

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichiro Atarashi, Valerie L. Sim, Noriyuki Nishida, Byron Caughey, and Shigeru Katamine. Prion strain-dependent differences in conversion of Mutant Prion Proteins in cell culture. *Journal of Virology* 80(16), 7854-7862 2006

2. 学会発表

Asian Research Forum on emerging and reemerging Infections-2007, Jan

15-16, 2007. Nishida et al. Dynamics-based discovery for a potential therapeutic agent for Transmissible Spongiform Encephalopathies. (poster session)

H. 知的財産権の出願・登録状況

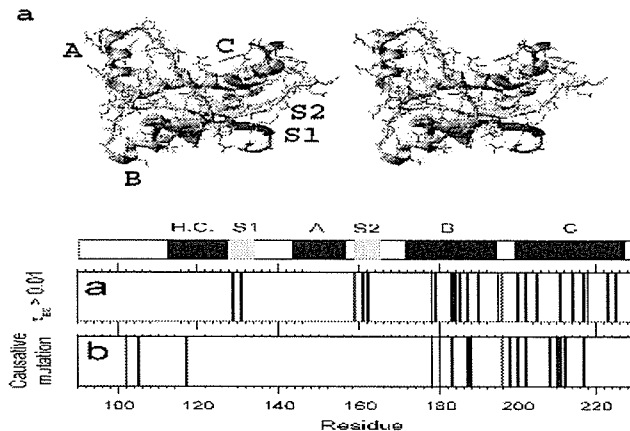
出願中特許 特願 2003-355617 アミロイド前駆体特殊構造形成阻害剤

I. 参考図

揺らぎの大きいアミノ酸を赤線にて下図に表示した。低分子結合ポケットは緑で3D図に表示している。

molecular pocket of PrP^C

The most of unstable amino acid residues are located surrounding the pocket indicated as green. A, B, and C are alpha-helix; S1 and S2 indicate beta-sheet.



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

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

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 木村朋寛, 石川謙介 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

新たな治療薬開発の標的となるプリオン複製・増殖に関連する宿主因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞において RNA 干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングを行ない、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。

A. 目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白の複製・増殖機構は未だ解明されておらず、治療法の開発が遅れている原因の一つとなっている。昨年度に引き続き、RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いてプリオン蛋白の異常化に関連する宿主因子の探索を行った。

B. 材料と方法

1. shRNA 発現ベクターの作製： 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。
2. 培養細胞への遺伝子導入： マウ

ス神経芽腫細胞 N2a 細胞を宿主とし、2種のプリオン病原株にそれぞれ持続感染した培養細胞（ScN2a 細胞および N167 細胞）、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞を継代した翌日にプラスミドベクターを細胞に導入した。必要に応じ培地交換や血清添加を行い、3日間培養した。

3. 異常型プリオン蛋白の検出： 遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテナーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクターのみを導入した細胞（mock）を対照とした。

4. 総プリオン蛋白および正常型プリオン蛋白の検出： 遺伝子を導入した

培養細胞の溶解液に含まれる総プリオン蛋白量をウエスタンブロット法により検討し、mockと比較した。さらに N2a 細胞膜表面上の正常型プリオン蛋白の発現をフローサイトメトリーにより検討した。

5. 標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析： 遺伝子を導入した細胞の全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準に β -actin を用いて相対的な定量を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

プリオン持続感染細胞 2 種において RNA 干渉を用いて任意の分子をノックダウンした。標的遺伝子の発現抑制を確認しながら、プロテナーゼ K 抵抗性である異常型プリオン蛋白の産生量への影響を検討した。昨年度に引き続き、プリオン蛋白を直接の標的とした塩基配列を陽性対照とした。

昨年度候補として挙げた 12 の遺伝子について、shRNA の新たな配列を設計したり、化学合成 siRNA を用いたりするなどさらに検討を加えた。その結果、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。

D. 考察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。

異常型プリオン蛋白の産生阻害を示

した4個の因子は、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。

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

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

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 逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨

新たに構築したインビトロ蛋白質アンフォールディング活性測定法を用いて、マウス神経芽腫細胞 N2a の細胞破砕液より正常プリオン蛋白質 (PrP^C) をアンフォールドする活性成分を探索した。その結果、分子シャペロンであるヒートショック蛋白質 90 (Hsp90) とその小胞体局在ホモログである 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 PrP^C を ATP などのヌクレオチド存在下でアンフォールドし、PrP^C の代謝や機能調節に関与する可能性を示した。

A. 研究目的

プリオンすなわち異常型プリオン蛋白の複製増殖の機構は未だ解明されておらず、そのためより有効な早期診断法や治療法の開発が遅れている。そこで、新規治療薬のターゲットを探索する目的で、プリオンの複製機構とされる正常型から異常型へのプリオン蛋白質の高次構造変化において、その初期過程と考えられる正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の高次構造を変化させる細胞内因子の解析を行った。

B. 研究方法

1. リコンビナントプリオン蛋白質の

調製： 3F4 タグを導入したマウスプリオン蛋白質 (rPrP) を大腸菌にて封入体として発現させ、8M 尿素により可溶化した後、アルギニン存在下でリフォールドした。フーリエ変換赤外分光分析法 (FT-IR) によって、 α ヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質と同様の高次構造をとっていることを確認した。

2. インビトロ PrP アンフォールド試験系の構築： rPrP は低濃度のトリプシンには部分耐性をもつことを利用したインビトロ PrP アンフォールド活性測定系を構築した。100ng の rPrP と披験物質を含む溶液 10 μ l (50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、0.5 μ g/ml ベスタ

チン、0.5 μ g/ml キモスタチン、0.5 μ g/ml ペプスタチン A、0.5ng/ml アプロチニン) を 16°C、15 分間保温した。1 μ g/ml になるようにトリプシンを添加し、さらに 20 分間消化反応を行った。消化産物は、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、3F4 抗体によって検出した。

3. PrP アンフォールド活性成分の精製： N2a 細胞破碎液の遠心上清 (200,000g、30 分間)より、インビトロ PrP アンフォールド活性を指標に精製を行った。まず、破碎液を濃縮し、ゲルろ過カラム Superdex200 (GE ヘルスケア) により分画した。活性分画はさらに陰イオン交換カラム MiniQ (GE ヘルスケア) および PhenylSephrose (GE ヘルスケア) によって分離し、ほぼ均一な成分にまで精製した。

4. 精製標品の同定： 精製標品は SDS-PAGE によって分離後、切り出したゲルよりトリプシンによってゲル内消化を行い、定法に従って MALDI-TOF MS/MS 解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

マウス神経芽腫細胞 N2a を新たに構築したインビトロ PrP アンフォールド活性測定系を用いて、rPrP をアンフォールドする活性成分を単離した。単離した成分は MALDI-MS/MS 分析により、マウスヒートショック蛋白質 90

(Hsp90) の β アイソフォームであることがわかった。

抗体を用いた方法により、活性分画には β アイソフォームだけでなく、 α アイソフォームを含むことが明らかとなった。 α アイソフォームと β アイソフォームのアンフォールド活性を比較したところ、ほぼ同程度の比活性を示し、大きな違いは認められなかった。また、Hsp90 の小胞体局在型ホモログ Grp94 と、他のシャペロン蛋白質である Hsp70 についても PrP アンフォールド活性を測定した。その結果、Grp94 は活性を示したものの、Hsp70 は活性を示さなかった。Hsp90 と Grp94 が示すアンフォールド活性には、ATP などのヌクレオチド依存性は認められなかった。

アンフォールドされた rPrP はトリプシンによって消化され、分子中央部を認識する 3F4 抗体では検出することはできなかった。しかし、N 末側のオクタペプチドリピートを認識する SAF32 抗体や、C 末側を認識する 6H4 抗体、M-20 抗体によって、それぞれ、10 kDa と 13 kDa のペプチドが検出された。

rPrP は Cu^{2+} 結合性を示すことが知られている。そこで、 Cu^{2+} 結合型 rPrP に対する PrP アンフォールド活性を調べた。その結果、60 μ M 以上の Cu^{2+} によって rPrP の高次構造変化によるプロテアーゼ部分耐性を示すこと、また、この部分耐性を示す rPrP については、アンフォールドに ATP などのヌクレオチドが必要なことがわかった。ADP や加水分解しないアナログ ATP γ S や AMP-PNP に

においても添加効果があることから、アンフォールド活性には ATP の加水分解は必要でないこと、また GTP や UTP、CTP においても添加効果があることから、Hsp90 や Grp94 に存在する 2 つのシャペロンドメインの内、C 末側シャペロンドメインの関与が示唆された。

Hsp90 の N 末側シャペロンドメインの阻害剤、ゲルダナマイシンやラディシコール、また C 末側シャペロンドメインの阻害剤、ノボビオシン、シスプラチンのいずれも阻害効果を示さなかった。

D. 考察

今回、我々は rPrP を基質としてアンフォールド反応を促進する細胞内因子として、分子シャペロンである Hsp90 および Grp94 を見出した。

Hsp90 および Grp94 は、サイトゾル、小胞体内腔に局在する Hsp90 ファミリー蛋白質である。Hsp90 には α 、 β の 2 つのアイソフォームがあり、 α アイソフォームはストレス応答することが知られている。Grp94 は小胞体内腔に局在する糖蛋白質であり、C 末側に小胞体膜に係留されるための KDEL 配列をもつ。いずれも N 末側と C 末側にそれぞれ独立したシャペロンドメインがあることが知られており、以下の特徴により区別することができる。前者は ATP 結合型であり、ゲルダナマイシンやラディシコールによって特異的に阻害され、後者は、ATP だけでなく、GTP などの他のヌクレオチドとも結合し、ノボビオシンやシスプラチンに

よって阻害される。Grp94 は、PrP^c の糖鎖修飾が異常な際に小胞体内腔にて PrP^c と複合体を形成することが知られている。

Hsp90 の二つのアイソフォームと Grp94 はインビトロ PrP アンフォールド活性測定系にて同程度の比活性を示し、活性に大きな違いは認められなかった。また、銅と結合していない rPrP に対しては、ATP などのヌクレオチドを必要としないのに対し、銅と結合した rPrP については ATP だけでなく GTP、CTP、UTP の存在下でアンフォールド活性を示した。このヌクレオチドの特異性は、Hsp90 および Grp94 の示す PrP アンフォールド反応には、C 末側シャペロンドメインが関与していることを示す。しかしながら、N 末側シャペロンドメインの阻害剤だけでなく、C 末側シャペロンドメインの阻害剤も阻害活性を示さなかったことから、今回見出した Hsp90 と Grp94 が示すアンフォールド活性は、従来知られている作用機序とは異なるシャペロン反応であることが予想される。

Hsp90 は主にサイトゾルと核に局在するが、他方、細胞外マトリクス中にも検出されることが報告されている。また、Grp94 は小胞体内腔に局在しているが、条件によっては細胞膜に局在することが報告されている。PrP^c は小胞体、ゴルジ体、分泌小胞内腔および細胞膜に局在するが、Hsp90 や Grp94 との相互作用については、Grp94 については報告されているが、今後さらなる解析が必要である。

一方、アンフォールドされた rPrP 分

子は、トリプシンによってN末側とC末側のそれぞれ 10 kDa と 13 kDa の 2本のポリペプチドに分断された。rPrP は 23 kDa であることと、分子中央部を認識する 3F4 抗体によって検出できないことから、トリプシンによる消化は、3F4 エピトープを含む分子中央部で起こっていること、また、N 末側、C 末側はほぼ安定な形でトリプシン消化から保護されていることが示唆された。この結果は、Hsp90 や Grp94 が示すアンフォールド活性は、分子中央部であることを示している。

分子中央部は、PrP^C の代謝の過程で切断を受けることが知られており、Hsp90 や Grp94 はこの過程を調節している可能性がある。また、この部分はアミロイドになりやすく、神経毒性を示す 106-126 にも対応しており、プリオン複製だけでなく、神経毒性の発現にも関与する可能性がある。

Hsp90 や Grp94 の働きを調製してやることによりプリオン複製や神経毒性の発現を抑えることが可能かどうか、感染材料を用いた *in vitro/in vivo* 実験系で明らかにしていく必要がある。

E. 結論

プリオン蛋白の高次構造変化を促進する細胞内因子として Hsp90 および Grp94 を見出した。これらの分子シャペロンは、Cu²⁺ に結合し高次構造変化を起こした PrP 分子についてもヌクレオチド存在下でアンフォールドする。

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

硫酸多糖体の抗プリオン作用発現機序に関する研究

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 照屋健太 東北大学大学院医学系研究科・助手
隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究院・教授

研究要旨

ヘパリンに代表される硫酸多糖体は強い抗プリオン活性を持つことが知られている。今回、ヘパリンについて、プリオン蛋白との相互作用について解析した。すでに、ヘパリン側の抗プリオン活性部位に特徴的な2糖構造が重要であることを明らかにしているが、今回その2糖構造がプリオン蛋白と結合すること、プリオン蛋白側の結合部位がN末端ドメインであることを明らかにした。今回の成果は、新たな治療薬の開発に役立つことが期待される。

A. 研究目的

ペントサンポリサルフェートやヘパリンなどの硫酸多糖体は *in vitro* において優れた抗プリオン活性を持っていることが知られているが、我々は *in vitro* だけでなく *in vivo* においても治療効果があることを示してきた。また、代表的な硫酸多糖体であるヘパリンについては、特徴的な2糖構造がプリオン感染細胞を用いたアッセイでヘパリンの抗プリオン活性に重要であることをすでに明らかにしている。新たな治療薬開発に役立てるために、今回はヘパリンとプリオン蛋白の相互作用について、その2糖構造がプリオン蛋白と結合し得るのかどうか？ 結合するとすれば、いったいプリオン蛋白のどのような部分と結合するかを明らかにした。また、感染

細胞を用いたアッセイで、2糖構造のみの糖体では抗プリオン活性が極めて低いことがわかっているが、その原因について検討し考察した。

B. 研究方法

ヘパリン、ヘパリンの代表的部分構造の二糖類、グルコースの各々を、チオール基で金表面に固定化した三種類の糖チップを研究協力者の隅田教授より供与を受けた。

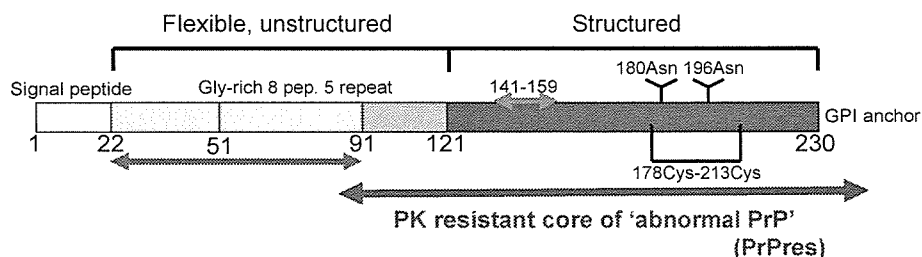


図 プリオン蛋白質のドメイン構造

プリオン蛋白質(マウスの配列、23-231、90-230、121-231、23-89 の4種類)は遺伝子組み換え大腸菌を宿主として産出させ、最終的に液体クロマトカラムによって精製した。各精製蛋白質は質量分析と抗体反応性によって評価したものをを用いた。

細胞はプリオン感染 N2a 細胞 (mouse neuroblastoma 由来) と非感染 N2a 細胞を用い、界面活性剤を含むバッファーで溶解させた。

糖チップ上への分子の結合は、簡易型 SPR 測定装置(モリテックス社 NanoSensor)を用い、共鳴プラズモン効果の共鳴角の変化を指標として追跡した。得られたセンサーグラムを 1:1 の化学量論比での結合を仮定して解析し、見た目の解離定数($K(\text{app})$)を算出した。リコンビナントプリオン蛋白質や、細胞溶解液を糖チップに結合させた後、過剰分を洗浄後、異なるバッファーや、各種分解酵素を添加した時のセンサーグラムの変化とウェスタンブロット(以下、WB)から結合分子の推定を行った。また、その結合の様子の追跡をおこなうためチップを洗浄後、結合した物質を酸性アセトニトリルで溶出し、濃縮後 WB 上で定量評価をおこなった。

(倫理面への配慮)

倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

1) リコンビナント・プリオン蛋白質を用いた場合以下の結果が得られた。PrP(23-231) はヘパリンの

代表的部分構造の二糖が固定されたチップに対して大きなセンサーグラムの経時変化が観測され、解離定数を見積もったところ数 μM の強い結合であることがわかった。また、チップに結合した分子がプリオン蛋白質であることを同定した。同様の結合実験を、PrP(90-230)、PrP(121-231)を用いて行なったところ、チップ上への有意な結合を示すセンサーグラムは得られなかった。蛋白質濃度は先の実験と同程度に設定した。この結果は、プリオン蛋白質の結合部位が、23-89 の領域に存在することを示唆するものであった。そこで、新たに PrP(23-89)を調製し、同様の結合実験をおこなった。その結果、PrP(23-89)は、PrP(23-231)と同程度の解離定数でチップに結合した。速度定数は、PrP(23-231)の場合のそれより大きかった。プリオン蛋白質の 51-91 の領域は銅イオンとの結合が示唆されているものの、PrP(23-231)と化学量論的に同程度の銅イオンの添加による結合のセンサーグラムに大きな変化は観測されなかった。

2) 培養神経細胞の溶解液をロードした場合にも大きなセンサーグラムの上昇が観測された。この変化に関してプリオン感染細胞と非感染細胞とで差は見られなかった。この大きなセンサーグラムの上昇は、リパーゼの添加によって減少することを発見したので、そのセンサーグラムの変化が細胞溶解液のどのような成分に起因するものであるかの検証を行

った。追跡する対象としたのは、プリオン蛋白質と脂質である。

非感染細胞の溶解液では、リパーゼを添加したサンプルでは、プリオン蛋白質はWB上で検出できなかった。一方、プリオン感染細胞ではプロテアーゼ抵抗性を示す領域(図を参照)に相当する移動度のバンドが検出された。このバンドは、リパーゼ処理後プロテイナーゼK処理したもの、プロテイナーゼK処理後リパーゼ処理したものの両方で同様の結果をした。すなわち、非感染細胞ではプリオン蛋白質は検出されず、感染細胞では、分解抵抗性の移動度をしめすプリオン蛋白質が検出された。

次に、細胞溶解液の溶液条件でプリオン蛋白質が糖チップへの結合を示すかどうか検証した。上記の条件下においても、プリオン蛋白質の添加でセンサーグラムの大きな上昇が観測され、さらに洗浄後チップ上から蛋白質を溶出し濃縮後、プリオン蛋白質を同定、定量した。その結果、十分な強度をしめす時、糖チップ上のプリオン蛋白質の量は、約120ナノグラムであった。

以下の実験で用いた細胞溶解液中には、上記の実験にて結合が強く確認された濃度に相当する濃度(約1/3)のプリオン蛋白質が含まれていることをWB上で確認した。ロードしたサンプル量は、上記の結合実験の4倍量を用いた。

予めプロテイナーゼK処理した感染・非感染の細胞溶解液を、リコンビナントプリオン蛋白質で結合が確認された2糖が結合した糖チップへとロードした。その結果、センサーグラムの大きな上昇が両サンプルで見られた。WB上では、非感染細胞溶解液では、プリオン蛋白質が検出されなかった。感染細胞溶解液ではロード中のパスに、添加した量に相当するプリオン蛋白質が検出された。洗浄後、チップからの蛋白質の溶出液にはプリオン蛋白質は検出されなかった。

次に、感染・非感染細胞溶解液をプロテイナーゼ

K処理せずに、その糖チップ上へとロードした。処理後のサンプルと同様にセンサーグラムの上昇が見られた。両サンプルにおいて、ロードのパスに添加した量に相当するプリオン蛋白質が検出された。十分な糖チップ上への結合をセンサーグラムで確認した後、チップ上でプロテイナーゼKによる消化処理を行った。この処理後のサンプルには、プリオン蛋白質は検出されなかった。糖チップ上の蛋白質を、プロテイナーゼK処理前に溶出したサンプルにプリオン蛋白質が痕跡量検出された。

D. 考察

へパリンは多様な構造を含んだ高分子化合物である。これまでにプリオン持続感染細胞を用いた薬剤スクリーニングの結果から、その多様な構造のうち、異常型プリオン蛋白質の産生を抑制するために必要な構造が同定された。その結果を受け、そのへパリン部分構造(代表的な2糖構造)と(リコンビナント)プリオン蛋白質とは直接の相互作用があることを確認した。また、この直接の相互作用については、プリオン蛋白質のどの部分を通して行われているかを検証した。ドメインをN末端側から削ったプリオン蛋白質を用いて結合実験を行った結果、N末端側のドメインPrP(23-89)での相互作用が示唆された。この結合活性の消失がドメイン欠損による可能性があるため、PrP(23-89)を調製して、直接その結合を調べたところ、PrP(23-231)に相当する平衡定数で結合することがわかった。結合・解離の速度定数は、PrP(23-231)のそれらと比べて大きな値を示したが、このことは、分子量が小さくなったことを反映していると考えられる。以上の結果からへパリンとプリオン蛋白質の結合は、へパリン側では代表的な2糖構造、プリオン蛋白質ではN末端の23-89の領域を通して行われることが明らかとなった。

しかしながら、その2糖構造が結合している糖チップに、プロテイナーゼKによる処理を行った細胞

の溶解液をロードした場合、感染・非感染によらず、(すなわち、正常型・異常型)プリオン蛋白質の有効な結合は検出できなかった。異常型プリオン蛋白質はロードのパスに検出された。これは、正常型・異常型によらず 23-89 の領域が分解されてチップ上の 2 糖に結合できなかったためだとリコンビナントプリオン蛋白質の実験から推測される。しかし、センサーグラム自体は大きな上昇を示し、かつ感染・非感染によって同様の結合プロファイルを示した。リコンビナントプリオン蛋白質は細胞溶解液の溶媒条件でも結合することから、上記のチップに結合するプリオン蛋白質以外の細胞成分の存在を示している。また、市販のリパーゼを用いるとセンサーグラムの上昇は見られなかったが、正常型プリオン蛋白質は分解され、異常型プリオン蛋白質も上記に述べた理由から糖チップへ結合できない部分構造へとトリミングされると思われる。これらの蛋白質分解は、リパーゼ製品に混在しているプロテアーゼ類のためだと考えられる。リパーゼ処理後のサンプル中の脂質を薄層クロマトで分析したところ反応は進行しているが、十分な進行度ではなかった(目視で 20%進行程度)。リパーゼ溶液添加によってセンサーグラムがほぼベースラインにまで下降したという観測と合わせると、その要因は脂質ではなく、むしろ蛋白質成分であったことが推測される。

プロテアーゼ K 処理していない試料についても、プリオン蛋白質の有効な結合が観測できなかった。先に述べた、細胞溶解液中の 2 糖へ結合する成分との競合によってプリオン蛋白質の結合が阻害されると考えられる。センサーグラムも先の実験と同様に大きな上昇を示したが、この系においても、感染・非感染で結合プロファイルに差は見られなかった。

なお、非感染細胞においては、非常に少量ではあるものの、結合した痕跡が見られた。

細胞溶解液ではプリオン蛋白質のへパリン部分構造への十分な結合、すなわち直接の相互作用、を観測することが困難であったが、これは細胞溶解液中にへパリン部分構造に親和性を示す成分が存在していることに起因していると推測された。へパリン部分構造はプリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する上で必要な基本構造であるが、この基本構造のみからなる糖体では十分な薬効が発揮されないことがわかっている。この観察事実と今回の細胞溶解液を用いた相互作用解析結果とはよく符合しており、2糖構造への他の成分の競合阻害を抑える工夫により、へパリンやへパリン 2 糖構造の更なる抗プリオン活性の増強がもたらされる可能性がある。したがって、そのような工夫の開発とともに、どのような成分が競合阻害を起こしているのか解析する必要がある。

E. 結論

プリオン蛋白質は、へパリンの代表的部分構造の二糖と強い結合を示した。この 2 糖構造は、プリオン蛋白質の N 末端側(23-89)と結合する。プリオン蛋白質以外にもこの 2 糖構造と結合する成分が細胞に存在しプリオン蛋白質との結合を競合阻害することが示唆された。

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

プリオン病の抗体治療に関する研究

分担研究者 坂口末廣 徳島大学分子酵素学研究センター・教授
研究協力者 林 早苗 徳島大学分子酵素学研究センター

研究要旨

抗プリオン活性を有する抗プリオン蛋白抗体によるプリオン病の治療法の開発を行うためには、抗プリオン蛋白抗体を脳内にデリバリーするシステムを開発する必要がある。そこで本研究では、脳内に侵入できる細胞ベクターを用いた抗体の脳内デリバリーシステムの開発を行うことにした。本年度は、抗プリオン活性を有する抗体 Sh3.9 の重鎖及び軽鎖の cDNA を単離し、培養細胞にトランスフェクションした。その結果、培養細胞において Sh3.9 抗体が再構築出来ることを示した。

A. 研究目的

プリオン病の有効な治療法は未だ確立されていない。最近、そのメカニズムは不明であるが、ある種の抗プリオン蛋白抗体（以下、抗プリオン抗体）がプリオン感染細胞からプリオンを完全に排除できることが報告された。つまりこの結果は、このような抗体を投与することによりプリオン病が治療できる可能性を示した。しかし、抗体は血液脳関門を通過できないため、脳内に到達できない。従って、プリオン病の治療法を開発するためには、効率の良い抗体の脳内デリバリーシステムを開発する必要がある。最近、細胞ベクターを用いた生物製剤の脳内デリバリーシステムの研究が進展している。そこで我々は、細胞ベクターを用いた抗体のデリバリーシステムを開発し、プリオン病の治療法の確立に繋がりたいと考えた。本年度は、抗プリオン活性を有する抗体、Sh3.9抗体が培養細胞で再構築できるかどうか検討した。

B. 研究方法

発現ベクターの作製：Sh3.9抗プリオン抗体

産生ハイブリドーマからRNAを抽出し、Smart™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech社)を用いて、重鎖及び軽鎖cDNAを単離した。次に、それぞれのcDNAを動物細胞発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen社)に挿入し、発現ベクターを作製した。

トランスフェクション：293T細胞に Lipofectoamine 2000 (Invitrogen社)を用いて、重鎖及び軽鎖発現ベクターを同時に導入した。トランスフェクション2-3日後、培養上清を回収した。

ELISA：回収した培養上清を、マウスレコンビナントプリオン蛋白を固相化したウェルに加え反応させた後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を用いて免疫複合体を検出した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験を行っていない。

C. 研究結果

Sh3.9抗プリオン抗体産生ハイブリドーマから5' RACE法により、重鎖及び軽鎖のcDNAをそれ

ぞれ単離した。次に、Sh3.9抗プリオン抗体が培養細胞にて再構築できるか検討するために、それぞれのcDNAをヒトサイトメガロウイルスのプロモーターを有する発現ベクター-pcDNA3.1に挿入し、培養293T細胞に同時にトランスフェクションした。Sh3.9抗プリオン抗体が再構築できたかどうか検討するために、培養上清を回収し、レコンビナントプリオン蛋白を抗原としたELISA法に供した。その結果、コントロールと比べて、抗体発現ベクターを導入した細胞の上清では、有意に高いOD値が得られた。この結果は、培養上清中にプリオン蛋白と結合できる抗体が産生されたことを示し、培養細胞にてSh3.9抗プリオン抗体が再構築できることを示した。

D. 考察

抗プリオン活性を有するSh3.9抗プリオン抗体が培養細胞にて再構築できたことは、脳内に侵入可能な細胞ベクターでも同様にSh3.9抗プリオン抗体の再構築が可能と考えられる。従って、本研究によるSh3.9抗プリオン抗体の培養細胞における再構築の成功は、抗プリオン抗体によるプリオン病の治療法開発に向けた大きな前進だと考えられる。

E. 結論

脳内に侵入可能な細胞ベクターを用いた抗プリオン抗体によるプリオン病の治療法開発のための第一歩となる、抗プリオン抗体の培養細胞における再構築の実験に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaguchi S, Arakawa T: Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. Expert

Review of Vaccines (in press)

2. 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.
3. 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
4. Sakaguchi S: Roles of Prion Protein and Prion Protein-Like Protein in Neurodegeneration: Implication in the Pathogenesis of Prion Diseases; pp. 53-71 PRIONS: New Research edited by Bridgette V. Doupher, Nova Science Publishers, Inc. 2006
5. Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of ant-prion compounds. Biol Pharm Bull. 29:927-932 2006
6. 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

7. 坂口末廣. プリオン病. 感染症 The infection. 36:9-13 2006 (カラー図, 17-18)
8. 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

1. 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
2. 石橋大輔、山中仁木、片峰茂、坂口末廣: 異種プリオン蛋白質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 ポンペ会館(長崎大学医学部), 2006年3月4日

3. 石橋大輔、山中仁木、片峰茂、坂口末廣: 異種プリオン蛋白質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
4. 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

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(2006年4月1日～2007年3月31日迄)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Sakaguchi S</u>	Roles of prion protein and prion Protein-Like protein in neurodegeneration: implication in the pathogenesis of prion diseases.	Doupher BV	PRIONS: New research	Nova Science Publishers, Inc.	New York	2006	53-71

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Doh-ura K</u> , Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, <u>Kataoka Y</u>	Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine.	Cell. Mol. Neurobiol.			in press 2007
Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, <u>Kataoka Y</u>	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, <u>Kataoka Y</u>	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, <u>Kataoka Y</u>	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
<u>Shiga Y</u> , Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, et al.	Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution.	J. Neurol.			in press 2007
<u>Sakaguchi S</u> , Arakawa T	Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases.	Expert Review of Vaccines	6(1)	75-85	2007
Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, <u>Sakaguchi S</u>	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, <u>Sakaguchi S</u>	Newly established <i>in vitro</i> 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
Kawatake S, Nishimura Y, <u>Sakaguchi S</u> , Iwaki T, <u>Doh-ura K</u>	Surface plasmon resonance analysis for the screening of ant-prion compounds.	Biol. Pharm. Bull.	29(5)	927-932	2006
Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, <u>Sakaguchi S</u>	Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Vaccine.	Vaccine	24	2815-2823	2006
Fukuuchi T, <u>Doh-ura K</u> , 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, <u>Nishida N</u> , Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, <u>Doh-ura K</u>	Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies.	J. Neurochem.	99	198-205	2006

Sasaki K, <u>Doh-ura k</u> , Ironsides 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, <u>Doh-ura K</u> , Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T	Increased asymmetrical 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, <u>Doh-ura K</u>	Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study.	Neuropathol.	26	43-49	2006
<u>Shiga Y</u> , Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H, Itoyama Y	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
Atarashi R, Sim VL, <u>Nishida N</u> , Caughey B, Katamine S	Prion strain-dependent differences in conversion of mutant prion proteins in cell culture.	J. Virol.	80(16)	7854-7862	2006
逆瀬川裕二、 <u>堂浦克美</u>	プリオン病の治療 —その現状と展望—.	Brain Medical	18(4)	365-370	2006
逆瀬川裕二、 <u>堂浦克美</u>	孤発性クロイツフェルト —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、 <u>堂浦克美</u>	プリオンイメージングの 試み.	Clinical Neuroscience	24(3)	313-316	2006