

分担研究者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野

1. 研究目的

これまでのアミロイド親和性化合物に関する研究成果を進展させ、経口投与で有効なプリオン病治療候補化合物の開発と評価を研究の目的とした。

2. 研究方法

Aβ等のアミロイド凝集の阻害等を指標に開発された化合物 **Comp B** について、経口投与時の薬物動態を各種動物において解析した。つぎに、**CompB** の各種プリオン株に対する抗プリオン活性や経口投与による治療効果をプリオン持続感染細胞や脳内感染マウスを用いて解析し、ウエスタンブロット法・免疫組織化学法・バイオアッセイ法等を実施して効果を検証した。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の許可を受け、動物実験指針を遵守して行った。

3. 研究結果及び考察

経口投与した **CompB** は、検討した全ての動物で脳への移行性にきわめて優れていた。**CompB** の治療効果は、プリオン持続感染細胞を用いたアッセイにおいても疾患動物を用いたアッセイにおいても、矛盾することなくプリオン株に依存していた。すなわち、RMLプリオンが **CompB** に最も感受性が高く（高容量投与で約 2.5 倍に潜伏期間延長）、**Fukuoka-1** プリオンと **22L** プリオンはそれより劣っており、**263K** プリオンに対しては効果は乏しかった。**263K** プリオンが感染している宿主側に原因があるのではなく、**263K** プリオンそのものに原因があることが確認された。ウエスタンブロット法の解析で、治療

群では脳に沈着している異常型プリオン蛋白量は非治療群より減少していた。このことは免疫組織化学的解析結果と矛盾しなかった。また、これらの結果は、病末期であるにもかかわらず非治療群と比較して治療群では脳の感染性が低下していた結果とも矛盾しない。一方、異常型プリオン蛋白の糖鎖パターンは、非治療群の脳内では一糖鎖優位パターンであるのに対して治療群の脳内では全て二糖鎖優位パターンであった。検討したプリオン株は **263K** プリオン以外は全て一糖鎖優位パターンで、**263K** プリオンのみが 2 糖鎖優位パターンを示すことより、二糖鎖優位パターンを示すプリオンは **CompB** に対して抵抗性を示した。このことは、細菌やウイルスですでに明らかにされている抗生剤耐性菌や化学療法剤耐性ウイルスと同じ現象が、プリオンにおいても生じ得ることが示唆された。

ヒトへの応用には **Comp B** の毒性や物性などを改善する必要がある、まだまだ遠い道のものであるものの、これまでに経口投与でプリオン病の予防や治療が行える化合物は発見されていないことより、**Comp B** の発見はプリオン病の化学療法剤開発において大きな励みとなるものである。

4. 評価

1) 達成度について

「経口投与で有効な治療候補化合物の開発と評価」を完了できたことより、当初の目的をほぼ 100%達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

研究成果は一流誌である **Journal of**

Virology に掲載されており、優れた効果を持つ経口投与薬の発見と治療薬耐性プリオンの存在を初めて指摘した点が高く評価された。本研究ではアミロイド親和性化合物がプリオン病だけでなくアルツハイマー病の診断や治療に応用できることも指摘しており、市場性のあるアルツハイマー病の診断・治療薬研究とリンクさせることで市場性のないプリオン病の診断・治療薬開発が進展することが期待される。

3) 今後の展望

Comp B はあくまでリード化合物であり、ヒトへの応用に向けてより治療効果があり毒性が極めて少ない治療化合物を開発する必要がある。この領域を専門とする創薬研究者や興味をもつ製薬企業との連携により、本研究成果の今後の発展が期待できる。

4) 研究内容の効率性について

3年間の短期間で、経口治療薬候補化合物を発見し、その効果を *in vitro* だけでなく時間のかかる *in vivo* 実験でも十分に評価し、それらの成果を論文として一流誌に掲載したことは、本研究を極めて効率的に実施したことを示している。

5. 結論

経口投与で著明にプリオン病の発症を遅らせるアミロイド親和性化合物を発見した。プリオン株依存的な治療効果を発揮し、投与中に化合物に対して耐性なプリオンが生じてくる可能性が示唆された。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：33件

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等)の発表：9件

そのうち主なもの

論文発表

1. 逆瀬川裕二, 堂浦克美. プリオン病の診断支援・治療への試み. 日本臨床 2007 ; 65(8) : 1417-1422.

学会発表

1. 堂浦克美. プリオン病の治療の試み. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.10.21-23.
2. 堂浦克美. プリオン病への治療アプローチ. 第25回日本神経治療学会総会, 仙台, 2007.6.21-22.

2) 海外

口頭発表：15件

原著論文による発表：14件

それ以外(レビュー等)の発表：2件

そのうち主なもの

論文発表

1. Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-Ura K. Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. J Virol 2007 ; 81(23) : 12889-12898.
2. 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 2006 ; 99 : 198-205.

学会発表

1. Doh-ura K. Amyloidophilic chemicals for therapeutics of prion diseases. CJD 2007, Vancouver, Nov 5-6, 2007.
2. Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y. Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals

for prion diseases. Prion 2006, Torino,
Oct 3-6, 2006.

物. 特願 2006-117294, 2006.4.20.国際出
願 PCT/JP2007/058566,2007.4.20.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1) 特許取得

特許出願 7 件(うち 1 件は国際出願)

そのうち主なもの

1. 堂浦克美:コンフォメーション病医薬組成

2. 実用新案登録

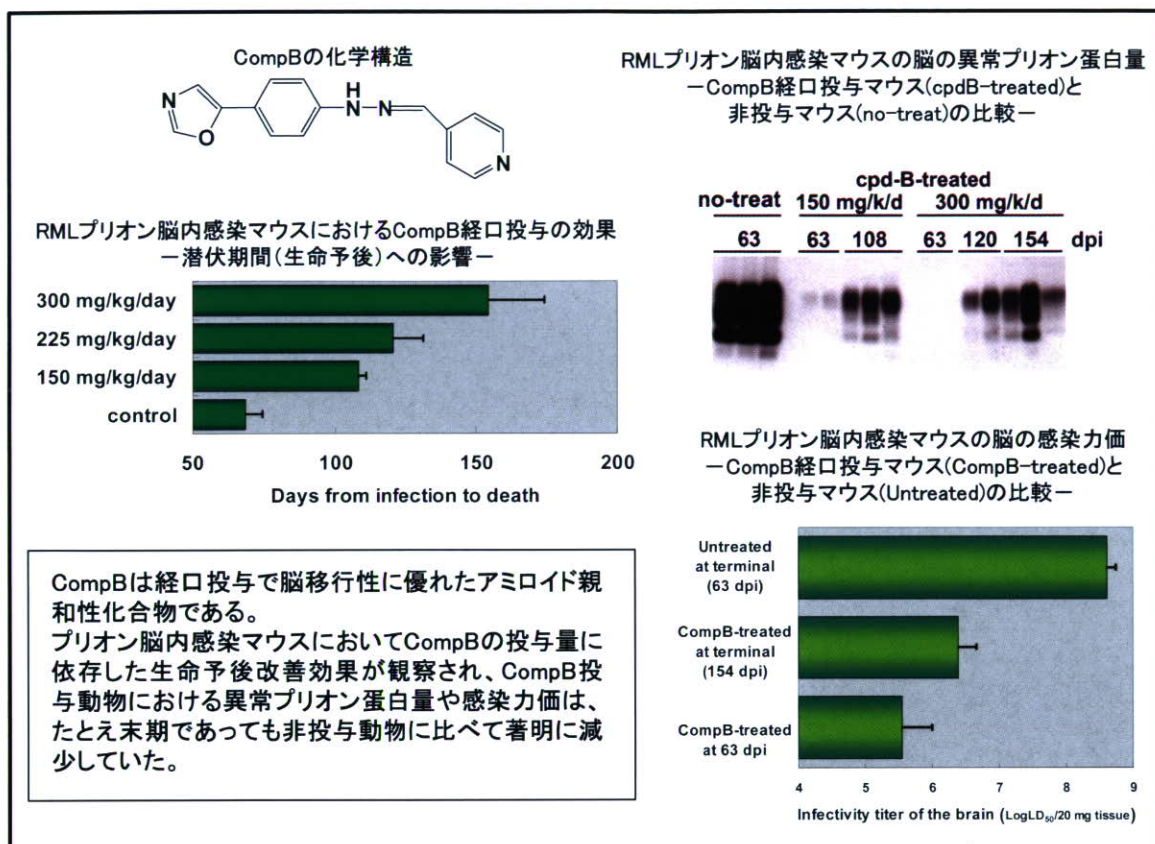
特になし

3. その他

特になし

経口投与型プリオン病治療薬候補化合物 の開発と評価

分担研究者: 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野・堂浦克美



経口投与で著明にプリオン病の発症を遅らせるアミロイド親和性化合物 CompB を発見した。プリオン株依存的な治療効果を発揮し、二糖鎖付加型優位の異常型プリオン蛋白よりなるプリオンは CompB に抵抗性であることが示唆された。プリオン株依存的な作用メカニズムを解明し、それを改善する必要がある残されているものの、経口投与で有効なアミロイド親和性化合物の発見は、プリオン病治療に対する化学療法剤の可能性を一步前進させたといえる。

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

分担研究者：山田達夫 福岡大学医学部 神経内科

1. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に代表されるプリオン病は、一旦発病すると治癒することがない致死性の神経難病である。現在までに有効な治療法は確立されていない。いまだ本邦で発症が続いているヒト死体由来の乾燥硬膜の移植による医源性プリオン病や、ウシ海綿状脳症(BSE)に関連した変異型CJD(vCJD)の発生も、その広がりが危惧されている。ペントサンポリサルフェート(PPS)は、動物実験で、脳室内投与によりプリオン病の発症遅延効果が認められた。PPSは血液脳関門を通過せず、脳室内に直接投与する必要がある。本研究では、体内埋め込み型微量注入器具を用いた PPS 脳室内投与療法のプロトコルを確立し、本邦のプリオン病患者に応用して同治療の安全性と患者の生命予後改善への効果を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

昨年度までに、PPS 脳室内持続投与法のプロトコルの作成を行い、福岡大学神経内科と脳神経外科の共同で、PPS 治療が行われてきた。簡単に記載すると、福岡大学手術室にて体内埋め込み型微量注入器具(Archimedes®)および脳室内カテーテルの留置手術を行い、PPS 薬剤注入を開始した。PPS 薬剤注入、薬剤効果の評価、副作用の有無は福岡大学神経内科病棟にて行った。PPS 脳室内投与用の製剤化と、PPS 髄液中濃度測定は福岡大学薬学部疾患管理学教室で行われた。

(倫理面への配慮)

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

3. 研究結果および考察

これまでに 11 例のプリオン病患者に対して施行された(表)。病型は孤発性 CJD 6 例、硬膜移植後医源性 CJD が 2 例、家族性 CJD(GSS1 例を含む)が 3 例であった。治療開始からの経過は 4 ヶ月から 26 ヶ月で、PPS 注入濃度は $120 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。治療前の modified Rankin Scale は 2-5 で、現在は全例 5-6 になっており症状の進行がみられた。11 例中 4 例が死亡し、治療からの経過はそれぞれ 17、20、4、9 ヶ月であった。周術期において問題は生じなかったが、手術後 3 ヶ月以降に 11 例中 8 例にさまざまな程度の硬膜下水腫が認められた。出現時期は治療開始から約 5.5 ヶ月後の CT で認められた。痙攣発作が 1 例において認められ、PPS に関連したと思われる血液データ(血算、生化学、凝固能)の異常は認められなかった。

図 PPS 脳質内持続投与法を施行した 11 例

No	Age	Gender	Diagnosis	Date of Surgery	Duration from the onset (M)	PPS dose Initial/Final (μ g/kg/day)	Survival Period from Tx. (M)
1	67	F	sCJD	2004/11/16	9	1/120	17*
2	73	F	sCJD	2005/3/1	3	2/120	20*
3	68	F	sCJD (MM2)	2005/6/2	6	10/120	30
4	64	F	fCJD (V180I)	2005/6/21	4	10/120	30
5	64	F	sCJD	2005/11/14	3	10/120	25
6	55	M	iCJD	2006/3/13	10	10/120	4*
7	66	M	iCJD	2006/6/12	3	20/120	9*
8	69	F	GSS (P102L)	2006/8/2	6	20/120	14*
9	73	F	fCJD (V180I)	2006/10/15	7	20/120	15
10	69	M	sCJD	2007/3/7	3	20/120	9
11	39	F	sCJD	2007/4/3	20	20/120	8

* ; dead

4. 評価(研究成果)

1) 達成度について

PPS 脳室内持続投与法のプロトコールは現在のところ、全例比較的安全に行われており、現在、同治療法はプリオン病に対して最も期待できる治療法と考えられている。国際的学会や欧州で行われた治療結果との共同の研究も進んでおり。今後も経過の注意観察、解析を継続することで、生命予後改善効果を明らかにすることと、副作用の問題点を解決する方法を検討する必要がある。

2) 研究成果の学術的意義について

本研究に使用する薬剤については、動物実験において抗プリオン効果が確認されており、副作用もよく検討されている薬剤である。しかし、プリオン病患者に対して脳室内に持続投与の試みは他の施設にはなく、脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与法としての意味と、プリオン病に対する臨床効果の 2 つの意味がある。本研究の成果はプリオン病患者の生命予後改善だけでなく、プリオン蛋白遺伝子変異キャリアーやヒト死体由来硬膜移植歴のある者のような危険因子の保因者がプリオン病を発症するのを予防する医療手段

としても発展することが期待される。

3) 研究成果の行政的意義について

CJD は稀な神経難病でその発病率は年間 100 万人に約 1 人であるが、不幸にも本邦では多数のヒト死体由来乾燥硬膜移植後の CJD 患者がいまだ発生しており、潜在的に発症の危険を有する硬膜移植患者も存在する。英国において多発した vCJD の脅威は本邦においても 1 例目の発生が確認されている。このような状況にあり本研究の成果であるプリオン病の治療法の確立は、患者や保因者個人にとっての利益となるだけでなく、新たな医原性疾患発生の可能性を抑えることに寄与し、広く社会の利益となる。

4) その他特記すべき事項について

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

らに検討する必要がある。

5. 結論

英国で同治療を受けた変異型 CJD の生存期間は、その平均をはるかに上回っているという報告もある。病型は異なるが、今回の検討でも、治療開始後 2 年以上の比較的長期生存例もあり、延命効果に関しては今後の経過の検討が必要であると思われた。PPS 脳室内持続投与の評価は今後の症例経過の解析と、剖検例における病理所見の検討を必要とする。同治療法で頻度の高い硬膜下水腫は、症状に影響を与えるものではないにせよ、その発生機序に関して検討を加えるべきと思われる。それ以外は、PPS による血液学的影響は認められておらず、比較的安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられる。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：13 件

原著論文による発表：0 件

それ以外(レビュー等)：14 件

論文発表

1. 坪井義夫, 山田達夫. プリオン病. 検査と技術. 2007 ; 35(5) : 426-430.
2. 坪井義夫, 山田達夫. 特集 治療の最前線 (7) : 脳の感染症 クロイツフェルト・ヤコブ病. Brain Medical 2007 ; 19(39) : 73-78.
3. 山田達夫, 坪井義夫. Creutzfeldt-Jakob 病の治療: 体内埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の効果、および安全性に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究」班. 平成 18 年度総括・分担研究報告書 2007 : 173-176.
4. 田中美紀, 坪井義夫, 山田達夫.

Quinacrine. Clin Neurosci 2006 ; 24(3) : 333-335.

5. 坪井義夫, 山田達夫. Pentosan polysulphate (PPS). Clin Neurosci 2006 ; 24(3) : 336-339.
6. 山田達夫. Flupirtine. Clin Neurosci 2006 ; 24(3) : 340.
7. 坪井義夫. プリオン病に対する PPS 治療 - 全身性の影響はきわめて少ない -. Medical Tribune 2006 ; 39(22) : 11.
8. 坪井義夫. クロイツフェルト・ヤコブ病 - 新しいペントサン・ポリサルフェート脳室内投与法の現状. ヤコブ・ネット NEWS. 11, 2006.
9. 山田達夫, 坪井義夫. 埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法に関する検討. 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」班. 平成 18 年度総括・分担研究報告書. 2006 : 8-10.
10. 山田達夫, 坪井義夫. 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. 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」班. 平成 16-18 年度総合研究報告書. 2006.
11. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. プリオン病の治療 - 経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状 -. 特集: 治療の最前線: 神経疾患の先端的治療. Brain Medical 2005 ; 17 : 59-64.
12. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. プリオン病の治療 - ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与 -. 神経内科 2005 ; 63 : 441-445.
13. 田中美紀, 坪井義夫, 山田達夫. プリオン病の治療 - キナクリン・キニーネ治療 -. 神経内科 2005 ; 63 : 446-451.
14. 山田達夫, 坪井義夫. ペントサンポリサ

ルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究. 厚生科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)平成 16 年度分担研究報告書. 8-9.

学会発表

1. 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療法の副作用. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 2007.5.16-18.
2. 寺田達弘, 小尾智一, 杉浦 明, 山崎公也, 溝口功一, 齋藤祐子, 村山繁雄, 坪井義夫, 山田達夫, 北本哲之. ペントサン治療後の Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の 1 例. 2007 年プリオン研究, 津南, 2007. 8.25-26.
3. 坪井義夫, 山田達夫, 堂浦克美. ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の臨床研究-11 例の臨床経過と問題点. 2007 年プリオン研究, 津南, 2007.8.25-26.
4. 坪井義夫. ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与の治験評価. 国際ヤコブデー東京相談会, 東京弁護士会館. 2007.11.12.
5. 堂浦克美, 坪井義夫, 山田達夫. プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006.5.11-13.
6. 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. 2006.9.2-3.
7. 荒木保清, 石神紀子, 坪井義夫, 山田達夫, 北本哲之, 佐藤克也, 中川正法. : Codon180 変異をしめす CJD へのペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 第 11 回日本神経感染症学会. 伊勢, 2006.10.13-14.
8. 坪井義夫. プリオン病治療戦略の展望-臨床試験-. 第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム. 福岡大学薬学部, 2006.10.21.
9. 寺田達弘, 小尾智一, 杉浦 明, 山崎公也, 溝口功一, 村山繁雄, 齋藤祐子, 坪井義夫, 山田達夫. ペントサン治療後の Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の 1 例. 第 85 回関東臨床神経病理懇談会. 東邦大学医学部, 2007.1.6.
10. 石津暢隆, 崎山快夫, 齋藤祐子, 松本ルミネ, 坪井義夫, 山田達夫, 北本哲之, 堂浦克美, 蛇澤 晶, 栗崎博司, 村山繁雄. ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与中に死亡した、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD) の 1 剖検例. 第 85 回関東臨床神経病理懇談会. 東邦大学医学部, 2007.1.6.
11. 坪井義夫. プリオン病治療の現状と展望. プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班. サーベイランス委員会・Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) サーベイランスに関する全国担当者会議. 東京, 2005.2.10.
12. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. CJD の新しい治療法の試み-ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与 2005 年プリオン研究会. 天童, 2005.8.26-27.
13. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. プリオン病の新しい治療法: ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 第 10 回日本神経感染症学会. 東京, 2005.10

2) 海外

口頭発表: 2 件

原著論文による発表: 2 件

それ以外(レビュー等)の発表: 0 件

論文発表

1. Waragai M, Yamada T, Matsuda H. Evaluation of brain perfusion SPECT using an easy Z-score imaging system (eZIS) as an adjunct to early-diagnosis of neurodegenerative diseases. J Neurol Sciences 2007 ; 260 : 57-64.

2. Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T. Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. J Neurol Sci 2005 ; 232 : 45-49.

学会発表

1. Rainov N.G , Doh-ura K , Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V. Experimental treatments for human Prion diseases. Neuro Prion 2006. Torino, 2006.10.3-6.
2. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T. Experimental treatment with

intraventricular pentosan polysulphate injection in Prion disease. Theraprion Meeting. Paris 2006.11.21.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

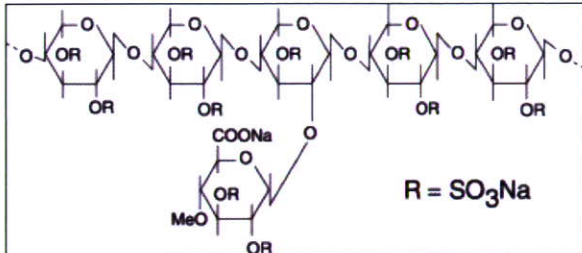
3. その他

特になし

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

分担研究者：山田達夫 福岡大学医学部 神経内科

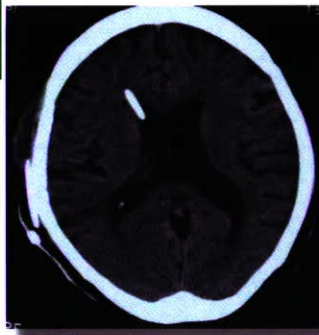
Chemical structure of pentosan polysulphate (PPS)



ヘパリン類似の活性
プリオン病動物感染実験で、発症遅延効果
免疫組織で、脳のPrPsc 蓄積を抑制
全身投与の安全性(血栓症、関節炎、膀胱炎に臨床応用)
PPSは血液脳関門を通過しない

PPS脳室内持続投与法
-脳CT-

- 1週間後のCTにて出血等の合併症がないことを確認
- 少量より開始して濃度を徐々に上げる
- 120μg/kg/day で増量維持
- 月1回薬液を補充



PPS脳室内持続投与法
-脳外科的手術-



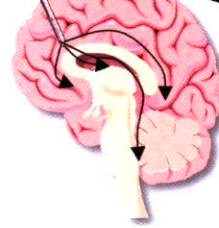
•右の側脳室前角脳室カテーテル留置



•右腹壁に微量持続注入ポンプを埋め込み、腹部カテーテルは皮下を通じて留置したポンプに接続

PPS脳室内持続投与法:薬物動態

Catheter in lateral ventricle



この図に示されるように、PPS 脳室内持続投与法のプロトコールの作成を行い、これまでに 11 例のプリオン病患者に対して同治療が施行された。治療開始後 2 年以上の比較的長期生存例もあり、延命効果等に関しては今後の経過の検討が必要であり、また剖検例における病理所見の検討も必要である。 PPS による全身的な影響は認められておらず、同治療は比較的安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられる。

分担研究者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部病院へき地病院再生支援教育機構

1. 研究目的

プリオン病の脳脊髄液中の生化学マーカーの検討と治療法開発

2. 研究方法

- 1) 平成 17 年度は CJD 患者におけるキナクリン投与の治験の成績のまとめとして CJD 患者におけるキナクリン投与の治療成績とその問題点について報告した。
- 2) 平成 18 年度は多数例及び CJD における病型別での拡散強調画像・脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白・Tau 蛋白の陽性率の結果を報告し、加えて発症前から経過観察できた貴重な孤発型 CJD 症例を経験したので合わせて報告した。
- 3) 平成 19 年度はプリオン病における脳脊髄液中の生化学マーカーである 14-3-3 蛋白の判定基準を明確化し、14-3-3 蛋白の有効性・陽性率を示した。また他のマーカーである総タウ蛋白・NSE・S-100b 蛋白の有効性・陽性率を示し、比較検討した。

(倫理面の配慮)

長崎大学の定める倫理規程に準じ、長崎大学の倫理委員会の承認を経て全ての研究は行われた。個人情報保護に関しては特に留意し、匿名化を厳格に行った。

3. 研究結果及び考察

- 1) 平成 17 年度までに治療薬物であるキナクリンの脳移行におよぼす P-gp 阻害薬として cyclosporine または verapamil 存在下でキナクリンの脳移行性が *in vitro* で有意に増大することを報告した。そこで平成 17 年度はキナクリンの投与量を副作用のでやすい従来の 300mg/day から

200mg/day に減じた上で verapamil を併用し、10 例のプリオン病患者に投与した。作用、副作用、髄液中の薬剤濃度を検討したところ、有効性は 300mg/day とほぼ同等で、副作用では皮膚黄染は全例にみられるものの肝障害は軽度で 2 名にみられるに留まり、髄液中薬剤濃度は、0.23-0.4mM と *in vitro* の有効濃度とされる 0.4-1M に近いレベルまで上昇することが判った。臨床的にはミオクロームスの減少が全例に見られ、一例のみ一過性の脳波所見の改善がみられた。しかしながら、この症例では改善後 2 週間以内に全汎徐波から PSD へ移行した。また、覚醒度(周囲への反応)の改善が一過性に観察されるが臨床経過を修飾し得るものではなかった。ミオクロームス、覚醒度(周囲への反応)など部分的な症状の軽快傾向がみられたものの、一過性で有効性に乏しいと思われた。

- 2) 平成 18 年度報告では 112 症例における病型分類での脳脊髄液(総 tau 蛋白、14-3-3 蛋白)、MRI 拡散強調画像でのデータを示し、孤発例では総 tau 蛋白測定の有用性を示した。さらに脳ドックで発症前に発見され、全経過を観察しえた孤発性 CJD の一例を報告した。

- 3) 平成 19 年度はサーベイランス委員会に寄せられた髄液検体を長崎大学で測定することとなったことを受けて多数例における生化学マーカーの検討を行い、総タウ蛋白 > 14-3-3 蛋白 > NSE > S-100 蛋白の順に感度・陽性率が高いことを証明した。従来ウエスタンブロットによる半定量的な 14-3-3 蛋白の判定基準を検出限界を明確化するで検査の信頼性を高めることが可

能になった。

4. 評価

1) 達成度について

治療法の開発については、キナクリン投与法の改良は可能となったが、決定的に不十分な治療でしかなく、今後の課題である。

診断法の開発に関しては、髄液中の各種生化学マーカーの有用性を比較検討し、タウ蛋白測定が最も感度、特異度共に高いことを明らかにできた意義は大きい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

国際的には髄液中 14-3-3 蛋白の検出が診断に有用とされているが、タウ蛋白測定が定量的で且つ診断能力が高いと言う知見を明らかにできたことは国際的にも意義が高い。

社会的には従来、複数の研究施設で測定されていた髄液診断法(14-3-3 蛋白・タウ蛋白など)を長崎大学に測定を一本化する事で国内基準を統一できることの意義は大きい。また、臨床の現場での有用性を向上させる目的で、測定の迅速化を図っており、国内的な診断の迅速化に対する貢献は極めて大きいと考えている。

3) 今後の展望

現在、検討できた症例は 100 検体程度であるが、これまでサーベイランス目的で集積された検体は疑い例を含めれば 1000 検体以上あり、これらの検体の解析を行い、CJD サーベイランス委員会との協力により臨床データ、画像データなどとの関連について追跡調査を行う予定である。

また、より簡便で迅速な診断法の開発をおこなう目的で。

最近急速に進化している PMCA 法を用いた異常プリオン蛋白の検出を応用し、異常プリオンの検出による診断法開発について新竜

一郎協力班員との共同研究で多数例の髄液、末梢血による解析を行いたい。

4) 研究内容の効率性について

髄液を用いた生化学マーカーによる診断法の確立については、全国でプリオン病を疑われたほとんど全ての症例の検体を当研究施設で解析しており、効率性については優れていると考えている。我々の解析結果が全国的にプリオン病の臨床診断に有用であるという点でも効率性が高い。

5. 結論

- 1) キナクリンを用いた治療法の改良で、プリオン病の治療法開発の分野で貢献できた。
- 2) サーベイランス委員会に寄せられた髄液検体を用いて多数例における生化学マーカーの検討を行い、総タウ蛋白>14-3-3 蛋白>NSE>S-100 蛋白の順に感度・陽性率が高いことを証明できた。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：9 件

1. 佐藤克也 他. プリオン感染腎特異的遺伝子発現とヒトプリオン病での意義. 日本神経学会総会. 愛知, 2007.5.16-18.
2. 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 志賀裕正, 浜口 毅, 山田正仁, 三條伸夫, 水澤英洋. 日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討. 日本神経学会総会. 愛知, 2007.5.16-18.
3. 佐藤克也, 中桶了太, 西浦義博, 辻野 彰, 福田 卓, 江口博人, 福島直美, 本村政勝, 調 漸, 江口勝美, 吉村俊朗. 脳ドッグにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者に対する quinacrine 投与経験. 日本神経治療学会総会, 宮城. 2007.6.21-22.
4. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. 日本におけ

- るプリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカーと画像検査の検討. 日本神経感染症学会総会. 福岡, 2007.10.12-13.
5. 調 漸. 血液脳関門 (BBB) を標的とした創薬. 生体機能と創薬シンポジウム 2006. 福岡, 2006.9.8.
 6. 調 漸. プリオン病の治療戦略を展望する. 第 28 回日本薬学学会九州支部コロキウム. 福岡, 2006.10.21.
 7. 佐藤克也, 調 漸, 辻野 彰, 西浦義博, 本村政勝, 江口勝美, 松尾秀徳, 佐藤 聡, 辻畑光宏. CJD 患者におけるキナクリン投与の既存病態マーカーの検討と治療成績、その問題点. 日本神経学会総会. 東京, 2006.5.11-5.13.
 8. 佐藤克也, 中桶了太, 西浦義博, 辻野 彰, 江口博人, 白石裕一, 福島直美, 本村政勝, 調 漸, 江口勝美, 吉村俊朗. 脳ドックにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の一例. 日本神経学会九州地方会. 沖縄, 2006.6.17.
 9. 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 丹羽正美, 片岡泰文, 片峰 茂. ペントサンポリ硫酸 (PPS) のクロイツフェルト・ヤコブ病治療効果と脳内移行性新規低分子 PPS 薬. 日本薬理学会年会, 神奈川, 2005.3.22-24.

原著論文による発表 : 1 件

1. 江口博人, 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美, 井手芳彦. 早期に診断し得た Heidenhain 型 Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例. 神経内科 2005 ; 63 (3) : 276-280.

それ以外(レビュー等)の発表 : 5 件

そのうち主なもの

1. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. 孤独性プリオン病(孤発性古典型 CJD, 視床型 CJD, MM2 皮質型 CJD). 日本臨床 2007 ; 65 (8) : 14253-1432.
2. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. プリオン病における神経障害のメカニズム. Brain Medical 2006 ; 18 (4) : 21-24.

3. 調 漸. 狂牛病とヒトのプリオン病. 長崎県医師会報 2006 ; 40 (6) : 31-34.
4. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. CJD の診断マーカー. Clin Neurosci 2006 ; 24 (3) : 307-311.
5. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. プリオン病の臨床検査(14-3-3 蛋白, NSE, Tau 蛋白). 神経内科 2005 ; 63 (5) : 429-434.
6. 調 漸, 佐藤勝也. プリオン病の概説と具体的事例. 難病と在宅ケア 2005 ; 11 (7) : 43-48.

2) 海外

口頭発表 : 2 件

1. Satoh K, Shirabe S, Eguchi K. Clinical, neuropathological analysis of administration of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease. Meeting of the European Neurological Society, Switzerland, 2006.5.27-5.31.
2. Shirabe S, Satoh K, Eguchi K, Katamine S, Niwa M. International Symposium on the New Prion Biology : Basic Science, Diagnosis and Therapy. Italy, 2005.4.7-9

原著論文による発表 : 6 件

それ以外(レビュー等)の発表 : 0 件

そのうち主なもの

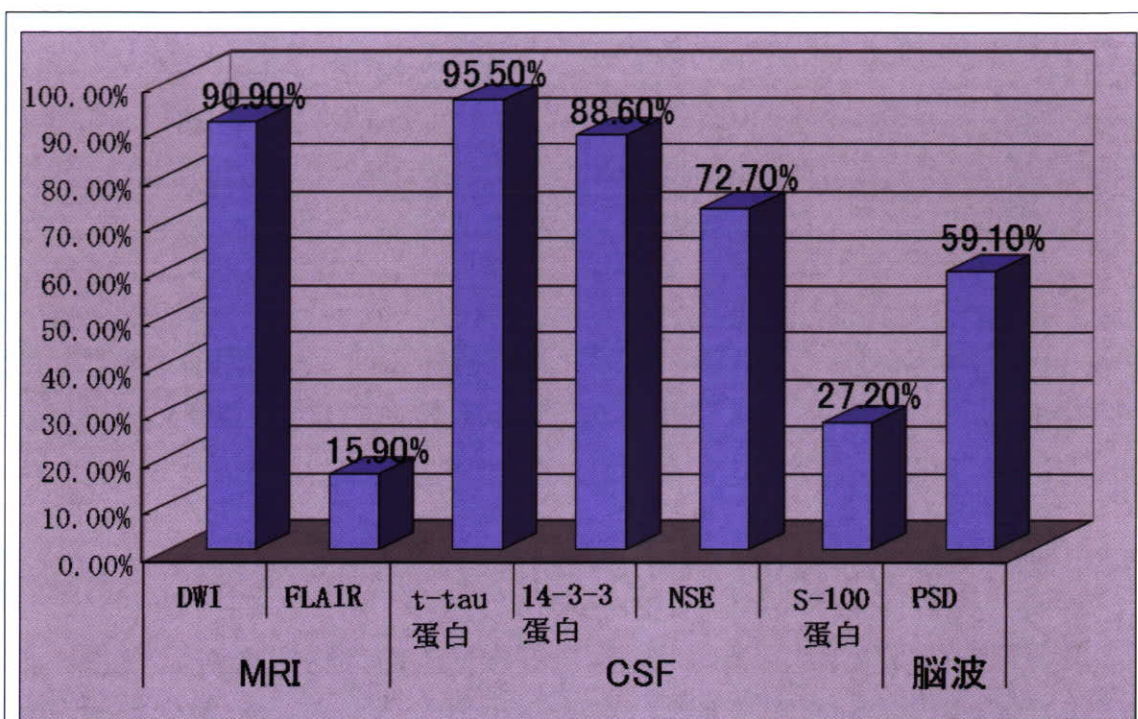
論文発表

1. Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A, Tsujihata M, Matsuo H, Nakagawa M, Eguchi K. Total Tau Protein in Cerebrospinal Fluid and Diffusin-Weighted MRI as an Early Diagnostic Marker for Creutzfeldt-Jakob Disease. Dement Geriatr Cogn Dusird 2007 ; 24 : 207-212.
2. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari O.Y, Muto H.J, Kodama K,

- Nakamura K.H, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, and Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. PNAS 2007 ; 104(29) : 11921-11926.
3. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. Dement Geriatr Cogn Disord 2007 ; 23(6) : 372-381.
 4. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. 2007 Nov ; 254(11) : 1509-1517.
 5. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S, and Matsuo H : 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. Cell Mol Neurobiol 2006 ; 26(1) : 45-52.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
 1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

プリオン病診断法確立のための特異性の高い診断マーカーの検討

分担研究者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院



プリオン病診断法確立のためにより特異性の高い診断マーカーの比較検討を行った。44例のCJD患者についてMRI拡散強調画像・MRIのFLAIR画像・脳脊髄液中の14-3-3蛋白・総Tau蛋白・NSE・S-100蛋白、脳波検査でのPSD(周期性同期性放電)の陽性率の結果を報告した。従来診断に用いられてきた14-3-3蛋白より総Tau蛋白の陽性率が高かった。総Tau蛋白>MRI拡散強調画像>14-3-3蛋白>NSE>脳波(PSD)S-100b蛋白>MRIのFLAIR画像の順で陽性率が高いことが明らかにできた。

分担研究者：岩城 徹 九州大学大学院医学研究院神経病理学分野

1. 研究目的

プリオン病は、正常型のプリオン蛋白が構造変換した異常プリオン蛋白が脳内に沈着し、神経変性をきたして発症すると考えられているが、その病態メカニズムは未だ不明な点が多い。プリオン病の早期診断、治療法を開発する上で、蛋白の構造変化から神経変性に至る過程を解明することは重要である。我々は、プリオン病モデルマウスを用いて、特に病初期における病態を解明するために、まずシナプス関連蛋白の発現変化を経時的に検討した。更に、プロテアーゼ抵抗性という従来 of 指標とは別の視点から、異常プリオン蛋白の生成過程を検討するために、遠心カラムを用いた簡易サイズ分画の手法を新たな検出法として適用し、病期ごとの異常プリオン蛋白の重合度の変化を検討した。

2. 研究方法

モデルマウスの作成

NZW/マウスに福岡-1 株を脳内接種して、0.5 ヶ月ごとに脳サンプルを採取した。ホルマリン固定して組織観察と免疫染色を行なうとともに、一部を凍結保存して蛋白生化学的解析に用いた。各時点における海綿状変化の評価は、H.E.染色標本で視床外側部の空胞領域を画像解析ソフトにより抽出し、領域面積を算出した。プリオン蛋白免疫染色で異常沈着のパターンを検討したほか、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白 (Pr^{Pres}) の発現量をプロテイナーゼ K (PK) 処理後にウェスタン・ブロット法で定量した。

シナプス関連蛋白の評価

シナプス終末で機能局在の異なる synaptophysin

(SYP)、SNAP-25、syntaxin (STX)、synaptobrevin (SYB)、synaptotagmin (SYT)、synapsin (SYN) に対するそれぞれの抗体で病期ごとに免疫染色とウェスタン・ブロットを行い、発現量や発現パターンの変化を検討した。

モデルマウスにおける病態と比較検討するため、ヒト・プリオン病 (孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病; sCJD、硬膜移植 CJD; dura CJD、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病; GSS) の剖検脳標本を用いて免疫組織化学的検討を行った。

異常プリオン蛋白の重合度の検討

市販の遠心ゲル濾過カラム (CHROMA SPIN TE-200, Clontech) を用いて、低速遠心と溶出バッファーの添加を繰り返して分子サイズによる分画を簡便に行う手法を開発した。この方法により PK 未処理の脳ホモジネートをサイズ分画して、プリオン蛋白の重合度の変化を病期ごとに解析した。

(倫理面の配慮)

本研究におけるマウスの感染実験は、九州大学動物実験委員会による審査で承認された。

3. 研究結果及び考察

NZW/福岡-1 株を脳内接種したマウスは、接種後 4.0 ヶ月に神経症状を呈して死亡した。視床外側の局所的なプリオン蛋白沈着、視床外側の海綿状変化、大脳皮質でのプリオン蛋白沈着がそれぞれ 2.0 ヶ月、3.0 ヶ月、3.5 ヶ月から認められたのに対して、Pr^{Pres} は 3.5 ヶ月より有意な増加がみられた。

シナプス関連蛋白の発現は、2.0 ヶ月まで一過性に増加した後、SNAP-25 と SYB が 2.5

ヶ月から 3.0 ヶ月、SYP が 3.5 ヶ月から発現量が低下していた。一方で、STX はプリオン蛋白沈着部位での局所的な発現低下が見られたが、全脳的には病末期まで発現量が保たれていた。SNAP-25、SYB、SYP の免疫染色でプリオン蛋白沈着部位より広範囲に染色性の低下を認め、大脳白質の軸索にスフェロイド様の蓄積を認めたことから、これらの蛋白は発現量そのものが低下するだけでなく、シナプス終末への輸送障害が病態形成に関与している可能性が示された。ヒト・プリオン病の検討においても、GSS や dura CJD のプラーク周囲の変性神経突起や軸索に一致してシナプス関連蛋白の蓄積が見られ、神経網での染色性が低下していた。今回我々が用いたモデルマウスでは、STX は比較的病末期まで発現分布が保たれていたことから、発症時にはシナプス構造自体はまだ維持されているにもかかわらず、特定の機能蛋白の発現輸送が低下することにより神経伝達が障害され、神経症状が出現することが考えられ、特に SNAP-25 の発現がより早期に低下していたことから、シナプス小胞開口分泌の障害が先行する可能性が示唆された。

遠心カラム法によりプリオン蛋白の重合度の変化を検討したところ、病期の進行に伴いオリゴマーに相当する分画で検出されるプリオン蛋白分子が増加することが確認された。接種後 3.0 ヶ月のサンプルでは PrP^{res} の明らかな増加は認めなかったが、オリゴマー状態のプリオン蛋白分子の出現が明らかとなり、この時期のプリオン蛋白オリゴマーはプロテアーゼ感受性異常プリオン蛋白である可能性が示された。一方で、病末期のオリゴマーの大部分は、プロテアーゼ抵抗性の PrP^{res} であった。異常プリオン蛋白の検出には、これまでプロテアーゼ抵抗性という性質を基準にして正常型と区別されてきたが、プロテアーゼ感受性異常プリオン蛋白の存在が報告され、また、高度に凝集したアミロイド線維よりもオリゴマー状態

の異常プリオン蛋白のほうが感染性や神経細胞毒性が高いことが示されるなど、病態に関する異常プリオン蛋白の性質については蛋白重合度の変化を含め総合的に解明する必要がある。

4. 評価

1) 達成度について

プリオン病の病初期の病態を病理形態学的、免疫組織化学的、蛋白生化学的に解析し、シナプス障害の関与とプリオン蛋白オリゴマーの出現を検討するという当初の目的をほぼ達成した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遠心ゲル濾過カラム法は蛋白重合状態を簡便にかつ迅速に解析するのに有用である。本研究でサンプル調整の条件設定等、実用化に向けた成果を挙げる事ができた。この方法はプリオン病以外のコンフォメーション病にも応用できる可能性がある。オリゴマー分子の病態への関与はプリオン病の研究分野の中でも近年、特に注目を集めている。またシナプス障害の関与は、神経細胞脱落より先に機能異常をきたす可能性を示すもので、治療戦略を構築する上で重要なデータであると考えられる。

3) 今後の展望

プリオン病症例の解析において、従来の形態的免疫組織化学的検討と PrP^{res} の解析に加えて、蛋白重合度解析は新しい指標で病態を検討する有用なツールとなりうる。CJD 早期診断のためのキット化を目標に、さらに細かな条件設定を行ない、再現性を確認する。同時に、分離したプリオン蛋白オリゴマーを培養細胞やマウスに接種して病原性の本体としての性格を有しているか検討し、病態解明を目指す。

4) 研究内容の効率性について

新しい実験手法を開発する上で試行錯誤を要したが、これまでに作出したモデルマウスのサンプルを用いることで病期の進行程度と関連づけて効率よく研究を実施することができた。しかし、プリオン蛋白オリゴマーを用いたあらたな動物実験を行なうためには感染実験の整備と実験費用が必要である。

5. 結論

プリオン病の病初期の病態を解析し、シナプス機能の障害が症状形成に関与している可能性を示した。また、遠心カラムを用いた簡便なゲル濾過サイズ分画の手法を開発して、PrP^{Pres}の生成に先行してプロテアーゼ感受性の異常プリオン蛋白オリゴマーが出現する可能性を示した。

6. 研究発表

1)国内

口頭発表：29件

原著論文による発表：6件

それ以外(レビュー等)の発表：1件

そのうち主なもの

論文発表

1. 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. *Neuropathology* 2006 ; 26 ; 82-88
2. 佐々木健介, 岩城 徹. プリオン病の病理解剖と標本作製の留意点. *病理と臨床* 2007 ; 25 ; 1124-1130.

学会発表

1. 皆木晴彦, 佐々木健介, 岩城 徹. プリオン蛋白オリゴマーの簡便な検出法, プリオン研究会 2007, 2007.8.
2. 佐々木健介, 皆木晴彦, 岩城 徹. 伝達性

海綿状脳症におけるシナプス関連蛋白発現の経時的解析, 第48回日本神経病理学会, 2007.5.

3. 佐々木健介, 岩城 徹. 伝達性海面状脳症における病理学的マーカーとしてのシナプス関連蛋白発現の解析, 第47回日本神経病理学会, 2006.5.

2)海外

口頭発表：5件

原著論文による発表：15件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

論文発表

1. Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Mabbott N, Iwaki T. Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *J Pathol* 2006 ; 209 ; 484-491.
2. Ishikawa K, Kubo 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* 2006 ; 99 : 198-205.
3. Kawasaki S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K. Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 2006 ; 29 ; 927-932.
4. Sasaki K, Doh-ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T. Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern : an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005 ; 31 ; 80-87.

学会発表

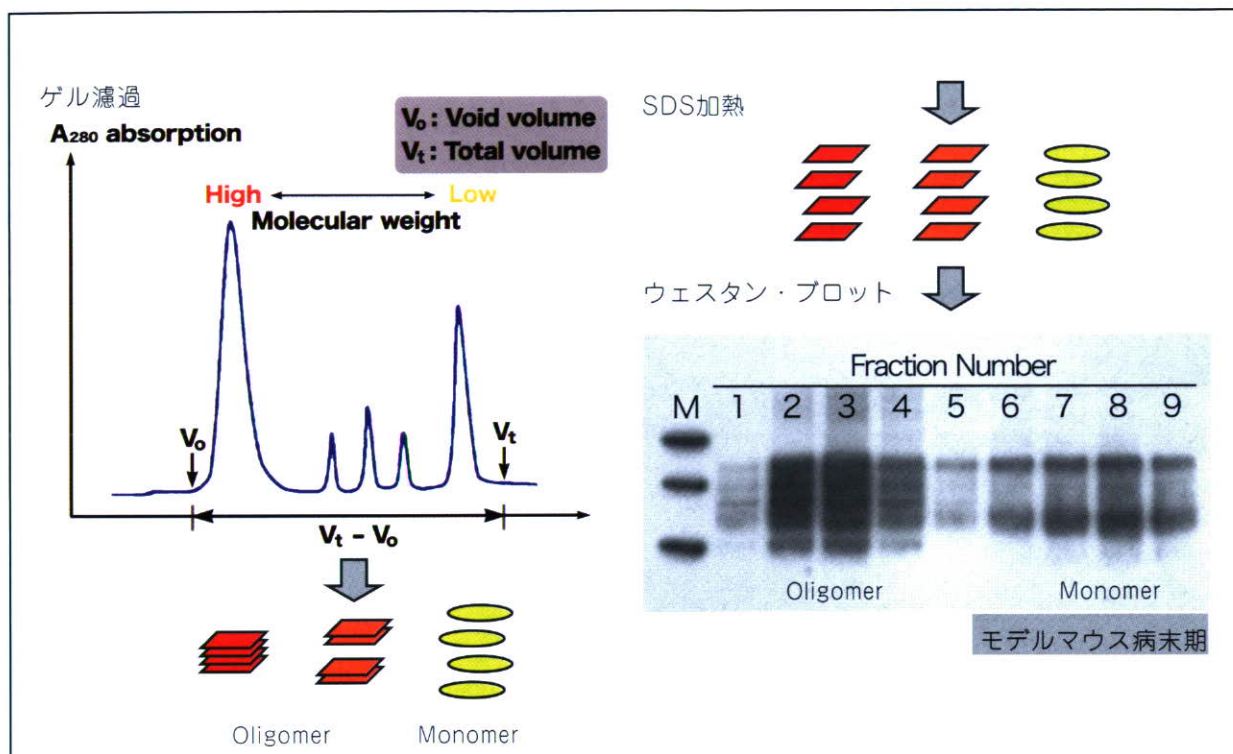
1. Sasaki K, Minaki H, Iwaki T : Time course of the development of PrP aggregates in a mouse model of prion disease, Prion 2007, Edinburgh, 2007.9.
2. Sasaki K, Iwaki T. Expression of synapse-related proteins in the transmissible spongiform encephalopathies. XVIth International Congress of Neuropathology, San Francisco, 2006.9.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

プリオン病モデルマウスにおける重合プリオン蛋白形成の経時的解析

分担研究者：岩城 徹 九州大学大学院医学研究院神経病理学分野



ゲル濾過サイズ分画による重合プリオン蛋白の検出法

市販の遠心カラムを用いて、簡便にサイズ分画を行うことができる。脳ホモジネートをゲル濾過して、分子サイズごとに分画する。ウエスタン・プロットで検出するために硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 存在下で加熱し、重合分子も全て単量体に解離させてから電気泳動した。

分画 1 のほとんどが void volume に相当し、分画 2~4 にオリゴマー状態のプリオン蛋白が抽出される。分画 6~9 のプリオン蛋白はモノマーで正常型であると考えられる。プリオン病モデルマウスの病末期ではオリゴマーに相当するプリオン蛋白分子が確認されたのに対して、正常コントロールでは分画 2~4 に抽出されるプリオン蛋白を認めなかった。さらに病初期のサンプルを用いた検討では、プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白の増加が明らかでないにもかかわらず、プリオン蛋白オリゴマーの出現が確認され、病初期にはプロテアーゼ感受性異常プリオン蛋白が病態形成に関与している可能性が示唆された。