

きる。4個の内の2個では、その因子のノックダウンによりプリオン蛋白質の発現亢進が見られるにも関わらず、異常型プリオン蛋白産生を減少させる興味深い因子であった。

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、興味深い候補として4個の遺伝子を同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. Cell. Mol. Neurobiol.,

(in press)

2. Fukuuchi T, Doh-ura K, Yoshihara S, Ohta S: Metal complexes with superoxide dismutase-like activity as candidates for anti-prion drug. Bioorg. Med. Chem. Lett., 16:5982-5987 2006
3. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. J. Neurochem., 99:198-205 2006
4. Sasaki K, Doh-ura k, Ironside J, Mabbott N, Iwaki T: Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. J. Pathol., 209(4):484-91 2006.
5. Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K, Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T: Increased asymmetric pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura mater graft. Neuropathol., 26:82-88 2006.
6. Shintaku M, Yutani C, Doh-ura K: Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study.

- Neuropathol., 26:43-49 2006.
7. 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., 29(5):927-932 2006
  8. 逆瀬川裕二、堂浦克美. プリオン病の治療 —その現状と展望—. Brain Medical, 18(4):356-370, 2006
  9. 逆瀬川裕二、堂浦克美. 孤発性クロイツフェルトーヤコブ病と6種類のサブタイプ. Medical Briefs in Brain & Nerve, 15(4):5-6, 2006
  10. 石川謙介、堂浦克美. プリオンイメージングの試み. Clinical Neuroscience(臨床神経科学), 24(3):313-316, 2006
2. 学会発表
1. Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, October 16, 2006
  2. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, Paris, November 21, 2006
  3. Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y: Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals for prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
  4. Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
  5. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
  6. Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C. J., Doh-ura K: Effectiveness of an orally administered anti-prion chemical. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
  7. Rainov N. G., Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V: Experimental treatments for human prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006
  8. Sakasegawa Y, Doh-ura K: A coumarin antibiotic Novobiocin directly induces aggregation of the cellular prion protein. The 20th IUBMB Congress and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006
  9. 堂浦克美: プリオン病の治療戦略を展望する —即戦力的方略—. 第28回日本薬学会九州支部コロキウム、福岡、2006年10月21日

10. 堂浦克美: プリオン病の治療開発。  
第64回慶應神経病理カンファレンス、  
東京、2006年9月9日
  11. 照屋健太、魚本幸、堂浦克美: プ  
リオン感染細胞からの迅速かつ効率  
的なPrPres回収法。2006年プリオン  
研究会、安比高原、2006年9月2、3  
日
  12. 川崎ゆり、川越敬一、陳忠正、堂  
浦克美: 経口投与型プリオン病治療予  
防薬の開発に関する研究。2006年プリ  
オン研究会、安比高原、2006年9月2、  
3日
  13. 堂浦克美、魚本幸、西澤桂子、川  
崎ゆり、伊波真彦: Prophylactic  
effect of dietary seaweed fucoidan  
against enteral prion infection.  
2006年プリオン研究会、安比高原、  
2006年9月2、3日
  14. 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫:  
プリオン病に対するペントサンポリ  
サルフェート脳室内持続投与の試み  
(続報)。2006年プリオン研究会、安比  
高原、2006年9月2、3日
  15. 石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、  
西田教行、岩城徹、堂浦克美:  
Styrylbenzoazole 誘導体を用いたプ  
リオンアミロイド斑のイメージング  
および伝達性海綿状脳症の治療。2006  
年プリオン研究会、安比高原、2006  
年9月2、3日
  16. Sakasegawa Y, Hachiya NS, Doh-ura  
K, Kaneko K. Heat shock protein 90  
kDa unfolds the copper loaded full  
length recombinant prion protein in  
a nucleotide dependent manner. 2006  
年プリオン研究会、安比高原、2006  
年9月2、3日
  17. 照屋健太、堂浦克美: 蛋白質ライ  
ゲーションを利用したカルボキシ末  
端選択的に修飾を施したプリオン蛋  
白質の調製。東北大学バイオサイエン  
スシンポジウム、仙台、2006年5月  
29日
  18. 山口恭史、三浦隆史、照屋健太、  
堂浦克美、竹内英夫: 銅イオンによる  
プリオンタンパク質のコンホメーショ  
ン変化。東北大学バイオサイエンスシ  
ンポジウム、仙台、2006年5月29日
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 堂浦克美: コンフォメーション病医  
薬組成物。特願2006-117294、2006年  
4月20日
  2. 堂浦克美、照屋健太、竹中繁織、大  
塚圭一: 異常型プリオン蛋白質濃縮方  
法、および除去方法。特願2006-071881、  
2006年3月15日
  3. 竹中繁織、大塚圭一、堂浦克美、照  
屋健太: 電気化学的抗原検出法とその  
ための装置並びに検出チップ。特願  
2006-65744、2006年3月10日

プリオン増殖に関する遺伝子の探索

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究協力者 中満 智史 北海道大学・大学院獣医学研究科

研究要旨

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から、感受性サブクローンで発現が高い 44 遺伝子をプリオン増殖に関与する宿主因子の一次候補として選抜した。これら遺伝子に対する siRNA をプリオン持続感染 N2a5 (ScN2a5) に導入して、遺伝子の発現抑制が PrP<sup>Sc</sup> の産生に及ぼす影響を検討した。PrP<sup>Sc</sup> および total PrP 量に加え、細胞のバイアビリティを siRNA の効果判定の評価に用いた。その結果、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Clcn5 の 6 遺伝子に対する siRNA が、ScN2a5 における PrP<sup>Sc</sup> 産生を低下させることが判明した。この効果は siRNA の長期処理によっても確かめられた。また、ScN2a5 とは異なるプリオン感受性サブクローンである ScN2a3 を用いて同様の実験を行った結果、前述 6 遺伝子のうち、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2 および Clcn5 の 4 遺伝子に対する siRNA が、ScN2a3 においても PrP<sup>Sc</sup> 産生を抑制した。以上の結果から、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2 および Clcn5 の 4 遺伝子産物は N2a におけるプリオン増殖に関与することが示唆された。

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。

昨年度までの研究で、我々は、プリオン感受性および非感受性 Neuro2a (N2a) サブクローンの遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により比較解析し、プリオン感受性サブクローンで高発現する遺伝子を同定してきた。さらに、それら遺伝子の発現を siRNA によりノックダウンさせ、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積への影響を検討

してきた。しかし、遺伝子発現ノックダウンによる PrP<sup>Sc</sup> 産生への影響を正確に評価するためには、細胞のバイアビリティへの影響やオフターゲット効果など、より慎重に評価を進める必要がある。

そこで、本年は、siRNA による遺伝子発現ノックダウンに伴う PrP<sup>Sc</sup> 量の変化を、細胞の total PrP (PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の総和) と PrP<sup>Sc</sup> 量の変化、および細胞のバイアビリティ等から、より厳密に判定することを試みた。また、選抜された遺伝子の PrP<sup>Sc</sup> 産生への関与が、使用した細胞にのみ特異的な現象であるかを調べるために、複数のプリオン持続感染 N2a サブクローンを使用して、複数のプリオン持続感染 N2a サブクローンを使用して、siRNA による遺伝子発現抑制の効果を評価した。

## B. 研究方法

プリオン感受性 N2a サブクローンである N2a5 と N2a3、およびこれらに Chandler 株が持続感染した ScN2a3 と ScN2a5 を使用した。

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。 $\Delta\Delta C_T$  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 の検出を行った。

PrP<sup>Sc</sup> および  $\alpha$ -tubulin の検出はドットブロットにより行なった。細胞を 200  $\mu$ 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、 $\alpha$ -tubulin の検出用に、100  $\mu$ 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  $\mu$ l の lysate は Proteinase K (20  $\mu$ 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。 $\alpha$ -tubulin は抗  $\alpha$ -tubulin モノクローナル抗体(mAb)により検出した。PrP<sup>Sc</sup> 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。

細胞のバイアビリティは、WST8 cell counting kit (Dojin) により測定した。測定 1 時間前に WST8 試薬を 1/10 量加え、1 時間培養後、培養上清を 110  $\mu$ l 回収して 450nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

(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

昨年度に引き続き、DNA マイクロアレイ解析により選抜された遺伝子に対する siRNA を、プリオン持続感染細胞 ScN2a5 に導入して PrP<sup>Sc</sup> の産生が抑制されるか否かを精査した。合計 10 回以上の試験を重ねた結果、一次スクリーニングとして、Fn1, Mst1, Fthfd, Arcmx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Clcn5, および Hrh1 の 9 遺伝子を、プリオンの増殖に関与する宿主因子の候補として絞り込んだ。これらの 9 遺伝子について、さらに詳細に検討するために、siRNA の導入によるバイアビリティの低下についても考慮して二次スクリーニングを行った。その結果、Arcmx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Clcn5 の 6 遺伝子に対する siRNA が ScN2a5 における PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することが明らかとなった(図 1)。

Arcmx2 に対する siRNA 処理は細胞のバイアビリティには殆ど影響しないが、PrP<sup>Sc</sup> 量を約 60%程度まで減少させた。また、total PrP 量には殆ど影響しなかった。同様な傾向が Wbp2 に対する siRNA で認められた。Fxyd2 に対する siRNA 処理は細胞のバイアビリティに影響しなかったが、PrP<sup>Sc</sup> 量は 40-50%程度まで減少させた。また、total PrP 量も減少傾向が認められた。同様な傾向が Gp1bb に対する siRNA で認められた。Clcn5 に対する siRNA 処理は細胞のバイアビリティを約 30%程度低下させるが、PrP<sup>Sc</sup> 量および total PrP 量は大きく減少した。

この結果を確認するために、siRNA の長期間処理による total PrP および PrP<sup>Sc</sup> 量の変化を調べた (図 2)。その結果、長期処理によっても PrP<sup>Sc</sup> 量の減少が確認できた。ただし、Gp1bb に対する siRNA 処理では、単回処理の場合と異なり total PrP 量も大きく減少させた。

さらに、ScN2a5 とは異なるプリオン感受性サブクローンである ScN2a3 を用いて同様の実験を行った (図 3)。その結果、ScN2a5 を用いた場合に PrP<sup>Sc</sup> 産生に対する抑制効果が認められた siRNA のうち、Arcmx2, Fxyd2, Clcn5 および Gp1bb が、ScN2a3 においても PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することが確認された。また、ScN2a3 を siRNA で長期間処理した場合でも、

これら 4 つの siRNA は PrP<sup>Sc</sup> 産生を抑制した (結果は示さず)。また、ScN2a5 の長期処理の場合と同様に、ScN2a3 においても Gp1bb に対する siRNA の長期処理により total PrP 量も大きく減少した (結果は示さず)。

#### D. 考察

プリオン感受性および非感受性の N2a サブクローンの遺伝子発現レベルの比較解析から、プリオン感受性のサブクローンで高発現する遺伝子を選抜し、それらの発現を抑制して PrP<sup>Sc</sup> 産生に及ぼす影響を調べた。ScN2a5 を用いてスクリーニングを進めた結果、最終的に、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Clcn5 の 6 遺伝子の発現抑制がプリオン持続感染細胞における PrP<sup>Sc</sup> 産生を減少させた。このうち、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2 および Clcn5 の 4 遺伝子の発現抑制は、ScN2a5 とは異なるプリオン感受性サブクローンである ScN2a3 においても、PrP<sup>Sc</sup> の産生を減少させたことから、これら 4 遺伝子の産物はプリオン持続感染 N2a 細胞において、PrP<sup>Sc</sup> の産生に影響を及ぼす宿主因子である可能性が示唆された。

これらの遺伝子産物が、PrP 分子との直接作用を介して PrP<sup>Sc</sup> の産生に影響するのか、あるいは、これらの発現抑制が PrP<sup>Sc</sup> の産生に必要な細胞内の微小環境を変えることにより、間接的に PrP<sup>Sc</sup> の産生に影響するのかは、現時点では不明である。

今後は、これらの遺伝子産物が、実際にもどのように PrP<sup>Sc</sup> 産生に関与するかを検討する必要がある。現在、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2 および Clcn5 に対する抗ペプチド抗体を作製中である。抗体が出来次第、遺伝子産物の定量解析を開始する予定である。同時に、これらの蛋白質のプリオン持続感染細胞における細胞内局在等を明らかにして、プリオン増殖との関連を調べる予定である。

#### E. 結論

プリオンの増殖に係わる宿主因子の同定を目的として、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 の比較解析を実施して、プリオンの増殖 (PrP<sup>Sc</sup> の産生) に関与すると考えられる宿主遺伝子として、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2 および Clcn5 の 4

遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物がどのようにプリオン増殖に関与するかについては、遺伝子産物の解析を中心とした今後の研究が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H, and Ishiguro, N: Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci.* 68: 27-33 (2006)
- 2) Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route. *Jpn. J. Vet. Res.* 53: 150-159 (2006)
- 3) Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, and Horiuchi M: Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 485-491 (2006)
- 4) Watanabe Y, Inanami., Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Inagaki F, and Kuwabara M: Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350: 549-556 (2006)

##### 2. 学会発表

- 1) Karino, A., Furuoka, H., Kimura, K., Shinagawa, M., Horiuchi, M. : Generation of mAb that distinguishes PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup> and neutralizes prion infectivity. NeuroPrion2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 2) Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C.-L., Nagatsuka, T., Uzawa, H., Horiuchi, M. : Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranoside and their polymers.

- NeuroPrion2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 3) Horiuchi. M. : Propagation and inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation in vitro and in vivo. The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine (7 Sept. 2006, Sapporo, Japan)
  - 4) 宋昌鉉、古岡秀文、金チャンラン、鈴木章夫、前田秋彦、堀内基広：抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価。 2006 年プリオン研究会 (2-3 Sept. 2006, 岩手)
  - 5) 中満 智史、瓜生 匡秀、堀内 基広：プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンをを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索。 第 54 回日本ウイルス学会 (212-23 Nov. 2006, 名古屋)
  - 6) 瓜生匡秀 堀内基広：マウス神経芽腫細

胞 Neuro2a(N2a)サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の相違.  
第 54 回日本ウイルス学会 (212-23 Nov. 2006, 名古屋)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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。

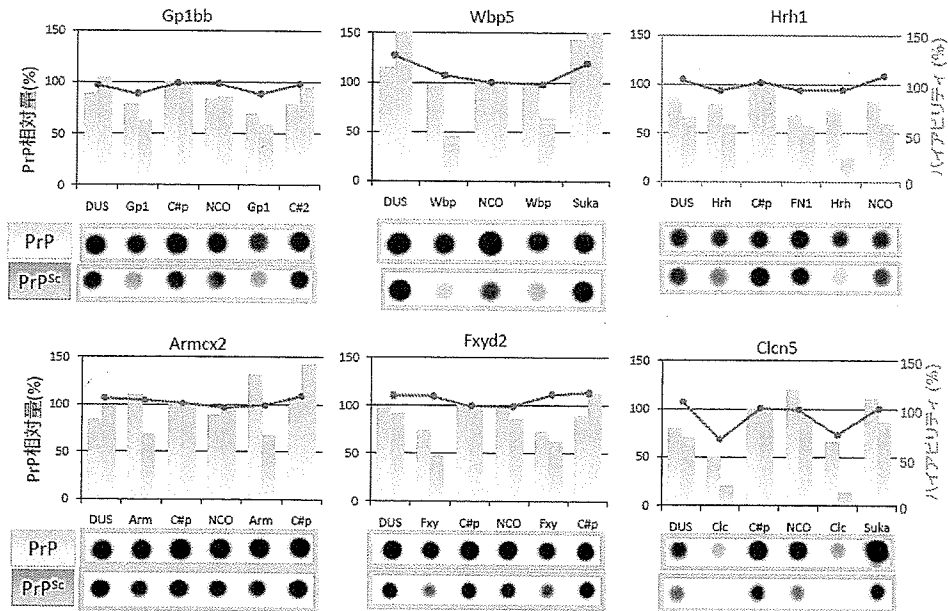
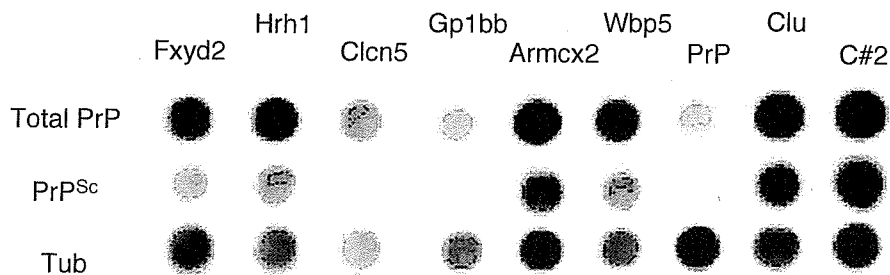


図1. siRNA処理によるtotal PrP、PrP<sup>Sc</sup>量の変化と細胞のバイアビリティ  
 ScN2a5にsiRNAを導入し、72時間後にtotal PrP(黄)およびPrP<sup>Sc</sup>(青)をドットプロットにより検出した。また、細胞のバイビリティをWST8アッセイにより調べ、グラフに示した(赤)。試験したsiRNAはグラフの上に示した。C#pは陰性対象のsiRNA、DUS、NCOはPrP量に影響を与えないことが判明しているsiRNAあり、陰性対象と同等として使用した。



	Fxyd2	Hrh1	Clcn5	Gp1bb	Armcx2	Wbp5	PrP	Clu	C#2
PrP <sup>Sc</sup>	17.7	39.0	6.4	11.6	69.2	61.0	3.7	100.1	100
Total PrP	31.4	50.9	32.7	11.6	68.1	65.7	4.9	110.0	100

図2. siRNA処理の長期処理によるPrP量の変化

ScN2a5を3継代連続でsiRNAで処理した後、total PrPおよびPrP<sup>Sc</sup>を検出した。図上に使用したsiRNAを示す。

陰性対象のsiRNA(C#2)処理時のtotal PrPおよびPrP<sup>Sc</sup>量を100%としたときの、各試料における相対値を表に示した。



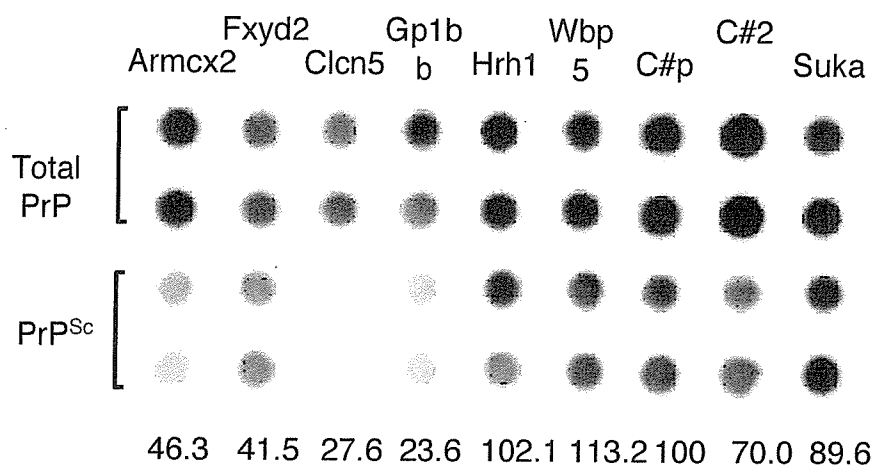


図3. ScN2a3におけるsiRNA処理の影響

ScN2a3に図上に示したsiRNAをトランスフェクトし、72時間後のtotal PrPおよびPrP<sup>Sc</sup>量をドットプロットにより解析した。上はtotal PrP、下はPrP<sup>Sc</sup>の検出を示す。実験はduplicateで実施し、蛋白量をtublinの検出により補正した。図下に、陰性対象siRNA(C#p)で処理した時のPrP<sup>Sc</sup>量を100%とした時の、各試料中のPrP<sup>Sc</sup>の相対値を示した。

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

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プリオンとの相互作用測定、②NMRによる結合サイトの決定、③GN8 類縁体の有機合成、④その *in vivo* スクリーニングを行った。表面プラズモン共鳴測定により、GN8 がプリオンに特異的に結合することが明らかとなった。またNMR測定により、結合サイトが同定された。またGN8 類縁体を有機合成し、その一部に対して、抗プリオン作用を確認した。また *in vivo* 実験から、GN8 の脳内投与によりプリオン感染動物の寿命が優位に延長することが判明した。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。もしこの描像が正しければ、細胞型（正常型）に結合し、その立体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部位を推定した。さらにこの部位に結合し、構造変換を抑制する薬剤を、*in silico* スクリーニングにより探索した。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、①プリオンとの相互作用測定、②NMRによる結合サイトの決定、③GN8 類縁体の有機合成、④その *in vivo* スクリーニング、という一連の実験を行った。

B. 研究方法

- ①Biacore を使い、GN8 とリコンビナント・プリオン蛋白質との相互作用を測定する。
- ②GN8 の存在下、若しくは非存在下で、NMR の HSQC スペクトルを取り、結合サイトを同定する。
- ③GN8 の類縁体を有機合成し、その活性を *ex vivo* で測定する。
- ④プリオン感染動物を用いた *in vivo* 実験（脳内投与）により、GN8 の治療効果を確認する。

（倫理面への配慮）

動物実験にあたっては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方

針」(平成18年文部科学省告示第71号)に従う。また、マウスに対するプリオン感染実験に関しては、岐阜大学組換えDNA実験・研究用微生物安全委員会の承認を得ている(H18.3.14)。

### C. 研究結果

抗プリオン物質 GN8 がリコンビナントプリオン蛋白に対して実際に結合するかどうかを、を BIAcoreT100 を用いて調べた。全長のマウス・リコンビナント・プリオンをセンサーチップ(CM5)に固定した。GN8(10, 20, 30, 40 and 50  $\mu$ M) を running buffer (10% DMSO in PBS) に溶解し、1分間に 20  $\mu$ l/min の流速で流した。

(図1参照)。これらの結果から、GN8 が実際にリコンビナントプリオン蛋白に対して結合し、その解離定数は、4  $\mu$ M 程度であることが分かった。

次に、全長のマウス・リコンビナント・プリオンの NMR スペクトル (HSQC) を GN8 の存在下及び非存在下で測定した(図2参照)。その結果、GN8 の特異的結合サイトが、N159 と E196 であることが明らかとなった。これらの部位は、ミリ秒からマイクロ秒の遅いタイムスケールの揺らぎを行っており、遺伝性のヤコブ病における変異部位とも関連していることが確認された。

また、GN8 の類縁体を複数(60種類)、有機合成し、抗プリオン活性を測定した結果、そのいずれにおいても、ほぼ抗プリオン活性が認められた。このことより、GN8 の基本骨格を保ちつつ、抗プリオン作用が最大になるようにその化学構造を最適化することが可能であることが分かった。

プリオン感染マウスに対し、GN8 を脳内投与したところ、特に副作用もなく、優位な寿命延長効果が認められた。このことから、GN8 は、抗プリオン薬のリード化合物とし

て非常に有望である、と考えられる。現在では、末梢投与においても有効であることが分かってきている。

以上により、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。さらにこのような機構によりプリオンに作用する GN8 の化学構造をさらに最適化することにより、より効果の高いプリオン治療薬を開発することが可能になる、と考えられる。

### 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備することが重要である。本研究により、*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、その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。

特に、プリオン病のようなタンパク質の立体構造変換が問題となるような場合に、タンパク質の立体構造を安定化させる低分子化合物が有効であることが、明らかとなった。このことは、今後のプリオン病治療薬開発において、大きな進歩である、と考えられる。

### E. 結論

計算機シミュレーション、構造生物学的測定、及び生物アッセイにより、新規抗プリオン物質を見出し、抗プリオン化合物の作用メカニズムを原子レベルで明らかにすることが出来た。さらに、抗プリオン化合物の化学構造の最適化を行うための論理的創薬基盤を構築することが出来た。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kiminori Kimura, Hisataka Moriwaki, Masahito Nagaki, Masanao Saio, Yasunori Nakamoto, Makoto Naito, Kazuo Kuwata, and Francis V Chisari. : Pathogenic role of B cells in anti-CD40 caused necro inflammatory liver disease. Am. J. Pathol. 168(3):786-95. 2006

K.Sukegawa-Hayasaka, Z. Kato, H. Nakamura, S. Tomatsu, T.Fukao, K.Kuwata, T. Orii, N. Kondo. : Effect of Hunter Disease (mucopolysaccharidosis type $\alpha$ ) mutations on molecular phenol types of iduronate-2-sulfatase : Enzymatic activity, protein processing and structural analysis. J Inherit Metab Dis. 29.755-761. 2006

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

桑田一夫 : プリオン. Drug Delivery System (DDS) 21, 156-157, 2006

連載“話題のウイルス” NO.12 プリオン  
桑田一夫 Drug Delivery System (DDS) Vol.21 NO.2 MARCH, 2006, 156-157

プリオン病の発症と伝播機構 - 特集 アミロイドの謎は解けるか? : プリオン病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く - 山口圭一, 松本友治, 児玉耕太, 岸直人, 桑田一夫 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 151-155 2007年1月22日

アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指して : 現状と展望, 夢 - 特集 アミロイドの謎は解けるか? : プリオン

病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く - 後藤祐児, 桑田一夫, 関島良樹, 田中元雅, 内木宏延, 永井義隆, 松崎勝巳, 樋口京一 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 181-185 2007年1月22日

2. 学会発表

Kuwata K: EMBO-FEBS Workshop on Amyloid Formation. Italy, Mar 25-28, 2006

Dynamics Based Drug Design for Prion Diseases Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan. November 12-16, 2006

3. その他

著書

20世紀の2大発見 - 量子力学と分子生物学, 『論理的創薬入門 - 構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 9-24

フーリエ変換とタンパク質・核酸の基本立体構造, 『論理的創薬入門 - 構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 25-49

タンパク質・核酸の構造ダイナミクス, 『論理的創薬入門 - 構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 91-108

計算機実験の基礎, 『論理的創薬入門 - 構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 137-145

分子構造と生理機能, 『論理的創薬入門 - 構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 168-181

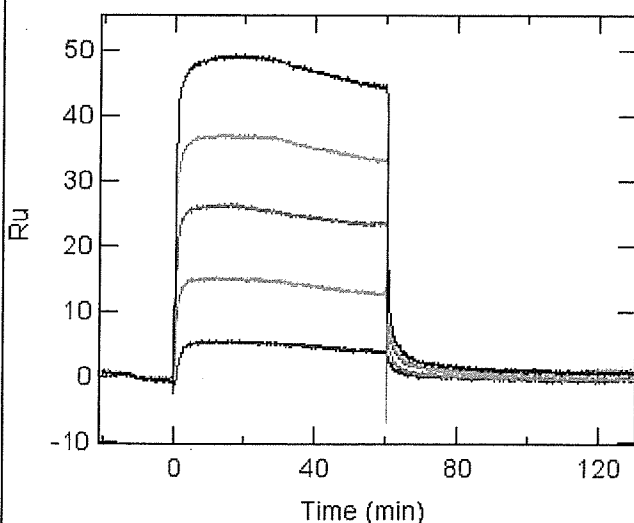
タンパク質の構造異常, 『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 182-194

タンパク質のコンホメーション制御—分子手術法, 『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著, 共立出版 (東京), 2006, 195-209

H. 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

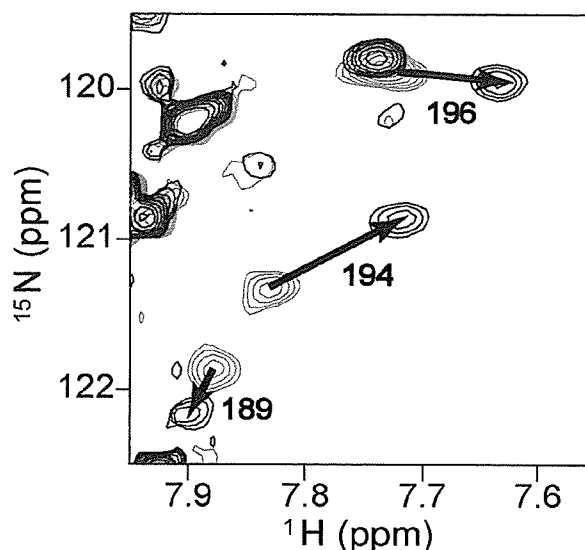
図1 Biacore 実験



プリオンと GN8 との相互作用を BIAcoreT100 を用いて調べた。全長のマウス・リコンビナント・プリオンをセン

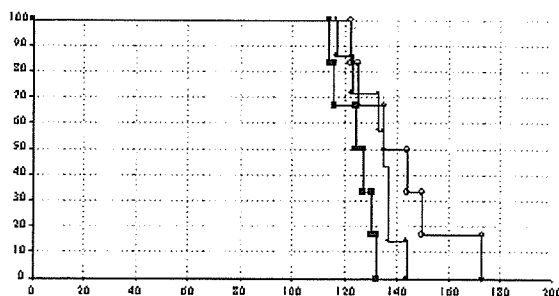
サーチップ(CM5)に固定した。GN8(10, 20, 30, 40 and 50  $\mu$ M) を running buffer (10% DMSO in PBS) に溶解し, 1分間に 20  $\mu$ l/min の流速で流した。データは, ブランクセンサーチップで補正した。

図2 NMR スペクトル



マウス全長プリオンの HSQC スペクトル。青は GN8 非存在下, 赤は GN8 存在下で測定したものである。GN8 の結合により, 結合部位周辺のアミノ酸の化学シフトが変化する。このことにより, GN8 の結合サイトが N159 と E196 に存在することが分かった。

図3 GN8 の寿命延長効果



GN8 の脳内投与により, マウスの寿命が優位に延長することが証明された。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

プリオン病患者に対する治療戦略における診断マーカー及び治療評価マーカーの評価

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

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の治療候補薬物としてin vitroの持続感染系や感染実験動物で有効な薬剤が多数知られつつあり、治療研究が報告されはじめている。治療を目指す上で治療薬を発症早期より投与することが最も重要であり、プリオン病の早期診断法の確立が急がれる。診断のためのより特異的なマーカーとして現在までに拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白が挙げられる。本年度は多数例による拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白の陽性率の結果を報告する。さらにプリオン病の患者における診断マーカーである脳脊髄液（タウ、14-3-3蛋白）と拡散強調画像以外の新規マーカーの検討を行ったので合わせて報告する。新規マーカーとして従来、多発性硬化症で高値を示すことが知られていた髄液中のオステオポンチンはプリオン病患者においても有意に異常値を呈し診断マーカーとして有用であることが明らかにできた。また平成18年度報告書にてキナクリンとペントサン投与における臨床的効果判定基準と髄液の生化学マーカーと画像検査を報告したが、さらに症例を増やし詳細な検討を行ったので報告する。その結果、病態の経過を最も鋭敏に反映できると思われたUnified MSA Rating Scales IIの修正版、髄液の生化学マーカー、画像検査の経過観察と剖検脳の部位別の病変の検討からCJD患者におけるキナクリン非投与群と投与群との違いはなかった。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。Unified MSA Rating Scales IIIでのSpO<sub>2</sub>の検討では夜間でのSpO<sub>2</sub>のキナクリン投与前後では減少する傾向があったため今後終夜ポリソムノグラフィー（PSG）を利用した検討が必要であると考えられる

#### A. 研究目的

急速に脳の変性を引き起こし数ヶ月以内に脳死状態に陥るプリオン病は、有効な治療法が全くない致死性疾患である。狂牛病の伝播による新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の出現や、本邦における汚染ヒト脳硬膜移植による医原性CJDの多発を背景に、治療あるいは病態進展阻止のための臨床方策の開発が急務となっている。プリオン病患者における世界で最初の大規模治験PRION1がキナクリンを用いて2005年より英国で開始された。2006年治験の応募が終了し、治験が継続されている。こうした流れの中で発症早期の正確な診断と病態把握のためのマーカーの開発が重要な課題になっている。本年度は多数例及びCJDにおける病型別での拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白の陽性率の結果を報告する。又拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白以外の新規マーカーの検討を報告する。さらに治療効果を判定するためのマーカーとして臨床的効果判定基準と髄液の生化学マーカーと画像検査について報告した。本年度は検討症例を増やし、Unified MSA Rating Scales IIの修正版、髄液の生化学マーカー、画像検査、CJD患者におけるキナクリン非投与群と

投与群との病理的な検討、生存期間について報告する。

#### B. 研究方法

- 1) プリオン病患者における拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白の診断の有効性の検討
  1. 対象  
対象はCJD患者(44例)とプリオン病以外の認知症患者(86例)とした。(表1)
  2. 方法
    - a. 対照群 (N=86)とCJD患者(N=44)の脳脊髄液14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) (Santuz Cruz及びIBL) 抗体を用いて検討を行った。
    - b. 対照群 (N=86)とCJD患者(N=44)において脳脊髄液中のTau蛋白定量(Innogenetics社)による比較検討を行った。
    - c. 対照群 (N=86)とCJD患者(N=44)において脳脊髄液中のS-100b蛋白、NSE蛋白はELISAにて測定した。
    - d. 対照群 (N=86)とCJD患者(N=44)において画像検査(拡散強調画像、FLAIR) .脳波による比較検討を行った。
    - e. CJD患者 (N=112) における画像検査(拡散強調画像)、脳脊髄液(t-tau蛋白、14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性)による比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の提供にあたり、患者及び患者家族に研究の内容・意義・検査結果のデータの公表など多岐にわたり、informed consentを得た。

## 2) 新規マーカーの検討

プリオン病では尿中での異常型プリオン蛋白様蛋白の存在が報告されている。そこでプリオン感染マウス腎での特異的遺伝子発現を検討した。得られた遺伝子の発現をCJD患者剖検脳と血漿・髄液で検討した。プリオン感染マウスの発症時の腎と正常腎のmRNAサブトラクション法にて強発現遺伝子のクローニングを行い、プリオン感染マウスと非感染マウス腎における遺伝子発現量の差をNorthern blot, in situ hybridizationで検討した。CJD患者における血清・髄液での発現も検討した。

## 3) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討

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、修正版Unified MSA Rating Scales IIとして症状変動の評価スケールとして利用し (表2) 本年度はキナクリン投与症例さらに非投与症例との差異を修正版Unified MSA Rating Scales IIを用いて検討を行った。

## 4) Haikらの方法を改変した病変部位別にサンプリングした半定量的病理学的検討

Haikの原著では脳の約10ヶ所をサンプリングし検討しているが (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) 我々は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ヶ所の検討を行った。また、我々は海綿状変化 (Grade 0-4)、神経細胞脱落・グリオーシス (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。

## 5) 予後調査について

平成12年から平成18年までの長崎大治療研究プロトコルに参加した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医師に委託した。

## C. 研究結果

### 1) プリオン病患者における拡散強調画像・脳

脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白の診断の有効性の検討

対照群 (N=86)とCJD患者(N=44)の脳脊髄液 (Tau蛋白定量, 14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性), S-100b蛋白、NSE蛋白)・画像検査 (拡散強調画像、FLAIR) 脳波における検討を行った。結果としてMRI拡散強調画像 90.9%, FLAIR 15.9%, 脳脊髄液 (Tau蛋白定量 95.5%, 14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) 88.6%, NSE蛋白 72.7%, S-100b蛋白27.2%), 脳波 59.1%であった (表5a)。我々はCJD患者の44症例の詳細の検討を行った。その詳細な検討ではまず孤発性 (古典的) CJDの患者では多くのケースでは発症から8週間以内に病院を受診することに注目し、早期を発症より8週間以内と定義し、検討を行った (表5b)。MRI拡散強調画像 90.5%, FLAIR 9.5 %, 脳脊髄液 (Tau蛋白定量 95.2%, 14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) 76.2 %, NSE蛋白 57.2%, S-100b蛋白9.5%) 脳波 0 %であった (図1)。これらの結果よりCJDの診断マーカーとしてMRI拡散強調画像、脳脊髄液中のTau蛋白定量、14-3-3蛋白の3項目での陽性率が高いため統計処理を行い、さらにこの3項目の組み合わせでの統計組み合わせを行った。早期及び全経過において最も感度・特異度が高い組み合わせはMRI拡散強調画像と脳脊髄液 Tau蛋白定量であった (表5)。プリオン病患者112例中の病型別分類のプロファイリングは表5で示す。又CJD患者 (N=112) における画像検査 (MRI拡散強調画像)、脳脊髄液 (t-tau蛋白、14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性)による比較検討の結果では古典型CJD (94例) において MRI拡散強調画像91.10%脳脊髄液 (t-tau蛋白、98.90% 14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) 95.70%であった。MM2皮質型4例においてMRI拡散強調画像100 %脳脊髄液 (t-tau蛋白100.0%, 14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) 50%であった。112例画像検査 (MRI拡散強調画像) 92.30%、脳脊髄液 (t-tau蛋白95.50%、14-3-3蛋白(14-3-3-β 定性) 86.60%であった (図2、表6)。

### 2) 新規マーカーの検討

マウスの発症時の腎と正常腎のmRNAサブトラクション法において6個のクローンが検出できた。6個のクローンについてそれぞれサブクローニングし、遺伝子を同定した。さらにNorthern blot法にてG3PDHではコントロールした上で3つの遺伝子が非感染マウスに比べ感染マウスにて1.4-1.5倍程度発現していた。非感染マウスに比べ感染マウスにて6.5倍以上強発現していた遺伝子がオステオポンチン (OPN) であった (図3) のこりの2つのクローンは非感染マウスに比べ感染マウスにて30-40%程度発現が減弱していた。非感染マウスと感染マウスの腎組織におけるin situ hybridizationにおいても感染マウスの腎にて高反応していた。又感染マウスの腎組織におけるin situ hybridizationにおいて腎での髓質や遠位尿管において2つのクローンが高発現している一方1つのクローンのみが発現が減弱し

ていた(図4)。

発症時での感染マウスでの異常プリオン蛋白はwestern blot 法にて脳、脾臓では検出可能であるが、腎臓、精巣においては正常プリオン蛋白のみしか検出可能でなく、異常プリオン蛋白の検出はできなかった。

そこでヒトプリオン病患者における血清及び髄液中の6つの遺伝子の発現を検討したが、いずれも血清中での発現は低く、髄液中でのオステオポンチン(OPN)の発現が著明であった(図5)。

### 3) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討について

平成18年報告書にて報告したようにスケールは修正版Unified MSA Rating Scales II及びIIIの有効性について報告した。修正版Unified MSA Rating Scales IIとして症状変動の評価スケールとして利用可能となった。本年度はキナクリン投与症例2症例増やし、さらに非対照症例を2症例増やし行った。これまでに12例のキナクリンの投与を終了した。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を利用すると有効であり、効果判定に有効である。

又今回の2症例を含め、現在までの症例の検討を行ったが、終夜ポリソムノグラフィ(PSG)の検討を行っていないものの、MSA Rating Scales IIIでのSpO<sub>2</sub>の検討では夜間でのSpO<sub>2</sub>のキナクリン投与前後では減少する傾向がある。又キナクリン投与前後でのapnea indexの前後の低下があり、生存期間の延長を支持する一因を担っている可能性が十分考えられた。

### 4) Haik 論文を利用した病変部位別にサンプリングした半定量的病理学的検討

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(図7)。

### 5) 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IVH、経管栄養を投与した患者のみとしたが、非投与患者においても生存期間も延長傾向にあった。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(図8)。

## D. 考察

### 1) プリオン病患者における拡散強調画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・Tau蛋白の診断の有効性の検討

多数例での脳脊髄液(t-tau蛋白、14-3-3蛋白)、MRI拡散強調画像における検討を行い、脳脊髄液t-tau蛋白が最も陽性率が高い

ことを証明した。112症例における病型分類での脳脊髄液(t-tau蛋白、14-3-3蛋白)、MRI拡散強調画像でのデータを示した。

### 2) 新規マーカーの検討

6個の遺伝子のプリオン感染マウスにて強発現しており、中でもオステオポンチン(OPN)が最も特異性が高く、CJD患者での髄液中のOPNは他の疾患に比べ、優位に高値だった。プリオン病でのOPNの関与が示唆された。

### 3) 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。修正版Unified MSA Rating Scales IIを利用するものの、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。キナクリン投与例及び非投与例での予後における比較は現在まだ生存例が正確ではないが、約1.6ヶ月程度延長している。この結果はイギリス・フランスのデータとほぼ一致している。はっきりとした原因は不明であり、バイアスが掛かっている可能性も含まれているが、他の2カ国とも同様な成績であるために、キナクリン投与による効果は否定できない。

しかしながら今回の2症例を含め、現在までの症例の検討を行ったがMSA Rating Scales IIIでのSpO<sub>2</sub>の検討では夜間でのSpO<sub>2</sub>のキナクリン投与前後では減少する傾向がある。又キナクリン投与前後でのapnea indexの前後の低下があり、生存期間の延長を支持する一因を担っている可能性が十分考えられた。

## E. 結論

- 1) CJDの補助診断法として髄液タウ蛋白測定の有用性を示した。
- 2) 脳ドックで発見された孤発性CJDの一例を報告した。

## [参考文献]

- 1) Satoh K, Shirabe S, Eguchi K : Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in CJD patients. Dementia and Geriatric Cogn. Dis. 2007 in press

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yusei Shiga, MD, PhD ; Katsuya Satoh, MD, PhD; Tetsuyuki Kitamoto, et al : Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution.



Journal of Neurology 2007 in press

2. Satoh K, Shirabe S, Eguchi K : Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in CJD patients. Dementia and Geriatric Cogn. Dis. 2007 in press
  3. Satoh K , Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Eguchi K, et al.: Total tau protein of cerebrospinal fluid as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. 未病と抗老化 ( Pre Symptomatic Medicine and Anti Aging ) 15(1): 115-118,2006
  4. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Iwa M, Katamine S, Kurihara S, and Matsuno H: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. Cell Mol Neurobiol 26(1):45-52,2006
  5. 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
  6. 佐藤克也, 調漸, 江口勝美 : プリオン病における神経障害のメカニズム. BRAIN MEDICAL 18(4):21-24,2006
2. 学会発表
1. 佐藤克也, 調漸, 辻野彰, 西浦義博, 本村政勝, 江口勝美, 松尾秀徳, 佐藤聡, 辻畑光宏 : CJD 患者におけるキナクリン投与の既存病態マーカーの検討と治療成績、その問題点. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006.05.11-05.13
  2. Satoh K, Shirabe S, Eguchi K : Clinical, neuropathological analysis of administration of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease. 第 16 回 Meeting of the European Neurological Society, Lausanne, Switzerland, 2006.05.27-05.31
  3. 佐藤克也, 中桶了太, 西浦義博, 辻野彰, 江口博人, 白石裕一, 福島直美, 本村政勝, 調漸, 江口勝美, 吉村俊朗 : 脳ドックにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の一例. 第 174 回日本神経学会九州地方会, 沖縄, 2006.06.17
  4. 本田裕之, 加用無二子, 中尾洋子, 佐藤秀代, 富田逸郎, 佐藤聡, 瀬戸牧子, 辻畑光宏, 佐藤克也 : 特異的な病理像を呈したクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) MM-type2 の 1 症例. 第 176 回日本神経学会九州地方会, 福岡, 2006.12.09
  5. 元宿ひと美, 竹内智子, 下地達也, 花城清祥, 仲地耕, 伊佐勝憲, 渡嘉敷崇, 大屋祐輔, 瀧下修一, 北本哲之, 佐藤克也 : 初期に橋本脳症との鑑別が困難であった CJD の 1 例. 第 176 回日本神経学会九州地方会, 福岡, 2006.12.09

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1. CJD 患者 (44 症例) と非 CJD 認知症患者(86 例)のプロファイル

patients	CJD patients (N=44)		Non-CJD patients (N=86)	
	definite case	6case	Alzheimer-type dementia (ATD)	57case
	probable case	38case	cerebrovascular disorder (CVD)	7case
			Pick disease	2case
			Parkinson disease	5case
			corticobasal degeneration (CBD)	2case
			Huntington's disease	1case
			frontotemporal dementia (FTD)	1case
			progressive supranuclear palsy (PSP)	3case
			ALS	3case
			PCD/LEMS	2case
			Limbic encephalitis	3case
Total		42case		86case

表 2) Unified MSA Rating Scales II (修正版)

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

表3 発症早期に検討できた CJD 患者のプロフィールとバイオマーカー

(14-3-3 protein and total-tau protein) と拡散強調画像の詳細

N	age	sex	type	d.l.	d. w. (wk)	CSF				MRI		EEG
						t-tau protein (pg/ml)	14-3-3 protein	NSE (ng/ml)	S-100b protein (ng/ml)	DWI	flair	PSWc
cut-off data in CJD patients						> 1260	> ±	> 35	> 2.5	> ±	> ±	-
1	64	f	sp	Probable	4	3,414	+	-	4.73	+	-	-
2	73	m	sp	Probable	4	2,068	+	-	1.64	+	-	-
3	67	m	sp	Probable	4	9,055	+	-	0.86	+	-	-
4	76	m	sp	Probable	4	4,645	+	-	0.60	+	-	-
5	80	f	sp	Probable	4	8,766	+	-	0.84	+	-	-
6	77	m	sp	Probable	2	10,671	+	-	0.60	+	-	-
7	63	f	sp	Probable	4	1,814	-	-	1.28	+	-	-
8	69	f	sp	Definite	6	4,917	+	+	0.91	+	-	-
9	54	f	sp	Definite	6	1,317	-	-	1.76	+	+	-
10	67	m	sp	Probable	4	3,055	+	-	1.96	+	-	-
11	70	f	sp	Probable	4	2,841	-	-	1.91	+	-	-
12	70	f	ia	Probable	6	9,787	+	-	0.85	-	-	-
13	67	f	sp	Probable	5	2,657	-	+	1.33	-	-	-
14	70	f	fa	Probable	6	3,358	+	-	0.60	+	+	-
15	63	m	sp	Probable	4	3,125	+	-	0.84	+	-	-
16	63	m	sp	Probable	4	3,530	+	-	0.90	+	-	-
17	64	f	sp	Probable	6	2,630	+	-	0.90	+	-	-
18	51	f	ia	Probable	6	3,930	+	-	0.62	+	-	-
19	74	m	sp	Probable	5	4,574	+	-	0.98	+	-	-
20	74	f	sp	Probable	6	3,666	+	-	1.86	+	-	-
21	71	m	sp	Probable	0	8,66	-	2/21	0.22	+	-	-
total						20/21	16/21	12/21	1/21	18/21	2/21	0/21
sensitivity						95.2%	76.2%	57.1%	4.8%	90.5%	9.5%	0%

f: female; m: male; type: sp: sporadic CJD, ia: iatrogenic CJD, fa: familial CJD; +: positive; -: negative, d. l.: diagnostic level based on the WHO and the Masters criteria; d. w.: duration from the onset of the disease to the diagnostic examination; t-tau protein: total tau protein; NSE: neuron-specific enolase; DW-MRI: diffusion-weighted magnetic resonance imaging; PSWC: periodic sharp wave complexes; EEG: electroencephalograph. In all 21 cases, codon 129 of the gene coding for the prion protein was Met/Met homozygous, whereas codon 219 was Glu/Glu homozygous.

表4. プリオン病患者 112 例中の病型別分類

孤発性		
	古典型 CJD	94 例
	MV 非典型例	1 例
	MM2 皮質型	4 例
家族性		
	180 変異	5 例
	144 塩基対挿入	2 例
	GSS 102	3 例
感染性		
	硬膜移植後 CJD	3 例

表 5a. CJD44 例のバイオマーカー(14-3-3 protein と total-tau protein) と拡散強調画像の統計学的検討

	TP	TN	FP	FN	Sens	Spefi	PPV	NPV	LR	NLR	Accura
total tau protein	42	88	4	2	95.5%	95.7%	91.3%	97.8%	22.0	0.048	95.6%
14-3-3 protein	39	88	4	5	88.6%	95.7%	90.7%	94.6%	20.4	0.119	93.4%
total tau protein and 14-3-3 protein	39	88	4	5	88.6%	95.7%	90.7%	94.6%	20.4	0.119	93.4%
MR-DWI	40	90	2	4	90.9%	97.8%	95.2%	95.7%	41.8	0.093	95.6%
MR-DWI and total tau protein	38	90	2	6	86.4%	97.8%	95.0%	93.8%	39.7	0.139	94.1%
MR-DWI and 14-3-3 protein	38	90	2	6	86.4%	97.8%	95.0%	93.8%	39.7	0.139	94.1%

TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; sensi: sensitivity; specific: specificity; LR: likelihood ratio; NLR: negative likelihood ratio; Accur: accuracy

表 5b. 発症早期に検討できた CJD 患者におけるバイオマーカー(14-3-3 protein と total-tau protein) と拡散強調画像の統計学的な検討 (20 例)

	TP	TN	FP	FN	Sens	Spefi	PPV	NPV	LR	NLR	Accura
total tau protein	20	88	1	2	90.9%	98.9%	95.2%	97.8%	80.9	0.092	97.3%
14-3-3 protein	16	88	5	5	76.2%	94.6%	76.2%	94.6%	14.2	0.252	91.2%
total tau protein and 14-3-3 protein	16	88	5	5	76.2%	94.6%	76.2%	94.6%	14.2	0.252	91.2%
MR-DWI	18	90	3	4	81.8%	96.8%	85.7%	95.7%	25.4	0.188	93.9%
MR-DWI and total tau protein	17	90	4	6	73.9%	95.7%	81.0%	93.8%	17.4	0.272	91.5%
MR-DWI and 14-3-3 protein	15	90	6	6	71.4%	93.8%	71.4%	93.8%	11.4	0.305	89.7%

TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; sensi: sensitivity; specific: specificity; LR: likelihood ratio; NLR: negative likelihood ratio; Accur: accuracy

表 6. プリオン病患者 112 例中の病型別分類髄液検査・画像検査の陽性率

	総数	14-3-3 蛋白	総タウ蛋白	DWI
古典型CJD	94 例	95.70%	98.90%	91.10%
MV非典型	1 例	0.00%	0.00%	100.00%
MM2皮質型	4 例	50.00%	100.00%	100.00%
家族性				
180	5 例	40.00%	80.00%	100.00%
144 塩基対挿入	2 例	0.00%	50.00%	不明
硬膜移植後CJD	3 例	100.00%	100.00%	100.00%
GSS	3 例	0.00%	33.30%	不明
総計	112 例	86.60%	95.50%	92.30%

図 1