

末梢投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究

分担研究者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者：川崎 ゆり 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：川越 敬一、陳忠 正 第一製薬東京研究開発センター

研究要旨

脳内感染マウスにおいて経口投与で治療効果を認めたアミロイド親和性化合物CompBについて、その効果について解析した。本化合物のプリオン株依存的な治療効果は、二糖鎖優位型パターンを示すプリオンに対して本化合物が効きにくいことに起因している可能性が示唆された。

A. 研究目的

生命予後改善効果や感染力価低下効果をもつ経口投与型治療候補化合物であるアミロイド親和性化合物 CompB に関して、プリオン株依存的な作用機序を明らかにするため、他の動物種での確認実験、ウエスタンブロット法と免疫組織化学法での解析を行った。

B. 研究方法

プリオン株依存性確認実験： 263K プリオンの宿主であるシリアンハムスターに、263K プリオンを脳内感染させ、CompB を粉末餌に混ぜて投与を行い、脳内感染から発病末期までの潜伏期間について観察した。

ウエスタンブロット解析： RML プリオン脳内感染 Tga20 マウスに CompB を粉末餌に混ぜて投与を行い、一定の期間飼育した後、安楽死させて脳を取り出し、半脳より異常型プリオン蛋白をウエスタンブロット法で検出した。CompB 非投与群を対照とした。

免疫組織化学解析： ウエスタンブロット解析したマウスの残りの半脳をホルマリン固定し、異常プリオン蛋白沈着を抗プリオン蛋白を用いた免疫組織化学で検出した。また、神経変性の程度を GFAP に対する免疫組織化学で解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東北大学医学系研究科動物実

験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

プリオン株依存性確認実験： これまでに 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ることを報告した。すなわち、RML プリオンが CompB に最も感受性が高く（高用量投与で約 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。本年度、263K プリオンの宿主動物としてシリアンハムスターを用いてハムスター型プリオン蛋白発現マウス Tg7 で観察された結果が再現できるかどうかを検討した。その結果、263K プリオン感染シリアンハムスターでも Tg7 と同様に CompB の効果が乏しいことが明らかとなった。

ウエスタンブロット解析： RML プリオン脳内感染後同一時期で安楽死させたマウスを比較したところ、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。また、発病末期の状態のマウスで比較しても、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。

一方、異常型プリオン蛋白の糖鎖パターン

を解析したところ、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ることが判明した。また、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 プリオンのみが二糖鎖優位パターンを示した。

免疫組織化学解析： 免疫組織化学的解析の結果はウエスタンブロット解析の結果と矛盾しなかった。すなわち RML プリオン脳内感染後同一時期で安楽死させたマウスを比較したところ、治療群の脳では異常プリオン蛋白沈着の程度は非治療群よりもはるかに軽く、GFAP 免疫染色で検出される神経変性の程度も極めて軽かった。また、発病末期の状態のマウスで比較しても、治療群の脳では異常なプリオン蛋白沈着の程度は非治療群よりも軽かったが、GFAP 染色像の程度に明らかな差は観察されなかった。治療群と非治療群の間で、異常プリオン蛋白沈着のパターンや分布に明らかな違いは指摘できなかった。

D. 考察

本年度の研究で、CompB のプリオン株依存性を改めて 263K プリオンにおいて確認できた。すなわち、263K プリオンに対する CompB の作用効果が乏しい原因は、感染している宿主側にあるのではなく、263K プリオンそのものにあることが強く推測された。一方、ウエスタンブロット解析より、治療を継続しているにもかかわらず治療マウスの脳内では元々感染させたプリオンと異なる二糖鎖優位パターンを示す異常型プリオン蛋白が観察されたことや、CompB の治療効果が乏しい 263K プリオンが二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すことが示唆された。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これまでの結果や本年度のウエスタンブロット解析や免疫組織化学解析の結果は、矛盾するものではなく、これらを総合的に評価すると治療群の脳内では感染

させたプリオンと性状の異なるプリオンが増殖していた可能性が考えられる。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を示唆している。

CompB がなぜ二糖鎖優位パターンを示すプリオンに効果が乏しいのか、その機序解明は今後の課題である。また、CompB の実用化には毒性や物性の改善による最適化が必要であるものの、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、CompB 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。

E. 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 CompB が、プリオン株依存的な治療効果を発揮し、投与中に化合物に耐性なプリオンが生じてくる可能性を示唆した。

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

13 頁－15 頁に記載。

抗プリオン作用を持つ生薬類の探索

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 逆瀬川 裕二、濱中 大一 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

新たな治療薬候補を探索するため、生薬101種類についてプリオン持続感染細胞を用いて抗プリオン活性をスクリーニングした。その結果13種類の生薬にScN2a細胞で抗プリオン活性を示す成分が見つかった。この内の6種類の生薬はN167細胞でも抗プリオン活性を示した。

A. 目的

これまでに米国FDAが承認しているほぼ全ての医薬品について、抗プリオン活性を網羅的に検討した仕事が報告されており、既存の医薬品から新たなプリオン病治療薬を見つけ出す試みは既になされている。しかしながら、日本を始めアジアで医薬品に用いられている生薬類については、これまでに網羅的に抗プリオン活性の有無を検討した仕事の報告はなく、新たな治療薬候補化合物が生薬類より発見される可能性が残されている。本研究では、新たな治療薬候補を探索するため、入手可能な生薬類についてプリオン持続感染細胞を用いて抗プリオン活性をスクリーニングした。

B. 材料と方法

RMLプリオンが持続感染しているマウス神経芽細胞腫細胞であるScN2a細胞と22Lプリオンが持続感染しているマウス神経芽細胞腫細胞であるN167細胞を用いた。71種類の生薬類より50%エタノールで抽出した成分を準備した。また、別の30種類の生薬類より100%エタノールで抽出した成分と熱水で抽出した成分も準備した。これらの成分を3種類の濃度（10、1、0.1 $\mu\text{g/ml}$ ）となるように細胞培養液中加入して、2日間培養を行った。細胞を回収し、細胞溶解液をプロテナーゼKで消化した後、高速遠心で異常型プリオン蛋白を沈殿させた。沈殿した異常型プリオン蛋白をウ

エスタンブロット法で解析し、異常型プリオン蛋白のシグナルの強さより、抗プリオン活性の有無を判定した。

（倫理面への配慮）

本研究に倫理面に配慮すべき実験は含まれていない。

C. 研究結果

13種類（#8, 15, 21, 22, 25, 43, 47, 48, 49, 63, 66, 72, 76）の生薬に、ScN2a細胞で抗プリオン活性が観察された。このうち6種類の生薬（#15, 43, 47, 66, 72, 76）はN167細胞でも抗プリオン活性を発揮した。一方、ScN2a細胞で抗プリオン活性がなくN167細胞でのみ抗プリオン活性を示すものは見られなかった。

D. 考察

今回の結果より、多数の生薬の成分に抗プリオン活性が認められることが明らかとなった。これまでの我々の経験や報告されている論文内容から、ScN2a細胞は抗プリオン活性を観察しやすい細胞であり、N167細胞でも抗プリオン活性を発揮するものは少ないことがわかっている。それだけに、N167細胞でも有効なものが6種類発見できたことは、その中に治療効果の高いものが含まれていることを期待させるものである。今後、抗プリオン活性を発揮する成分の特定やin vivoでの有効性を検証する必要がある。

E. 結論

プリオン持続感染細胞において抗プリオン活性を発揮する生薬を多数発見した。

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

13 頁－15 頁に記載。

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候補に関する研究

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 木村 朋寛 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候補として発見した受容体関連蛋白について、プリオン持続感染細胞を用いてさらに検証を進めた。

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。これまでに 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てきたが、その中で候補となる受容体関連蛋白を発見した。本年度は、プリオン持続感染細胞を用いて同蛋白が特異的に異常型プリオン蛋白産生に関与しているかどうかを繰り返し検証した。

B. 材料と方法

1. ノックダウン用 RNA： 受容体関連蛋白遺伝子に特異的な 21 塩基配列を 6 種類選択し、shRNA 発現ベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。一方、受容体関連蛋白遺伝子に特異的な 25 塩基配列よりなる 3 種類と 21 塩基配列よりなる 1 種類の計 4 種類の化学合成 siRNA を合成した。

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 (RML スクレイピー感染細胞) および N167 細胞 (22L スクレイピー感染細胞))、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 shRNA 発現コンストラクトあるいは合成 siRNA 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、ウェ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ェ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 mRNA 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 を用いた遺伝子発現解析を行った。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

受容体関連蛋白遺伝子をノックダウンしたところ、プリオン持続感染細胞および非感染細胞のいずれにおいてもプリオン蛋白遺伝子発現量 (mRNA 量および正常型プリオン蛋白量) に変化をきたさず、プリオン持続感染細胞 (ScN2a および N167) のいずれにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。検討した 6 種類の shRNA

発現用コンストラクトの内2種類で、また4種類の合成 siRNA の内1種類で、このことが観察された。shRNA および siRNA を用いた実験では、受容体関連蛋白遺伝子の mRNA 発現のノックダウンと異常型プリオン蛋白の産生抑制は完全に相関していた。用いた細胞では受容体関連蛋白遺伝子の mRNA 発現及び蛋白発現は極めて少ないことより、受容体関連蛋白の発現抑制をウエスタンブロット法で証明することは出来なかった。さらにこの分子に対する特異的阻害剤を用いて検討したところ、正常型プリオン蛋白発現に影響せず異常型プリオン蛋白の産生を抑制した。

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。この接触が起こる場所はラフトと呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインや早期エンドゾーム中の膜上と推測されている。本研究で検討している受容体関連蛋白は細胞膜上に発現している蛋白質であり、遺伝子発現抑制実験だけでなく特異的阻害剤を用いた実験から異常型プリオン蛋白産生が抑えられたことより、十分に創薬の対象になると考えられる。

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が多いが、今回解析を進めたところ、受容体関連蛋白が特異的にプリオンの複製・増殖に関与している可能性がこれまで以上に確かとなった。発現量が極めて少ないため蛋白質レベルでは評価できなかった点をどのように解決するのかや、ノックダウンと同時に遺伝子導入を行うことにより遺伝子抑制効果を打消すことが出来るかといった点を確認する必要がある。また、これまでのプリオン持続感染細胞を用いた実験だけでなく、インビボでの検証実験も行っていく必要がある。

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候補としての受容体関連蛋白について解析を進め、エビデンスを積み上げた。

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

13 頁－15 頁に記載。

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・助教

研究要旨

これまでにヒートショック蛋白質Hsp90がインビトロにおいてプリオン蛋白質の構造変換を促進することを報告している。今回、1) Hsp90がマウス神経芽細胞腫由来N2a細胞の細胞膜上に局在すること、2) 新規に見出したHsp90構造変換活性阻害剤が、N2a細胞において正常型プリオン蛋白質の一次代謝産物C1ペプチドの産生および、3) RMLおよび22Lプリオン株に持続的に感染したN2a細胞において異常型プリオン蛋白質の産生を抑制することを見出した。これらの結果は、Hsp90がプリオン蛋白質の代謝および異常型プリオン蛋白質の産生に關与する可能性を示している。

A. 研究目的

Hsp90の正常型プリオン蛋白質(PrPC)の代謝およびプリオン持続感染細胞における異常型プリオン蛋白質(PrPres)の産生への關与を調べた。

B. 研究方法

インビトロ PrPC 高次構造変換試験系

100ngのリコンビナントプリオン蛋白質(rPrP)とHsp90を含む20 μ lの反応液[50mM HEPES-KOH (pH7.5)、2mM MgCl₂、2mM ATP]中にて16 $^{\circ}$ 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。

リコンビナント Hsp90 (rHsp90) の精製

マウスHsp90 α をN末端側にHis6タグを付加するようにマウスcDNAライブラリーよりPCR法によって増幅し、大腸菌蛋白質発現ベクターpET11に導入した。上記発現プラスミドにて形質転換した大腸菌Rosetta2を0.1mM IPTGを含む培地で18 $^{\circ}$ C、一晚培養することによってrHsp90を発現誘導し、細胞破碎液上清からHIS-Select (Sigma) およびUNO-Q (Bio-Rad) により精製した。

間接蛍光抗体法による Hsp90 の局在の観察

ガラスボトムディッシュ上に培養したN2a細胞をPBS(-)で洗浄後、パラホルムアルデヒド固定した。1次抗体に抗Hsp90抗体 α 、 β (Neo Markers)あるいは抗PrP抗体(M-20, Santa Cruz)、2次抗体にAlexa488結合抗ウサギIgG抗体、Alexa596結合ヤギIgG抗体(Invitrogen)を用いて、コンフォーカル顕微鏡システムFV300(Olympus)にて観察した。

培養細胞における C1 ペプチドの検出

マウス神経芽細胞腫細胞N2a(7 \times 10⁵細胞)を12ウェルプレートに添加し、2日間培養した後、化合物AあるいはDMSOを添加し、さらに12時間培養した。PBS(-)にて細胞を洗浄した後、200 μ lのLysis緩衝液[0.5% NP-40、0.5% Na Deoxycholate、PBS(-)、1mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Nacalai Tesque、動物細胞用)]に溶解し、5,000 \times g上清を回収した。上清100 μ lに0.2U PNGaseを添加し、37 $^{\circ}$ C、12時間糖鎖消化処理した。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、SAF83抗体により正常型PrPを検出した。

培養細胞における異常型プリオン蛋白質 (PrPres) の検出

プリオン持続感染細胞Sc84あるいは

N167(7x10⁵細胞)を12ウェルプレートに添加し、2日間培養した後、化合物AあるいはDMSOを添加し、さらに12時間培養した。PBS(-)によって細胞を洗浄した後、200 μ lのLysis緩衝液[0.5% NP-40、0.5% Na Deoxycholate、PBS(-)]に溶解し、5,000 \times g上清を回収した。上清100 μ lに20 μ g/mlとなるようにProteinase Kを添加し、37 $^{\circ}$ C、30分間消化処理した後、SDS-PAGEによって分離し、PVDF膜にトランスファーした後、SAF83抗体によりPrPresを検出した。

(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

Hsp90の細胞内局在

間接蛍光抗体法を用いて、N2a細胞の細胞膜表面にHsp90が局在するか否か調べた。その結果、Hsp90の α および β アイソフォームのいずれも細胞膜上にドット状に局在することが判明した。細胞膜上に局在するHsp90の一部は、細胞膜上のPrPと共局在していた。

正常型プリオン蛋白質の代謝への影響

これまでに、インビトロPrP高次構造変換試験系によるスクリーニングによってHsp90が示すrPrPの高次構造変換活性を阻害する化合物を見出している。そこで、この化合物(化合物A)を用いて、Hsp90がPrPCの合成および代謝に与える影響を調べた。化合物(200 μ M)を含むメディウム中にて12時間培養したN2a細胞の破碎液を回収し、PrPCの糖鎖をPNGase Fにて消化し、無糖鎖のPrPCをSDS-PAGEによって分離し、イムノブロット法により検出した。その結果、未処理の細胞に比して、PrPCの一次分解産物と考えられるC1ペプチドの産生が減少していた。また、化合物AによるPrPCの発現の影響は認められなかった。

異常型プリオン蛋白質の複製への影響

2つのプリオン株RMLおよび22Lに持続的に感染したN2a細胞を化合物Aを含むメデ

イウム中にて2日間培養し、PrPresの産生に与える影響を調べた。その結果、いずれのプリオン株に感染した細胞においても、化合物Aは濃度依存的にPrPresの産生を抑制した。

D. 考察

これまでに、Hsp90ファミリー蛋白質が、rPrPの構造変換を促進すること、さらに、銅結合型PrPをヌクレオチド依存的に構造変換し、そのシャペロン活性の本体は2つあるシャペロンドメインの内、C末側シャペロンドメインであることを発見している。本年度の研究で、1)Hsp90の細胞内局在、2)正常型プリオン蛋白質の代謝への影響、3)異常型プリオン蛋白質の複製への影響を検討した。

従来、Hsp90はサイトソルあるいは核内に局在し、ステロイドホルモンレセプターやチロシンキナーゼなどの活性化あるいは安定化に働いていることが報告されている。最近になって、細胞外マトリクスに局在するHsp90の α アイソフォームは、細胞外マトリクスメタロプロテアーゼの活性化に働き、がん細胞の転移に関与することが報告された。今回、抗Hsp90抗体を用いた間接抗体法によってN2a細胞の細胞膜表面上に結合するHsp90 α および β の存在を確認することに成功した。細胞膜上のHsp90はPBSによる洗浄では除かれないことから、細胞膜上に一定の結合力で結合していると考えられる。一部のHsp90は細胞膜上のPrPCとも共局在しており、Hsp90とPrPCは直接相互作用する可能性がある。Hsp90はrPrPの分子中央部を構造変換すると考えられ、Hsp90によって構造変換されたrPrPはトリプシン消化によって2つのペプチド(N1、C1様ペプチド)に切断される。この結果は、生体内で観察されているPrPCの代謝産物、C1ペプチドの産生にHsp90が関与することを予想させる。そこで、Hsp90のrPrPに対する構造変換活性の新規阻害剤(化合物A)を用いて、C1ペプチドを測定したところ、化合物Aによって処理したN2a細胞のC1ペプチドの産生はコントロール

に比べて強く抑制された。また、化合物 A は 2 つのプリオン持続感染細胞において、PrPres の産生を抑制した。

これらの結果は、Hsp90 が PrPC の代謝および PrPC から PrPres への構造変換に関与する可能性を示唆している。今後は、化合物 A の基質特異性や阻害作用のメカニズムを明らかにすることが必要である。

E. 結論

Hsp90 は、N2a 細胞においてサイトソルだけでなく細胞膜上に局在すること、また、インビトロにおいて Hsp90 の rPrP 構造変換活性の阻害剤、化合物 A は、PrPC の代謝産物 C1 の産生を抑制し、また、プリオン持続感染 N2a 細胞において PrPres の産生を抑制した。Hsp90 は PrPC の代謝および PrPres の産生に関与する可能性がある。

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

13 頁-15 頁に記載。

カクテル療法を目指した抗プリオン化合物の薬物動態学的研究

分担研究者 片岡 泰文 福岡大学薬学部・教授
研究協力者 児玉 耕太 福岡大学薬学部・助教

研究要旨

これまでに強力な抗プリオン活性をもつキナクリンやペントサン硫酸の臨床試験が実施されているが、低い脳移行性あるいは副作用発現などの問題から劇的な治療効果はあがっていない。本研究では、抗プリオン治療候補薬である GN8 の構造最適化および脳指向型 siRNA の開発による新規治療候補薬の探索を企図した。PrP とのドッキングシミュレーションより数種の GN8 誘導体を、またアミノ酸配列を参考に siRNA を合成した。いずれの候補化合物も *in vitro* において強力な抗プリオン活性を示すことが判った。

A. 研究目的

本邦においてキナクリンおよびペントサン硫酸の臨床試験が実施されたが、劇的な治療効果はあがっていない。要因としては高頻度の副作用発現および低い脳移行性が挙げられる。従って、効果的で安全性が高い新たな治療薬の探索が必要である。本研究では、抗プリオン治療候補薬である GN8 の構造最適化および脳指向型 siRNA の開発による新規治療候補薬の探索を企図した。

B. 研究方法

①新規ケミカルシャペロン GN8 の構造の最適化

これまでに我々は、特異的に正常型 PrP の立体構造を安定化し、異常型 PrP の産生を抑制する低分子化合物 GN8 を合成した。そこで、この GN8 について抗プリオン効果を指標として構造の最適化を行うことを計画した。GN8 について必須アミノ酸をビルディングブロックに用いて、約 300 種の新規化合物ライブラリーを構築し、PrP とのドッキングシミュレーションを行うことにより、PrP 結合能を予測した。続いて、結合能上位の約 50 種を合成し、それぞれについて抗プリオン効果を評価した。化合物の抗プリオン活性の評価は、Fukuoka-1 株持続感染 GT1-7 を用いて、Western blot

法によりプリオン蛋白の確認を行い、GN8 及び誘導体の IC₅₀ を算出し、評価を行った。

②PPS（ペントサン硫酸）モノクローナル抗体の作製

現行の PPS 脳室内投与療法の改良点を探るには、PPS の脳内動態ならびに脳内分布を明らかにする必要があるが、PPS の特異的な測定方法がない。そこで抗 PPS 抗体による PPS の検出および定量化法の確立を目指した。PPS モノクローナル抗体の作製には Balb/c 雌性マウスに PPS (40 μg) をアジュバンドと共に免疫し、2 週間間隔で PPS (20 μg) を 2 回免疫した。その後、血液中の抗体価を評価しつつ、1 週間間隔で PPS を追加免疫した。抗体価が上昇したところで、免疫したマウスより脾臓を摘出しリンパ球浮遊液を調製し、ミエロマ細胞と細胞融合を行い、HAT 培地によりハイブリドーマのクローニングを行った。

③PrP^c の発現抑制可能な siRNA の脳特異的なドラッグデリバリーシステムの開発

次世代型バイオ医薬品として期待される siRNA を脳特異的に送達する方法を開発し、プリオン病の病因分子の核となるプリオン蛋白質の発現を抑制することで、モデル動物の実験的治療を行うことを企図した。具体的には、狂犬病ウイルス由来 fragment peptide (RVG-9R) の脳移行機構の解析を

行い、これを基盤に PrP 発現を抑制する脳指向型 siRNA (siPrP) 製剤を作製し、in vitro 及び in vivo において PrP 発現を抑制することにより PrP^{Sc} 量を減少させる。本年度は、PrP 発現を効果的に抑制する siRNA を、既報および PrP^C のアミノ酸配列より探索し、RNA 合成機を用いて作製した。

いずれの研究においても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は、プリオン持続感染細胞を用い、ウエスタンブロット法・バイオアッセイ法等を実施し検証した。

(倫理面への配慮)

感染モデル系を用いた実験においては、国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」におけるバイオセーフティーレベルに準ずる実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

- ①GN8 より抗プリオン活性が向上した新規化合物を複数得ることができた。
- ②ハイブリドーマが産生する抗体は PPS に対するものではなく、免疫したマウスの何らかの自家抗体であった。
- ③今回作製した siRNA は 250~1000nM の濃度範囲で強力な PrP^C 発現抑制効果を示した。

D. 考察

- ①今回合成した抗プリオン活性を有する新規化合物について、更なる構造最適化を行い、CJD をはじめとするプリオン関連疾患に対する治療薬開発を行っていく必要がある。
- ②PPS は多糖という分子の性質上、免疫認識が起こりにくいため、ウシ血清アルブミンと結合させるなど免疫原性をあげて検討する必要がある。
- ③RVG-9R との結合による細胞内移行性の検討および in vitro BBB モデルを用いた脳移行性の検討が必要である。

E. 結論

本研究で合成した GN8 誘導体および siRNA は、in vitro において抗プリオン活性を示した。今後、構造最適化、薬物送達性の向

上を目指す。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Kataoka Y., Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 27:687-694, 2007
- Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Kodama K, Nakamura HK, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y., Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:11921-11926, 2007
- Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y. Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both antiprion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell Mol Neurobiol.* 27:303-316, 2007
- Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y. Inhibition of transforming growth factor-beta production in brain pericytes contributes to cyclosporin A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 27:317-328, 2007
- Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y. An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol.* 27:263-270, 2007

Nishioku T, Takata F, Yamauchi A, Sumi N, Yamamoto I, Fujino A, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y.
Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells. J Pharmacol Sci. 103:323-327, 2007

2. 学会発表

神田英里、廣田剛、児玉耕太、武藤淳二、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、西田教行、桑田一夫、片岡泰文：抗プリオン活性をもつケミカルシャペロンの構築。第81回 日本薬理学会年会、横浜、2008年3月

中川慎介、Deli Maria A、中尾しのぶ、林健太郎、中桶了太、片岡泰文、丹羽正美：BBB キットの完成：血液脳関門 in vitro 再構成モデル。第80回 日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者：桑田一夫、木村公則、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、高田二郎、西田教行、片峰茂、片岡泰文、児玉耕太、特許の名称：プリオンタンパク質構造変換抑制剤、特願2007-178247、出願日：平成19年7月6日、出願人：岐阜大学、長崎大学、福岡大学

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

異常型プリオン蛋白検出プローブの開発

分担研究者	工藤 幸司	東北大学先進医工学研究機構・教授
研究協力者	古本 祥三	東北大学先進医工学研究機構・助教
研究協力者	岡村 信行	東北大学大学院医学系研究科・助教
研究協力者	志賀 裕正	宮城病院・部長
主任研究者	堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

[¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究では4例のプリオン病患者のうち、2例では異常型プリオン蛋白と [¹¹C]BF-227 との結合が示唆される PET 画像が得られた。 [¹¹C]標識体に比し、半減期が約 5.5 倍長いことから、臨床有用性の高い [¹⁸F]標識 PET プローブとして [¹⁸F]FACT を見い出した。近赤外線蛍光プローブとして、励起および蛍光波長とも 600nm 以上で、且つ β シート構造をとったアミロイド β 蛋白との結合性を有するいくつかの基本化学構造を得た。

A. 研究目的

異常型プリオン蛋白の β シート構造を認識結合するプローブ（低分子有機化合物）を開発し、これをプリオン病診断に用いることを目的に、本年度は以下の3つの研究課題を検討した。すなわち、まず分担研究者らによって開発された β シート構造を認識結合する PET プローブ [¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究の実施、次に [¹¹C]標識体に比し、半減期が約 5.5 倍長いことから、臨床有用性の高い [¹⁸F]標識 PET プローブを開発すること、およびより簡便な診断を可能とする近赤外線蛍光プローブを開発し、3-5年後の探索的臨床研究を実施することである。

B. 研究方法

1. [¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究

平成 20 年 1 月末日までに 4 例のプリオン病患者の PET 画像を撮影した。

2. [¹⁸F]標識プローブの開発

最適化 [¹⁸F]標識体の脳移行性および脳からのウォッシュアウト、Tg マウスモデルにおける脳内アミロイド斑との結合性、GSS 患者脳標本における染色性等を検討した。

3. 近赤外線蛍光プローブの開発

β シート構造をとったアミロイド β 蛋白との結合性、最適励起および蛍光波長、GSS 患者脳標本における染色性等を検討した。

（倫理面への配慮）

プリオン病患者脳標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する、また臨床試験においてはヘルシンキ宣言を基準として倫理面に十分配慮するとともに、東北大学医学部倫理委員会、同薬剤研究委員会、同臨床研究委員会の承認を得た上で実施する。動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針（S63.3.24）に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。放射性同位元素を取り扱う試験においては東北大学放射線障害予防規定（H14.6.18）を遵守し、被曝および汚染の防護に努める。

C. 研究結果

1. [¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究

4 例のプリオン病患者のうち、2 例では異常型プリオン蛋白と [¹¹C]BF-227 との結合

が示唆される PET 画像が得られた (詳細は志賀裕正の分担研究報告書参照)。

2. [¹⁸F]標識プローブの開発

900 を超える化合物をスクリーニングし、¹⁸F 標識プローブとして [¹⁸F]FACT (Fluorinated Amyloid Imaging Compound of Tohoku University) を見い出した。静脈内投与された [¹⁸F]FACT は脳移行性および脳からのウォッシュアウトに優れるとともに、¹⁸F 標識プローブにしばしば見られる脱フッ素による [¹⁸F]イオンの骨集積は全く認められなかった。Tg マウスにおける検討では、静脈内投与された [¹⁸F]FACT は特異的選択的に脳内アミロイド斑に結合した (ex vivo オートラジオグラフィ)。また非標識 FACT は GSS 患者脳の異常型プリオン蛋白に結合した。

3. 近赤外線蛍光プローブの開発

励起および蛍光波長とも 600nm 以上で β シート構造をとったアミロイド β 蛋白との結合性を有するいくつかの基本化学構造を得た。また同基本構造を有する化合物群は GSS 患者脳の異常型プリオン蛋白に結合した。

D. 考察

[¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究では 4 例のプリオン病患者のうち、2 例では異常型プリオン蛋白と [¹¹C]BF-227 との結合が示唆される PET 画像が得られた。

[¹⁸F]標識プローブとして [¹⁸F]FACT を見い出した。 [¹⁸F]FACT はアルツハイマー病については 2007 年度内の探索的臨床研究を実施する予定であるが、プリオン病についても出来るだけ速やかに同臨床研究に入りたいと考えている。

近赤外線蛍光プローブとして励起および蛍光波長とも 600nm 以上で、且つ β シート構造をとったアミロイド β 蛋白との結合性を有するいくつかの基本化学構造を得た。今後さらなる化合物の最適化を加え、3-5 年後には探索的臨床研究を実施したいと考えている

E. 結論

[¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究では 4 例のプリオン病患者のうち、2 例では異常型プリオン蛋白と [¹¹C]BF-227 との結合が示唆される PET 画像が得られた。 [¹¹C]標識体に比し、半減期が約 5.5 倍長いことから、臨床有用性の高い [¹⁸F]標識 PET プローブとして [¹⁸F]FACT を見い出した。近赤外線蛍光プローブとして励起および蛍光波長とも 600nm 以上で、且つ β シート構造をとったアミロイド β 蛋白との結合性を有するいくつかの基本化学構造を得た。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H: 2-(2-[2-Dimethylamino- thiazol-5-yl] ethenyl) -6-(2-[fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer' s disease patients. J Nucl Med. 48. 553-561. 2007.
- Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: Recent advances in the development of amyloid imaging agents. Current Topics in Medicinal Chemistry. 7. 1773-1789. 2007.
- Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada S, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer' s disease. Japan Geriatrics Society. 7.

393-400. 2007.

- 工藤幸司, 古本祥三, 岡村信行: アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の診断. 非侵襲・可視化技術ハンドブック、編者 小川誠司, 上野照剛、N T S社、562-566、2007、東京
- 古本祥三, 岡村信行, 工藤幸司: アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の早期診断. 臨床医のためのクリニカルPET-病期・病態診断のためのガイドブック、編者 伊藤正敏、先端医療技術研究所、205-210、2007、東京
- 工藤幸司, 古本祥三、岡村信行: アミロイドイメージング「アミロイド画像化用プローブ」、日本臨床、2008, 66Suppl. 1, 300-306
- 岡村信行、谷内一彦、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司: アミロイドイメージング「PET」、日本臨床、2008, 66Suppl. 1, 288-292
- 岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦: 脳の分子イメージング「アルツハイマー病」、日本臨床、2007, 65, 320-326
- 荒井啓行、工藤幸司: 病理像を画像化する分子神経イメージング法による Alzheimer 病の早期診断-日本での BF-227 の開発と臨床応用.、医学のあゆみ、2007, 220, 404-408

2. 学会発表

- Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Yanai K, Arai H: Noninvasive detection of amyloid deposits in the patients with Alzheimer's disease using [11C]BF-227 PET、第 26 回認知症学会 学術集会・第 13 回国際老年精神医学会、大阪国際会議場、10 月 14 日-18 日、2007 年
- Arai H, Okamura N, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y: In Vivo Detection of Amyloid Deposits in Normals, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients Using [11C]BF-227 and PET, Human Amyloid Imaging・Boston2007, Boston Back Bay Hilton Hotel, 5 月 4 日、2007 年

Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Funaki Y, Kato M, Ito S, Ishikawa Y, Maruyama M, Arai H, Fukuda H, Iwata R, Itoh M, Yanai K: In vitro detection of amyloid deposits in Alzheimer's disease using [11C]BF-227 PET, Brain' 07 & Brain PET' 07, 大阪国際コンベンションセンター, 5 月 20 日-24 日, 2007 年

Tashiro M, Kumagai K, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Funaki Y, Maruyama M, Kimura Y, Itoh M, Iwata R, Kudo Y, Arai H, Yanai K: Quantitative analysis of detection of amyloid deposition in human brain using PET and a new imaging probe [¹¹C]BF-227, Brain '07 & Brain PET '07, 大阪国際コンベンションセンター, 5 月 20 日~24 日, 2007 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

PCT/JP2007/063350、ベンゾキサゾール誘導体、出願日 平成 19 年 7 月 4 日、出願人 東北大学、発明者 工藤幸司、古本祥三、岡村信行

特願 2007-176366 フッ素およびヒドロキシ基で置換されたアルコキシ基を有する PET プローブ、出願日 平成 19 年 7 月 4 日、出願人 東北大学、発明者 工藤幸司、古本祥三、岡村信行

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン病の治療研究：体内埋め込み型ポンプを用いた
ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法

分担研究者 坪井 義夫 福岡大学医学部・准教授
研究協力者 山田 達夫 福岡大学医学部・教授

研究要旨

プリオン病は、発病後、その病型にかかわらず、進行性、致死性の経過をたどるが、これまでに有効とされる治療薬は見つかっていない。ペントサンポリサルフェート（PPS）の脳室内持続投与は、スクレイピー感染マウスモデルで著しい発病の遅延を認めた薬剤である。2003年に英国で、はじめて臨床応用が行われ、本邦でも2004年11月から、2007年3月までに11例に対して同治療が行われた。病型は孤発性CJD6例、硬膜移植後医原性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9ヶ月から31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。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10例にさまざまな程度の硬膜下水腫が認められ、痙攣発作が1例に認められた。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。症状の改善は見られなかったが、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。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

プリオン病の診断は、WHOの診断基準に従った。体内埋め込み型微量注入器具（Archimedes®20 ml reservoir, Flow rate 0.5 ml/24h, Codman Inc., Germany）および脳室内カテーテルの留置手術は福岡大学脳神経外科により、福岡大学手術室にて行われた。PPS薬剤注入、薬剤効果の評価、

副作用の有無は福岡大学病院神経内科病棟にて原則的に行われたが、一定期間の後、紹介病院にて、その後の経過観察を行った。PPS脳室内投与用の製剤化と、PPS髄液中濃度測定は福岡大学薬学部疾患管理学教室で行われた。腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置及び脳室内カテーテルの留置手術を行い、手術後1週間はポンプに生食を満たし、頭部CTで出血がないことを確認する。出血等の合併症がなければ術後8日目よりPPS投与を低濃度で開始する。その後、漸増し維持量に到達させる。最終維持濃度は $120\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ として、4週間毎に腹部皮下の微量注入器具中に、経皮的に薬液を交換充填する。

（倫理面の配慮）

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。

C. 研究結果

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)。この11例において、治療前後の神経学的評価、日常生活動作、同治療に関連した可能性のある副作用を検討した。病型は孤発性CJD6例、硬膜移植後医原性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7ヶ月から31ヶ月で、治療前のmodified Rankin Scaleは平均3.5(2-5)、現時点は平均5.2(4-6)と、全例に症状の進行がみられた。11例中5例が死亡し、治療から平均12.8(4-20)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10例にさまざまな程度の硬膜下水腫が認められた。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。

D. 考察

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いる。硬膜下水腫は、神経症状を悪化させるものではないが、高頻度に認められた。原因は萎縮に伴う脳脊髄液の硬膜下への漏出の可能性が高い。現在治療のエントリーは終了したが、治療、臨床評価は継続している。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と思われる。この研究成果は、脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与法の確立としての意味と、プリオン病に対する臨床効果の2つの意味がある。また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。

E. 結論

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

F. 研究危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 研究発表

Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Vighetto A, Doh-Ura K Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7: 713-726

坪井義夫, 山田達夫. 【治療の最前線 脳の感染症】クロイツフェルト・ヤコブ病 *Brain Medical* 2007; 19: 267-272

坪井義夫, 山田達夫. 病気のはなし プリオン病 検査と技術 2007; 35: 426-430

表. PPS 脳室内持続投与法を施行した 11 例

No	Age at surgery	Sex	Diagnosis	Date of Surgery	PPS dose (μ g/kg/day)	Survival from the surgery (M)	mRS at Surgery	mRS at Present
1	67	F	sCJD	2004/11/16	120	17*	5	6
2	73	F	sCJD	2005/3/1	120	20*	4	6
3	68	F	sCJD (MM2)	2005/6/2	120	31	3	5
4	64	F	fCJD (V180I)	2005/6/21	120	31	3	4
5	64	F	sCJD	2005/11/14	120	26	5	5
6	55	M	iCJD	2006/3/13	120	4*	4	6
7	66	M	iCJD	2006/6/12	120	9*	4	6
8	69	F	GSS (P102L)	2006/8/2	120	14*	2	6
9	73	F	fCJD (V180I)	2006/10/15	120	15	2	4
10	68	M	sCJD	2007/3/7	120	10	2	5
11	39	F	sCJD	2007/4/3	120	9	4	4

*: dead

海外で実施されている治験に関する調査分析

主任研究者 堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

海外で実施されているプリオン病に対する治験に関して、情報を収集し分析した。代表的な2つの治験に関してプロトコルを入手し、内容を精査した。二重盲検法が主流であり、患者数は60名程度で、診断は早期治療介入を目的とした診断基準に依っていた。エンドポイントは投与開始からの生存期間であった。わが国では、「医師主導の治験」で行うか、「臨床研究」で行うか検討する必要がある。

A. 研究目的

海外で実施されているプリオン病患者に対する治験を調査した。代表的な治験について、どのようなプロトコルで実施されているのか情報収集・分析して、国内の実験的治療研究に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

平成18年11月21日にパリで開催されたプリオン病治療に関する国際会議 TheraPrion 2006、平成19年9月26日-28日にエジンバラで開催されたプリオンに関する国際会議 NeuroPrion 2007、平成19年11月5日-6日にバンクーバーで開催されたCJDに関する国際会議CJD2007での情報や、海外の研究者との個別のディスカッションで得た情報、論文等の文献、インターネット等で得られた情報を分析した。さらに、Tagliavini 博士から Doxycycline を用いた治験のプロトコル原文、Geschwind 博士から Quinacrine を用いた治験のプロトコル原文を入手し、内容を精査した。

（倫理面への配慮）

特記すべきことはない。

C. 研究結果

- ・ プリオン病患者に対して、現在4つの薬剤に関する治験が実施されている。
Quinacrine: 英国 (Collinge ら) の

Prion-1 プロジェクトはオープンラベル方式で実施され、すでに3年間のプロジェクトが終了している。米国 (Geschwind ら) のプロジェクトは二重盲検法で実施され、現在も進行中である。

PPS: 日本のプロジェクトはオープンラベル方式で実施して来たが、昨年度でエントリーを終了した。フランス (Vighetto ら) もオープンラベル方式で実施中である。

Doxycycline: イタリア (Tagliavini ら) のプロジェクトが昨年より二重盲検法で始まっている。同じ治験プロトコルを用いてドイツ (Zerr ら) 及びフランス (担当者不明) が二重盲検法で実施中。

Simvastatin: ドイツ (Otto ら) で治験が行われているとのインターネット情報があるものの詳細は不明。

- ・ 時間的、空間的に散発する比較的まれな疾患であるプリオン病に対して二重盲検法を実施することは不可能に近いと考えられていたが、28名のCJD患者に対して Otto らが Flupirtine を用いた二重盲検法で治験を実施して以来 (Otto M, Cepek L, Ratzka P et al. Neurology 62(5);714-718, 2008)、効果や安全性をより正当に評価できる二重盲検法を採用するようになっている。
- ・ 現在 EU の3地域で実施されている

Doxycycline 治験の背景を調べたところ、Tagliavini らは二重盲検法での治験を実施する前に、5年間で21例のCJD患者にパイロット試験を実施していた。これらの患者の発症後の生存期間（13.0±4 ヶ月）が、パイロット試験を実施した施設で経験した非投与の78例のCJD患者の発症後生存期間（6.0±0.7 ヶ月）より有意に延長していたことを確認の上、二重盲検法を開始した。

- 代表的な Tagliavini らの Doxycycline 治験プロトコールと Geschwind らの Quinacrine 治験プロトコールを入手し、詳細を調査した。両プロトコールは、用いる薬剤が異なるため、対象患者の基準などに若干の違いがみられたが、対象患者数（CJD患者60名）や治療評価の項目、薬効評価のエンドポイント（一次エンドポイント：投与開始からの生存期間）などはほぼ共通していた。Tagliavini らのプロトコールの概要を別添資料1にまとめた。概要中の（*）や（**）は、治験を行う施設で可能であれば実施するというものである。
- Tagliavini らも、Geschwind らも、それぞれ、疾患の診断には、早期治療介入を目的としたCJD診断基準を設けている。その概要を別添資料2に示した。

D. 考察

今回の調査から、プリオン病においてもより正当に評価が可能である二重盲検法による治験が、世界の主流となってきていることが判明した。まれな疾患であるプリオン病では、60名程度の患者数を対象に、エンドポイントには「投与開始からの生存期間」や「投与開始からの特定の機能が失われるまでの期間」などが用いられている。やはり特異的な病勢マーカーがない現状では、生命予後改善効果を測定する以外には薬効評価をする方法がない。一方、疾患の診断に関しては、早期治療介入を目的としたCJD診断基準が工夫されている。現在のWHO診断基準はサーベイランスを目的と

して作成されたものであり、早期治療介入のためには、その目的に合った診断基準が必要である。

さて、わが国で二重盲検試験を実施するうえで、「医師主導の治験」で行うか、「臨床研究」で行うか選択する必要がある。前者は後者よりもはるかにハードルが高くなるものの、透明性が高く、治療薬としての認可を目的と考えるのであれば必須である。しかし、時間的・空間的に散発性に発生する亜急性に進行する希少疾患の実験的治療に柔軟に対応できるか不明であり、検討が必要である。

E. 結論

海外で実施されている治験に関する情報と実際の治験プロトコールを入手し、内容に関して具体的な考察を行った。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表及び知的所有権の出願状況

13頁－15頁に記載。