

厚生労働省科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堂浦 克美

平成19年（2007年）4月

目 次

ページ

I. 総括研究報告書

- プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究 1
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)

II. 分担研究報告書

- 埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンプオリサルフェート脳室内持続
投与療法に関する検討 10
山 田 達 夫 (福岡大学医学部)
- プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究 15
福 島 武 雄 (福岡大学医学部)
- プリオン病治療候補薬物の脳移行性評価に関する研究 18
片 岡 泰 文 (福岡大学薬学部)
- プリオン病患者のアミロイドPETイメージング 21
志 賀 裕 正 (東北大学病院)
- 経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究 23
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 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 29
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- プリオン構造緩解作用を持つ治療薬に関する研究 31
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- プリオン病の画期的治療法の開発のための基礎的研究 33
西 田 教 行 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)
- 治療薬開発の標的候補となるプリオン増殖複製関連因子の探索 36
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 新規治療薬開発を目指したプリオン蛋白構造変換因子の解析に関する研究 39
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)

硫酸多糖体の抗プリオン作用発現機序に関する研究 堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科）	・ ・ ・ ・ 43
プリオン病の抗体治療に関する研究 坂口末廣（徳島大学分子酵素学研究センター）	・ ・ ・ ・ 47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 50
IV. 研究成果の刊行物・印刷	・ ・ ・ ・ 55

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する
調査研究班
プリオン病の画期的治療法に関する
臨床研究と基礎研究班

平成18年度合同班会議

会期 平成19年1月22日(月)・23日(火)
会場 全共連ビル 4F・会議室

總 括 研 究 報 告

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18年度 総括研究報告書

プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究

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

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法をプリオン病患者で実施して、その効果と安全性を検証することが本研究の目的の一つである。平成18年度は新たな3例を加えた合計9例の患者において検討した結果、亜急性進行例では無効であること、長期投与例で硬膜下水腫を高率に合併することが明らかとなった。また、同療法を実施された海外の16例を解析して、若年発症例で生命予後改善効果があることを明らかにした。新たな治療評価手段開発の必要性から、脳内プリオンアミロイドPET画像検査を実施し、同検査の有用性が期待できることを明らかにした。

一方、本研究のもう一つの目的である次世代型治療薬開発においては、経口投与で治療予防効果のある化合物について作用機序と治療効果についてさらに解析を進め治療効果をより一層高める方策を探った。また、皮下単回投与で著明な治療予防効果のある化合物について、末梢感染に対して極めて優れた発症予防効果があることを明らかにした。プリオン高次構造緩解薬物について発症遅延効果があることを明らかにした。さらに、プリオン蛋白の構造ダイナミクスに基づく論理的創薬の手法により、治療効果のあるリード化合物を開発した。

画期的治療法開発に関する基盤研究では、RNA干渉による遺伝子スクリーニングを行い新たな治療薬の標的として受容体関連蛋白を同定することが出来た。また、プリオン蛋白構造変換に関わる因子としてHsp90等を同定し、PPS等の硫酸多糖体のプリオン蛋白上の作用部位としてN末端ドメインを同定した。さらに、薬物脳移行性を簡便に評価できる検定キットを開発した。また、ミクログリアを用いた抗体の脳内デリバリーシステムの開発を行った。

分担研究者

山田達夫	福岡大学医学部・教授
福島武雄	福岡大学医学部・教授
片岡泰文	福岡大学薬学部・教授
西田教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授
志賀裕正	東北大学病院・講師
坂口末廣	徳島大学分子酵素学研究センター・教授

A. 研究目的

英国をはじめ本邦では、多数の後天性プリオン病 (man-made disease) が若年層でも発生しており、実効性のある予防治療法が至急に求められている。本研究は二つの目標を持っている。主任研究者が開発したペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法をプリオン病患者に実施して、その効果と安全性について検証を行うことが目標の一つである。また、ペントサンポリサルフェート (PPS) 脳室内持続投与療法に取って代わる末梢投与可能な治療薬の開発と次世代型の画期的治療法となる方策の糸口を見つけることがもう一つの目標である。

B. 研究方法

(1) 画期的治療法の臨床研究

山田、福島は PPS 脳室内持続投与療法の臨床研究のための環境整備の改善を行い、プリオン病患者に同治療法を実施して、その経過を観察して効果と安全性を調べた。また、山田、堂浦は堂浦が同療法のプロトコール作成等に関与した海外実施例について効果と安全性を同様に調査した。また、志賀は病勢診断や治療評価の手段として標識化合物 [^{14}C]BF-227 を用いた PET 法による脳内プリオンアミロイド画像検査を実施し、その有用性と安全性を検討した。片岡は PPS の製剤化を分担し、PPS の脳室内投与における薬物動態を解析するため患者髄液中の薬物濃度を測定した。

(2) 次世代型治療法開発の基礎研究

堂浦は疾患モデル動物において経口投与で治療予防効果のある化合物 compB について昨年度に引き続き治療効果を評価した。皮下への投与で治療効果を示した成分に関しては、末梢感染の際の発症予防効果の検討を

行った。プリオン高次構造緩解薬物については動物実験にて治療効果を検証した。RNA 干渉による遺伝子スクリーニングを継続し、新たな治療開発のターゲットとなる宿主因子を探索した。また、細胞溶解液を in vitro のプリオン蛋白構造変換アッセイで解析しプリオン蛋白構造変換に関わる宿主因子を探索し同定した。さらに、ペントサンポリサルフェート等の抗プリオン活性の高い硫酸多糖体がプリオン蛋白のどの部位と相互作用するかを、表面プラズモン共鳴法で解析した。西田は、効率的な候補化合物の絞込みのため、プリオン蛋白の構造解析を行い構造的揺らぎ部位の同定と、その領域を標的とした化合物のインシリコ・スクリーニングを実施し、候補化合物の治療効果を持続感染細胞を用いた実験と動物実験で検証した。坂口は、治療効果を持つ抗プリオン蛋白抗体を利用した治療法として、同抗体を効率的に脳内にデリバリーするためにミクログリアを応用する方法の開発に着手した。片岡は薬物脳移行性を簡便に評価できる検定キットを、脳血管内皮細胞、脳血管ペリサイト、アストログリア細胞などのプライマリー培養細胞を組み合わせて開発した。

(倫理面への配慮)

患者に対する臨床試験は、患者が入院中の各施設における倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ治療研究が開始された。動物実験は、研究者所属施設の動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

C. 研究結果

(1) 画期的治療法の臨床研究

我国の 9 名の患者 (男 : 女 = 2 : 7、55 ~ 73

歳)でPPS治療を実施した。周術期の合併症として1例で脳室内カテーテルの留置不全があり、再留置術を必要とした。埋め込み・留置手術に起因する有害事象はなかった。PPS投与開始後も、注入ポンプ不全やカテーテル閉塞などはなかった。投与慢性期において、6名の患者で硬膜下水腫、1名でけいれん、1名で少量の脳室内出血が認められた。これらは経過観察中に消失するものがほとんどであったが、1名では硬膜下水腫が進行するためPPS治療を中止し、中止後も水腫が残存した。PPS治療開始後も進行性経過を示したのは孤発性または医原性症例の5例で、神経学的検査等の諸検査で治療効果を証明できなかった。一方、元々経過が緩徐進行であるV180I家族性プリオン病患者やMM2型と考えられる孤発性CJD患者では、PPS治療開始後も臨床症状の変化は見られていない。残り2例は、PPS治療を最近開始したため評価には尚早である。

我国の治療例の成績を海外症例と比較検討するため、主任研究者が関与した欧米のPPS治療症例の情報を解析した。変異型CJD、医原性CJD、GSS、孤発性CJD患者の16症例(男:女=8:8、17~60歳)(PPS維持量、11~220ug/kg/日)で、病型別に治療効果を見たところ、どの病型でも明らかに若年者ほど長期生存する傾向があった。特に、変異型CJDでは治療例は他の症例より遥かに長期生存しており、生存期間から判断してPPS療法の効果は明らかである。ただし、大脳や小脳の萎縮を止めたり、高次機能障害を回復させることは出来なかった。また、我国の症例と同様に、長期投与例では硬膜下水腫を合併し、一時的なPPS投与中止で水腫の消失が観察された。

治療評価手段にもなり得る病勢診断の新ツールとして脳内プリオンアミロイドのPETを用いた画像化を2名のプリオン病患者で実施した。1名は孤発性CJD患者で、大

脳皮質、視床、小脳皮質でシグナル亢進が観察された。もう1名はGSS患者で、大脳皮質及び小脳皮質に強いシグナル亢進が観察された。有害事象は観察されなかった。

(2)次世代型治療法開発の基礎研究

脳内感染マウスへの経口投与で延命治療効果のある化合物compBは、正常型プリオン蛋白の発現に影響せずに、異常型プリオン蛋白の産生を阻害し、感染因子の蓄積を抑制した。脳移行に優れていたが、当初想定していた以上に脳からのクリアランスが迅速であった。また、治療効果は投与時期に大きく影響されることが明らかとなった。

昨年度体内動態研究の結果を報告した抗プリオン成分について、末梢感染に対する発症予防効果の経過をさらに追跡した。その結果、対照群は90日前後で発症したのに対して、抗プリオン成分投与群では20ヶ月を経ても発症が見られず、顕著な発症予防効果があることがあらためて確認された。

異常型プリオン蛋白構造を緩解する効果のある臨床薬については、腹腔内感染動物で、皮下への単回の投与にもかかわらず有意な発症遅延効果が観察された。また、この臨床薬のどの成分が抗プリオン活性を持っているのか、有効成分の絞込みを行った。その結果、有効成分は20kDa以上の分子サイズを持つ蛋白質であることが判明した。

RNA干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングでは、新たな治療薬開発の標的となる4つの候補を同定した。そのうちの3つは受容体関連蛋白であり、そのうちの1つでは受容体阻害化合物の投与によりプリオン持続感染細胞でプリオン産生阻害効果が確認できた。

In vitro プリオン蛋白アンフォールディング活性測定法を用いて、正常プリオン蛋白をアンフォールドする分子としてHsp90とGrp94を見出した。これらのシャペロン蛋白質は、プロテアーゼに部分耐性をもつ銅イオ

ン結合型プリオン蛋白をヌクレオチド存在下でアンフォールドし、プリオン蛋白の代謝や機能調節に関与する可能性を示した。

硫酸多糖体であるヘパリンについて、プリオン蛋白の相互作用部位について解析したところ、ヘパリンの特徴的な二糖構造がプリオン蛋白 N 末端ドメインに結合することを発見した。

プリオン蛋白の構造ダイナミクスに基づく論理的創薬の手法を用いて治療化合物を絞り込み、その中のいくつかを検討したところ、特異的にプリオン蛋白に結合し疾患マウスへの末梢投与で治療効果を認める新規化合物 GN8 を発見した。

抗プリオン蛋白抗体を用いた治療法開発研究では、同抗体の脳室内への持続注入が疾患マウスの生命予後を改善することをすでに発見しており、同抗体を効率的に脳内にデリバリーするため同抗体過発現ミクログリアの作製準備を行い、同抗体遺伝子の細胞での発現による同抗体の再構成に成功した。

プリオン病治療候補薬物の探索には、薬物の脳移行性の評価が必要不可欠であり、血液脳関門 (BBB) の構成細胞 (脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト) から再構築した *in vitro* BBB モデルを開発した。

D. 考察

(1) 画期的治療の臨床研究

PPS 治療の安全性検討については、周術期、投与開始期、投与慢性期の各時期での安全性について問題点の抽出が行える程度に検討が行えた。当初予定していた髄液中の PPS 濃度モニターについては、PPS 濃度測定法が確立でき 4 名の患者試料の測定を開始できているものの、経過を追っての測定や複数の患者での測定にまで至らなかったため、PPS 濃度と合併症 (硬膜下水腫、けいれん等) との関係性を明らかにすることが残された課題の一つである。

PPS 治療の効果検討については、疫学的データが揃っている欧州症例で PPS 治療の治療効果を確認できたものの、疫学的データの欠落している我国では当初予定していた各種の臨床的評価法での評価が困難であったこともあり、治療効果について十分に根拠のある評価を行えなかった。

治療評価方法として検討した臨床検査や神経学的所見、各種スケーリングのデータは症例間のばらつきが大きく、評価方法に工夫が必要であることが判明した。国際プリオン病治療ワークショップでは、最も信頼できる治療評価項目は「生存期間」であるとしており、残念ながら我国では病型別、発症年齢別、性差別の患者の生存期間に関する疫学データが欠落しているため、「生存期間」測定に代わる治療評価方法の確立が重要である。ところで、硬膜下水腫を高率に合併したが、これは PPS そのものが原因か、あるいは進行性萎縮をきたす脳に持続的な送液を行うことが原因なのかは不明であり、原因解明は今後の課題である。

PPS 治療の普及については、当初は 3 年間で 30 例程度を予定していた。これは、以前のキナクリン・キニーネによる実験的治療で 3 年間約 30 例を経験したことに基づいていた。しかし、実際には 3 年間で 9 例と予定の 3 分の 1 にとどまった。CJD サーベイランス委員、「プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班」班員、患者家族会等への啓蒙活動を行い、主治医や患者家族への相談に丹念に対応してきたにもかかわらず、PPS 治療が実施できる施設が福岡の 1 施設に限られていたことと、脳外科的処置に対する医者側及び患者側の抵抗感に起因していた。前者に関しては関東以北で同治療を実施できる施設を設ける努力を行ったが、手術場関係者や脳外科医の協力を得ることはできなかった。

PPS 治療の治療プロトコールの整備につ

いては、治療導入部分の整備は完了したが、前述したように合併症と PPS 投与量との関係解析や治療評価の標準化が出来ていないため、合併症や治療評価に対応したプロトコール化は出来ていない。

PPS 治療の効果を上げ合併症の発生を抑えるためには、PPS の脳実質内への移行を高め、投与量を減らす工夫が必要である。動物実験でも明らかのように片側の脳室内に投与した PPS の効果は対側まで十分に行き渡らない。PPS そのものの分子サイズを減らしたり、硫酸基の数を減らすと治療効果は大きく損なわれるため、脳室から脳実質への薬物送達を促進するような工夫を考える必要がある。

PPS は異常型プリオン蛋白（プリオン）の産生を阻害するものの、既に存在する異常型プリオン蛋白の分解の促進や神経変性の抑制には全く働いていないと考えられる。異常型プリオン蛋白の分解促進に働く治療薬（例えばドキシサイクリンやテトラサイクリン）や神経変性の抑制に働く治療薬（例えばメマンチンやフルピルチン）との併用による多剤療法により治療効果を上げるとともに、ペントサンポリサルフェートの投与量低減や休薬期間設定により合併症発生を抑えることが期待できる。したがって、今後は多剤療法も検討する必要がある。

新たな病勢診断ツールとしてのプリオンアミロイド PET 画像化法の安全性及び有用性については、当初の予定にない研究項目であるが、通常臨床的治療評価では治療評価が出来ないことより、3年目より急遽導入したものである。試験的導入として2例の症例を経験でき、安全性及び有用性に期待を持てる結果が得られ、今後に繋がる成果である。

治療研究に関連して早急に開発を求められているのは、早期診断や病勢診断技術の開発である。本研究で臨床試験を開始したプリオンアミロイド画像化法は感度等に問題が

あり早期診断法としては即応できないが病勢診断法・治療評価法としては期待できる。治療評価の基準として「生存期間」測定が国際的にコンセンサスを得ているが、詳細な「生存期間」に関する疫学的データを完備している欧州に対して、そうでない我国では「生存期間」測定に代わる信頼できる治療評価手段が必要であり、プリオンアミロイド画像化法はその候補である。

(2) 次世代型治療法開発の基礎研究

末梢投与で効果のある治療候補化合物の開発については、compB、GN8 等の4種の新たな化合物について疾患マウスで評価を行い、臨床応用への可能性についても各化合物の問題点を抽出することが出来た。compB および GN8 は安全性に問題があり物性を改良する必要があるものの、残りの2種の化合物については問題となるような毒性は観察されず、その中の1種は既に別の目的で臨床薬として使用されていることよりプリオン病患者への応用が近い将来可能であると考えられる。

新たな治療薬開発の標的となる宿主因子候補やプリオン蛋白のドメインに関する情報が得られたとは治療に結びつく新たな基礎研究の成果である。今後これらの発見の芽を実用化にまで育てていくことが必要である。抗体を用いた治療法の開発はアイデアとしては新しいとは言いがたく、また研究も端緒についたばかりであるが、脳内への抗体デリバリーの方法を確立できれば、他の疾患への応用も可能である。

E. 結論

多数の医原性プリオン病が発生している我国で、実効性のある治療予防法が求められていることを背景に、PPS 療法をプリオン病患者に実施し、効果と安全性について検討を行った。また、末梢投与できる次世代型治療薬の開発と基礎研究の視点から画期的治療

に結びつく方策の開発研究を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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), 2007
- 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.*, 209:484-491, 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
- Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y: Inhibition of transforming growth factor- β production in brain pericytes contributes to cyclosporine A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.*, (in press), 2007
- Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y: An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell. Mol. Neurobiol.*, (in press), 2007
- Nishioku T, Takata F, Yamauchi A, Sumi N, Yamamoto I, Fujino A, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y: Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.*, (in press), 2007
- 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
- Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, et al.: Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution., *J. Neurol.*, (in

- press), 2007
- Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, et al.: 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J. Clin. Neurosci.*, 13:661-665, 2006
- Sakaguchi S, Arakawa T: Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. *Expert Review of Vaccines*, (in press), 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*, 25:985-992, 2007
- 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 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
- Sakaguchi S: Roles of prion protein and prion protein-like protein in neurodegeneration: Implication in the pathogenesis of prion diseases. *PRIONS: New research* (ed. by Doupher BV), pp. 53-71, Nova Science Publishers, 2006
- 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*, 24:2815-2823, 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*, 24(3):313-316, 2006
- 田中美紀、坪井義夫、山田達夫: Quinacrine. *Clinical Neuroscience*, 24(3):333-335, 2006
- 坪井義夫、山田達夫: Pentosan polysulphate (PPS). *Clinical Neuroscience*, 24(3):336-339, 2006
- 山田達夫: Flupirtine. *Clinical Neuroscience*, 24(3):340, 2006
- 坪井義夫: プリオン病に対する PPS 治療—全身性の影響はきわめて少ない—. *Medical Tribune*, 39(22):11, 2006
- 坪井義夫: クロイツフェルト・ヤコブ病—新しいペントサン・ポリサルフェート脳室内投与法の現状. *ヤコブ・ネット NEWS*, 11, 2006
- 坂口末廣: プリオン病. *感染症 The infection*, 36:9-13, 2006 (カラー図, 17-18)
- 坂口末廣: プリオン蛋白質の生理機能. *化学療法の領域*, 22:56-62, 2006

2. 学会発表

- 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
- Yamauchi A, Dohgu S, Takata F, Sumi N, Nishioku T, Shuto H, Niwa M, Kataoka Y: Immunosuppressant and blood-brain barrier. Biofunction and Drug Discovery Symposium 2006, Fukuoka, September 8-9, 2006
- Nishida N, et al.: Dynamics-based discovery for a potential therapeutic agent for transmissible spongiform encephalopathies. Asian research forum on emerging and reemerging infections -2007, Nagasaki, Jan 15-16, 2007
- Sakaguchi S: Antagonistic interaction between prion protein and its homologue, PrPLP/Dpl, in neurodegeneration. AACL-Nagasaki Symposium, ASIAN AGING 2006: The Regional Aging Connection and the Future. Nagasaki, June 17, 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 PrPres 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

堂浦克美、坪井義夫、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方法。第47回日本神経学会総会、東京、2006年5月11-13日

荒木保清、石神紀子、坪井義夫、山田達夫、北本哲之、佐藤克也、中川正法： Codon180変異をしめすCJDへのペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。第11回日本神経感染症学会、伊勢、2006年10月13-14日

坪井義夫、山田達夫： プリオン病治療戦略の展望-臨床試験-。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

寺田達弘、小尾智一、杉浦 明、山崎公也、溝口功一、村山繁雄、齊藤祐子、坪井義夫、山田達夫： ペントサン治療後のCreutzfeldt-Jakob disease (CJD)の1例。

第85回関東臨床神経病理懇談会、東京、2007年1月6日

石津暢隆、崎山快夫、齊藤祐子、松本ルミネ、坪井義夫、山田達夫、北本哲之、堂浦克美、蛇澤 晶、栗崎博司、村山繁雄： ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与中に死亡したクロイツフェルトヤコブ病(CJD)の1剖検例。第85回関東臨床神経病理懇談会、東京、2007年1月6日

志賀裕正、大沼 歩、佐藤 滋、他： Creutzfeldt-Jakob 病疑い例の検討。第47回日本神経学会総会、東京、2006年5月12日

石橋大輔、山中仁木、片峰茂、坂口末廣： 異種プリオン蛋白によるプリオン感染の予防効果。第30回長崎感染症研究会、長崎、2006年3月4日

石橋大輔、山中仁木、片峰茂、坂口末廣： 異種プリオン蛋白免疫によるプリオン病の予防。生体機能と創薬シンポジウム2006福岡「疾病の標的分子と治療薬開発の最前線」、福岡、2006年9月8、9日

坂口末廣： プリオン病：その発症から治療、そして予防まで。第18回日本臨床微生物学会総会（教育講演）、長崎、2007年2月17、18日

H. 知的所有権の出願・登録状況

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

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

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

西田教行、他： アミロイド前駆体特殊構造形成阻害剤。特願2003-355617

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究
平成18年度 分担研究報告書

内埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンポリサルフェート
脳室内持続投与療法に関する検討

分担研究者：山田 達夫 福岡大学医学部内科学第五教室

研究協力者：坪井 義夫 福岡大学医学部内科学第五教室

研究要旨

プリオン病はいったん発症すると、その病型にかかわらず、進行性、致死性の経過をたどる。プリオン病の病理所見は、海綿状脳症で、不溶性の異常プリオン蛋白の蓄積を特徴とする。これまでに有効とされる治療薬はなく、実験的には、異常プリオン蛋白の蓄積を防ぐ可能性のある効果的な薬剤の検討が行われてきた。ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与は、スクレイピー感染マウスモデルで著しい発病の遅延を認めた薬剤である。2003年に英国で、はじめて臨床応用が行われた。ペントサンポリサルフェートは血液脳関門を通過しないため、脳室内持続投与法が行われた。本邦でも2004年11月から、現在までに9例に対して同治療が行われ、経過を見ている。治療開始からの経過は4ヶ月から20ヶ月で、注入濃度は $120\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ で行われている。効果判定は評価法が統一されておらず、コントロールとの比較が困難であることが問題である。これまでに、明らかな臨床症状の改善がみられた症例はない。症状の進行や生存期間の延長は解析中だが、海外において、同治療を受けた変異型CJDの生存期間は、その平均をはるかに上回っている。ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与が効果的な治療法であるかどうかの検討は今後の症例経過の解析と、剖検例における病理所見の検討を必要とする。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に代表されるプリオン病は、いまだ致死性の神経難病であり、その有効な治

療法は確立されていない。本邦で多発し、現在も発生が続いているヒト死体由来の乾燥硬膜の移植による医原性プリオン病や、欧州で多発した、ウシ海綿状脳症(BSE)に関連した変異型CJDも、

その広がりや危惧されている。ペントサンポリサルフェート(PPS)はマウスを用いたプリオン蛋白感染実験において、脳室内持続投与により発症遅延効果が確認された。PPSは血液脳関門を通過せず、脳室内に直接投与する必要がある。本研究では、体内埋め込み型微量注入器具を用いた PPS 脳室内投与療法のプロトコルを確立し、本邦のプリオン病患者に応用して同治療の安全性と患者の生命予後改善への効果を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

PPS 脳室内持続投与法のプロトコルに関しては、昨年度と PPS の濃度を除いては変更がない。概略を述べると、プリオン病の診断は、WHO の診断基準に従った。体内埋め込み型微量注入器具 (Archimedes®20 ml reservoir, Flow rate 0.5 ml/24h, Codman Inc., Germany) および脳室内カテーテルの留置手術は福岡大学脳神経外科により、福岡大学手術室にて行われた。PPS 薬剤注入、薬剤効果の評価、副作用の有無は福岡大学病院神経内科病棟にて原則的に行われたが、一定期間の後、紹介病院にて、その後の経過観察を行った。PPS 脳室内投与用の製剤化と、PPS 髄液中濃度測定は福岡大学薬学部疾患管理学教室で行われた。腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置及び脳室内カテーテルの留置手術を行い、手術後 1 週間はポンプに生食を満たし、頭部 CT で出血がないことを確認する。出血等の合併症がなければ術後 8 日目より PPS 投与を低濃度で開始する。その後、漸増し維持量に到達させる。最終維持濃度は $120 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ として、4 週間毎

に腹部皮下の微量注入器具中に、経皮的に薬液を交換充填する。

(倫理面での配慮)

本研究は、福岡大学倫理委員会の承認を受けている。本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された。同意書は書面にて確認され、カルテに保存することとした。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮が行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

C. 研究結果

これまでに 9 例のプリオン病患者に対して施行された(表 1)。これまでのところ、経過中に臨床上的進行がみられたのは 5 例のうち 3 例(孤発性 CJD2 例、医原性 CJD1 例)が死亡した。2 例(家族性 CJD (V180I)、孤発性 CJD (MM2 型))は治療開始後、しばらく症状の安定がみられ、その後緩徐に進行している。2 例はまだ治療開始早期であり、判定が不能である。治療に関連した合併症としては CT 上硬膜下水腫が 6 例に、うち一部に出血が確認されたものは 2 例、少量の脳室内出血が 2 例に認められた。痙攣が 1 例に見られた(表 2)。血算、生化学、凝固検査に異常は認められなかった。

D. 考察

PPS 脳室内持続投与法のプロトコルは現在のところ、全例比較的安全に

行われており、その評価は継続しておこなわれている。欧州で行われた治療結果との共同の研究も進んでおり、国際的学会において報告した。今後も経過の注意観察、解析を継続することで、生命予後改善効果を明らかにすることと、副作用の問題点を解決する方法を検討する必要がある。本研究に使用する PPS は、動物実験において抗プリオン効果が確認されており、他の疾患に使用された歴史を有し、副作用もよく検討されている薬剤である。しかし、プリオン病患者に対して脳室内に持続投与の試みは、これまでに行われていない。脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与方法としての意味と、プリオン病に対する臨床効果の 2 つの意味がある。本研究の成果はプリオン病患者の生命予後改善だけでなく、プリオン蛋白遺伝子変異キャリアーやヒト死体由来硬膜移植歴のある者のような危険因子の保因者がプリオン病を発症するのを予防する医療手段としても発展することが期待される。

現在福岡大学で作成した PPS 脳室内持続投与方法プロトコールは、長期の治療にも耐えうる安全性が確認されたが、その効果に関して、今後も各種の評価法を用いて検討する必要がある。また PPS の濃度が $120 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ としているが、この濃度で、血算、生化学、凝固検査上の異常は認められない。今後は安全域を考えた治療濃度設定をさらに検討する必要がある。

CJD は稀な神経難病でその発病率は年間 100 万人に約 1 人であるが、不幸にも本邦では多数のヒト死体由来乾燥硬膜移植後の CJD 患者がいまだ発生しており、潜在的に発症の危険を有す

る硬膜移植患者も存在する。英国において多発した vCJD の脅威は本邦においても 1 例目の発生が確認されている。このような状況にあり本研究の成果であるプリオン病の治療法の確立は、患者や保因者個人にとっての利益となるだけでなく、新たな医原性疾患発生の可能性を抑えることに寄与しうると考えられる。

E. 結論

プリオン病治療法の開発において、PPS 脳室内持続投与方法は脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与方法として比較的安全で、有用であることが確認された。しかし、まだプリオン病に対する臨床効果は明かではなく、この証明は症例数が少なく、未治療例を対照とする点で統計学的に有意差を出すことが困難である。しかし、患者の生存期間や、無動無言になるまでの期間などを指標に、今後解析が必要である。また同時に、剖検例における、異常プリオン蛋白の蓄積が抑制されているかどうかの評価も重要と思われる。

[参考文献]

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, et al.: Treatment of transmissible spongyform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal model. *J. Virol.*, 78:4999-5006, 2004
- 2) Todd NV, Morrow J, et al.: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Infec. Dis.*, 50(5):394-396, 2005

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 田中美紀、坪井義夫、山田達夫 :Quinacrine. Clinical Neuroscience. 24(3): 333-335, 2006.
 2. 坪井義夫、山田達夫: Pentosan polysulphate(PPS). Clinical Neuroscience. 24(3): 336-339, 2006.
 3. 山田達夫 :Flupirtine. Clinical Neuroscience. 24(3): 340, 2006.
 4. 坪井義夫:プリオン病に対する PPS 治療—全身性の影響はきわめて少ない—. Medical Tribune. 39(22): 11, 2006.
 5. 坪井義夫:クロイツフェルト・ヤコブ病—新しいペントサン・ポリサルフェート脳室内投与方法の現状. ヤコブ・ネット NEWS. 11, 2006.
- ### 2. 学会発表
1. 堂浦克美、坪井義夫、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方法, 第47回日本神経学会総会. 東京. 2006. 5. 11-13
 2. 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年プリオン研究会文部科学省 獣共通感染症研究会クラスター支援事業. 岩手県安比高原. 2006. 9. 2-3
 3. Rainov N. G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V: Experimental treatments for human Prion diseases. Neuro Prion 2006. Torino. 2006. 10. 3-6

4. 荒木保清、石神紀子、坪井義夫、山田達夫、北本哲之、佐藤克也、中川正法: Codon180 変異をしめす CJD へのペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 第11回日本神経感染症学会. 伊勢市観光文化会館. 2006. 10. 13-14
5. 坪井義夫: プリオン病治療戦略の展望—臨床試験—. 第28回日本薬学会九州支部コロキウム. 福岡大学薬学部. 2006. 10. 21
6. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T : Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in Prion disease. Therapriion Meeting. Paris . 2006. 11. 21
7. 寺田達弘、小尾智一、杉浦 明、山崎公也、溝口功一、村山繁雄、齊藤祐子、坪井義夫、山田達夫: ペントサン治療後の Creutzfeldt-Jakob disease(CJD)の1例. 第85回関東臨床神経病理懇談会 (東邦大学医学部. 2007. 1. 6
8. 石津暢隆、崎山快夫、齊藤祐子、松本ルミネ、坪井義夫、山田達夫、北本哲之、堂浦克美、蛇澤 晶、栗崎博司、村山繁雄: ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与中に死亡した、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)の1剖検例. 第85回関東臨床神経病理懇談会. 東邦大学医学部. 2007. 1. 6

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表 1. PPS 脳室内持続投与法を施行した 9 例

No	Age	Gender	Diagnosis	Date of Surgery	Duration from the onset (M)	PPS dose Initial/Final (μ g/kg/day)
1	67	F	sCJD	2004/11/16	9	1/120
2	73	F	sCJD	2005/3/1	3	2/120
3	68	F	sCJD (MM2)	2005/6/2	6	10/120
4	64	F	fCJD (V180I)	2005/6/21	4	10/120
5	64	F	sCJD	2005/11/14	3	10/120
6	55	M	iCJD	2006/3/13	10	10/120
7	66	M	iCJD	2006/6/12	3	20/120
8	69	F	GSS (P102L)	2006/8/2	6	20/120
9	73	F	fCJD (V180I)	2006/10/15	7	20/120

表 2. PPS 脳室内持続投与法を施行した 9 例の経過と副作用

No	Age	Date of Surgery	Survival (months after Tx*)	Subdural effusion	Presence of effusion from surgery (M)	Any hemorrhage
1	67	2004/11/16	17 (died)	+	23	+(脳室)
2	73	2005/3/1	21 (died)	+	5*	-
3	68	2005/6/2	20	+	4-12	+(脳室)
4	64	2005/6/21	20	+	12	+(硬膜下)
5	64	2005/11/14	15	+	3*	+(硬膜下)
6	55	2006/3/13	4 (died)	+	3	-
7	66	2006/6/12	8	-	-	-
8	69	2006/8/2	6	-	-	-
9	73	2006/10/15	4	-	-	-