

1、3、5及び7時間後にサンプルを採取し、本測定法を用いてPPS濃度の測定を行い、BBB透過性を評価した。

2) 生体試料中 PPS 濃度の測定法

①測定感度・精度に関する検討：

人工髄液中または Drug-free Serum 中に既知濃度の PPS を添加した試料を作製し、sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit を用いて PPS 濃度の測定を行い、検量線の直線性、同時再現性及び日差再現性について検討した。

②本測定法の有用性の確認：

各種神経疾患を有する患者髄液中の内因性 sGAG 量の確認を行った。さらに、患者髄液中に既知濃度の PPS を添加し、添加濃度と本測定法での実測濃度の比較を行った。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いる研究は、患者・家族にインフォームドコンセントを行い同意を得た。

C. 研究結果

1) 細胞培養液中 PPS 濃度の測定：

検量線は $2.5\sim 40\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が認められ、同時再現性及び日差再現性の変動係数はともに 10%未満であった。また、PPS 原末及び LMW-PPS の BBB 透過性を評価した結果、低分子化処理によって PPS の BBB 透過性が若干向上することがわかった。

2) 生体試料中 PPS 濃度の測定：

検量線は $2.5\sim 40\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が認められ、同時再現性及び日差再現性の変動係数はともに 10%未満であった。また、プリオン病を含む各種神経疾患を有する患者髄液中の内因性 sGAG 量は測定限界 ($2.5\mu\text{g/mL}$) 以下であった。さらに、患者髄液中に既知濃度の PPS を添加し、添加濃度と実測濃度の比較を行った結果、両者はほぼ同値を示した。

D. 考察

Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay

kit (Biocolor, Ltd) による細胞培養液中 PPS 濃度測定法は、十分な感度と精度を有し、しかも、操作が簡便で試料採取から測定値算出までの工程を 1 時間以内で遂行可能である。本測定法は *in vitro* における PPS の動態評価に有用と考えられる。

sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit (Wieslab AB) による髄液中 PPS 濃度測定法は、十分な感度と精度を有し、しかも、試料採取から測定値算出までの工程を 3 時間以内で遂行可能である。本測定法はヒトでの髄液中 PPS の動態評価に応用可能であると考えられる。

E. 結論

本研究は *in vitro* 系及び *in vivo* 系での PPS の動態評価に必須である濃度測定法に関する基礎情報を提供するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y: Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25:923-928, 2005

2. 学会発表

Hagihara M, Shuto H, Takata F, Shirabe S, Nakagawa S, Deli MA, Niwa M, Kataoka Y: Evaluation of pentosan polysulfate for the permeability of blood-brain barrier. The 79th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 8-10, 2006, Yokohama, Japan

Hirakawa C, Takata F, Shuto H, Nakagawa S, Deli MA, Niwa M, Kataoka Y: Regulation of blood brain barrier function with 17β -estradiol. The 79th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March

8-10, 2006, Yokohama, Japan

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17年度 分担研究報告書

経口投与型治療予防薬の開発研究

主任研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者 川崎ゆり 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 鈴木伸之 第一製薬株式会社

研究要旨

複数のプリオン株において脳内感染させたプリオン病モデルマウスにおいて、経口投与で予防治療効果をもつ化合物を発見した。

A. 研究目的

これまでの本研究班の研究より、キナクリンやキニーネを用いた経口投与療法は、これらの薬剤の安全域が狭く副作用が頻発するにもかかわらず効果は一過性であることが判っている。一方、ペントサンボリサルフェート脳室内投与療法は、臨床研究が現在進行しているところであり、その有効性についての結論が得られるまでにはまだかなりの時間を要すると考えられる。この治療法では持続注入装置の体内埋め込みやカテーテル脳室内留置のための外科的処置を必要とすることから、臨床研究実施へのハードルが高く、複数の施設で実施されるには至っていない。やはり、通常の薬剤投与方法である経口、静注、経皮、皮下投与で有効な治療薬を開発する必要がある。

これまでの研究で、アミロイド親和性化合物にプリオン病治療効果のあることを報告しているが、これらは静脈内投与により脳移行性があり脳内に沈着した異常プ

リオン蛋白に結合して治療効果が観察されたものであった。今回、さらにこの方向での研究を発展させ、脳移行性に優れている化合物について複数のプリオン株を脳内感染させたプリオン病モデルマウスで検討し、経口投与で予防治療効果を検討した。

B. 研究方法

アミロイド親和性化合物について、複数の疾患モデルでの予防治療効果を検討した。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、RML 株プリオンを脳内感染させた Tga20 マウス、22L 株プリオンを脳内感染させた Tga20 マウス、福岡 1 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。化合物は脳内感染時より混餌して経口より投与した。

(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

今回検討したアミロイド親和性化合物は、プリオン持続感染細胞を用いた実験では、異常型プリオン蛋白の産生をピコグラムのオーダーで阻害した。脳内感染マウスを用いた実験では、RML株感染マウスで顕著な発症遅延効果が観察された。この予防治療効果は投与量に依存しており、高濃度投与群では発症までの期間が無治療対照群に比して2.5倍にまで遅延した。RML株以外のプリオン株を脳内感染させたマウスにおいても、RML株に対する効果よりは劣るものの有意な発症遅延効果が観察された。しかし、検討したプリオン株の中には263K株のように発症遅延効果が明らかではないものもあったが、263K株感染に用いたマウス種(Tg7)は他のプリオン株に用いたマウス種(Tga20)とは異なっている。

D. 考察

アミロイド親和性化合物にプリオン病治療効果があることは、以前の研究で明らかにしているところである。その研究では、*in vivo* 実験で複数のプリオン病モデルマウスを用いて検討しているが、モデルによって治療効果に差が見られた。その治療効果の差は、*in vitro* 実験の結果を考え合わせるとプリオン株に起因することが強く示唆されていたが、実験に用いたマウスの

種差の可能性や投与方法(投与時期、回数)に起因する可能性も排除できなかった。今回の実験では、同一のマウス種(Tga20)を用いて3種のプリオン株(RML、22L、福岡1)を検討し、化合物の投与方法等を統一できた。その結果、プリオン株によって予防治療効果に差が見られることが確認できた。

今後、治療効果について異常プリオン蛋白沈着や神経変性との関連について解析を進めることにより、プリオン株による効果の差を規定する要因について検討を進めたい。

E. 結論

脳内感染にもかかわらず複数のプリオン株において、経口投与で予防治療効果をもつアミロイド親和性化合物があることを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 pp.41-66, 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方法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005
- 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。臨床神経科学 24(3):313-316, 2006
2. 学会発表
- 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 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
- 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

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、
丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-347818、2005

年12月1日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、
丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ。特願
2005-371821、2005年12月26日

新たな治療薬開発の標的となる宿主因子の探索

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 干渉による遺伝子スクリーニングでプリオン産生に関与する宿主因子を探索した。これまでに250個を超える遺伝子を解析し、12個の候補因子を発見した。

A. 研究目的

プリオン病の病原因子とされるプリオン（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。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、治療薬開発の標的となる新たな宿主因子の同定を目指す。

B. 材料と方法

・shRNA 発現ベクターの作製：プリオン産生（正常型プリオン蛋白から異常型プリオン蛋白への変換）はラフトと呼ばれる細胞膜ドメインで起こると考えられていることより、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数値化し、ベクターのみを導入した細胞を対照とした。

・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中の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、対照と比較した。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 β -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宿主遺伝子をノックダウンし、標的遺伝子の発現抑制を確認しながら、異常型プリオン蛋白の産生量への影響を検討した。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可能性があるシグナル伝達系蛋白分子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 μ g/穴の条件では、対照と比較して約 70% の異常型プリオン蛋白発現抑制がみられた。その効果は用量に依存していた。またこの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対照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、260 個を超える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、発現抑制によりプリオン(異常型プリオン蛋白)の産生を阻害する 12 個の遺伝子が同定された。

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、村本らの研究成果(GPI アンカーを欠いた異常型プリオン蛋白が脳内に多量に蓄積しても病気を起こさない; 未発表)より、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が予想されることより、シグナル伝達関連因子なども候補となる。

同定した 12 個の因子は、プリオンの産生や病原性の発現に関与している可能性があるが、その阻害効果が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、そのメカニズム解明は今後の課題である。

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さらに進めていく。

E. 結論

プリオン病治療薬開発の新たな標的とな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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 pp.41-66, 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
- 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。 *臨床神経科学* 24(3):313-316, 2006
2. 学会発表
- 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-347818、2005 年 12 月 1 日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ。特願 2005-371821、2005 年 12 月 26 日

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17年度 分担研究報告書

プリオン構造緩解作用を持つ治療薬の探索

主任研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究協力者 大本晃弘 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

これまでに異常型プリオン蛋白の高次構造を緩解し、かつ持続感染細胞でも有効であるものは見つかっていない。今回、異常型プリオン蛋白構造を緩解する薬剤や化合物を探索し、感染細胞でも有効な治療候補薬を求めてスクリーニングを行った。その結果、検討した限り全てのプリオン株感染細胞でも有効であり、なおかつ生体にすぐにでも使用できるものを発見した。

A. 研究目的

プリオンの産生を抑制する効果のある薬剤や化合物として、持続感染細胞を用いたスクリーニングで我々がこれまでに発見したきたものは、疾患動物において感染早期に投与を開始すると生命予後改善効果を発揮し予防治療薬として期待されるものであることをすでに報告して来た。しかし、いったん中枢神経系内に蓄積したプリオン（異常型プリオン蛋白）を分解あるいはその高次構造を緩解して分解し易くするものは、これまでに見つかっていない。本研究では、すでに存在している異常型プリオン蛋白を分解し易くする働きのある治療薬候補化合物の発見を目指す。

B. 材料と方法

・スクリーニング法： 異常型プリオン蛋白を含む持続感染細胞溶解液に、薬剤や化

合物を数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度を加えた後に、 37°C で30分間反応させた後に、プロティネース K（終濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加え 37°C で30分間反応させ、 0.1mM PMSF で反応をとめた。薬剤や化合物を加えないで同様な処理をしたものとプロティネース K（終濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）消化し PMSF 添加後に薬剤や化合物を加えたものを対照とした。異常型プリオン蛋白を超遠心で回収し、SDS-PAGE 泳動後、ウエスタンプロット法で解析した。

・持続感染細胞での効果： 各種プリオン株（RML、福岡1、22L）が持続感染したマウス神経芽細胞種細胞の培養液中に、構造緩解作用を持つ薬剤や化合物を添加し、3日間ほど培養を行い持続感染細胞中の異常型プリオン蛋白量への効果を調べた。また、正常型プリオン蛋白への影響をウエスタンプロット法、蛍光免疫染色やフローサイトメトリーなどで解析した。

・有効成分の同定： 発見した構造緩解作用を持つ薬剤は成分が十分には同定されていないものであったため、有効成分を同定しようとした。ゲル濾過による分画、等電点電気泳動による分画などを行ない、有効成分を含む画分の絞込みを行うとともに、構成成分の分析を行った。

(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

スクリーニングの結果、持続感染細胞溶解液中の異常型プリオン蛋白の高次構造を緩解する働きを持つ薬剤を発見した。この薬剤は、いずれのプリオン持続感染細胞においても 10 μ g/mL 前後で異常型プリオン蛋白量を減少させた。ウエスタンブロットの結果や蛍光免疫染色やフローサイトメトリーなどの解析から、この薬剤が正常型プリオン蛋白の産生量や細胞膜上での発現に影響を与えないことが推察された。一方、有効成分を同定するため、ゲル濾過で分画したところ 20 万以上の画分に活性成分の濃度が高いことがわかった。次に、この画分に緩い条件で加水分解を行い、その産物をゲル濾過で分画したものを検討したが、小さい分子量画分には活性はほとんど検出されなかった。さらに等電点電気泳動による分画等を行ない、有効成分を含む画分の絞込みを行ったところ、活性を持つ成分が弱酸性画分に高濃度に含まれることが判明した。そこで、構成成分の分析を進めたが、これまでに有効成分の同定に成功していない。しかし、有効成分が蛋白

質であることを示唆する実験結果が得られた。

D. 考察

プリオンの本体である異常型プリオン蛋白は、いまだにその詳細な高次構造は判明していないものの、 β シートに富む構造をしており、この高次構造の緩解には高濃度の尿素やカオトロピックイオンが必要であることがわかっている。異常型プリオン蛋白の高次構造を緩解し、生体にも使用できるものとしてはテトラサイクリンや β シート・ブレイカー・ペプチド等が知られている。しかし、これらは試験管内では有効であるものの、プリオン持続感染細胞では無効であることが知られている。これまでに、異常型プリオン蛋白の高次構造を緩解し、かつ持続感染細胞でも有効であるものは見つかっていない。今回発見した薬剤は、検討した限り全てのプリオン株感染細胞でも有効であり、なおかつ生体にすぐにでも使用できるものである。

今後は有効成分の同定、さらに詳細な作用機序の解明と、疾患動物での効果について検討を行う。

E. 結論

異常型プリオン蛋白の高次構造を緩解し、かつ持続感染細胞でも抗プリオン作用を発揮する薬剤を発見した。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 pp.41-66, 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
- 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。臨床神経科学 24(3):313-316, 2006
- ## 2. 学会発表
- 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
- 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-347818、2005 年 12 月 1 日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ。特願 2005-371821、2005 年 12 月 26 日

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

昨年度報告した抗プリオン成分について、その薬物体内動態について動物で検討を行った。その結果、この成分は、皮下に投与した際には長時間をかけて徐々に血管内に吸収され、血管内で長期間にわたり安定に存在することがわかった。血管内からプリオン病の標的臓器である脳実質内にどのように移行するのかわからないが、この成分を脳室内に直接投与した実験結果から、この成分が直接脳内で抗プリオン作用を発揮していることが示唆された。

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検討を行い、ある抗プリオン成分が極めて期待できることを昨年度報告した。今年度は、その抗プリオン成分について、疾患動物を用いて薬物の体内動態を解析した。

白成分そのものあるいはその修飾体が行因子としてプリオン病の標的臓器である脳にまで到達するのか、あるいは抗プリオン蛋白成分により誘導される生体因子が行因子であるのかを検討した。さらに、脳内や血管内に直接投与した抗プリオン蛋白成分が、治療効果を発揮できるかどうかを検討することにより、この成分が実効因子そのものである可能性を検証した。

B. 研究方法

薬物体内動態の解析

抗プリオン蛋白成分を含む化合物をハムスターの背部皮下に投与し、経時的に血清を採取し、血清中の抗プリオン効果を持つ因子の存在を持続感染細胞を用いてアッセイを行った。さらに、除アルブミン処理を行った血清を各種酵素や各種 pH バッファーや加熱処理等を行い、どのような処理により血清中の抗プリオン活性が失われるか検討することにより、抗プリオン蛋

（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

薬物体内動態の解析

抗プリオン成分について、ハムスターへの皮下投与を行った際のその薬物体内動態について検討を行った。皮下に単回投与した後に数時間、数日おきに末梢静脈を採

血し、血清中の抗プリオン活性の存在をプリオン持続感染細胞を用いてアッセイしたところ、抗プリオン活性は数時間後より数週間にわたり認められた。一方、皮下に投与した成分は1週間以内にほとんど消失していた。血清を除アルブミン処理を行い、各種分解酵素やアルカリ、酸などの各種pHバッファーで処理を行ったり、加熱処理を行ったり、各種のcut off値をもつフィルターで処理したところ、血清中の抗プリオン活性の生化学的性質は抗プリオン成分の生化学的性質と同一であることが判明した。これらの結果より、皮下に投与した抗プリオン成分が、そのままあるいは何らかの修飾を受けて血液中に移行していることが判明した。次に、血液中のその成分が脳内に直接移行するかどうかは、直接検討することが出来なかったため、抗プリオン成分を直接脳内（脳室内）や末梢血管内に投与し、治療効果があるかどうかを検討した。その結果、脳内や血管内に直接投与した抗プリオン成分に治療効果を認めた。

D. 考察

昨年度の報告で、抗プリオン成分を含む化合物は、動物の背部皮下への単回投与で、著明な生命予後改善効果が認められが、複数回投与による加重効果が見られないことを指摘した。また、感染以前のかなり前の時期に単回投与しても著明な生命予後改善効果が認められることを指摘した。今回の薬物体内動態解析の結果は、抗プリオン成分が長時間をかけて徐々に血管内に吸収され、血管内で長期間にわたり安定に存在することを示唆しており、この薬物動

態はこの成分を含む化合物の複数回投与に加重効果がないことや発症以前投与に予防効果があることを説明できる。血管内からプリオン病の標的臓器である脳実質内にどのように移行するのかは不明であるが、血管内や脳内に直接この成分を投与した実験結果から、この成分が血管内から直接脳内に移行し抗プリオン作用を発揮していることが示唆された。

なお、昨年度指摘したこの薬効成分の最適化とより詳細な作用機序解明については、今年度は成果が得られなかったため、それらの検討を続け、実用化に一步でも近づける。

E. 結論

昨年度報告した抗プリオン成分の薬物体内動態を解析し、この成分の複数回投与に加重投与効果がないことや発症前投与に予防効果があることを説明できる知見を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 pp.41-66, 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方法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005
- 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。臨床神経科学 24(3):313-316, 2006
2. 学会発表
- 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 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
- 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
- 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、

丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-347818、2005年12月1日

工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ。特願 2005-371821、2005年12月26日

プリオン病の画期的治療法の開発のための基礎的研究

分担研究者：西田教行 岐阜大学人獣感染防御研究センター・助教授

研究協力者：古川ひさ子， 高倉由佳， 川嵯真 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

CJDの神経再生療法の開発に向けて、初代培養骨髄間質細胞（以下MSCと略）を用いて神経への分化能とプリオン病原体感染に対する感受性について基礎検討を行った。ウイスターラット（3週齢オス）の大腿骨より骨髄を採取しDezawaらの方法に従いMSCを分離、初代培養を行った。分離培養されたMSCは成長因子等による刺激によって神経様の細胞へと分化した。ラットMSCは正常PrPを発現しており、またマウス、ハムスター、ウシ、およびヒトのMSCでも同様にPrPの発現を認めた。ラットMSCを用いてGSS由来の感染因子がex vivoにて長期持続感染しうることを見だし、さらに感染マウス骨髄から得たMSCを培養したところ、異常PrP産生をウェスタンブロット法にて検出できた。これらの結果から初代培養MSCは神経前駆細胞としての再生医療に用いるには有力な候補であるが、プリオン病原体感受性細胞であるため、移植後の定着、機能回復を期待するには人為的に病原体抵抗性を付加する必要があると思われた。

A. 研究目的

プリオン病の発症遅延薬剤の開発が進んでいるが、発症後の投与によって効果を発揮する薬剤はまだない。早期に治療を行い発症を遅延できたとしても既に失われた神経機能を回復させる方法もまた皆無である。本研究では細胞移植による神経再生/脳機能回復を目指し、そのための基礎的検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 生体由来幹細胞（骨髄間質細胞MSC）の分離培養。Wistar rat、3週齢オスの大腿骨及び腓骨を採取後、長骨の上端および下端を切除し培養液を満たしたシリンジにて骨髄を押し出し、採取した細胞を37℃5%CO₂下に2日間培養。培養液はαMEM, 15%FBSを用いた。その後浮遊細胞は吸引除去し、付着系細胞群をトリシプシン処理し継代培養をおこない

以下の実験を行った。ウシ（ホルスタインおよび黒毛和牛）、ハムスター（Golden Syrian Hamster）の骨髄採取も同様に行った。ヒト由来MSCは

- 2) MSCの分化誘導。rat MSCの3継代もしくは4継代細胞を以下の4種類の方法で分化誘導を行った。a) in vitro blood brain barrier culture model (BBB kit)の培養上清の添加 b) cAMP/bFGF 成長因子カクテルの添加 c) Notch 導入と成長因子カクテルの添加 d) JAK3 inhibitor 成長因子カクテルの添加（詳細は省略）各処理後、継時的に細胞形態を観察しまた神経特異的因子の免疫染色を行った。
- 3) Ex vivo 感染実験。rat 継代(1回)GSS 感染因子 (Nu-1株)を接種後発症したrat brain homogenate 0.2%をMSC培養液に添加し37℃にて72時間培養後継代培養を行い、各継代

毎に蛋白抽出を行い ProteinaseK 処理後 PrP の検出をウェスタンブロッティング法にて行った。

- 4) 感染マウス骨髄細胞の分離培養。マウス順化 GSS 株 (福岡 1 株) およびマウス BSE 株 (moBSE-UK) の感染脳乳剤 (10%) を 4 週齢オス ddY マウスに脳内接種して感染マウスを作成。発症前後 (感染後 16 週前後) にて大腿骨を採取。Rat と同様の手法にて骨髄細胞を分離培養した。2 もしくは 3 継代後の付着細胞を回収し蛋白抽出を行い異常型 PrP の検出に用いた。
- 5) 異常 PrP の検出 (省略)

(倫理面への配慮)

動物実験は所属施設の動物実験委員会の許可を得て、同施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

- 1) ラット MSC 細胞は比較的容易に分離することに成功した (figure 1b)。3-4 回の継代培養後は形態的にはほぼ均一な細胞集団となった。成長因子等による分化誘導では 3-4 日後に bipolar な神経様の形態へと変化が認められ、BBBkit 培養上清を添加した場合にもっとも高頻度に神経様の細胞が出現した (figure 1a)。神経細胞特異的マーカーのひとつである MAP1ab に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色したところ、多くの細胞が陽性であったが (1c; green)、同時に未分化な細胞のマーカーである fibronectin にも陽性の細胞が見られた (red)。
- 2) ラットのほかウシ、ハムスター、マウスの骨髄からの MSC 分離培養を試みたところいずれも付着系の細胞集団を得ることは出来たが増殖速度にはばらつきがあり、また形態的に

は多様な細胞集団が認められた (figure 2a)。ヒトおよびウシの MSC はラットと非常に類似した fibroblast 様の形態を示し均一性もあり 10 代以上継代培養が可能であった。これらの種々の骨髄由来の付着系細胞集団における PrP の発現をウェスタンブロッティングにて検討したところいずれの細胞においても brain における発現と同等の発現を認めた (figure 2b)。

- 3) ラット MSC (4 継代後) を用いて GSS 脳乳剤への暴露を行い、継代培養したところ感染後 2 回継代したところから (10 days post inoculation) Proteinase K 抵抗性 PrP (以下 PrP-res) を認めシグナルが次第に増強していった (figure 2c)。現在まで 50 継代以上 (約一年) の培養を続けているが PrP-res の産生は維持されている。この細胞における感染性を確認するために現在ラットを用いたバイオアッセイを行っている。
- 4) マウスプリオン株を脳内接種後発症した ddY マウスより MSC を分離培養し増幅したのちに蛋白質を回収 (約 1 mg) し PrP-res の存在を検討したところ、BSE 感染マウスでも Fukuoka-1 株感染マウスでも PrP-res を認めた。つまり感染個体においても MSC 細胞が病原体に感染していること示唆している。現在感染早期から発症前の骨髄を採取して検討を行っている。

D. 考察

骨髄 MSC 細胞は手技的には比較的容易に分離培養が可能であり増殖もさかんで移植療法に必要な細胞数を得ることができ、特に自家移植を行うには非常に優れた細胞ソースである。間葉系の脂肪細胞、骨芽細胞などへの分化能は以前から知られており、近年は神経系やグリア細胞、筋芽細胞への分化能を有することが報告さ