

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

プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究

分担研究者 福島武雄 福岡大学医学部脳神経外科・教授
研究協力者 大城真也 福岡大学医学部脳神経外科・講師
小松文成 福岡大学医学部脳神経外科・助手

研究要旨

ペントサンポリサルフェート(PPS)脳室内投与を目的とし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留置術をプリオン病が強く疑われる9症例において施行した。周術期においては外科処置に係わる全てのスタッフに対して適切な教育・訓練・十分な手術シミュレーションを行うことで、安全性の高い確実な手術処置が可能になるものと推測された。また周術期においては患者自身に直接影響を与えるような有害事象の出現はなく、比較的安全性の高い手術・手技であることも確認された。しかし慢性期に出現する硬膜下水腫の問題については、プリオン病の自然歴を踏まえた具体的な予防措置の検討が必要と思われた。

A. 研究目的

ペントサンポリサルフェート(PPS)を用いたマウスの感染実験においては、PPSの脳室内投与により、プリオン病の発症遅延効果が確認されている。本研究ではPPSの脳室内投与に必要な脳室内カテーテルおよび腹部埋め込み型注入ポンプ留置術をプリオン病が強く疑われる患者に施行し、外科的処置・治療に関わる周術期の合併症や安全性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)診療マニュアル(改訂版)をもとに、プリオン病が強く疑われた症例の中で、治療研究への参加の同意が得られた9症例に対

して、腹部皮下体内埋め込み型微量注入ポンプの留置及び脳室内カテーテルの留置術を施行した。

具体的には全身麻酔下に右前頭部から前角穿刺で脳室内にカテーテルを留置し、耳介後方を通して側頸部、前胸部、上腹部までカテーテルを誘導し、右腹部皮下に体内埋め込み型微量注入ポンプ(Archimedes infusion pump)を留置した。周術期においては全身及び神経所見の詳細な評価を行い、術翌日および第7病日に頭部CTにて頭蓋内病変、特に出血性病変のcheckを行った。その後、臨床的および画像上に特記すべき問題のないことを確認して、第8病日からのPPS脳室内投与を基本とした。

なお外科的処置・治療に先立って、実際の実務に直接携わるスタッフ（看護師／麻酔科医／脳神経外科医）全てに適切な教育を行い、手術器具の取り扱い／保管／洗浄／消毒または廃棄の具体的な計画を立てて、手術シュミレーションを十分に行った。

（倫理面への配慮）

患者に対する臨床研究は福岡大学医学部倫理審査委員会の承認をすべて得て行われ、患者・家族に対しても十分なインフォームドコンセントを行い同意を得た。

C. 研究結果および考察

今年度対象となったプリオン病疑いの症例は4例で、これまでの症例5例を含めると全部で9例であり、男女比は2:7で女性に多かった。年齢は55歳～73歳の範囲で、平均年齢は67.3歳であった。周術期の合併症としては1例で脳室内カテーテルの留置不全があり、1週間後に局所麻酔下に脳室カテーテルのみの再留置術を必要とした。しかし、その他には外科的処置に直接起因するような有害事象はなく、概ね第8病日からのPPS脳室内投与が予定通り開始可能であった。またPPSの脳室内投与が開始された後にも定期的な画像評価が施行されたが、経過中の慢性期において、4例で硬膜下水腫の出現が確認された。そのうち1例では硬膜下水腫から血腫へ移行したため、術後約4カ月目に硬膜下血腫に対する洗浄術が必要となった。

一方、安全性の面においては、手術中にスタッフ間での針刺し事故が1件生じた。

これはスタッフ間での徹底した教育・訓

練・手術シュミレーションで回避可能な事象であると思われた。

対応処置として針刺し事故後直ちに局所を圧迫し血液を押し出すとともに流水洗浄御、ブラッシングを行い、キッチンハイターで45分間（第1回15分、第2回30分）消毒を行った。その後感染防止目的でペントサンの持続点滴静注および7日間の皮下注を行った。（研究班の堂浦克美・片岡泰文先生指導）

D. 結論

PPS脳室内投与を目的とし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留置術をプリオン病が強く疑われる9症例において施行した。周術期においては外科処置に係わる全てのスタッフに対して適切な教育・訓練・十分な手術シュミレーションを行うことで、安全性の高い確実な手術処置が可能になるものと推測された。また周術期においては患者自身に直接影響を与えるような有害事象の出現はなく、比較的安全性の高い手術・手技であることも確認された。しかし慢性期に出現する硬膜下水腫の問題については、プリオン病の自然歴を踏まえた具体的な予防措置の検討が必要と思われた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

平成18年1月23日：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：17年度班会議

1P-12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ハウ

ノ効果と安全性の検討：山田達夫、坪井義男、福島武雄、堂浦克美

1 P-13 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投与の実際：福島武雄（堂浦班）福岡大学医学部脳神経外科

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17年度 総括・分担研究報告書 主任研究者 堂浦克美

平成18年（2006年）4月 プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究 福島武雄、大城真也、野中将、小松文成 pp11-14

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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

プリオン病治療候補薬物の脳移行性評価に関する研究

分担研究者：片岡 泰文 福岡大学薬学部・教授

研究要旨

①福岡大学医学部第5内科で進行中の臨床試験「プリオン病患者に対するペントサン硫酸(PPS)脳室内投与」において、患者より採取した脳脊髄液中のPPS濃度測定を行った。測定方法は、前処理として除蛋白操作を加えたsGAG Alcian Blue Binding Assay Kitを用いた。髄液の採取ができた4名中、2名の髄液中PPS濃度は測定感度以下であった。残り2名のPPS濃度はそれぞれ、1.2及び5.1 μ g/mLであった。今後も症例数を増やして検討を続ける必要がある。

②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る。簡便な薬物脳移行性評価系の確立を目指して、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モデルの開発を行った。各構成細胞はラット脳より単離後、7種類のモデルを作成してBBB機能を比較検討した。7種類のモデル中、3種の構成細胞からなる共培養モデルが最もBBB機能が亢進していた。このBBBモデルは解剖学的にも生体に類似したものであり、3種細胞間のクロストークはBBB機能の維持に必要であると考えられる。本モデルは、薬物脳移行性を簡便に評価する検定キットとして有用であろう。

A. 研究目的

現在、福岡大学病院でプリオン病患者に対するペントサン硫酸(PPS)脳室内投与の臨床試験が進行中である。PPSはグリコサミノグリカン類似の構造を有する硫酸化多糖で、分子量が大きく水溶性が高いことから、経口投与や静脈内投与では血液脳関門(BBB)を通過しない。昨年度はPPS脳室内投与における体内動態評価を目指し、市販のAssay KitによるPPS濃度測定法を確立した。本年度は、その測定方法を用いて、患者脳脊髄液中のPPS濃度の測定が可能であるか否か検討した。

またプリオン病治療候補薬物の探索において、

BBB透過性の評価が必要である。これまで簡便なin vitro BBB透過性評価法として脳血管内皮細胞単層培養系を用いた方法が行われてきた。BBBは脳血管内皮細胞、アストロサイトおよびペリサイトから構成され、BBB機能の調節はそれら細胞間のクロストークが重要であることが明らかとなりつつある。そこで、本年度は、新規in vitro BBB透過性評価法の確立を目指して、3種のBBB構成細胞を用いた各種BBBモデルを作成し、密着結合性および輸送タンパク質発現量を比較検討した。

B. 研究方法

1) 患者脳脊髄液中 PPS 濃度測定

一定期間 PPS 脳室内投与中の患者で脳脊髄液の採取が可能であった4名を対象とした。測定時の PPS 投与量は、60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。髄液中 PPS 濃度は、検体を除タンパクした後、sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit (Wieslab AB) を用いて測定した。

2) 新規 in vitro BBB モデルの確立

①BBB モデルの作成：

ラットより脳毛細血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを既報に従い単離した。モデルの作成は、Transwell®システムを用い、脳血管内皮細胞をメンブラン上に播種し、内皮細胞のみの単層培養系および任意の細胞2種あるいは3種からなる共培養系を構築した。共培養系ではメンブランを介した血管内皮細胞との接着あるいは非接着のモデルを作成し、合計7種類のモデルを比較した。

②密着結合性の評価：

脳血管内皮細胞の密着結合性は、経内皮電気抵抗 (TEER) を指標として機能を評価し、ウエスタンブロットおよび免疫染色法により密着結合構成タンパク質 (Occludin、Claudin、Zo-1) の発現を評価した。

③輸送タンパク質の評価：

輸送タンパク質はウエスタンブロット法および免疫染色法により評価した。

(倫理面への配慮)

プリオン病患者に対する PPS 脳室内投与の臨床試験は、福岡大学病院倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族に説明の後、文書による同意を得た。動物実験は、福岡大学動物実験委員会の承認を得た後、福岡大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1) 患者脳脊髄液中 PPS 濃度：

髄液の採取できた4名中、2名の髄液中 PPS 濃度は測定感度以下であった。残り2名の PPS 濃度

はそれぞれ、1.2 及び 5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

2) 各種 in vitro BBB モデルの比較：

各 BBB モデルの TEER は脳血管内皮細胞単層培養系と比較し、共培養系 (アストロサイト、ペリサイト) で上昇した。脳血管内皮細胞とペリサイトが接着し、アストロサイトが非接着である3種共培養系 (EPA) で、TEER が有意に上昇し、最高値を示した。EPA 型モデルでは、脳血管内皮細胞接合部位で密着結合構成タンパク質の発現が認められ、発現量は他のモデルと比較して高かった。また、輸送タンパク質に関しても、EPA 型ではグルコーストランスポーター、LDL レセプター、多剤耐性タンパク質および P-糖タンパク質の発現が認められた。

D. 考察

前年度確立した sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit 測定法を用いると患者検体の PPS 濃度測定が可能であることが判った。標準的な髄液量と1日あたりの産生量から、現在の投与量での髄液中濃度は約 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になると推測されるが、実際の患者検体の濃度は予想値よりかなり低かった。プリオン病態下での髄液量および産生量などが異なる可能性があり、PPS 脳内動態について患者数を増やしてさらに検討する必要がある。

BBB 構成細胞を用いた各種 in vitro BBB モデルは、EPA 型で良好な密着結合性と輸送タンパク質発現が認められた。EPA 型モデルは解剖学的に BBB と類似した構造を持ち、3種細胞間のクロストークによる BBB 機能調節機構が再現可能であると推察される。EPA 型モデルは、薬物の BBB 透過性を簡便に評価する検定キットとして有用である。

E. 結論

本研究では、PPS 脳室内投与の臨床試験において PPS の脳内挙動を明らかにし、科学的根拠に基づく投与設計を行う際に必要な基礎的方法を提

示した。また、プリオン病治療候補薬の探索において、簡便な BBB 透過性評価を可能とする in vitro BBB モデルを確立した。以上、本研究は、プリオン病治療法開発を推進する上で重要な支援ツールを提供するものである。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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.* (inpress), 2007

2. 学会発表

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*, September 8-9, 2006, Fukuoka, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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

プリオン病患者のアミロイドPETイメージング

分担研究者	志賀裕正	東北大学病院神経内科・講師
研究協力者	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科・助手
研究協力者	工藤幸司	東北大学大学院医学系研究科・教授
主任研究者	堂浦克美	東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者	中村起也	東北厚生年金病院神経内科
研究協力者	坪井義夫	福岡大学医学部第五内科・助教授
研究協力者	糸山泰人	東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

プリオン病の生前早期診断法開発のため、孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)患者、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群(GSS)患者各1名を対象にアミロイドPETイメージングを施行した。孤発性 CJD 患者では正常者と比較してアルツハイマー病患者(AD)と同様に大脳皮質で取り込みが増大していたが、視床、小脳でも増大していることがADと異なっていた。また Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群(GSS)患者では正常者よりも大脳皮質、小脳で取り込みが増大していたが、特に小脳での取り込み増大がADとの明らかな違いであった。今後症例数を蓄積する必要がある。

A. 研究目的

プリオン病の治療法を開発するためには、より早期に確定診断ができた患者を対象に治療法の検討をする必要があるが、プリオン病の生前確定診断法は脳生検以外に存在しないのが現状である。非侵襲的な診断法の開発が重要な問題である。

アミロイドと特異的に結合し、ヒトへの臨床応用が可能であるプローブを用いて、プリオン病患者の脳内に蓄積するアミロイドを検出することができれば、早期確定診断が可能となる。本研究ではPET (Positron Emission Tomography: PET) 検査用に開発されたアミロイドと特異的に結合するBF-227を用いて、PET検査にてプリオン病患者脳内のアミロイドを可視化することを目的としたものである。

B. 研究方法

対象は孤発性 CJD 患者1名、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群(GSS)患者1名。最大 370 MBq の¹¹¹C]BF-227 を確保してある肘静脈から投与した。投与直後からPET撮像を開始し、脳内の放射能を測定した。ミオクローヌスにて体動が激しい孤発性CJD患者には鎮静剤を使用した。鎮静剤の使用も含め患者家族より同意を得るとともに、東北大学医学部倫理委員会にて承認を得た。

(倫理的配慮)

個人が識別できないように匿名化して記録を保存した。

C. 研究結果

孤発性CJDでは同年齢の正常対象者と比較して大脳皮質、視床、小脳で[11C]BF-227の取り込みが亢進していた。大脳皮質の取り込みはアルツハイマー病患者(AD)と同様の経口を示したが、視床、小脳の取り込み亢進がADとは異なる所見であった(図1)。

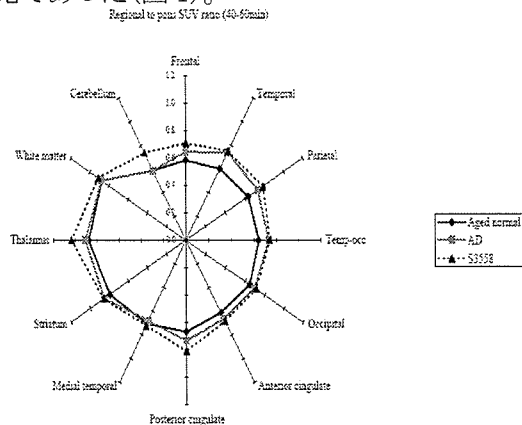


図1. 孤発性CJDの[11C]BF-227取り込み所見

GSS患者では同年齢の正常対象者と比較して大脳皮質、小脳の取り込みが亢進していたが、脳幹部、視床では差がなかった(図2)。

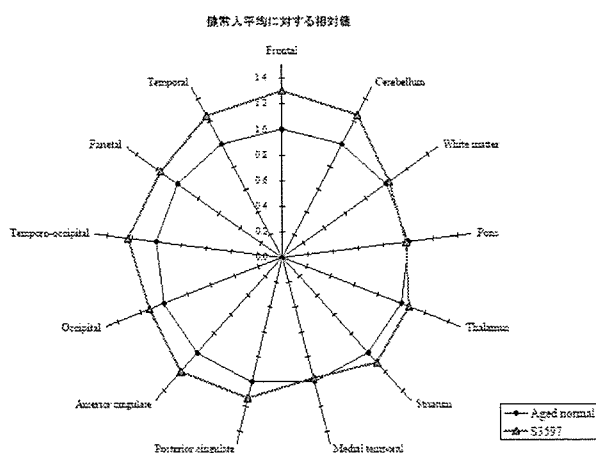


図2. GSS患者の[11C]BF-227取り込み所見

D. 考察

アミロイドPETイメージングでは、施行症例がまだ少なく結論は出せないが、孤発性CJD、GSSともに正常高齢者と比較してBF-227の集積増加を認め、PrP^{Sc}異常沈着を反映している可能性がある。

[参考文献]

1. Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, et al. Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. J Gen Virol 2004; 85: 1785-1790.
2. Kudo Y. Development of amyloid imaging PET probes for an early diagnosis of Alzheimer's disease. Minim Invasive Ther Allied Technol 2006; 15: 209-213.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, et al. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. J Neurol (in press)
2. 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 2006; 13: 661-665.

2. 学会発表

1. 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. 5. 12

G. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得：なし
4. 実用新案登録：なし
5. その他：なし

経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究

主任研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者 川崎ゆり、伊藤由美子、山田有希 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 川越敬一、陳忠正 第一製薬東京研究開発センター

研究要旨

脳内感染において経口投与で治療効果を認めた compB について、その効果についてさらに解析を進めた。本化合物は正常型プリオン蛋白の発現に影響せず、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。

A. 研究目的

脳内感染動物において経口投与で発症遅延効果を発揮するアミロイド親和性化合物 compB を発見したことを報告している。今年度はこの化合物の治療効果と作用機序について、さらに *in vitro* と *in vivo* での解析を進めた。

B. 研究方法

作用機序解析：プリオンが持続感染しているマウス神経芽細胞腫細胞の培養上清中に、compB を加えて培養を続け、細胞がコンフルエントになった時点で細胞を回収し、細胞に含まれる全てのプリオン蛋白をウエスタンブロット法で、細胞膜上に発現しているプリオン蛋白をフローサイトメーターで解析した。また、compB が異常型プリオン蛋白アミロイドに結合するかどうかを、GSS 患者小脳組織切片に compB をふりかけ蛍光顕微鏡で観察した後に、同一

切片をプリオン蛋白免疫染色を行い解析した。

動態解析：ICR マウスの尾静脈に compB を投与し、投与後 2 分および 30 分に血漿及び脳を採材した。血漿中及び脳中より compB を抽出し、HPLC で分析した。移動層には AcCN / 20 mM NaH₂PO₄ = 350 / 650 を、HPLC のカラムには Inertsil 5 μm 4.6×250 mm を用い、流速 1.5 ml/min で溶出し、UV 285 nm、蛍光 Ex 285 nm、Em 311 nm で検出した。標準濃度の compB を加えたサンプルを測定して検量線を引き、脳内および血漿中濃度を求めた。

治療効果解析：RML 株プリオンを脳内感染させた Tga20 マウスにおいて、compB の経口投与開始時期と生命予後改善効果、経口投与期間と生命予後改善効果を調べた。化合物は毒性が出ない高用量を粉末餌に混ぜて投与した。

治療個体の感染力価解析：compB

投与を行った RML スクレイパー脳内感染 Tga20 マウスの脳中の感染力価をバイオアッセイで解析した。対照群として未治療群のマウス脳を compB 投与非感染マウス脳ホモジネートで希釈した材料を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は東北大学医学系研究科動物実験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

作用機序解析： ウェスタンブロット法及びフローサイトメーターで解析した限りでは、compB は正常型プリオン蛋白のトータルの発現量や細胞膜上での発現量に影響しないことが明らかとなった。また、プリオン病患者の組織切片を用いた解析から、compB は異常プリオン蛋白アミロイドに選択的に結合することが明らかとなった。

動態解析： compB は尾静脈より静注後 2 分では高率に脳実質内に移行した。脳・血漿比は 2.7 と、脳移行性に極めて優れていることが明らかとなった。しかし、静注後 30 分では脳内でも血漿中でも検出感度以下にまで低下した。

治療効果解析： 昨年度まだ結果が出ていなかった Fukuoka 1 株感染マウスにおいても発症遅延効果があることが判明した。また、マウスの系統に関係せず、RML 株脳内感染させた ICR マウスにおいても発症遅延効果があることが明らかとなった。RML 株脳内感染 Tga20 マウスを用いた実験で、投与時期

と治療効果との関係を解析したところ、投与開始時期が遅れば遅れるほど治療効果が劣ることが明らかとなった。さらに、投与期間と発症遅延効果との関係を解析したところでは、投与期間が長いほど発症が遅延すること、投与中止後の生存期間は非投与群の生存期間よりも長くなること、投与期間が長くなれば投与中止後の生存期間はやや短くなることが判明した。

治療個体の感染力価解析： 脳内感染マウスにおいて compB 投与マウスの脳中の感染力価を対照マウスの脳中の感染力価と比較したところ、ともに発症末期であっても compB 投与マウス脳中の感染力価は非投与マウス脳中の感染力価よりも低いことが判明した。

D. 考察

本年度の結果から、compB は正常型プリオン蛋白の発現に影響して間接的に異常型プリオン蛋白の産生を抑制している可能性は考えにくい。アミロイドに親和性であり、組織切片を用いた解析から、compB は異常型に結合して正常型が異常型へ変換されるのを阻害している可能性が考えられる。

一方、compB は脳移行性に優れているばかりでなく、アミロイド・イメーシングプローブ化合物と比較して脳からのクリアランスが遅れることで優れた治療効果を発揮していると当初は想定していた。しかし、本年度の動態解析の結果から、この化合物は脳への移行性に優れているものの脳や血液中から短

時間でクリアランスされることが判明した。より一層優れた治療効果を発揮させるためには長時間にわたり脳内で一定以上の化合物濃度を保つことが必要であると考えられるため、徐放的に compB を作用させるような投与方策が開発できれば、治療効果が上がることが期待できる。

また、治療効果の解析結果から、より長期間にわたる発症遅延効果を期待するには、できるだけ感染早期より投与を開始することが絶対条件であることが明らかとなったが、それ以外にも長期間投与による薬効低下を抑えることが必要で、薬効低下をきたす前に休薬期間を置く間歇的投与法なども検討してみる必要があるかもしれない。

さらに、感染力価の解析より発症末期であっても compB 投与マウス脳中の感染力価は非投与マウス脳中の感染力価よりも低いことが判明したが、脳中の異常型プリオン蛋白量と感染力価が平行であるかどうかを明らかにするため、ウエスタンブロット法と免疫組織化学法で解析を進めているところである。プレリミナリーな実験の結果では、投与群では発症末期であっても脳内の異常プリオン蛋白沈着の程度が軽いことがわかっている。

E. 結論

経口投与で有効なアミロイド親和性化合物 compB の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について考察した。

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: Styrylbenzazole 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*, 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: Styrylbenzazole 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

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

末梢投与可能な次世代型プリオン病治療薬開発に関する研究

主任研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者 小熊 歩、魚本 幸、山田有希、伊藤由美子、西澤桂子、
川崎ゆり、逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

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、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。

A. 研究目的

末梢投与可能な次世代型のプリオン病治療薬の開発を目指して、*in vitro*、*in vivo* アッセイで有効であった化合物・薬剤の中から、臨床応用が可能なものについて検討を行い、ある抗プリオン成分が極めて期待できることを一昨年度報告した。昨年度は、その抗プリオン成分について、疾患動物を用いて薬物の体内動態を解析し、皮下に投与した際には徐々に血液中に吸収されること、吸収された成分は長期間にわたり血液中で安定に存在することが示唆された。今年度は、これらの成果を踏まえこの成分のプリオン末梢感染に対する効果をさらに追跡した。

B. 研究方法

脳内感染よりも発症予防効果が期待できる末梢感染において、どの程度発

症を抑えることができるのか Tg7-263K の疾患モデルで検討した。腹腔内感染は1% 263Kホモジネート100 μ lをマウスの腹腔内に接種して行った。腹腔内感染直前にマウスに抗プリオン成分を皮下投与した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東北大学医学系研究科動物実験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

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ていない。

D. 考察

昨年度の薬物体内動態解析の結果は、抗プリオン成分が長時間をかけて徐々に血管内に吸収され、血管内で長期間

にわたり安定に存在することを示唆していたが、今回の結果はこの体内動態の結果に矛盾しない。どこまで発症を抑えられるのかさらに経過観察が必要である。

E. 結論

抗プリオン成分の末梢感染に対する

発症予防効果を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表及び知的所有権の出願状況

25 頁－28 頁に記載。

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

プリオン構造緩解作用を持つ臨床薬の効果に関する研究

主任研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者 小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

昨年度発見し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、動物実験で治療効果があるかどうかを検討した。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20 kDa以上の分子サイズを持つ蛋白質であることが判明した。

A. 目的

昨年度報告した異常型プリオン蛋白を分解し易くする働きがあり、検討した全てのプリオン感染細胞で著明な抗プリオン作用を発揮した臨床薬 CR（別の疾患の治療薬として使用されている）について、*in vivo* で治療効果を発揮するかどうか動物実験で検討した。また、CR は成分が十分に解明されていない複数の成分よりなっているため、抗プリオン活性を持つ成分を同定するため抗プリオン活性を含む画分を絞込んだ。

B. 材料と方法

1. *in vivo* 実験： RML プリオンの1%ホモジネート液 100 μ l を Tga20 マウスの腹腔内に接種して感染させた。感染させる直前に CR100mg をマウスの背部皮下に投与した。

各マウスについて感染から発症末期までの日数を計測し、発症遅延効果の有無を Kaplan-Meier 法で解析した。

2. 成分の分析： 有効成分を同定するためゲル濾過による分画、等電点電気泳動による分画などを行ない、有効成分を含む画分の絞込みを行うとともに、構成成分の分析を行った。なお、抗プリオン活性は昨年度報告した持続感染細胞を用いたアッセイ法で解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東北大学医学系研究科動物実験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. *in vivo* での治療効果： CR は投与経路

に関わらず血中への移行が知られているため、末梢感染モデルとして経口感染よりも実験が容易である腹腔感染において皮下への単回投与で予防効果があるかどうか検討したが、結果は図1に示すように生命予後改善効果が観察された。

2. 成分分析： 有効成分を同定するため、ゲル濾過で分画したところ 20 万以上の画分に活性成分の濃度が高いことがわかった。次に、この画分を緩い条件で加水分解を行い、その産物をゲル濾過で分画したものを検討したが、小さい分子量画分には活性はほとんど検出されなかった。さらに等電点電気泳動による分画等を行ない、有効成分を含む画分の絞り込みを行ったところ、活性を持つ成分が弱酸性画分に高濃度に含まれることが判明した。また、CR に含まれる糖質部分を精製したものと蛋白質部分を精製したものを用いて抗プリオン活性をアッセイしたところ、抗プリオン活性は蛋白質成分に認められた。

D. 考察

今回の結果より、臨床薬 CR が *in vitro* だけでなく *in vivo* においても治療効果を発揮することが判明した。患者への使用を考え、脳内感染動物で連日経口投与した際の治療

効果や、末梢感染動物で連日経口投与した際の治療効果について検討を行う必要がある。

一方、CR は複数の成分よりなっているため、どの成分が抗プリオン作用を発揮するのか同定する必要があるが、今回の研究から抗プリオン活性は 20 kDa 以上の分子サイズを有する蛋白質であることが示唆された。抗プリオン活性に富む画分を SDS-PAGE で分離して解析を行ったが、有効成分を単離するところまでは至らなかった。さらに、方法論を検討しながら有効成分の単離同定を行う。

E. 結論

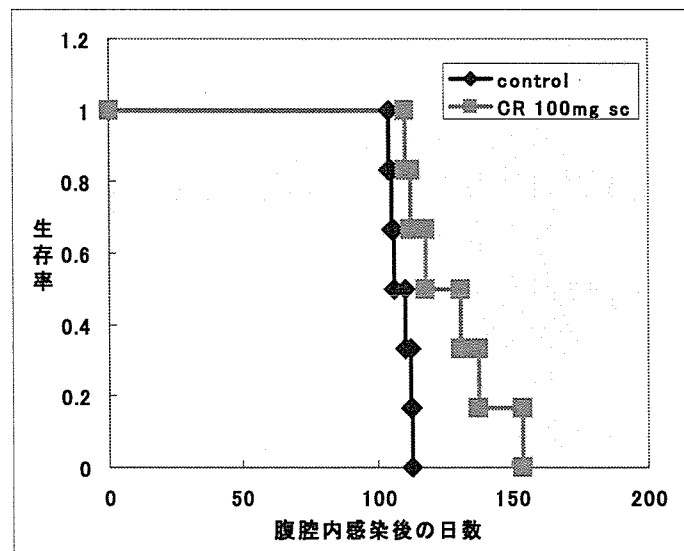
異常型プリオン蛋白質構造を緩解する効果のある治療薬の効果を、動物実験で確認した。治療薬中の有効成分をある程度絞り込むことができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表及び知的所有権の出願状況

25 頁-28 頁に記載。



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

プリオン病の画期的治療法の開発のための基礎的研究

分担研究者：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教授
研究協力者：桑田一夫 岐阜大学人獣感染防御研究センター・教授

研究要旨

プリオン蛋白 (PrP) の異常化のメカニズムは不明な点が多い。しかし正常 PrP の構造を安定化することができれば、異常化は抑制できるものと考えられる。我々は NMR による正常プリオン蛋白の構造解析から構造的揺らぎの大きいアミノ酸を同定し、その領域を標的とし特異的に結合する低分子化合物の *in silico* screening を行った。化合物データベースに含まれる約 32 万個の中から結合すると期待されるもの約 50 種類を選択し、次にそれらの抗プリオン活性を持続感染 GT 1-7 細胞 (GT/FK) を用いてテストしたところ、一つの新規化合物を見いだした (GN8 と仮称)。GN8 は Fukuoka-1 株、22L 株、Chandler 株、BSE 株いずれの感染細胞においても異常 PrP の産生を抑制した ($IC_{50} = 1.32 \mu M$)。さらにリコンビナント PrP との結合性を SPR および NMR にて解析し、構造安定化に重要な PrP のホットスポットを同定することができた。GN8 の *in vivo* での効果を Fukuoka-1 株感染 ddY マウスモデルを用いて検討したところ、末梢投与においても有意な発症遅延効果を認めた。PrP の構造ダイナミクスに基づく論理的創薬の手法はリード化合物の検索に有効であると思われる。

A. 研究目的

プリオン病に対する治療薬 (リード化合物) をデータベースから検索し、末梢投与可能な薬剤を見いだす。正常型 PrP の構造的揺らぎを抑制することができれば、異常型構造への変換を抑制し、発症予防、病態進展抑制に効果を発揮するであろうとの仮説を検証する。

B. 研究方法

1) *in silico* virtual ligand

screening の論理および手法を PrP に応用した。高圧 NMR 等の手法にて見いだした比較的ゆっくりとした揺らぎを示す PrP のアミノ酸残基を正常 PrP の 3 次元構造上にプロットし、それらを含む領域にて囲まれた低分子ポケットをターゲットとした。スクリーニングプログラムの一つ ICM を使い、化合物データベース (32 万分子) の中から結合エネルギーが 32 Kcal/mol 以下の低

分子を検索した。

- 2) *ex vivo* screening test : *in silico*にて hit した化合物のうち、44 個の化合物を持続感染細胞 (GT/FK) を用いて、その効果を判定した。薬剤を DMSO にて溶解後、100, 10, 1 μM に細胞培養液に希釈し、GT/FK 培養液に添加、72 時間培養を行い、細胞を溶解し蛋白質を回収、ウェスタンブロッティングを行い異常型 PrP (PrP-res) の定量を行った。
- 3) *in vivo* test: 4 週齢オスの ddY マウスに Fukuoka-1 株 10% 脳乳剤を脳内投与し、プリオン感染モデルを作成した。薬剤の投与は、皮下埋め込み式浸透圧ポンプ (Alzet) を用いて、4~8 週間の持続末梢投与を行った。

C. 研究結果

In silico screening では 32 万個のうち 624 個がプログラムによって検出されたが、分子構造式、側鎖構造などを湛然にチェックし drug-like なもの 56 個をさらに選び、そのうち実際に入手可能な化合物 44 種類について *ex vivo* test を行うこととした。

Ex vivo テストでは、細胞毒性の強いもの (2 個) をのぞく 42 個の抗プリオン効果を検証できた。IC₅₀ ≤ 10 μM にて効果を示したものは 1 種類だけであった。そのほか 10 μM 以上の高濃度でわずかに効果を示すものは 2 種類ほど認めた。効果を認めた化合物 (GN8 と仮に命名、

分子量 420) は IC₅₀=1.32 μM , GT/FK 以外の感染細胞、GT/22L, GT/BSE, GT/Chandler, N2a58/22L 等においてもほぼ同様に効果を認めた。

GN8 を塩酸塩化し水溶性に変換後、*in vivo* テストを行った。比較的感染後期の 9 週目から薬剤を投与 (6 mg/kg/day) したところ、2 週間ほどの発症遅延効果が認められた (P<0.01)。

D. 考察

抗プリオン薬の開発は、経験的手法すなわち実際に感染細胞を用いてその効果をテストする方法が主に用いられている。本研究では PrP の正常構造とその揺らぎ情報に基づき論理的創薬の手法を応用し、結合化合物の検索を行った。計算機を用いた first screening によって 32 万から 620 へと効率よく絞り込みができたと考えられる。プログラムはさらに改善の余地があるが、こうした新しい手法が有効であることを示すことができたことは意義がある。GN8 と PrP の結合性に関しては NMR 等にて結合領域をほぼ同定できたが、果して揺らぎを押さええているのかどうか今度検証する必要がある。

E. 結論

- 1) PrP 異常化の hot spot を見だし、*in silico* と *ex vivo* のコンビネーションによる低分子化合物のスクリーニング法を確立した。
- 2) GN8 は末梢投与によっても効果を示し、lead 化合物として有用である。