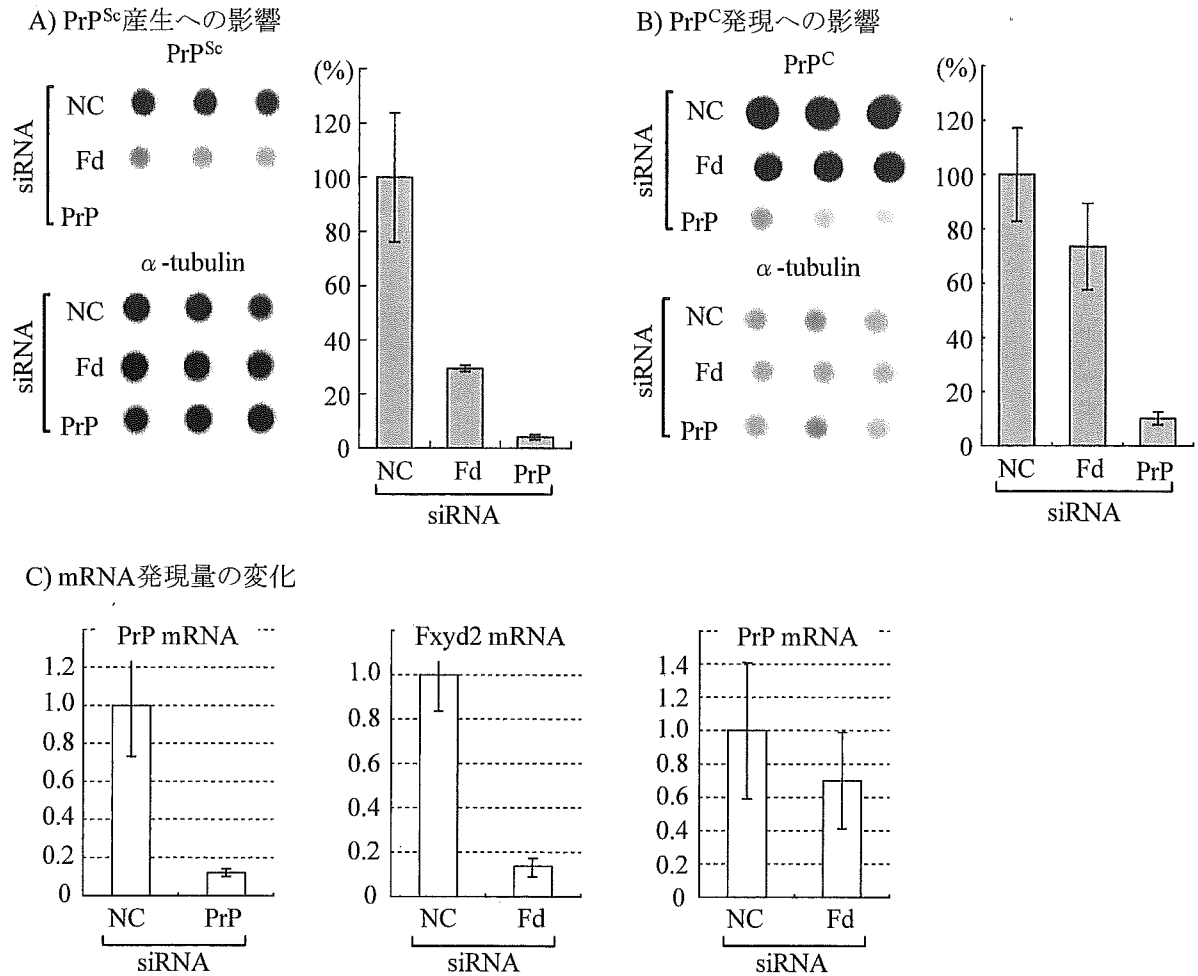


図3. Fd遺伝子のsiRNAによるPrP^{Sc}産生の減少

(A) ScN2a-5に陰性対照(NC), Fd, およびPrPのsiRNAをトランスフェクトして、ドットプロットによりPrP^{Sc}(上)および α -tubulin(下)を検出した。PrP^{Sc}の検出結果を定量化し、グラフに示した(n=3)。

(B) N2a-5に陰性対照(NC), Fd, およびPrPのsiRNAをトランスフェクトして、ドットプロットによりPrP^C(上)および α -tubulin(下)を検出した。PrP^Cの検出結果を定量化し、グラフに示した(n=3)。

(C) ScN2a-5に陰性対照(NC), Fd, およびPrPのsiRNAをトランスフェクトして、TaqMan assayによりmRNAの発現を定量解析した。NCを1とした時の相対値をグラフに示した。

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

構造生物学情報（NMR による遅い揺らぎの測定等）に基づく *in silico* スクリーニングによって見出された、抗プリオン物質（GN8）の抗プリオンメカニズムを明らかにするため、①計算機シミュレーション、②細胞型の立体構造を有するマウス・リコンビナント・プリオンの作成、③GN8 の有機合成、④プリオンと薬剤との相互作用の測定を行った。理論計算により、GN8 がプリオンの特定部位に結合することが重要であることが明らかとなった。また上記実験から、正しく α ヘリックスを巻いている細胞型プリオンと合成された GN8 とが実際に結合することが証明された。これにより、抗プリオン物質を論理的にデザインし、その構造を最適化するための理論的及び実験的基盤が得られた。

A. 研究目的

BSE（狂牛病）やクロイツフェルト・ヤコブ病等に代表されるプリオン病に対しては、現時点において確立された治療法がなく、またプリオン複製のメカニズムも、完全には解明されていない。Stanley B. Prusiner 博士（1997 年ノーベル賞受賞）によれば、プリオンは主にタンパク質からなる感染性粒子であり、その病原性は、正常型から異常型への立体構造変換にある。またその際、プリオンの共有結合は変化せず、主に非共有結合のみが変化する、とされる。その詳細は不明ではあるが、もしこの描像が正しければ、細胞型（正常型）に結合し、その構造を安定化させる薬剤の投与により、立体構造変換反応を抑制できるはずである。

我々はまず、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より、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の抗プリオンメカニズムを実際に調べるため、一連の実験を行った。

B. 研究方法

- 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。

(倫理面への配慮)

特に該当なし

C. 研究結果

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(図 1~4)。

さらに GN8 を有機合成した。合成ル

ートは以下のようなものである。

Glycine 0.1mol 7.5g を EtOH 50ml に溶解し、NaHCO₃ 0.3mol 25.2g を加える。その溶液を氷上で dibromobutane 21.6g 0.1mol を 30 分かけて攪拌しながら滴下する。その後、80℃で12時間加熱還流を行う。反応終了後、蒸留水を加え、塩酸で pH を 7 以下にし、減圧留去を行った。その残渣より EtOH で抽出を行い、EtOH / Et₂O で再結晶を行った。その結果、12g の Pyrrolidin-1-yl-acetic acid を得た。Pyrrolidin-1-yl-acetic acid 0.01mol 1.29g と 4,4'-methylenebis-Benzenamine 5mmol 0.99g を DMF に溶解し、DCC 6mmol 1.24g, DMAP 0.5mmol 60mg 加えて、12時間攪拌する。その後 DMF を減圧留去し、残渣に CHCl₃ と H₂O を加えて分配を行い、CHCl₃ 層を減圧留去精製を行い、GN8 を得た。生成物の確認は¹H-NMR と TLC において行った。TLC は CHCl₃:MeOH=1:1 で R_f 値 0.4 で標品と同じであった。また¹H-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。

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

組み合わせることにより、薬剤を論理的にデザインし、具体的に抗プリオン薬剤構造を最適化することが、現実的に可能であることが明らかとなった。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

3. その他

著書

K.Kuwata: "Semi-classical quantization of protein dynamics: Novel NMR relaxation formalism and its application to prion." T.Kitamono(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

講演

桑田一夫：国立感染症研究所平成 17 年度学友会シンポジウム（平成 17 年 2 月，東京，「テクノロジーの進化と感染症研究の展望」演者）

桑田一夫：プロテイン・クロストークサロン' 05（平成 17 年 3 月，茨城，「プリオンの構造ダイナミクスと治療薬開発」演者）

桑田一夫：理研シンポジウム「Pressure and protein dynamics」（平成 17 年 3 月，兵庫，「Slow conformational dynamics, Prion protein」演者）

桑田一夫：医薬基盤研究所シンポジウム「in silico 創薬の現状と展望」（平成 17 年 11 月，東京，「プリオンの立体構造解析と抗プリオン薬の in silico デザイン」演者）

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

図1 逆相 HPLC

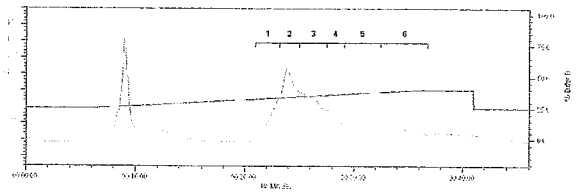


図2 ウェスタン・ブロッティング

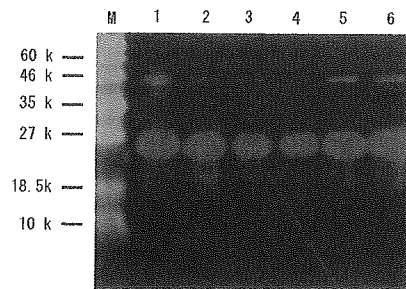


図3 円二色性スペクトル

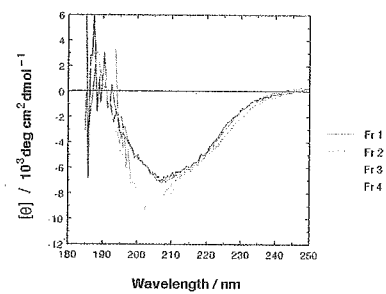
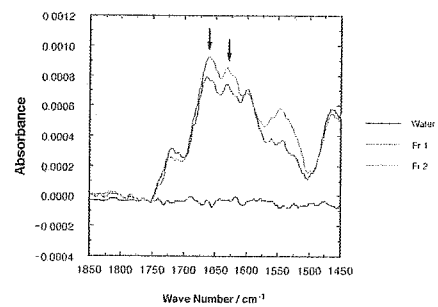


図4 赤外吸収 (ATR) スペクトル



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-

分担研究者 調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院 教授
分担研究者 佐藤克也 長崎大学医歯薬学総合研究科

1. 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中で脳脊髄液と画像検査における最も感度の高い検査を検索する目的で既知の診断指標についての検討を行った。脳脊髄液については既存マーカーであるtotal tau 蛋白、14-3-3蛋白、S-100蛋白、NSEの4項目について、画像診断としてはMRIの拡散強調画像とFLAIR画像について検討し、全経過においても早期診断マーカーにおいてもいずれもtotal tau蛋白が最も感度が高い事を示した。

2. 抗マラリア薬であるキナクリンは、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の治療法としてin vitroの持続感染系や感染実験動物で有効性が知られている。現在当教室ではCJD患者における治療薬としてキナクリンとペントサン投与を開始している。今回我々はCJD患者におけるキナクリンにおける治療効果及び病態マーカーの検索を研究の目的とした。現在までprobable case及びdefinite caseのCJD患者10例に対し、キナクリン投与を開始し、我々の考案した各種スケールにおいて臨床的効果判定基準を行い、さらに髄液の生化学マーカーと画像検査にて検討を行った。又同時にCJD患者におけるキナクリン非投与群と投与群との病理学的検討と予後比較を検討した。結果として我々の考案した各種スケールにおいて臨床的効果判定基準では評価する事ができなかったために、既存の各種スケールにおける評価を行った。現在までのUnified MSA Rating Scales IIの修正版を利用した。又髄液の生化学マーカーと画像検査では明確な違いはなかった。さらにCJD患者におけるキナクリン非投与群と投与群との病理学的検討では違いはなかった。しかしながら生命予後的な検討ではCJD患者におけるキナクリン投与群が非投与群の方よりも長かった。以上よりキナクリン投与ではほぼ明確な効果はなかった。今後キナクリン以外の新しい薬剤の開発が必要であると考えられる。

A. 研究目的

1. CJD 患者における診断マーカーの中で脳脊髄液と画像検査における最も感度の高い検査について検討を行った。
2. 今回我々は試験管内での異常プリオン抑制効果が判明している薬剤の中で、既に他疾患への治療薬剤として使用され安全性が確認されているものを材料として、脳内送達に優れる薬剤の開発を行い、プリオン病治療・病態進展阻止のための臨床方策の早期確立を目指している。平成12年から平成17年までの長崎大治療研究プロトコールに参加していただいたCJD患者（キナクリン投与群）における現在までの診断・神経病理学・治療効果の側面での検討を行う

B. 研究方法

1. CJD 患者 44 例における診断マーカーの中で脳脊髄液における既存マーカーである total tau 蛋白、14-3-3 蛋白、S-100 蛋白、NSE の 4 項目と画像診断としては MRI の拡散強調画像と FLAIR 画像について検討した。発症早期を患者が病院に受診する可能性の高い 2 ヶ月と定義し、脳脊髄液の total tau 蛋白、14-3-3 蛋白、S-100 蛋白、NSE の 4 項目と

画像診断としては MRI の拡散強調画像と FLAIR 画像について検討した。

2. キナクリン投与した CJD 患者 10 例について検討した。
 - 1) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討
知的機能検査と行動・生活評価尺度において 1) 認知症のスケールの検討（GBS, GDS, MMSE, Brief Psychiatric Rating Scale,）、2) ALS のスケールの検討（ALS functional Rating Scale, ALS assessments questionnaire 40, Quality of Life for Ventilator Dependent ALS）、3) MSA のスケールの検討（Unified MSA Rating Scales I, II and III）について検討を行った。
 - 2) Haik 論文を利用した病理学的具体的検討
Haik の原著の脳の約 10 ヶ所とは前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、嗅内野、海馬、視床、線条体、黒質、小脳であるがさらに中脳水道周囲灰白質、青斑核、延髄（下オリーブ核）を加えた 13 ヶ所の検討である。又 Haik の原著では、海綿状変化、神経細胞脱落、グリオシスで検討しているが、神経細胞脱落とグリオシスを分けて検討されている論文

が少なく、一緒に検討されている可能性が多い。海綿状変化 (Grade 0-4)、神経細胞脱落・グリオシス (Grade 0-4)、プリオン蛋白の沈着 (Grade 0-4) について検討を行った。

3) 予後調査について

平成 12 年から平成 17 年までの長崎大治療研究プロトコールに参加していただいた CJD 患者 (キナクリン投与群) における現在までの予後・生存期間の調査について検討した。倫理面への配慮) 1) 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)

2) 副作用監視に特に注意を払うために副作用監視医師を当該研究グループに属さない内科教官に委託している。

C. 研究結果

1. ①全経過での t-tau 蛋白 95.50% MRI-DWI 90.9% と高率であり、診断マーカーとの t-tau 蛋白と MRI-DWI がいずれも陽性例は CJD の診断率は 100%であった。

②CJD 患者が病院に初診時受診しうる可能性のある期間が 2 ヶ月以内と考え、発症早期を 2 ヶ月以内と定義し、生化学診断マーカーと画像検査の検討においても脳脊髄液中の総タウ蛋白が最も感度が高い事を証明した。

2. ①知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討について認知症のスケールの検討 (GBS, GDS, MMSE, Brief Psychiatric Rating Scale), ALS のスケールの検討 (ALS functional Rating Scale, ALS assessments questionnaire 40, Quality of Life for Ventilator Dependent ALS), MSA のスケールの検討 (Unified MSA Rating Scales I, II, III) について検討を行ったが、今回の検討に利用可能であったスケールは Unified MSA Rating Scales II 及び III であり、このスケールは MSA のみであったために、Unified MSA Rating Scales II を修正し、症状変動の評価スケールとして利用可能となった。(表 1) 又今回キナクリン投与患者 10 症例においてはおのおのケースで修正版 Unified MSA Rating Scales II を利用し、評価を行った。

②患者について

これまでに 10 例のキナクリンの投与を終了した。(表 1) ミオクローヌスの減少は全例に見られた。一例のみ一過性の脳波所見の改善がみられたが、他の例では覚醒度の改善が一過性に観察されるが臨床経過を修飾し得るものではなく、経過中一過性の周囲への反応の改善などみられたものの脳波所見は改善後 2 週間以内に全汎徐波から PSD へ移行した症例があった。結論的にはミオクローヌスなどごく一部の症状が軽快傾向にあったのみで、有効性に乏しかった。副作用としては肝機能障害、幻覚妄想が各々 1 例である。

知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討において評価のスケールである修正版 Unified MSA Rating Scales II を利用すると一過性に改善を認められるが、数週間投

与行くと元の状態に戻り傾向しかなかった。

③Haik 論文を利用した病理学的具体的検討剖検の時期・ステージが異なるために、又は症例数が少ないために正確な評価は難しいが、現在まではキナクリン投与例での病理学的な明確な効果は見出すことはできなかった。

④予後調査について

キナクリン投与例と非投与例での予後調査ではエンドポイントを無動性無言にするという考えもあるが、キナクリン投与例において無動性無言以後の患者も対象となっており、さらに無動性無言の症例でも一過性の効果も認められる症例もあり、純粋に生存期間のみを比較とした。又対象となっているキナクリン非投与例では I V H, 経管栄養を投与した患者のみとした。キナクリン投与例では非投与例に比べ明らかに生命予後は延長する傾向にあった。

D. 考察

1. 知的機能検査と行動・生活評価尺度の研究

現在まで CJD の評価スケールについては現在まではっきりとしたものは存在していなかった。すべての疾患において評価スケールは存在するが、CJD に対する利用できる最初のスケールであり、修正版 Unified MSA Rating Scales II を利用していきたいと思う。

2. 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索キナクリンは、脳に移行する場合、能動的な細胞外排出輸送系によって排出されているが、排出輸送系として P-gp が関与している。従って、P-gp 阻害によりキナクリンの脳内移行量が增大する可能性が考えられ、この知見に基づいてキナクリンと verapamil 併用療法を行なったところ、良好な治療効果と副作用の軽減が可能となり、髄液中のキナクリン濃度も治療可能なレベルに達すると思われた。新たな治療戦略として提案できると考えるが、現在までの臨床効果については効果無しといえる。

3. キナクリン投与の臨床効果

キナクリン投与では覚醒度、追視などの改善に加えて驚愕反射、ミオクローヌスの頻度に改善がみられたが 1 例で脳波所見に一過性の改善がみられたが、無言無動に至る臨床経過には改善はみられなかった。Verapamil を併用すれば副作用を軽減した上で、有効な髄液中濃度に近い濃度が得られることが判った。しかしながら 現在、早期診断においては MRI、髄液検査で早期診断がある程度可能になり、治療効果の判定のための病態評価マーカーである修正版 Unified MSA Rating Scales II を開始するものの、キナクリン投与による予後以外は明らかな投与効果は見られなかったと考えられる。

E. 結論

1. 診断という側面では診断マーカーの中で脳脊髄液と画像検査における最も感度の高い

検査は t-tau 蛋白ではあるが、t-tau 蛋白と MRI-DWI がいずれも陽性例は CJD の診断率は 100%であり、この 2つの項目は診断に必須である。

2.キナクリン投与例 CJD 患者は画期的な効果はない。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) K.Satoh,S.Shirabe,H.Eguchi,A.Tsujino, K.Eguchi,A.Satoh,M.Tsujihata,M.Niwa,S.Katamine,S.Kurihara, and H.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
- 2) S.Shirabe: Therapeutic Trial and Diagnostic Markers of Human Prion Diseases. 21 COE Hokkaido University The 9The International Symposium for Zoonosis Control Pathogenesis and Etiology of Zoonoses Causing Encephalitis and/or Encephalopathy 5,2005
- 3) 調 漸、佐藤克也：プリオン病の概説と具体的事例. 難病と在宅ケア 11(7):43-48,2005
- 4) 江口博人、佐藤克也、調 漸、江口勝美、井手芳彦：早期に診断し得た Heidenhain 型 Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例. 神経内科 63(3):276-280,2005
- 5) 佐藤克也、調 漸、江口 勝美：プリオン病の臨床検査 (14-3-3 蛋白, NSE, Tau 蛋白)*. 神経内科 63(5):429-434,2005
- 6) 佐藤克也、調 漸、江口勝美：CJD の診断マーカー. Clinical Neuroscience 24(3): 307-311, 2006

2.学会発表

- 1) 一般口演 78 日本薬理学会年会 (遠藤政夫) 調 漸、佐藤克也、江口勝美、丹羽正美、片岡泰文、片峰茂：ペントサンボリ硫酸 (PPS) のクロイツフェルト・ヤコブ病治療効果と脳内移行性新規低分子 PPS 薬
- 2) 2nd International Symposium on the New Prion Biology:Basic Science, Diagnosis and Therapy (Adriano Aguzzi, Italy Venice) S Shirabe, K Satoh, K Eguchi, S Katamine, M Niwa. The serial analysis of total tau protein and other biochemical markers of CSF, clinical signs and MR images in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during disease time course.

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

Unified MSA Rating Scales II (修正版)

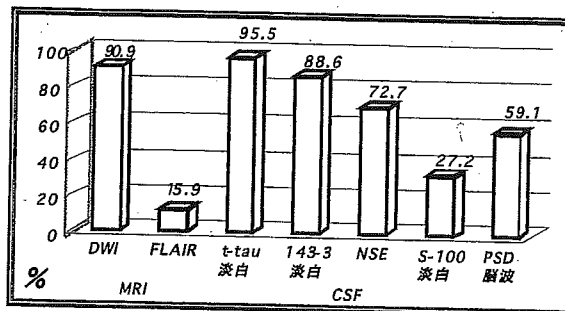
	スコア
1. facial expression	0-4
2. speech	0-4
3. ocular function	0-4
4. myoclonus	0-4
5. action myoclonus	0-4
6. Increased tone	0-4
7.rapid alternating movements of hands	0-4
8.finger taps	0-4
9.leg agility	0-4
10.Heel-kneel test	0-4
11.Arising from chair	0-4
12.posture	0-4
13.body sway	0-4
14.gait	0-4

髄液中のキナクリン濃度

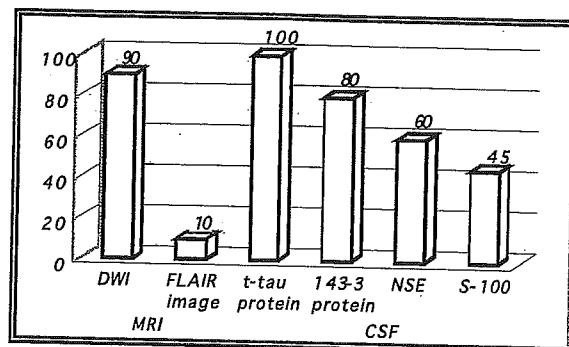
	濃度 (uM)
MM1★	0.3981
MM1	0.2261
dura CJD★	0.401

★p 糖蛋白阻害剤併用とする

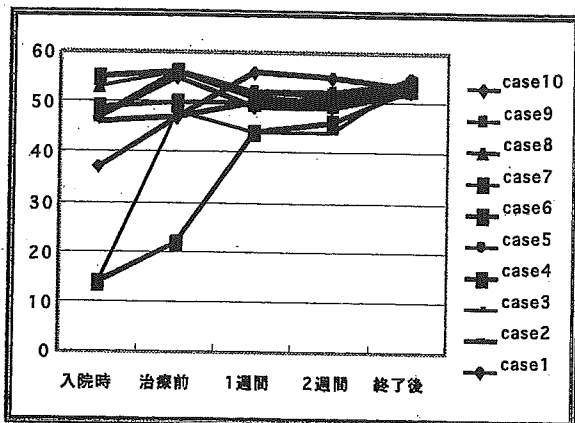
全経過での生化学診断マーカーと画像検査の検討



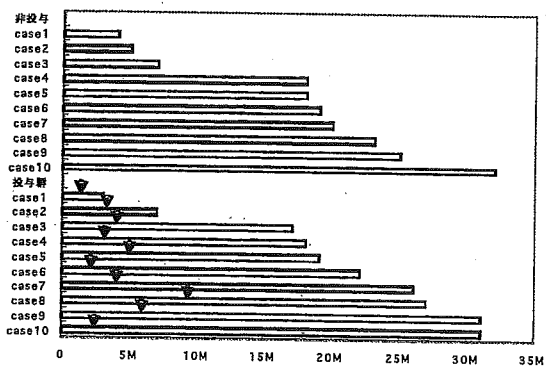
発症早期での生化学診断マーカーと画像検査の検討



キナクリン投与例における
Unified MSA Rating Scales



予後調査の結果



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
片峰 茂	プリオンと遅発性ウイルス 感染症	平松啓一 中込治	標準微生物学 第9版	医学書院	東京	2005	556-560
片峰 茂	プリオンとプリオン病	光山正雄	微生物感染学 ～新しい感染 の科学～	南山堂	東京	2005	294-301
Rainov NG, Whittle IR, Doh- ura K	Treatment options in patients with prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate	Kitamoto T	Prions-Food and Drug Safety	Springer	Japan	2005	41-66
桑田一夫	プリオンタンパク質	後藤祐児, 桑島邦博, 谷澤克行	タンパク質科 学・構造・物 性・機能	化学同人	京都	2005	315-330
Kuwata K	Semi-classical quantization of protein dynamics: novel NMR relaxation formalism and its application to prion.	Kitamoto T	Prions-Food and Drug Safety	Springer	Japan	2005	155-170

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
Arima K et al.	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		in press	2006
片峰 茂	プリオンの今日概念「特集・プリオン病とBSE」	化学療法の領域	22(1)	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(1)	81-86	2006
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
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
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
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
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(1)	80-87	2005
Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T	Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals.	Acta Neuropathol	109	263- 271	2005
Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M, 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
Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M	Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	67	321- 323	2005

Inanami O, Hashida S, Iizuka D, Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Nakamura H, Inagaki F, Kuwabara M	Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study.	Biochem. Biophys. Res. Commun	335	785-792	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
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
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(7)	501-506	2005
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(2)	263-269	2005
桑田 一夫	バイオインフォ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(1)	87-93	2006
K.Satoh, S.Shirabe, H.Eguchi, A.Tsujino, K.Eguchi, A.Satoh, M.Tsujihata, M.Niwa, S.Katamine, S.Kurihara, and H.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	2006

S.Shirabe	Therapeutic Trial and Diagnostic Markers of Human Prion Diseases	21 COE Hokkaido University The 9 th International Symposium for Zoonosis Control Pathogenesis and Etiology of Zoonoses Causing Encephalitis and / or Encephalopathy		5	2005
佐藤克也、 調 漸、江口勝美	CJDの診断マーカー	Clinical Neuroscience	24(3)	307-311	2006
佐藤克也、 調 漸、江口勝美	プリオン病の臨床検査 (14-3-3蛋白, NSE, Tau蛋白)	神経内科	63(5)	429-434	2005
江口博人、佐藤克也、 調 漸、江口勝美、井手芳彦	早期に診断し得たHeidenhain型 Creutzfeldt-Jakob病の1例	神経内科	63(3)	276-280	2005
調 漸、佐藤克也	プリオン病の概説と具体的事例	難病と在宅ケア	11(7)	43-48	2005