

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・機能に基づく治療法の開発

平成16年度～18年度
総合研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成19年3月

はじめに

平成16年度～平成18年度の

「プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく治療法の開発」の
研究報告を公表する。

平成19年3月

主任研究者 片峰 茂

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 感染免疫学講座	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	T058-230-6145 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

目 次

I. 総合研究報告

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく治療法の開発

長崎大・院医・感染免疫学 片峰 茂 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 17

総合研究報告

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）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)論理的創薬の手法により見出した新規抗プリオン化合物 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。(2) PrP のN末領域は神経毒性を有するプリオン類似蛋白 Dpl に対して *intrans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能すること、PrP のN末領域のうちオクタペプチドリピート(OR)領域 (aa51-90) と charged motif 領域 (aa25-50) のどちらか一方のみで抗 Dpl 作用には十分であることが判った。(3) プリオン感染細胞における遺伝子発現の shRNA を用いた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4種類を見出した。(4) プリオン感受性サブクローン N2a5 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^{Sc} の産生) に関与すると考えられる宿主遺伝子として、Ammx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Cln5 の6遺伝子を同定した。(5) 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。

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・医学部歯学部附属病院・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判明していない。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 (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 (図4) から PrP との機能的関連が予想されたが、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 との機能的相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4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^C の C 末側の球状構造は3つの α -helix 領域 (A, B, C) と2つの短い β -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^{Sc} の構造は不明の点が多いが大部分 β -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^I) の存在を証明し、A, B の2つの α -helix 構造が消失していることを明らかにした。もし、PrP^C の球状構造のゆらぎを制御し、PrP^I 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剤開発の試みは、世界で未だ例のない先端的試みであると考えられる。
遺伝子改変マウスを用いた PrP と Dpl の機能の解明：PrP

類似蛋白である Dpl およびその遺伝子はプ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 類似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が明らかにした。本研究では種々の PrP と Dpl 変異体の Tg マウスを作製し、その 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ことが十分に期待できる。

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。

プリオン病診断マーカー及び治療評価マーカーの評価: プリオン病患者における世界で最初の大規模治療 PRION1 がキナクリンを用いて 2005 年より英国で開始された。2006 年治療の応募が終了し、治療が継続されている。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となっている。本研究では多数例及び CJD における病型別での拡散錫蘭画像・脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白・Tau 蛋白の陽性率を検討する。又それ以外の新規マーカーの検討を行う。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、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、生存期間との比較検討を行う。

B. 研究方法

PrP の構造に係るバイオ・インフォマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索: 桑田は、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 (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。③Biacore を用い、GN8 とリコンビナント・プリオン蛋白との相互作用を測定した。④GN8 の存在下、若しくは非存在下で、NMR の HSQC スペクトルを取り、結合サイトの同定を試みた。⑤GN8 の類縁体を有機合成し、その活性を *ex vivo* で測定した。⑥GN8 の治療効果を確認するためプリオン感染動物を用いた *in vivo* 実験(脳内投与)を行った。

Dpl 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 PrP^{delN} と OR 領域を欠損させた PrP^{delOR}、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(図 5)。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^{-/-} と Tg(Dpl)PrP^{-/-} 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^{-/-})。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、ウェ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得した。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。内源性マーカーとして GAPDH を使用した。siRNA は Dharmacon 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散後、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 -tubulin をドットプロットにより半定量検出した。さらに、遺伝子発現ノックダウンによる PrP^{Sc} 産生への影響を正確に評価するために、siRNA による遺伝子発現ノックダウンに伴う PrP^{Sc} 量の変化を、細胞の total PrP (PrP^C と PrP^{Sc} の総和) と PrP^{Sc} 量の変化、および細胞のバクテリヤ等から、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^{Sc} 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。

プリオン病診断マーカー及び治療評価マーカーの評価 : CJD 患者(44 例)とプリオン病以外の認知症患者(86 例) を対象として、プリオン病診断における拡散強調画像

像・脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白・Tau 蛋白の診断の有効性を検討した。脳脊髄液 14-3-3 蛋白(14-3-3- β 定性)は (Santuz Cruz 及び IBL) 抗体を用いて、Tau 蛋白定量(Innogenetics 社)により、S-100b 蛋白、NSE 蛋白は ELISA にて測定した。これらと画像検査 (拡散強調画像、FLAIR) 脳波の比較検討を行った。

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。

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) について検討を行い、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キナクリン投与症例さらに非投与症例との差異の検討を行った。

Haik の原著に中脳水道周囲灰白質、青斑核、延髄 (下オリブ核) を加えた 13 ヶ所の病理学的検討を行った。また、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。

平成 12 年から平成 18 年までの長崎大治療研究プロトコールに参加した CJD 患者 (キナクリン投与群) における現在までの予後・生存期間の調査を行った。

(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。臨床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)。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。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。

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

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で、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・GN8を *in silico* スクリーニングにより見出した。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 mM) を running buffer (10%DMSO in PBS) に溶解し、1分間に 20 ml/min の流速で流した。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 μ 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。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 (図1)。

また、GN8 の類似体を複数 (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 (図2)。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 (図3)。

Dpl による神経変性死の分子機構の解析：Tg(Dpl)PrP⁰ がプルキンエ細胞変性死に伴う動揺性歩行を生後 99 ± 20 日で呈したのに対し、Tg(fuPrP-Dpl)PrP⁰ は生後 730 日経過しても神経症状は出現しなかった。また、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP⁰ の潜伏期も 200 ± 52 日と有意に遅延した (図6)。

Tg(Dpl)PrP⁰ に PrP^{Sc} を共発現させたマウス Tg(PrP^{Sc}/Dpl)PrP⁰ ではプルキンエ細胞は回復し、500 日以上経過しても発症は認められず Tg(Dpl)PrP⁰ と比較

して有意に遅延した。同様に、Tg(PrP^{Sc}/Dpl)PrP⁰ も発症までの潜伏期 385 ± 47 日とプルキンエ細胞は回復し、有意な回復が認められた (図6)。

RNA 干渉を用いたプリオン増殖関連因子の探索：shRNA による発現抑制により異常型プリオン蛋白の産生を阻害する 4 因子が同定された。その遺伝子産物の内訳は、受容体関連蛋白が 3、金属結合蛋白が 1 であった。

受容体関連蛋白の # 58 では、shRNA、化学合成 siRNA の両方でターゲット遺伝子のノックダウンが確認され、異常型プリオン蛋白の産生が抑制された。

金属結合蛋白の # 80 をターゲットとした shRNA では、正常型プリオン蛋白の発現が亢進されるにも関わらず、異常型プリオン蛋白の産生阻害が見られた。

受容体関連タンパク「B」では ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られたが、正常型プリオン蛋白の発現量への顕著な影響は見られなかった。

受容体関連タンパク「G」では、N2a において正常型プリオン蛋白の発現亢進が見られるにもかかわらず、ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。さらにこの分子に対する阻害剤でも検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制と全プリオン蛋白の増加が見られた。

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：一次スクリーニングとして DNA マイクロアレイ解析により、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として、Fn1, Mst1, Fthfd, Armcx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Clcn5, および Hth1 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、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hth1 および Clcn5 の 6 遺伝子に対する siRNA が ScN2a5 における PrP^{Sc} の産生を抑制することが明らかとなった (図7)。

Armxc2 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^{Sc} 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 Wbp5 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^{Sc} 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^{Sc}量およびtotal PrP量は大きく減少した。

この結果は siRNA の長期間処理によっても PrP^{Sc} 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。その結果、ScN2a5 を用いた場合に PrP^{Sc} 産生に対する抑制効果が認められた siRNA のうち、Armxc2, Fxyd2, Clcn5 および Gp1bb が、ScN2a3 においても PrP^{Sc} 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^{Sc} 産生を抑制した。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。プリオン病診断マーカー及び治療評価マーカーの評価：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。さらに CJD 患者の 44 症例の詳細の検討を行った。早期を発症より 8 週間以内と定義すると、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。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 (図 8)。

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、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としてオステオポンチン (OPN) を見出した。また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。

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ー (PSG) の検討

を行っていないものの、MSA Rating Scales III での SpO2 の検討では夜間での SpO2 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。

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。

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 VH, 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。

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、及びシミュレーション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。

プリオン類似蛋白 Dpl の神経細胞死誘導作用と PrP^C のそれに対する拮抗的防御作用の解析については、Tg(fuPrP-Dpl)PrP^{-/-}と Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP^{-/-}の検討で、PrP の N 末領域は Dpl に対して *in trans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能することが判った。当教室以外からの報告も合わせて考察すると、構造的に類似する PrP の C 末領域と 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と結論できる。また、PrP は N 末領域の 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”することが示唆された。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(aa.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 (aa.23-28) 領域も Dpl の神経細胞毒性に対する拮抗作用領域のどちらかでないことを明らかとした。PrP の aa.23 から aa.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る。ただ、PrPdel23-88 と Tg(PrPdelNDpl)PrP^{-/-} 及び Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP^{-/-}では、前者が aa.23-24 も欠失するのに対して後二者では保存されている点は考慮する必要がある。シグナルペプチドに続く2つのアミノ酸の有無が蛋白質の細胞内局在を変化させ、ひいては機能発現に影響を与える可能性を否定できないからである。

shRNA を用いた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4種類を見出した。これらは、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。4個の内の3個は受容体関連蛋白であり、抗体や阻害物質を用いた細胞外からの処理による効果が期待できる。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。更に解析を進め、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。

一方、プリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子改析により Amcx2, Gp1bb, Fxyd2 および Cln5 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} の産生に影響するのか、あるいは、これらの発現抑制が PrP^{Sc} 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^{Sc} 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、実際にどのように PrP^{Sc} 産生に関与するかを検討する必要がある。現在、Amcx2, Gp1bb, Fxyd2 および Cln5 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。

ところで、治療法開発の臨床試験遂行には確度の高い早期診断法の開発が不可欠である。本研究では、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も行った。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すことができた。

E. 結論

- (1) 論理的創薬の手法により見出した新規抗プリオン化合物 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。
- (2) PrP の N 末領域は Dpl に対して *intrans* のみならず *incis* にも抑制的に機能すること、PrP の N 末領域のうちオクタペプチドリピート (OR) 領域 (aa.51-90) と charged motif 領域 (aa.25-50) のどちらか一方のみで抗 Dpl 作用には十分であることが判った。
- (3) プリオン感染細胞における遺伝子発現の shRNA を用いた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4種類を見出した。その内訳は、受容体関連蛋白が3、金属結合蛋白が1であった。
- (4) プリオン感受性サブクローン N2a5 と非感受性サブクローン N2a1 の比較解析を実施して、プリオンの増殖 (PrP^{Sc} の産生) に関与すると考えられる宿主遺伝子として、Amcx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Cln5 の6遺伝子を同定した。
- (5) 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。

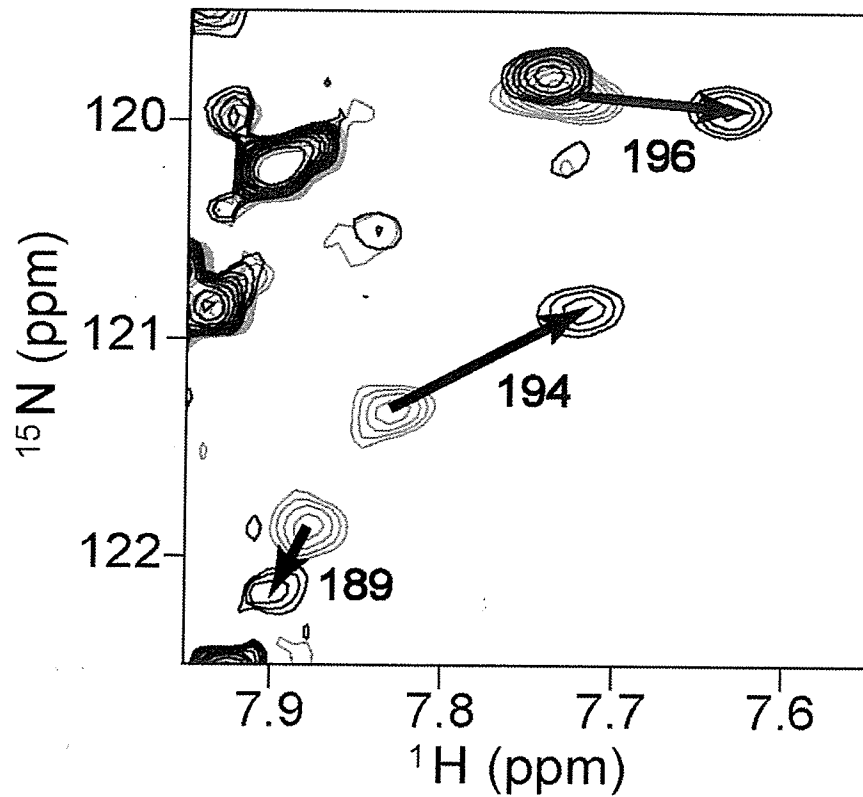
F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

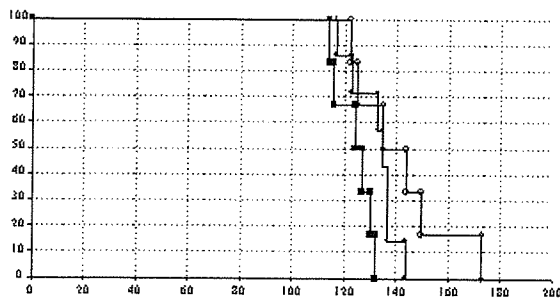
1. 論文発表

図1 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2 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。

図3 GN8によるPrP異常化阻止機構

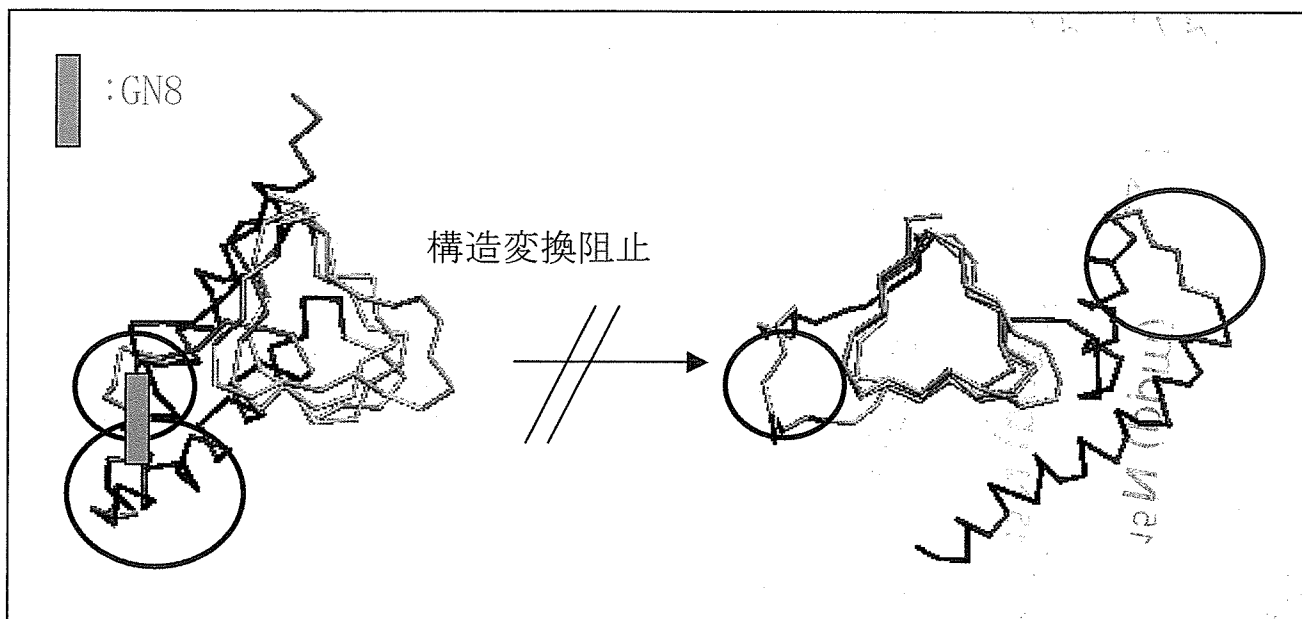


図4 PrPとDplの構造比較

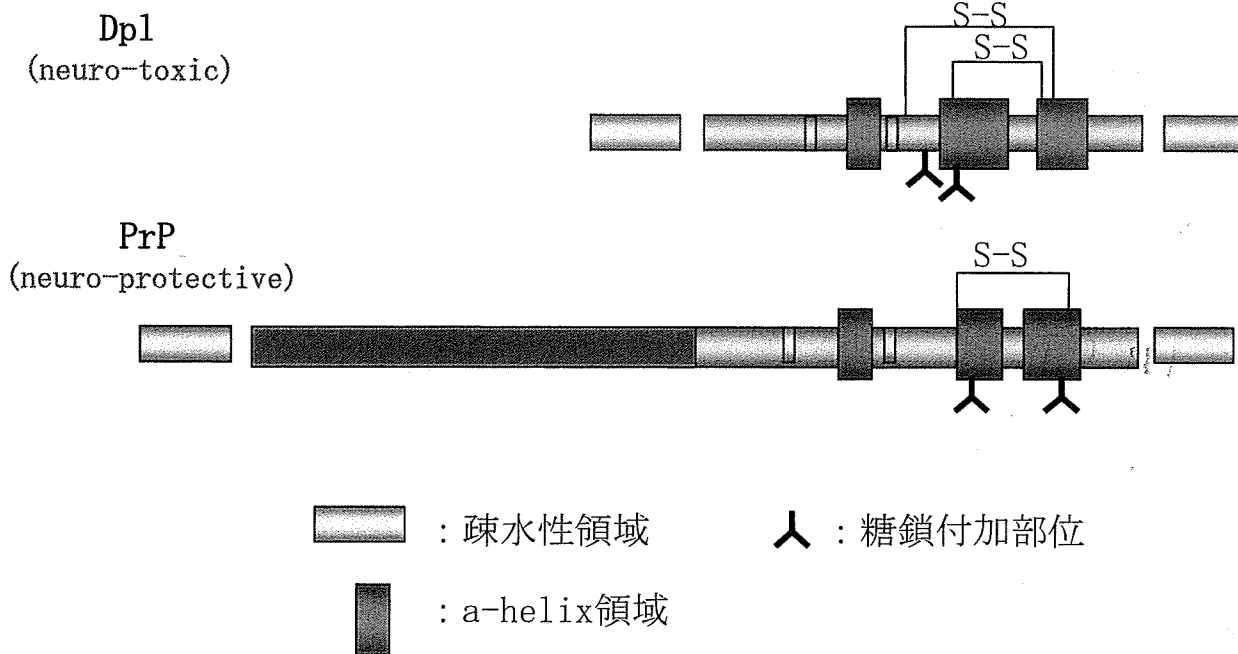


図5 変異型 PrP 発現トランスジェニック (Tg) マウス construct

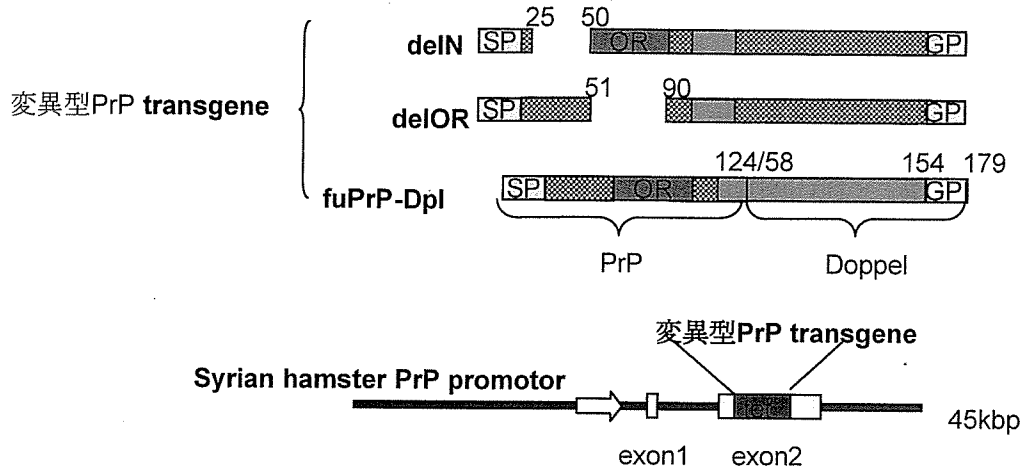
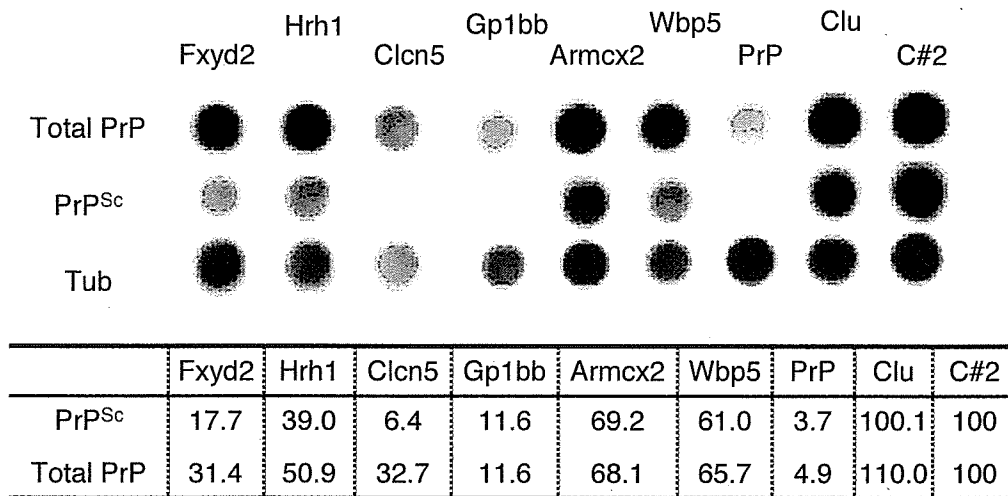


図6 これまでの 変異型PrPについての解析結果

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
Wild PrP * 	---	yes	Yes *
PrPdel23-28 	Not tested	no	
PrPdel51-90 * 	No phenotype *	no	Yes *
PrP ORmu 	Not tested	no	
PrPdel25-50 * 	No phenotype *		Yes *
PrPdel23-88 	No phenotype		no
PrPdel32-121 	ataxic		---
PrPdel32-134 	ataxic		---
fuPrP-Dpl * 	No phenotype *		Yes *
Doppel * 	Ataxic *		---

* 今回の検討で得られた結果

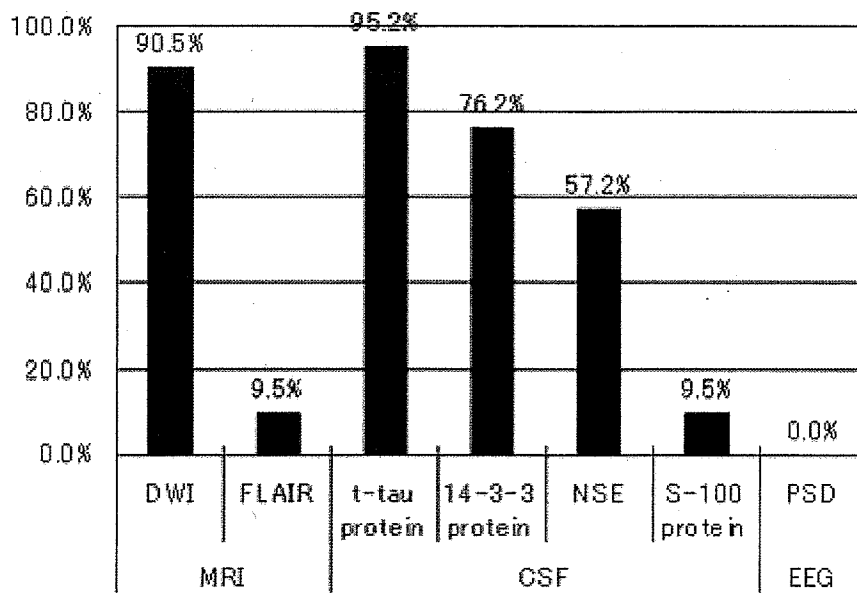
図7 siRNAの長期処理によるPrP量の変化



ScN2a5を3継代連続でsiRNAで処理した後、total PrPおよびPrP^{Sc}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^{Sc}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8 プリオン病患者における新規の診断マーカーの検討



G. 研究発表

1.論文発表

- 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* 24(15),2815-2823,2006
- Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S, Matsuo 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
- Atarashi R, Sim VL, Nishida N, Caughey B, Katamine S: Prion strain-dependent differences in conversion of mutant prion proteins in cell culture. *J Virol* 80(16), 7854-7862,2006
- Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S: Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that 3 abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA *Gene* 386, 139-146,2007
- Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 25 (6): 985-992,2007
- Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H: Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol.* 127 (3): 291-301,2007
- 片峰茂: プリオン仮説 (タンパク質単独犯説) は本当か。科学11月号 pp1122-1126、岩波書店、2006
- Kiminori Kimura, Masahito Nagaki, Jun Nishihira, Kazuo Kuwata, Hisataka Moriawaki. Role of macrophage migration inhibitory factor for CTL-induced liver injury in hepatitis B transgenic mice. *Clin. Vaccine Immunol.*13(3):415-9,2006.
- Kiminori Kimura, Hisataka Moriawaki, 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
- 桑田一夫: プリオン. *Drug Delivery System (DDS)* 21, 156-157,2006
- 桑田一夫: 連載 “話題のウイルス” NO.12 プリオン *Drug Delivery System (DDS)* Vol.21 NO.2 MARCH 2006, 156-157
- 山口圭一, 松本友治, 児玉耕太, 岸直人, 桑田一夫: 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— 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 151-155 2007年1月22日
- 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: 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— 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 181-185 2007年1月22日
- 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)
- 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
- Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neurochem.*,99:198-205 2006
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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
- Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Once 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)

- 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)
- Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, and Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 485-491 (2006)
- 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)
- Yusei Shinga, 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.
- 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
- 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
- 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
- 佐藤克也, 調瀬江口勝美: 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
- 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
- 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
- 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)
- 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)
- 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—ペンタ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—経口キノクリン療法とペンタサン硫酸の脳室内持続投与法の現状。Brain Medical. 17(3):259-264, 2005
- Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319(4), 1247-1252, 2004
- Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa M, Katamine S, Kataoka Y: Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 24(2), 205-217, 2004
- Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N, Katamine S: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of p-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol* 24 (6), 873-875, 2004
- Atarashi R, Sakaguchi S, Shigematsu K, Katamine S: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI J* 3, 82-90, 2004
- Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:80-7, 2005
- Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Mugikura S, Tamura H, Higano S, Takahashi S, Itoyama Y: Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 63:443-9, 2004
- Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T: Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest* 84:828-35, 2004
- Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78:4999-5006, 2004
- Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T: Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* 85:1785-90, 2004
- Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* 279:23661-7, 2004
- Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T: Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004
- Kim, C-L, Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M. and Honiuchi, M. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320: 41-52, (2004)
- Kim, C-L, Kanino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Honiuchi, M. Cell surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J. Gen. Virol.* 85: 3473-3482 (2004)
- Gombojav, A., Ishiguro, N., Honiuchi, M, and Shinagawa, M. Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J. Vet. Med. Sci.* 66(10): 1293-1295 (2004)
- Kazuo Kuwata, Yuji O Kamatari, Kazuyuki Akasaka and Thomas L. James : Slow Conformational Dynamics in the Hamster Prion Protein. *Biochemistry*. 43, 4439-4446, 2004
- 桑田一夫：プリオン中間体と治療薬開発—分子感染機構と創薬制御。蛋白質 核酸 酵素. 49 (7), 1110-1112, 2004
- 桑田一夫, 副田明男, 岩間亨, 桑田弘美, 中島年彦：fMRI による高次脳機能障害の診断法及び各種治療法の開発。岐阜脳医学研究会報告集, 1, 2004
- 桑田一夫：素数とプリオン—21 世紀における生命科学の新表現理論への挑戦。数理科学. 499, 45-53, 2005
- Satoh K., Shirabe S., Eguchi K., Yamauchi A., Kataoka Y., Niwa M., Nishida N. and Katamine S: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of p-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol*. 24:873-875, 2004
- 佐藤克也, 調 漸 片峰茂 村本 環 北本哲之: 医原性クロイツフェルト・ヤコブ病 日本臨床 62:248-251, 2004
- 富田逸郎 佐藤克也, 調 漸 長郷国 彦 佐藤 聡 辻畑 光宏: 発症早期から MRI 拡散強調画像を経時的にこしらべた Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例. 臨床神経. 44:182-186, 2004

2.学会発表

片峰茂：プリオン蛋白質及び関連遺伝子の構造・機能に基づく治療法の開発平成18年度ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会「先端医療実現のための基盤技術開発研究はどこまで進んだか？」2007年2月、東京

高倉由佳、西田教行、山口尚宏、吉良潤一、片峰茂：プリオン病病原体の初代培養骨髄間質細胞における感染と増殖第54回日本ウイルス学会ワークショップ「ウイルス同定・診断法の新規開発」2006年11月、名古屋

Katamine S: An attenuated prion strain interferes superinfection by more virulent strains in murine neuronal cell cultures. Plenary lecture in 8th Nagasaki-Singapore medical symposium on infectious diseases: The challenge of emerging and tropical infectious diseases, May 2006, Singapore

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

Kuwata K: 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

Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, October 16, 2006

Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, Paris, November 21, 2006

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

Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

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

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

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

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

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

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 PrP^{Sc} 回収法。2006年プリオン研究会、安比高原、2006年9月2、3日

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

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

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

石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、西田教行、岩城徹、堂浦克美：Styrylbenzazole 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

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

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

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

Kaino, A., Furuoka, H., Kimura, K., Shinagawa, M., Horiuchi, M. : Generation of mAb that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)

Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C.-L., Nagatsuka, T., Uzawa, H., Horiuchi, M. : Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranoside and their polymers. NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)

Horiuchi, M. : Propagation and inhibition of PrP^{Sc} 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)

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) 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)

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^{Sc})の相違。第 54 回日本ウイルス学会 (212-23 Nov. 2006, 名古屋)

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

Sato H, 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

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

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)

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)

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)

桑田一夫：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

桑田一夫：フーリエ変換とタンパク室・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

桑田一夫：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

桑田一夫：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

桑田一夫：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

桑田一夫：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

桑田一夫：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

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、