

される界面活性剤による処理)、複数工程を併せて評価することは有用となる可能性がある。一連の全製造工程をまとめて評価することは理想的な到達点であろう。しかし、ウイルスの場合と同様に、最初にスパイクする病原体の力価が、多くの場合、1 ないしは 2 工程以上の複数の工程を評価するにはあまりに低い、という実験上の制約がある。

考慮すべき要点は、以下のとおりである。

- ・ 工程のスケールダウン
- ・ スパイクする病原体の選択
- ・ アッセイ法の選択
- ・ 製造工程の選択
- ・ データの解釈と限界
- ・ TSE クリアランスの再評価
- ・ 設備の消毒

### 3.2. 工程のスケールダウン

実験室レベルでの TSE クリアランス評価において実生産スケールでの製造プロセスをスケールダウンする際の原則は、ウイルスバリデーション評価の場合と同じである。実生産スケールでの製造工程をスケールダウンしたモデルにおける収率、品質及び製品又は製造中間体の組成に関するデータを、製造者は提出する必要がある。これらのデータは、実生産スケールで製造された製品の典型的なロットにおけるデータと同等でなければならない。

### 3.3. スパイクする病原体の選択

TSE 病原体に実験的に感染させた動物でのデータによれば、血液中にも感染性が見出され、そのうちの約半分が血漿に、半分が Buffy Coat に存在している (Brown, P., *et al.* Transfusion 38: 810-816 (1998))。しかしながら血液中の感染性の程度は低く、脳に見出される感染性の少なくとも 10,000 倍以下である。そのため、スパイクするための病原体試料を調製するためには、脳組織が事実上唯一の材料である (Brown, P., *et al.* Transfusion 39: 1169-1178 (1999))。スパイクする病原体試料は可能なかぎり力価の高いものを用いるべきではあるが、病原体試料を添加する元の試料溶液の性質を変化させることを回避するため、試料溶液に添加する病原体試料の容積は試料溶液の総容積の 10 %を上回ってはならない。

考慮すべき主な点は以下のものである。

- ・ スパイクする病原体の系統及びその調製に用いられた動物種
- ・ スパイクする病原体の物理化学的性質

#### 3.3.1. 種及び系統

スパイクする病原体試料の調製に用いられる原材料は、入手可能性、アッセイ結果、ヒト血漿に存在する可能性のある感染性と類似した性質をもっているかどうか、などの要因を考慮して決定する。vCJD の症例から直接得た生体試料を供給・使用することは、倫理的観点及び他の理由から制限される。vCJD の生物学的アッセイには正常

マウスを用い、かつ vCJD の患者から得た病原体試料をスパイク実験に使用した例が少なくとも 1 報以上の文献で報告されてはいるものの (Stenland, C. J., *et al.* Transfusion 42: 1497-1500 (2002))、vCJD そのものの使用は強制ではない。適切な品質の原材料を得ることが実際には困難であるが、原則的には BSE 感染ウシからの大量の脳を利用できる可能性がある。原材料のアッセイも困難な場合がある。これは BSE 感染ヒツジにもあてはまるし、スクレイピー感染ヒツジでは特にそうである。デモンストレーション的な場合を除き、例えば、ある工程がモデルとして用いた病原体のみならず vCJD の病原体も除去することを示すためには、げっ歯類で馴化された TSE (例えば、スクレイピー、家族性 CJD、BSE 又は vCJD) の実験株を使うことが最も合理的であるように考えられる。実験株は病原性及び系統の性質が互いに異なっていることから、いくつかの系統について研究が行われている。当該研究で実施されているアッセイの原理は、十分に確立しているものである。これまでに公表された当該研究の結果からは、熱に対する抵抗性は病原体の系統ごとに異なる可能性がみられたが (Taylor, D. M. Veterinary J. 159: 10-17 (2000) ; Somerville, R. A., *et al.* J. Biol. Chem. 277: 11084-11089 (2002))、除去工程の評価においては由来する動物種又は病原体の系統による明白な差異はみられなかった (Stenland, C. J., *et al.* Transfusion 42: 1497-1500 (2002))。除去工程の評価に際しては、どの系統を選択しても問題がないことから、使用する系統は実務的な要因を踏まえて決定してよい。但し、いずれの場合においても、系統を選択した理論的根拠は示さなければならない。

### 3.3.2. スパイクする病原体の物理化学的性状

動物実験では血中に TSE 感染性が明らかに見出されているものの、血中における TSE 病原体の物理化学的性質はこれまで知られていない。血中にある TSE 病原体が脳以外の組織から由来していると仮定するならば、それは脾臓由来である可能性があることが示唆されている。しかしながら、その報告の中で示されているモデル系において、血中の感染性が何に由来するのかは明確ではない。脳が変性するにつれて TSE 病原体が血中に放出されている可能性もあり、その場合にはスパイクする病原体を調製するための材料として脳が適切であろう。他方、PrP<sup>Sc</sup> の不溶性高度凝集塊を含む脳組織が、血中に存在する感染性プリオンに似ているかどうかは不明である。重要なことは、スパイクする病原体の物理的性質について様々な可能性を慎重に考慮することである。

Vey らはハムスター脳の破碎液に由来する 4 種類の病原体を用いて研究を行った (Vey, M., *et al.* Biologicals 30: 187-196 (2002))。

#### ① 未精製の脳破碎液

TSE 感染性に関する公表文献において、未精製の脳破碎液が広く使われている。未精製の脳破碎液は最も高い感染性をもつ。このような試料を用いて研究を実施する場合、試料の均一性と再現性が重要な要因となるであろう。もし試料中の粒子サイズが広い範囲に及ぶのであれば、それに対応するようにろ過などの物理的技術により広い範囲の除去を行う必要があるかも知れない。試料調製の再現性も、得られ

る試験成績の信頼性を判断する際に重要な要因となる可能性がある。

## ② ミクロソーム画分

ミクロソーム画分は脳破砕液を分画遠心することによって調製される。このため、大きな凝集体は除去され、膜に結合している感染性のみが反映される。感染性の程度は未精製破砕液に比べて低いものの依然として高度であり、ミクロソーム画分試料は未精製の脳破砕液に比べてより均一であることが期待できる可能性がある。

## ③ カベオラ様ドメイン (CLD)

カベオラ様ドメインは、脳破砕液を界面活性剤で溶解後、ショ糖密度超遠心分離を行うことによって調製される。感染性の程度はミクロソーム画分より低く、細胞から放出された膜ドメインのようにみえることもある。

## ④ 精製 PrP<sup>Sc</sup>

精製 PrP<sup>Sc</sup> は、脳破砕液から繰り返し界面活性剤で抽出を行い、さらに塩析及び超遠心分離を行うことにより調製される。これは、細胞又は膜と結合していない場合の形状を反映している。このような方法によって調製された精製 PrP<sup>Sc</sup> が、天然に存在する PrP<sup>Sc</sup> と類似しているかどうかは明らかでない。

沈殿処理における挙動を調べた結果、3 つの膜結合型のスパイク用病原体試料（破砕液、ミクロソーム画分、CLD）はいずれも同様の挙動を示し、TSE クリアランス評価に用いる試料としてこれらの 3 つのタイプはいずれも適切である可能性が示された。最も大きい凝集体が除去され、かつ高いレベルの感染性を保持しながら試料が均一となるよう調製されているであろうことから、ミクロソーム画分が最も適切であるかも知れない。これら 3 種とは対照的に、精製 PrP<sup>Sc</sup> は膜画分の試料 3 種のどれよりも容易に沈殿した（クリオ沈殿に含まれた）。スパイクする病原体として他のタイプのもものを選択することも可能である。

このようなスパイク用試料の挙動が血漿中に存在する可能性のある感染性の形状を反映しているかどうかは明らかでない。実験室レベルで製造工程を評価する際には、クリアランスが最小となるケースでの評価が行えるものとして、除去／不活化が最も困難であると推測されるスパイク用病原体試料を選択すべきである。いずれの場合においても、スパイクする病原体試料を選択した理論的根拠は示さなければならない。

## 3.4. アッセイ法の選択

感染性アッセイは、TSE 病原体検出のためのゴールドスタンダードとして受け入れられている。組織又は体液中の病原体は、適切な動物モデルにおける感染によって存在が確認される。つまり、動物モデルに投与して潜伏期間の後に神経系疾患の発現がみられれば、病原体が存在することの証拠である。感染性は動物を用いたエンドポイント力価測定法により測定される。感染性を測定するためのエンドポイント力価測定法を対照として十分バリデートされているならば、試料中に存在する感染性を定量するために、潜伏期間の長さを指標として用いることも可能であるかも知れない。感染における種差の存在並びに病原体の由来する動物種及び病原体の系統の影響によって、アッセイに使

用可能な試料の種類は限定される。例えば、ヒトから得られた孤発性 CJD 試料は、アッセイ用の動物としてトランスジェニックマウスが作製されているが、野生型マウスに対して感染を起こすことは稀である。上述のスパイクする病原体の選択において、この点は考慮すべき要因の 1 つである。しかしながら、潜伏期間のために、動物に投与後、最も速いもの（例：ハムスター 263K モデル）でも少なくとも 6～9 カ月間、非トランスジェニック型のモデルマウスにおいては 15～18 カ月もの期間中、観察・臨床的モニタリングを行わなければならないことから、動物を用いたアッセイ（生物学的アッセイ）の実施は非常に煩雑である。それに加えて、1 つの生物学的アッセイにおいても、感染性病原体ないしは病原体の系統と、それが投与される動物の組み合わせ方は、用いる試料の性質によって限定される。換言すれば、バリデーション評価においては、スパイクする試料として使用可能なすべての種類の感染性物質について、ある特定の動物種又はある特定の病原体の系統のみを用いて確認することは不可能である。この点は、ヒト TSE の分配／不活化能を示す製造工程に対してバリデーション評価のための試験を設計する際に困難をもたらすさらなる制限となる。

生物学的アッセイは、専用の実験室及び動物室内で、使用する病原体の系統に応じて定められた封じ込め条件下（性質が詳しく調べられているスクレイピーの系統であればレベル 2、ヒト及び BSE の系統であればレベル 3）で実施しなければならない。多数の動物を扱うことができ、かつ長期の臨床観察を実施できるレベル 2 又はレベル 3 の施設は、ヨーロッパにはほとんどない。このような試験に要する費用は、アッセイの煩雑さ、発症までの潜伏期間の長さ及び必要となる封じ込め条件を考慮すると、最終的には非常に高額となる。それにもかかわらず、すでに公表されている製造工程の TSE クリアランスに関する研究の大部分では、感染性アッセイの要素がある程度含まれている。試験を実施する際には、性質がよく調べられている試験系（系統及び指標動物）を用いるべきである。

感染性の存在を確認したり、感染性の程度を定量化するために利用できる *in vitro* 試験法について、一般的に適用可能なものはまだ存在しない。N2a、GT1 のような培養細胞株は感受性が高く、マウスで馴化された TSE のいくつかの系統が感染する (Klöhn P. C., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 11666-11671 (2003))。一方、PrP 遺伝子をトランスフェクトした培養細胞株の中には、いくつかのスクレイピーの系統を増殖・複製させることが可能なものもある。

また、公表されている研究において、これと並んでよく用いられている他のアッセイ法は、PrP<sup>Sc</sup> を検出するというものである。多数の実験結果から、TSE 病原体は宿主蛋白質である PrP が異常な立体構造をとって集合したものの自体であろうと示唆されているものの、TSE 病原体の正確な性質は現在まだ知られていない。その異常な立体構造をもつ蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) は、プロテイナーゼ K (これにより PrP<sup>Sc</sup> が生じる) に対して比較的抵抗性を持ち、また、正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) を除去するグアニジン塩酸塩のような変性剤に対しても高濃度まで比較的抵抗性をもつ。動物組織における PrP<sup>Sc</sup> 又は PrP<sup>Sc</sup> の検出は、感染性についての代替指標とみなすことができる。しかし、感染性と PrP<sup>Sc</sup> の量との間の相関関係は系統によって異なるし、感染性又は PrP<sup>Sc</sup> を測定するために採用した方法によってもおそらく異なるであろう。公表されている研究の中には相関関係

が確認されているケースもいくつかあるものの (Lee, D. C., *et al.* Transfusion 41: 449-455 (2001))、このような考慮すべき事項により、PrP<sup>Sc</sup> の除去量から評価されるクリアランスを感染性のクリアランスに関連づけようとする際の信頼性が影響を受ける。PrP<sup>Sc</sup> 検出のための生化学的アッセイと感染性を測定する生物学的アッセイとの間に相関関係が確認された場合には、生化学的アッセイによって感染性プリオン蛋白質の分配／不活化を示すことが適切であろう。

生化学的アッセイ又は生物学的アッセイを用いての段階的アプローチに関するさらなるガイダンスは、2004 年 6 月の CHMP 見解声明中の「9.2.3 血漿由来製品の製造工程」に示されている。

### 3.5. 製造工程の選択

すでに知られているとおり例えば加熱などの従来広く用いられているウイルス不活化法に対して TSE 病原体は抵抗性をもつことを念頭におきながら、TSE 病原体の除去／分配が期待される工程を評価の対象として選択する必要がある。そのため有機溶媒／界面活性剤 (S/D) 処理工程及び加熱処理工程を対象として評価を行うことにはほとんど意味がなく、TSE 病原体の除去にかなり有効であるといくつかの研究から示されているエタノール分画工程、沈殿工程、クロマトグラフィー工程及びろ過工程に焦点をあてるべきである。

他方、ある工程段階での試料にスパイクする病原体の性質は、それより前の処理によって影響を受ける可能性があることに留意しなければならない。例えば、感染性をもつ凝集塊を S/D 処理により分解できることから、低分子量化した感染性物質はろ過膜を容易に通過できるようになり、したがって S/D 処理を実施していない病原体をろ過工程のクリアランス評価に用いると当該工程のクリアランス能を過大評価することになる。

すべての製造者は、公表されているデータと照らし合わせながら、各自の製造工程を注意深く評価しなければならない。各製品に固有のクリアランス評価における段階的アプローチに関しては、2004 年 6 月の CHMP 見解声明の 9.2.3 項にガイダンスが示されている。

### 3.6. データの解釈と制限

ウイルスクリアランス評価においていくつか存在する制約は、TSE 除去能に関する工程評価においてはさらに厳しい制約となる。その制約とは以下の事項を含んでいる。

- ① 製造工程をスケールダウンしてモデル化することが適切に行われていない可能性があること。

ウイルスクリアランス評価において、信頼性をもってウイルス分離工程をスケールダウンすることは困難である。これは、TSE 病原体の除去に特に重要である可能性をもつエタノール分画工程において、特によくあてはまる。

- ② 2 工程のクリアランス評価を行う際に、当該工程の総クリアランスを各工程のクリアランスの合計で近似してよいと仮定していること。

特にスパイクする病原体が不均一なものである場合には、1つの工程で特定の病原体画分のみが優先的に除去され、次の工程でも同じ病原体画分が除去されることもあり得ることから、この仮定が当てはまらない可能性がある。

- ③ 病原体の前処理がクリアランスに影響を及ぼす可能性があること。

例えば、病原体試料が界面活性剤の処理により分解されれば、それを行わない場合に比べて、例えばろ過などの以後の工程においてより容易に通過してしまい、除去が困難になる可能性がある。

- ④ 適用可能なアッセイ法が必ずしも理想的なものではないこと。

感染性アッセイは費用を要するし時間も要する。一般的には PrP<sup>Sc</sup> の量と感染性との間に相関関係が存在するが、これは PrP<sup>Sc</sup> 量及び感染性を測定するために採用した方法に依存する可能性がある。現在までのところ、大部分の研究では、最も適切と考えられる感染性アッセイを用いて結果が確認されている。

- ⑤ スパイクする病原体の系統及び由来する動物種が適用可能なアッセイ法を限定してしまう可能性があること。

現在までのところ、除去工程にこの点が重大な影響を与えるという証拠はないが、得られるクリアランス値がスパイクする病原体の由来によって影響を受ける可能性はいまだ否定できない。

- ⑥ スパイクする病原体の物理化学的な性質が重要である可能性が存在すること。

TSE 病原体が血中に存在するとして、血中での TSE 病原体の物理化学的な形状についての情報は現在何も得られていない。異なる膜画分をそれぞれ含有するスパイク用病原体試料について評価を行った研究成果がすでに公表されているが、それによると評価対象としたすべての沈殿工程において各病原体試料とも非常に類似した様式で除去された。それとは対照的に、膜に結合していない形のスパイク用病原体試料は、特定の沈殿工程においてより容易に除去された (Vey, M., *et al.* *Biologicals* 30: 187-196 (2002))。沈殿工程以外の特定の工程 (例えば、吸着工程) においては、逆のことが起き得る。したがって、最も厳格な結果が得られるスパイク用試料の種類は、製造工程によって異なる可能性がある。

- ⑦ クリアランス評価用の試料溶液にスパイクする病原体は可能なかぎり高い力価のものを用いるとされているにもかかわらず、動物実験では血中に存在する病原体の量が少ないこと。

高濃度のスパイク用病原体試料を用いた場合に比べて、低濃度のスパイク用試料を用いた場合では病原体の除去効率が劣る可能性がある。

- ⑧ ウイルス除去／不活化工程の評価においては、例えば製造パラメータを変動させた場合のクリアランスへの影響を調べるなどして、工程の頑健性に関する評価も実施する必要があること。

*In vitro* でのアッセイ法のみを用いる場合を除けば、TSE を使用するこの種の評

価の実施が困難であるということは、すなわちこのような試験を頻繁に繰り返して実施することがないであろうということである。

したがって、ある製造工程のもつモデルウイルスに対する除去能を表す値の信頼性に比べて、TSE 病原体に対する除去能を表す値の信頼性は低い。

### 3.7. TSE クリアランスの再評価

ウイルスバリデーション評価の場合と同様、製造工程の重大な変更が行われた際には、製造工程の TSE クリアランスデータの再評価が必要となるであろう。評価の実施が困難であること及び得られる結果の信頼性を踏まえると、再評価が必要となる製造工程の変更とはおそらく本当に重大な変更のみに限られると考えられる。その代わり、例えば、感染性のアッセイが *in vitro* で可能になるなど、科学技術の進歩によってクリアランス評価が容易に実施できるようになれば、さらなる評価を実施する必要性が生じるであろう。

### 3.8. 設備の消毒

従来から知られている汚染除去方法によるプリオンの不活化については、多くの研究で評価されている。TSE 感染性の不活化は特に難しく、数年にわたって環境中で感染性を保持していた病原体試料も見出されている。いくつかの処理方法（例えば、アルキル化剤処理、界面活性剤処理）は通常の処理条件では無効であることが知られているが、一方で、極めて有効な処理方法も知られている（例えば、2 %以上の漂白剤又は 1 ~ 2 M の水酸化ナトリウム溶液への 60 分間の浸漬処理、一定の圧力及び時間での 134 ~ 138 °Cオートクレーブ処理）。WHO によっていくつかの処理方法が標準的処理方法又は推奨する処理方法として挙げられており（WHO Laboratory Biosafety Manual 2003 (2003)）、実際に医療機器又は医療廃棄物の処理に使われている。しかしながら、これらの方法が適用できるケースは、以下の理由からかなり限定されている。これらの方法の大部分は苛酷な条件下での方法であり、生物由来製品に対してダメージを与える可能性が高い。また、これらの方法は、製造設備に対する腐食性があったり、他の感染性物質に対しては限られた有効性しか示さない（例えば、水酸化ナトリウムは殺芽胞作用をもたないと報告されている）。いくつかの実験的な処理方法（例えばアルカリ性のクレンザー、プロテアーゼなど）については、汚染除去方法として有効であるかどうか現在評価中であり、まだ適用可能ではない。

TSE 病原体が不活化に抵抗性をもつこと及びステンレス鋼やその他の材料に付着しやすい性質をもつことから、TSE 病原体を除去／不活化できる分離装置を用いた汚染除去方法について考慮することは特に重要である。また、カラムの消毒及び再利用についても、適用可能な処理方法の TSE 感染性に対する効果を踏まえて考慮することが必要である。分画工程の多くで、最後にウイルスろ過工程が導入されていることに留意する必要がある。この工程で使用されるろ過膜は使用後に廃棄される。この工程が除去に効果的であることが示されれば、製造設備から浸出する感染性による製品汚染のリスクは当該工程で減少することになる。

金属表面に固着した TSE 病原体の除去／不活化について評価することは大変困難で

あろう。TSE 試料の中に浸した鋼線を、その TSE に感受性をもち発症する動物の脳に移植するとの試験系が開発されている。このような試験系を用いることによって、すなわち病原体試料を異なる倍率で希釈した各液で処理した鋼線を動物に移植し、感染性がみられなくなる試料の希釈倍率を決定することによって、鋼線が消毒されているかどうかをモニタリングできる可能性がある。プリオンに汚染された医療機器の新しい消毒方法を開発する研究の中で、このアプローチの例が最近報告されている (Fichet, G., *et al.* Lancet 364: 521-526 (2004))。このような研究結果を実生産レベルの設備にまで外挿することは難しいかも知れない。製造設備の汚染除去方法として、水酸化ナトリウム溶液が一般的に使われている。0.1 M 水酸化ナトリウムによる処理は、溶液中又は金属表面に吸着した PrP<sup>Sc</sup> をプロテアーゼ感受性型に変換することが示されている (Kasermann, F., *et al.* J. Gen. Virol. 84: 3173-3176 (2003))。これらの研究結果は感染性アッセイによって確認される必要がある。

以上の考慮すべき点を踏まえると、血漿処理設備に関する新しい科学的知見が利用可能になるまで、現時点では推奨すべき特定の処理方法はない。

#### 4. 本指針のまとめ／結論

すべての製造者は、公表されているデータと照らし合わせながら、各自の製造工程を注意深く評価しなければならない。各製品に固有のクリアランス評価における段階的アプローチに関しては、2004 年 6 月の CHMP 見解声明の 9.2.3 項にガイダンスが示されている。除去工程の評価に際しては、TSE 病原体のどの系統を選択しても問題がないことから、使用する系統は実務的な要因を踏まえて決定してよい。スパイクする病原体として、異なるものを使用することができる。実験室レベルで製造工程を評価する際には、クリアランスが最小となるケースでの評価が行えるものとして、除去／不活化が最も困難であると推測されるスパイク用試料を選択すべきである。いずれの場合においても、スパイクする病原体の系統、由来する動物種及び調製方法を選択した理論的根拠は示さなければならない。

クリアランス評価においては、モデル系としての性格、及び実生産レベルでの製造工程を実験室レベルで評価ができるよう近似を行っていることから、これにより得られるデータに制限があることはよく認識されている。しかしながら、血漿分画製剤の製造工程における TSE 病原体の除去能について、これら実験室レベルでの評価が有用な情報を提供してくれると期待される。

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## <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	出版年	ページ
永田 龍二, 早川 堯夫	非臨床における安全性評価 概論	早川 堯夫 (監修)	バイオ医薬品の品質・安全性評価<増補改訂版>	エル・アイ・シー	出版準備中	—

## <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
平成 19 年					
Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T., Yamaguchi, T., and Kawanishi, T.	Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture	<i>Biologicals</i>	—	—	<i>in press</i>
平成 18 年					
Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C-L., Ishiguro, N., Nagatsuka, T., Uzawa, H., and Horiuchi M.	Inhibition of PrP <sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	349	485-491	2006
Watanabe, Y., Inanami, O., 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	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	350	549-556	2006
Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M.	Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route	<i>Jpn. J. Vet. Res.</i>	53	150-159	2006
Nakamitsu, S., Miyazawa, T., Horiuchi, M., Onoe, S., Ohoba, Y., Kitagawa, H., and Ishiguro, N.	Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black)	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	68	27-33	2006
山口 照英	医薬品各条の改正点—生物薬品	薬局	57	89-95	2006

平成 17 年

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	<i>Acta Neuropathol.</i>	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	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	335	785-792	2005
Iwata, A., Yamaguchi, T., Sato, K., Yoshitake, N., and Tomoda, A.	Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	28	905-907	2005
Yamamoto, Y., Akita, Y., Tai, S., Fukasaku, S., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Yamaoka, K., Shimamura, M., and Hazato, T.	Two-dimensional electrophoresis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis	<i>J. Electrophoresis</i>	49	23-27	2005
Kurosaki, Y., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M.	Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	67	321-323	2005
Kataoka, N., Nishimura, M., Horiuchi, M., and Ishiguro, N.	Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, <i>Cervus nippon</i> , from Tokachi district in Hokkaido	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	67	349-351	2005
堀内 基広	BSE 診断法の開発と現状	<i>Virus Report</i>	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
水沢 左衛子, 岡田 義昭, 堀内 善信, 田中 建志, 佐藤 功栄, 金子 健二, 佐々木 祐子, 田中 利明, 伴野 丞計, 友水 健雄, 速水 照一, 土方 美奈子, 平子 一郎, 真弓 忠, 三上 貢一, 三代 俊治, 宮本 誠二, 牟田 健吾, Weimer, T., Gierman, T.,	C 型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査のための第一次国内標準品の作製	日本輸血学会雑誌	51	515-519	2005

小室 勝利, 山口 照英					
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合成と伝達	膜	30	78-83	2005
平成 16 年					
Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., and Sawada, J.	Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G	<i>J. Gen. Virol.</i>	85	3449-3457	2004
Kim, C-L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., and Horiuchi, M.	Cell-surface retention of PrP <sup>C</sup> by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation	<i>J. Gen. Virol.</i>	85	3473-3482	2004
Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M.	Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	66	1293-1295	2004
Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M.	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies	<i>Virology</i>	320	40-51	2004

## 研究成果の刊行物・別刷



## Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic *O*-sulfated glycopyranosides and their polymers

Satoko Yamaguchi <sup>a</sup>, Yoshihiro Nishida <sup>b</sup>, Kenji Sasaki <sup>b</sup>, Miki Kambara <sup>b</sup>,  
Chan-Lan Kim <sup>d</sup>, Naotaka Ishiguro <sup>a</sup>, Takehiro Nagatsuka <sup>c</sup>, Hirotaka Uzawa <sup>c</sup>,  
Motohiro Horiuchi <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro 080-8555, Japan

<sup>b</sup> Molecular Design and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

<sup>c</sup> Research Center of Advanced Bionics, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 5, Higashi 1-1-1, Tsukuba 305-8565, Japan

<sup>d</sup> Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

Received 29 July 2006

Available online 22 August 2006

### Abstract

Sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and sulfated glycans inhibit formation of the abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in prion-infected cells and prolong the incubation time of scrapie-infected animals. Sulfation of GAGs is not tightly regulated and possible sites of sulfation are randomly modified, which complicates elucidation of the fundamental structures of GAGs that mediate the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. To address the structure–activity relationship of GAGs in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation, we screened the ability of various regioselectively *O*-sulfated glycopyranosides to inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation in prion-infected cells. Among the glycopyranosides and their polymers examined, monomeric 4-sulfo-*N*-acetyl-glucosamine (4SGN), and two glycopolymers, poly-4SGN and poly-6-sulfo-*N*-acetyl-glucosamine (poly-6SGN), inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation with 50% effective doses below 20 µg/ml, and their inhibitory effect became more evident with consecutive treatments. Structural comparisons suggested that a combination of an *N*-acetyl group at C-2 and an *O*-sulfate group at either *O*-4 or *O*-6 on glucopyranoside might be involved in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. Furthermore, polymeric but not monomeric 6SGN inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation, suggesting the importance of a polyvalent configuration in its effect. These results indicate that the synthetic sulfated glycosides are useful not only for the analysis of structure–activity relationship of GAGs but also for the development of therapeutics for prion diseases.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prion; Transmissible spongiform encephalopathy; Glycosaminoglycan; Sulfated glycosides

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), so-called prion diseases, are neurodegenerative diseases with long incubation periods and invariably fatal outcomes. Prion diseases include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Schinker syndrome (GSS) in human beings, scrapie in sheep and goats, and bovine spongiform encephalopathy. One of the characteristics of TSEs is an accumulation of a protease-resistant, abnormal

isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the central nervous system. PrP<sup>Sc</sup> is posttranslationally generated from the host-encoded, protease-sensitive prion protein (PrP<sup>C</sup>) [1]. A central event in the pathogenesis of TSEs is the conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> [1]; therefore, it is expected that inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation will be an effective way of treating prion diseases.

It is well known that sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and sulfated glycans such as dextran sulfate 500 (DS500) and pentosan polysulfate (PPS) prevent prion infection via the peripheral route when administered prior

\* Corresponding author. Fax: +81 11 706 5293.

E-mail address: [horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp](mailto:horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp) (M. Horiuchi).

to, simultaneously, or just after the inoculation with prion [2–5]. They also have been shown to inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation in scrapie-infected murine neuroblastoma cells [6,7]. Based on these findings, sulfated GAGs and their analogues have been considered as candidates for the development of therapeutics for treating prion diseases. Recently, Doh-ura et al. reported that intraventricular infusion of PPS prolonged the survival time of prion-infected mice, antagonized PrP<sup>Sc</sup> accumulation and also reduced neuronal degeneration even when the infusion was given at the late stage of infection [8]. Clinical trials of intraventricular infusion of PPS to CJD and GSS patients have been started in some countries including the United Kingdom.

GAGs consist of a number of disaccharide repeating units, which are composed of uronic acid (glucuronic or iduronic acid) and an amino sugar (galactosamine or glucosamine). The uronic acid and the amino sugar have one to two and two to three possible sites of sulfation, respectively, although these sites are not always sulfated. Consequently, the various combinations of sulfations yield many different possible disaccharide units [9,10]. Although sulfated GAGs may be useful for treating prion diseases, core structures necessary for inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation are still unclear. The identification of the core structures should help in the development of compounds with enhanced therapeutic potential.

To examine the structure–activity relationship (SAR) of GAGs in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation, we screened various regioselectively *O*-sulfated glycopyranosides as mimics of GAGs and their components [11–13]. Here we show that some synthetic sulfated glycopyranosides and their polymers inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation in prion-infected cells. The results presented here suggest that the locations of the *O*-sulfate and *N*-acetyl groups on glucopyranosides are important for the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation.

## Materials and methods

**Glycopyranosides and their polymers.** The structures of glycopyranosides used in this study are shown in Fig. 1. Six monomeric (mono-) *p*-nitrophenyl (*p*NP) glycosides, *p*NP *N*-acetyl-glucosaminide (GlcNAc), *p*NP 3-sulfo-GlcNAc (3SGN), *p*NP 4-sulfo-GlcNAc (4SGN), *p*NP 6-sulfo-GlcNAc (6SGN), *p*NP 6-sulfo-glucopyranoside (6SGlc), and *p*NP 6-sulfo-galactopyranoside (6SGal) were used. In addition, we used polymers of the glycopyranosides, in which the mono-glycopyranosides were linked to acrylamide chains to mimic the oligosaccharide entity of GAGs [14]. Molar ratios of acrylamide to each glycopyranoside were approximately 9:1, indicating that each polymer has ca. 10% of glycopyranoside as residues. Average molecular weights of these polymers were estimated to be approximately  $1.2\text{--}3.3 \times 10^5$ . The compounds were dissolved in distilled water or dimethyl sulfoxide and filtered through a 0.45- $\mu$ m Millex filter (Millipore). Heparan sulfate (HS) and heparin were purchased from Sigma. DS500 was purchased from Polysciences, Inc. PPS (Cartrophen Vet, Biopharm Australia Pty, Ltd.) was generously provided by Dr. Katsumi Doh-ura, Tohoku University.

**Cell culture.** Neuro2a mouse neuroblastoma cells (ATCC CCL-131) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (ICN Biomedicals) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and non-essential amino acids. Mouse neuroblastoma cells persistently infected with prion, which were originally established by Race et al. [15], were cloned by limiting

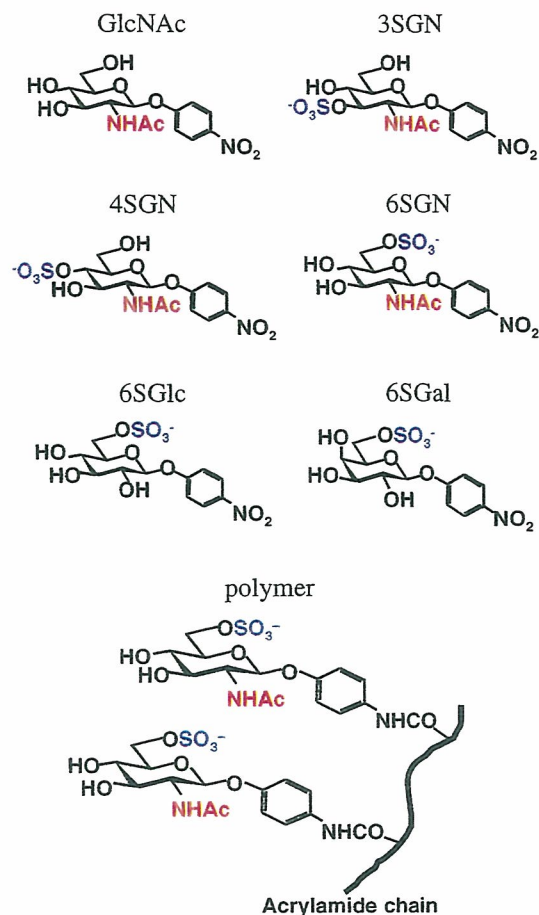


Fig. 1. Structures of sulfated glycopyranosides and their polymers. Structures of mono-glycopyranosides used in this study. 3SGN, 4SGN, 6SGN, 6SGal, 6SGlc, and GlcNAc were also used in polymeric form, in which the glycopyranosides were coupled to an acrylamide chain through their *p*NP residues [14].

dilution, and a resulting subclone (I3/I5-9) that possessed a high level of PrP<sup>Sc</sup> [16], was used in this study. The I3/I5-9 cells were maintained in Opti-MEM (Invitrogen) containing 10% FBS, and cells passaged fewer than 20 times were used for the experiments.

**Treatment of cells and sample preparation, SDS-PAGE, and immunoblotting.** The I3/I5-9 cells or Neuro2a cells nearly confluent in a 25 cm<sup>2</sup> flask were seeded in a 35 mm tissue culture dish with 1:10 dilution. On the second day, the medium was replaced with 3 ml of Opti-MEM containing 10% FBS (for I3/I5-9 cells) or 3 ml DMEM containing 10% FBS (for Neuro2a cells) and test compounds were added to the medium. The cells were cultured for 2 days in the presence of test compounds and examined for the presence of PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>Sc</sup> by immunoblotting as described previously [16]. For quantitative analysis, we used one of the following: the Western-Star™ Protein Detection Kit (Tropix) for chemiluminescent detection and quantitation of immunoreactive bands using an LAS-1000 lumino image analyzer (Fujifilm) as described previously [16]; or an ECL Western Blotting detection kit (Amersham Biosciences) and quantitation with an LAS-3000 lumino image analyzer (Fujifilm).

**Indirect immunofluorescence assay (IFA).** Cells seeded on 8-well chamber slides (Nunc) were treated with test compounds for 2 days and then fixed with methanol for 20 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After blocking for 30 min with PBS containing 5% FBS (FBS-PBS), the cells were incubated for 1 h at room temperature with mAb 31C6 [17] diluted in 1% FBS-PBS. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h with 1:1,000 diluted Alexa 488-labeled Fab fragment of goat anti-mouse IgG. Finally, the slide was mounted with PBS containing 50% glycerol, and 1% *n*-propyl gallate

and examined with an Olympus IX71 fluorescence microscope equipped with a cooled CCD unit (CoolSNAP™ HQ, Roper).

**Cell growth assay.** Cells were seeded in 96-well plates at  $1 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ l of medium. On day 2, test compounds were added and the cells were incubated for 48 h. All experiments were carried out in quadruplicate. Next, 20  $\mu$ l of a mixture of 1 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) and 0.2 mM 5-methylphenazinium methyl sulfate was added to each well and the plates were incubated for 3 h at 37 °C. Finally, the optical density at 450 nm was measured with a microplate reader. The relative growth ratio in the presence of test compounds was calculated by comparing the growth of cells with and without the test compounds.

## Results

### Effect of *O*-sulfated glycopyranosides on PrP<sup>Sc</sup> formation in cells

To investigate the SAR of GAGs in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation, we used regioselective *O*-sulfo glycopyranosides synthesized by a combination of chemical and enzymatic reactions (Fig. 1). Because GAGs are oligosaccharides consisting of uronic acids and amino sugars, we

also used polymers of glycopyranosides. DS500, heparin, and PPS, which inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation in cultured cells [6], were used as positive controls.

Fig. 2 shows representative results of immunoblot analysis for the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. A 2-day treatment with mono-4SGN, poly-4SGN, or poly-6SGN dose-dependently reduced PrP<sup>Sc</sup> formation. In agreement with previous reports, DS500, heparin, and PPS reduced PrP<sup>Sc</sup> formation, but HS did not [6,7]. Table 1 summarizes the effect of glycopyranosides on PrP<sup>Sc</sup> formation from at least three independent experiments. Three glycopyranosides, mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN, reduced PrP<sup>Sc</sup> with low 50% effective dose (ED<sub>50</sub>); ED<sub>50</sub> of them were 10, 4, and 9  $\mu$ g/ml, respectively. However, they were less potent than PPS (ED<sub>50</sub> = 0.3  $\mu$ g/ml) and DS500 (ED<sub>50</sub> = 0.5  $\mu$ g/ml), which are known to be the most effective GAG analogues for inhibiting PrP<sup>Sc</sup> formation (Fig. 2 and Table 1). Other three glycopyranosides, mono-6SGal, poly-3SGN, and poly-6SGal, showed weak inhibitory activities (ED<sub>50</sub> > 20  $\mu$ g/ml; Table 1). We mainly focused on mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN in the subse-

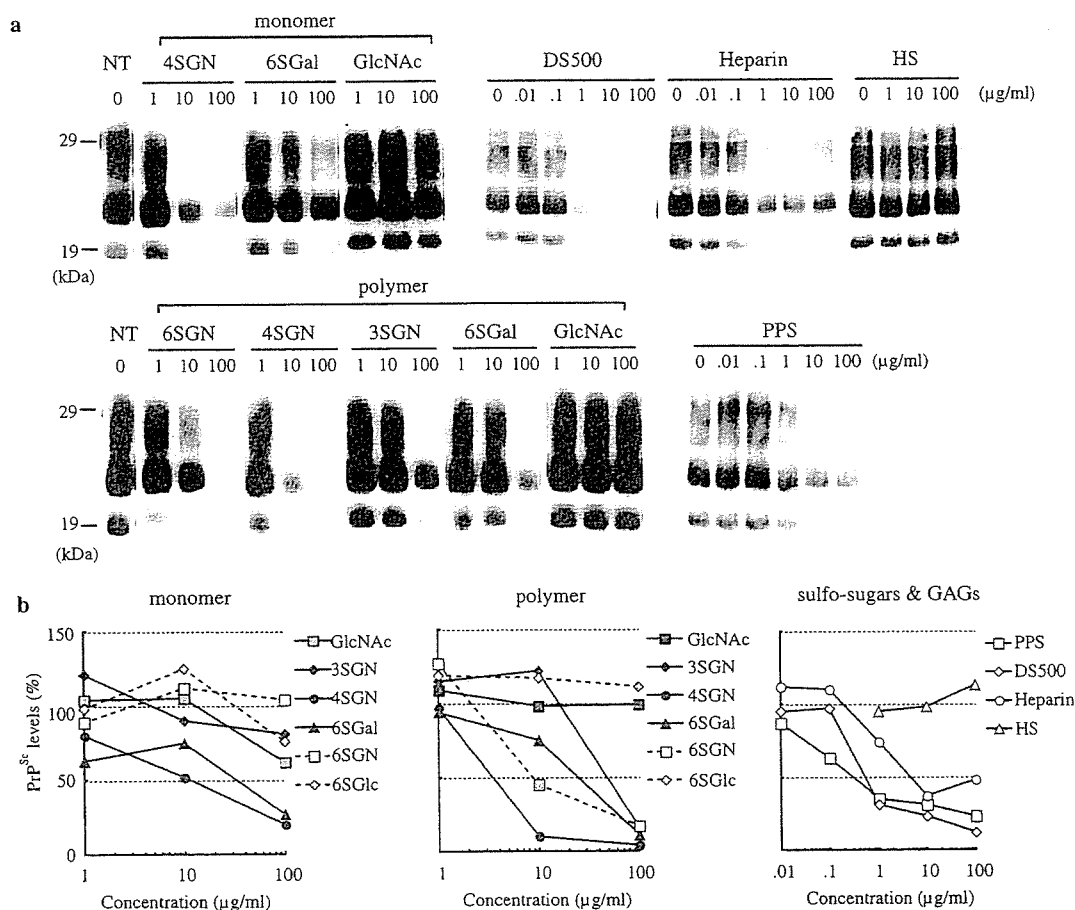


Fig. 2. Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation in prion-infected cells by sulfated glycopyranosides. (a) Representative results of PrP<sup>Sc</sup> detection. I3/I5-9 prion-infected cells were treated for 2 days with various monomeric glycopyranosides and their polymers or GAGs (PPS, DS500, heparin, and HS) at the indicated concentrations. GlcNAc was included as a representative non-inhibitory glycoside. Western blots for the samples containing PPS, DS500, heparin, and HS were visualized with a LAS-3000 lumino image analyzer, whereas the samples containing the other compounds were detected with X-ray film. Molecular mass markers are indicated on the left. NT, untreated cells. (b) Quantitative analysis. Quantitative analyses were carried out using a LAS-1000 or an LAS-3000 lumino image analyzer. Results represent the average of at least three independent experiments.

Table 1  
Effect of glycopyranosides and their polymers on PrP<sup>Sc</sup> formation

Compound	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μg/ml)
GlcNAc	>50
3SGN	>50
4SGN	10
6SGal	31
6SGN	>50
6SGlc	>50
Poly-GlcNAc	>50
Poly-3SGN	50
Poly-4SGN	4
Poly-6SGal	21
Poly-6SGN	9
Poly-6SGlc	>50
PPS	0.3
DS500	0.5
Heparin	4
HS	>50

<sup>a</sup> The ED<sub>50</sub> values were estimated from the graphs shown in Fig. 2.

quent experiments because they were relatively strong inhibitors of PrP<sup>Sc</sup> formation.

Fig. 3 shows the results of long-term treatment with glycopyranosides. Mono-4SGN, and two polymers, poly-4SGN and poly-6SGN, which reduced the level of PrP<sup>Sc</sup> for two-day treatment, decreased PrP<sup>Sc</sup> to undetectable level during the serial passage in the presence of the compounds. In contrast, poly-6SGlc, which did not affect the PrP<sup>Sc</sup> formation in 2-day treatment, did not reduce the level of PrP<sup>Sc</sup> even when used long-term.

#### Effect of *O*-sulfated glycopyranosides on the expression of PrP<sup>C</sup>

GAGs bind to N-terminal region of PrP, which contains basic amino acid residues [18,19]. In addition, GAGs are known to accelerate PrP<sup>C</sup> endocytosis and to reduce the total PrP<sup>C</sup> level and cell surface expression of PrP<sup>C</sup> [20]. These facts suggest that direct interaction of GAGs with PrP<sup>C</sup> is involved in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation, although the mechanism of inhibition remains unclear. Thus, we investigated the effect of glycopyranosides on the expression of PrP<sup>C</sup>. Neuro2a cells were treated with test

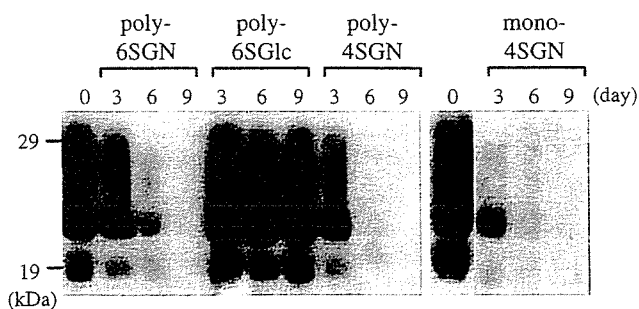


Fig. 3. Long-term effect of sulfated glycopyranosides on PrP<sup>Sc</sup> biosynthesis. I3/I5-9 cells were cultured in the presence of 20 μg/ml of glycopyranosides for 3, 6, or 9 days. Day 0 indicates the untreated control.

compounds at 50 μg/ml for 2 days, and expression of PrP<sup>C</sup> was analyzed by immunoblot and IFA. The positive controls DS500 and PPS clearly reduced the total level of PrP<sup>C</sup> (Fig. 4). Similar to the positive controls, mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN, which inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation, significantly reduced the total PrP<sup>C</sup> level (Fig. 4). In contrast, test compounds that did not inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation (mono-6SGN, mono-6SGlc, poly-6SGlc, and poly-GlcNAc) did not reduce the total level of PrP<sup>C</sup>. In agreement with the immunoblot analysis, fluorescence intensities in Neuro2a cells treated with DS500, mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN appeared to be lower than that of untreated control cells (Fig. 5). Although the total PrP<sup>C</sup> level was reduced by the glycopyranosides, we did not observe a marked difference in localization of PrP<sup>C</sup>.

#### Effect on cell growth

The inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by *O*-sulfated glycopyranosides suggests that they may be useful for treating prion diseases, however, the reduction of PrP<sup>C</sup> level might

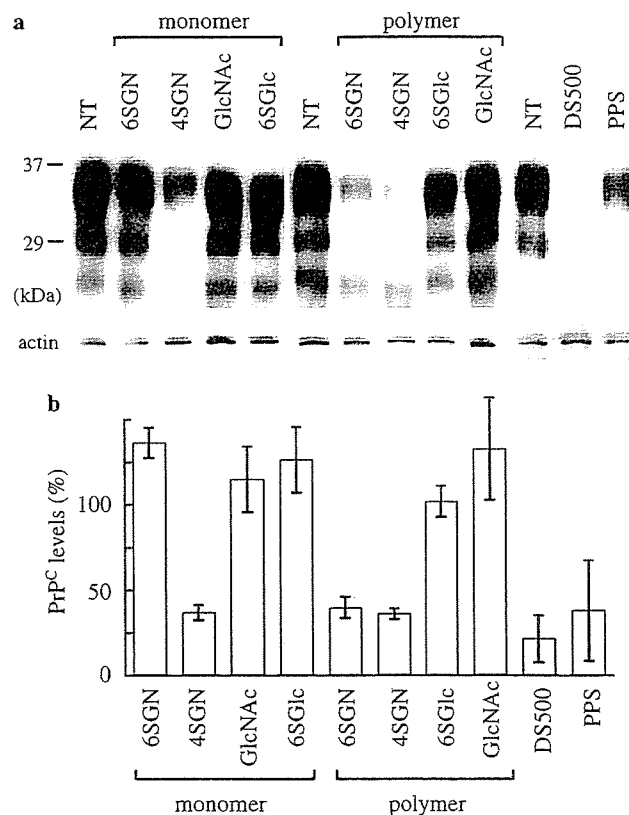


Fig. 4. Effect of sulfated glycopyranosides on PrP<sup>C</sup> level. (a) Representative results for PrP<sup>C</sup> detection. Neuro2a cells were treated for 2 days with various glycosides at 50 μg/ml. α-Sarcomeric actin was used as an internal loading control. PrP<sup>C</sup> was detected with mAb 31C6. NT, untreated control. (b) Quantitative analysis of the effect of sulfated glycosides on PrP<sup>C</sup> level. The experiment in (a) was repeated at least three times, and the graph in (b) indicates level of PrP<sup>C</sup> relative to the untreated control.

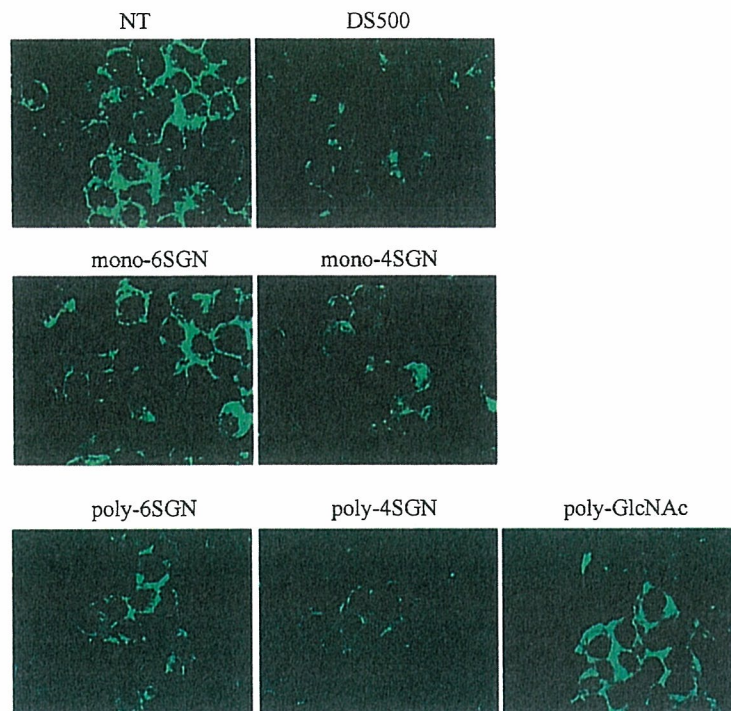


Fig. 5. Localization of PrP<sup>C</sup> in Neuro2a cells treated with sulfated glycopyranosides. Neuro2a cells were cultured for 2 days in the presence of the indicated glycosides at 50  $\mu$ g/ml. PrP<sup>C</sup> was detected by IFA using mAb 31C6 and Alexa-488-conjugated secondary antibody. NT, untreated cells.

produce side-effects. To examine whether the synthetic glycopyranosides influence cell growth or have cytotoxicity, we performed WST-1 and lactate dehydrogenase-release assay. We found that mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN had no effect on cell growth (Fig. 6) and were not cytotoxic (data not shown) at any of the concentrations examined.

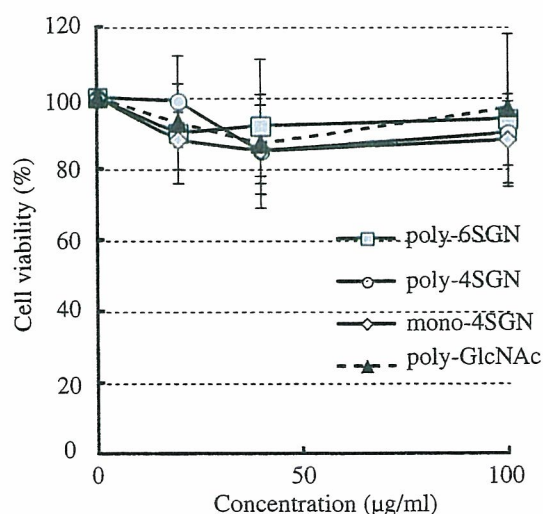


Fig. 6. Effect of sulfated glycopyranosides on cell growth. Cell growth in the presence of sulfated glycosides was determined by WST-1 assay as described in Materials and methods. Values represent means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ) relative cell growth compared to the untreated control.

## Discussion

Sulfated glycans inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation in prion-infected cells [6,7], prevent scrapie infection by peripheral challenge [2–5], and reduce the level of PrP<sup>Sc</sup> in the brain of prion-infected mice [8]. The degree of sulfation appears to be one of the factors affecting anti-prion activity of sulfated glycans [21,22], although other properties, such as the chain length, repeating unit of glycans, the location of sulfate groups, and the type of glycan chains, will also be involved in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation [6,23]. Selective desulfation is one way to address the SAR of sulfated GAGs [24], however, in the current studies, to examine the SAR of sulfated glycans for inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation, we used synthetic sulfated glycopyranosides and their polymers, in which the position of sulfation was controlled by chemical and enzymatic reactions [11–13].

Among the compounds tested, mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation with ED<sub>50</sub> below 20  $\mu$ g/ml. This suggests that a combination of an *N*-acetyl group at C-2 and an *O*-sulfate group at either *O*-4 or *O*-6 on glucopyranoside is important for the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. In fact, the monomeric and polymeric forms of GlcNAc and 6SGlc did not inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation, emphasizing the importance of both the *N*-acetyl group at C-2 and the *O*-sulfate group at *O*-6 in the inhibition by 6SGN. However, mono-6SGN did not inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation, suggesting that polyvalent or cluster effects are also important for the inhibitory effect of poly-6SGN.

Heparin is a sulfated GAG that inhibits PrP<sup>Sc</sup> formation in cells [6,7]. Major constituents of heparin are disaccharide units consisting of 2-*O*-sulfate-L-iduronic acid and 2-*N*-, 6-*O*-disulfate D-glucosamine, although the sulfation sites are not always sulfated [25]. Thus, the inhibitory effect of heparin on PrP<sup>Sc</sup> formation may be due to the presence of an *O*-sulfate at *O*-6 and an *N*-acetyl group at *C*-2 participate in the anti-prion effect of heparin. Preliminary experiments showed that 2-*N*-, 6-*O*-disulfate glucosamine and its polymer inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation (data not shown), supporting the role of an *N*- or *O*-sulfate group at *C*-2 and *C*-6 in the anti-prion effect of heparin.

Here, we showed that mono-4SGN inhibited PrP<sup>Sc</sup> formation with an ED<sub>50</sub> below 20 µg/ml. To our knowledge, this is the first report that a monomeric glycoside antagonizes PrP<sup>Sc</sup> formation. The GlcNAc did not inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation, suggesting a combination of *O*-sulfate group at *C*-4 and *N*-acetyl group at *C*-2 is important for the effect of mono-4SGN. However, further analyses of other glucopyranosides such as 4SGlc will be required to address the importance of *O*-sulfate group at *C*-4 more precisely. Although poly-4SGN was more effective than the monomer, monomeric glycosides have an advantage with respect to understanding the SAR of GAGs and for the development of new therapeutic compounds against prion diseases. The purpose of this study was mainly focused to analyze the effect of sulfated glucopyranosides on PrP<sup>Sc</sup> formation as constituents of GAGs. However, we also found that mono-6SGal showed weak inhibitory effect (ED<sub>50</sub> = 31 µg/ml) and the effect was enhanced in its polymer form (ED<sub>50</sub> = 21 µg/ml). Thus this finding will prompt to analyze the effect of other sulfated galactopyranosides.

Treatment of cells with sulfated glycans such as PPS and DS500 stimulated endocytosis of PrP<sup>C</sup> and reduced the total and cell surface level of PrP<sup>C</sup> [16,20]. Reduction of the amount of PrP<sup>C</sup>, i.e., reduction of the amount of substrate available for PrP<sup>Sc</sup> biosynthesis, may be linked to the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. In this study, mono-4SGN, poly-4SGN, and poly-6SGN reduced the PrP<sup>C</sup> level to about 50% of that in untreated cells, suggesting that the mechanism of the inhibition is similar to that of PPS and DS500. In contrast, a chemically modified dextran, heparan mimetics HM 2062, was reported to inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation without altering the level of PrP<sup>C</sup> [21,22]. Thus, there may be several mechanisms for the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by sulfated glycans. HS binds to PrP<sup>C</sup> possibly via the N-terminal portion of PrP<sup>C</sup> and this interaction is enhanced by Cu(II) [18,19]. The interaction between PrP<sup>C</sup> and HS is thought to be involved in the biosynthesis of PrP<sup>C</sup> and possibly in the conversion of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup> [26,27]. Thus, exogenous sulfated glycans may compete with endogenous GAG in binding to PrP<sup>C</sup> or other molecules such as laminin receptor precursor/laminin receptor. As a consequence, blocking the interaction of PrP<sup>C</sup> with an endogenous GAG may inhibit PrP<sup>Sc</sup> formation.

This study provided new information on the SAR of GAGs in the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation. In addition,

the inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by the monoglycoside, mono-4SGN, showed that studies of synthetic sulfated glycosides can aid in the development of compounds for treating prion diseases. Although it is unlikely that sulfated polyanions can pass through blood-brain barrier (BBB), small molecule such as mono-glycosides may be able to pass. The aglycons of glucopyranosides, *p*NP residue, can be modified to hydrophobic moieties [28]. Such modification may facilitate the delivery of the glucopyranosides to the brain through BBB. Further studies using synthetic sulfated glycosides may provide lead structures for the development of new compounds for the treatment of prion diseases.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by a Grant-in-Aid from the BSE Control Project of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. This work was also supported by a grant from the 21st Century COE Program (A-1), a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 15208029), and Strategic Cooperation to Control Emerging and Reemerging Infections funded by the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## References

- [1] S.B. Prusiner, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 (1998) 13363–13383.
- [2] B. Ehlers, H. Düringer, Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen, *J. Gen. Virol.* 65 (1984) 1325–1330.
- [3] R.H. Kimberlin, C.A. Walker, Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions, *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 (1986) 409–413.
- [4] C.F. Farquhar, A.G. Dickinson, Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection, *J. Gen. Virol.* 67 (1986) 463–473.
- [5] H. Düringer, B. Ehlers, Chemoprophylaxis of scrapie in mice, *J. Gen. Virol.* 72 (1991) 457–460.
- [6] B. Caughey, G.J. Raymond, Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells, *J. Virol.* 67 (1993) 643–650.
- [7] R. Gabizon, Z. Meiner, M. Halimi, S.A. Ben-Sasson, Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate, *J. Cell. Physiol.* 157 (1993) 319–325.
- [8] K. Doh-ura, K. Ishikawa, I. Murakami-Kubo, K. Sasaki, S. Mohri, R. Race, T. Iwaki, Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models, *J. Virol.* 78 (2004) 4999–5006.
- [9] S.B. Selleck, Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics, *Trends Genet.* 16 (2000) 206–212.
- [10] J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator, *Trends Cell Biol.* 11 (2001) 75–82.
- [11] H. Uzawa, T. Toba, Y. Nishida, K. Kobayashi, N. Minoura, K. Hiratani, Convenient synthetic approach towards regioselectively sulfated sugars using limpet and abalone sulfatase-catalyzed desulfation, *Chem. Commun.* 21 (1998) 2311–2312.

- [12] K. Sasaki, Y. Nishida, T. Tsurumi, H. Uzawa, H. Kondo, K. Kobayashi, Facile assembly of cell surface oligosaccharide mimics by copolymerization of carbohydrate modules, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4463–4467.
- [13] K. Sasaki, Y. Nishida, H. Uzawa, K. Kobayashi, *N*-Acetyl-6-sulfo- $\alpha$ -D-glucosamine as a promising mimic of *N*-Acetyl neuraminic acid, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 2821–2823.
- [14] Y. Nishida, H. Uzawa, T. Toba, K. Sasaki, H. Kondo, K. Kobayashi, A facile synthetic approach to L- and P-selectin blockers via copolymerization of vinyl monomers constructing the key carbohydrate modules of sialyl LewisX mimics, *Biomacromolecules* 1 (2000) 68–74.
- [15] R.E. Race, L.H. Fadness, B. Chesebro, Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells, *J. Gen. Virol.* 68 (1987) 1391–1399.
- [16] C.L. Kim, A. Karino, N. Ishiguro, M. Shinagawa, M. Sato, M. Horiuchi, Cell-surface retention of PrP<sup>C</sup> by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation, *J. Gen. Virol.* 85 (2004) 3473–3482.
- [17] C.L. Kim, A. Umetani, T. Matsui, N. Ishiguro, M. Shinagawa, M. Horiuchi, Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies, *Virology* 320 (2004) 40–51.
- [18] T. Pan, B.S. Wong, T. Liu, R. Li, R.B. Petersen, M.S. Sy, Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans, *Biochem. J.* 368 (2002) 81–90.
- [19] R.G. Warner, C. Hundt, S. Weiss, J.E. Turnbull, Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18421–18430.
- [20] S.L. Shyng, S. Lehmann, K.L. Moulder, D.A. Harris, Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>C</sup>, in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 30221–30229.
- [21] K.T. Adjou, S. Simoneau, N. Sales, F. Lamoury, D. Dormont, D. Papy-Garcia, D. Barritault, J.P. Deslys, C.I. Lasmezas, A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases, *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 2595–2603.
- [22] O. Schonberger, L. Horonchik, R. Gabizon, D. Papy-Garcia, D. Barritault, A. Taraboulos, Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 473–479.
- [23] S.A. Priola, B. Caughey, Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis, *Mol. Neurobiol.* 8 (1994) 113–120.
- [24] M. Rusnati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. d'Adda di Fagagna, M. Giacca, M. Presta, Interaction of HIV-1 Tat Protein with Heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11313–11320.
- [25] U. Lindahl, L. Kjellen, Heparin or heparan sulfate—what is the difference? *Thromb. Haemost.* 66 (1991) 44–48.
- [26] S. Gauczynski, J.M. Peyrin, S. Haik, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J.P. Deslys, D. Dormont, C.I. Lasmezas, S. Weiss, The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein, *EMBO J.* 20 (2001) 5863–5875.
- [27] C. Wong, L.W. Xiong, M. Horiuchi, L. Raymond, K. Wehrly, B. Chesebro, B. Caughey, Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP<sup>Sc</sup>-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein, *EMBO J.* 20 (2001) 377–386.
- [28] K. Sasaki, Y. Nishida, M. Kanbara, H. Uzawa, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, Design of *N*-Acetyl-6-sulfo- $\beta$ -D-glucosaminide-based inhibitors of influenza virus sialidase, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 1367–1375.

## Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique

Yasuko Watanabe <sup>a</sup>, Osamu Inanami <sup>a,\*</sup>, Motohiro Horiuchi <sup>b</sup>, Wakako Hiraoka <sup>c</sup>,  
Yuhei Shimoyama <sup>d</sup>, Fuyuhiko Inagaki <sup>e</sup>, Mikinori Kuwabara <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Radiation Biology, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18-Jo Nishi 9-chome, Sapporo 060-0818, Japan

<sup>b</sup> Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

<sup>c</sup> Laboratory of Biophysics, School of Science and Technology, Meiji University, Kawasaki 214-8571, Japan

<sup>d</sup> Soft-Matter Physics Laboratory, Graduate School of Emergent Science, Muroran Institute of Technology, Muroran 050-8585, Japan

<sup>e</sup> Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Received 24 August 2006

Available online 26 September 2006

### Abstract

We analyzed the pH-induced mobility changes in moPrP<sup>C</sup>  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheets by cysteine-scanning site-directed spin labeling (SDSL) with ESR. Nine amino acid residues of  $\alpha$ -helix1 (H1, codon 143–151), four amino acid residues of  $\beta$ -sheet1 (S1, codon 127–130), and four amino acid residues of  $\beta$ -sheet2 (S2, codon 160–163) were substituted for by cysteine residues. These recombinant mouse PrP<sup>C</sup> (moPrP<sup>C</sup>) mutants were reacted with a methane thiosulfonate sulfhydryl-specific spin labeling reagent (MTSSL). The  $1/\delta H$  of the central ( $^{14}\text{N}$  hyperfine) component ( $M_I = 0$ ) in the ESR spectrum of spin-labeled moPrP<sup>C</sup> was measured as a mobility parameter of nitroxide residues (R1). The mobilities of E145R1 and Y149R1 at pH 7.4, which was identified as a tertiary contact site by a previous NMR study of moPrP, were lower than those of D143R1, R147R1, and R150R1 reported on the helix surface. Thus, the mobility in the H1 region in the neutral solution was observed with the periodicity associated with a helical structure. On the other hand, the values in the S2 region, known to be located in the buried side, were lower than those in the S1 region located in the surface side. These results indicated that the mobility parameter of the nitroxide label was well correlated with the 3D structure of moPrP. Furthermore, the present study clearly demonstrated three pH-sensitive sites in moPrP, i.e., (1) the N-terminal tertiary contact site of H1, (2) the C-terminal end of H1, and (3) the S2 region. In particular, among these pH-sensitive sites, the N-terminal tertiary contact region of H1 was found to be the most pH-sensitive one and was easily converted to a flexible structure by a slight decrease of pH in the solution. These data provided molecular evidence to explain the cellular mechanism for conversion from PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> in acidic organelles such as the endosome.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** SDSL; ESR; Prion; Domain mobility; pH-sensitive region

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative disorders including Creutzfeldt–Jacob disease, Gerstmann–Sträusler–Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru in humans, scrapie in sheep, and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle [1,2]. According to

the “prion-only hypothesis” [1,3,4], the abnormal (scrapie-like and  $\beta$ -sheet-rich) form of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) converted from the normal cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is recognized as the only pathogenic component of TSEs. Mammalian PrP<sup>C</sup> is a ubiquitous glycoprotein attached to the plasma membrane via a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor [1]. As illustrated in Fig. 1A, mouse PrP (moPrP) consists of 208 amino acids (residues 23–231). The carboxy-terminal domain of moPrP (121–231) is defined as a tertiary structure and contains three  $\alpha$ -helices

\* Corresponding author. Fax: +81 11 706 7373.

E-mail address: [inanami@vetmed.hokudai.ac.jp](mailto:inanami@vetmed.hokudai.ac.jp) (O. Inanami).