

200834012A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

プリオン病に対する診断・治療技術開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 堂浦 克美

平成21年(2009年)3月

## 目 次

ページ

I. 総括研究報告書	
プリオン病に対する診断・治療技術開発に関する研究 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 1
II. 分担研究報告書	
末梢投与可能な次世代型治療予防薬開発に関する研究 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 9
末梢投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 12
抗プリオン作用を持つ生薬類の探索 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 14
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 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 16
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 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 19
カクテル療法を目指した抗プリオン化合物の薬物動態に関する研究 片 岡 泰 文 (福岡大学薬学部)	・ ・ ・ ・ 21
異常型プリオン蛋白検出プローブの開発に関する研究 工 藤 幸 司 (東北大学先進医工学研究機構)	・ ・ ・ ・ 24
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研究 坪 井 義 夫 (福岡大学医学部)	・ ・ ・ ・ 28
海外で実施されている治験に関する調査分析 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 31

プリオン病治療例の剖検脳におけるプリオン蛋白重合度の解析 佐々木健介（九州大学大学院医学研究院）	・ ・ ・ ・ 34
抗PrP抗体と再生医療技術を用いたプリオン病治療法の開発に関する研究 長谷部理絵（北海道大学大学院獣医学研究科）	・ ・ ・ ・ 36
新たなサロゲートマーカーの開発に関する研究 佐藤克也（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	・ ・ ・ ・ 40
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 47
IV. 研究成果の刊行物・印刷	・ ・ ・ ・ 49

總 括 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
平成20年度 総括研究報告書

プリオン病に対する診断・治療技術開発に関する研究

研究代表者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

昨年度に続き（1）現行の治療手段の改善と新たな治療手段の検討、（2）新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発、（3）新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発について研究を進めた。

（1）については、PPS脳室内持続投与法の有効性や安全性に影響する宿主要因の分析、海外で実施中の治験の調査分析、臨床薬剤を用いた2剤併用療法のパイロット試験、治療効果判定のための病理学的・蛋白生化学的な定量的解析、を進めた。新たな成果として、プリオン蛋白オリゴマーやモノマーの評価が、治療効果判定に役立つことを発見した。

（2）については、優れた治療予防薬候補である多糖化合物の安全性試験、経口投与で効くアミロイド親和性化合物 compB の構造活性相関研究、抗プリオン活性を発揮する生薬の探索、治療薬開発の新たな標的となる受容体関連蛋白についての解析、異常型プリオン蛋白産生へのヒートショック蛋白質の関与解析、治療候補化合物 GNS および siRNA の最適化研究、を進めた。また、今年度より抗体投与療法および幹細胞移植療法の開発を始めた。実用化に向けた成果としては、多糖化合物の安全上の問題点を新たに抽出できた。

（3）については、 $^{11}\text{C}$ BF-227 による PET プローブの探索的臨床研究、近赤外線蛍光プローブの探索、を進めた。また、今年度より血清・髄液を用いた診断技術の開発を開始し、候補となる血清マーカーを発見した。

研究分担者

片岡 泰文	福岡大学薬学部・教授
工藤 幸司	東北大学未来医工学治療開発センター・教授
坪井 義夫	福岡大学医学部・准教授
佐々木 健介	九州大学大学院医学研究院・助教
長谷部 理絵	北海道大学大学院獣医学研究科・助教
佐藤 克也	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教



## A. 研究目的

多数の後天性プリオン病の発生や発病リスク保因者の存在を背景に、実効性のある予防治療法が求められている。本研究では、

(1) 現行の治療手段の改善と新たな治療手段の検討、(2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発、(3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発について研究を進めた。

## B. 研究方法

### (1) 現行の治療手段の改善と新たな治療手段の検討

昨年度に引き続き坪井は、PPS療法を実施中の症例のフォローアップと解析を行い、この治療法の効果が期待できる症例についての共通要因を抽出した。また、症例の解析より合併症発生に影響する要因について臨床的に検討した。また、坪井は作用機序が異なる抗プリオン活性を持つ臨床薬剤であるドキシサイクリン（またはミノサイクリン）とシンバスタチンを用いた2剤併用療法のパイロット試験を患者に実施し、その有効性と安全性を評価した。堂浦は、海外で行われているプリオン病治療について引き続き情報収集を行い、得られた情報を分析し坪井を支援した。佐々木は引き続き治療実施症例の剖検脳において治療効果や副作用を病理学的、免疫組織化学的、蛋白生化学的方法で検討を進めた。

### (2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

堂浦は多糖化合物の皮下投与による安全性について、昨年度実施した試験で投与濃度ミスが判明した「2週間反復投与試験および2週間休薬試験」を再度実施し検討した。また、多糖化合物の薬理作用について解析を進め、抗プリオン作用を発揮する実行因子の同定に関する研究に取り組んだ。また、堂浦は経口型治療リード化合物であるアミロイド親和性化合物 compB について、構造活性相関研究に取り組むとともに、抗プリオン活性をもつ生薬類について活性分子の絞込みを行った。さらに、遺伝子ノ

ックダウンスクリーニングで新たな治療標的分子として発見した二つの宿主因子に関して、引き続きプリオン複製増殖機序における役割の解明に取り組んだ。

片岡はプリオン蛋白構造解析で発見した治療リード化合物であるGN8について、引き続き構造最適化研究に取り組んだ。また、脳内移行型 siRNA の開発研究を行い、プリオン持続感染細胞で評価を行った。

長谷部は骨髄由来間葉系幹細胞と抗プリオン蛋白抗体のプリオン病治療への応用に関する研究をプリオン感染動物において行った。

### (3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

工藤と堂浦は、引き続きプリオン病患者にアミロイド・イメージング PET (BF-PET) を実施して鑑別診断・病勢診断に有用であるかどうか検討した。また、工藤は次世代型の画像診断技術として近赤外線分光法に適用できる近赤外線蛍光プローブの最適化研究を引き続き行った。

坪井は、臨床で用いられている各種の画像検査法・機能検査法・生理学的検査法や各種の神経機能・運動機能・高次機能・ADL機能・意識・痴呆等に関する評価法(スケールリングやレイティング)や髄液検査等の組み合わせを患者で引き続き検討して、もっとも適切に治療評価できるものを探索した。

佐藤は血清・髄液を用いた早期診断マーカーや病態マーカーの探索と評価を行った。

### (倫理面への配慮)

患者に対する臨床試験は、患者が入院中の各施設における倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ治療研究が実施された。動物実験は、研究者所属施設の動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

## C. 研究結果

### (1) 現行の治療手段の改善と新たな治療



## 手段の検討

- PPS療法を実施した11症例で病型別に有効性と安全性に影響する宿主の要因について分析し、有効性は発症年齢と臨床経過に関係していること、安全性は脳萎縮の程度とその進行度合いに関係していることが示唆された。生存中の4症例は有意に延命されている。
- 病理学的な治療効果や安全性の評価では、非治療例では病変の進行とともに病態に関与するPrPsc oligomerが増加しPrPc monomerが著明に減少するのに対して、PPS療法を受けた剖検例（3例）でPrPsc oligomer形成が抑制されていることが新たに判明した。
- PPS療法に代わる多剤併用療法の模索では、作用機序の異なるシンバスタチン・ドキシサイクリンの2剤併用療法を新たに4症例で実施したが、安全性には問題がないものの明らかな有効性は確認できなかった。
- 海外ではドキシサイクリンの二重盲検試験が盛んに実施され、生命予後改善の可能性が示唆されている。

## (2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

- 昨年度に引き続き多糖化合物の実用化への準備として、「2週間反復投与および2週間休薬試験」を再度実施した。昨年度の動態試験結果から残留性があることは判明していたが、2週間反復投与で毒性変化が出現することが新たに判明した。一方、多糖化合物の作用機序解明に取り組み、解析のための *in vitro* 実験系と *in vivo* 実験系を作り上げ作用因子の絞込みを行った。
- 2つのプリオン株に対して最も高い抗プリオン活性を示した生薬エキスの活性成分の精製を行い、2種類の活性成分を得た。
- リード化合物である compB の最適化研究では、リード化合物以上に優れた活性を示すものは見つからなかったが、compB の oxazole 構造が抗プリオン活性

に重要な役割を果たすことが示唆された。

- 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として、GABAA 受容体サブユニット  $\beta 1$  “Gabbr1” を発見した。Gabbr1 の GABAA 受容体と関係しない別の機能がプリオンの産生に関与していることが示唆された。
- Hsp90 だけでなく、Grp94 や Grp78 もインビトロにおいて rPrP 構造変換活性を示すことを明らかにした。これらのヒートショック蛋白は、小胞体における正常型プリオン蛋白の機能や代謝を調節することが示唆された。
- リード化合物である GN8 の最適化研究では、多数の誘導体を合成して取り組み、リード化合物以上に優れた活性を示し、脳移行性の良い 5 つの誘導体を発見した。
- プリオン蛋白の発現を抑制する siRNA を、脳指向性ドラッグデリバリー素材である RVG-9R と複合体を形成させると、プリオン蛋白発現抑制効果が失われることが判明した。
- プリオン感染動物において、抗 PrP 抗体あるいは間葉系幹細胞は脳内投与だけでなく末梢静脈投与においても治療効果を発揮することを発見した。

## (3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

- GSS症例でBF-PETの有効性を確認した。また、次世代診断薬である近赤外線蛍光プローブの開発も順調であり、最適化合物THK-265を発見した。
- サロゲイトマーカーの開発では、既存の髄液マーカーではプリオン病と鑑別しにくい脳炎や脳症などの疾患群との区別も可能である血清マーカーとしてS-100b蛋白、MMP-9、TIMP-1を発見した。

## D. 考察

- (1) 現行の治療手段の改善と新たな治療手段の検討

- ・ PPS療法を受けて生存中である4症例について、引き続きフォローアップを行わない、これまでの分析結果を確認してきた。当初の計画では、臨床的にPPS療法の改良点を模索することも予定していたが、症例数が少なく、有効性を見るのに患者の経過を長期間フォローアップする必要があることなどから、実際的に改良点を模索することは時間的に困難である。
- ・ 病理学的な解析より、治療的介入が病変の進行と関係するプリオン蛋白オリゴマーの増加を阻止していることが示唆された。さらに症例数を重ねてこの新たな知見を確認する必要がある。
- ・ PPS療法に代わる多剤併用療法の模索では、臨床薬2剤の併用療法で安全性は確認できたが、有効性は確認できていない。したがって、当初予定の多剤併用療法の多施設での二重盲検試験実施については、その環境を整備する前に、パイロット試験でさらに症例数を重ねることが必要である。
- ・ 海外では有効性が観察されたパイロット試験の結果を受けドキシサイクリンの二重盲検試験が実施されているが、その有効性については我国の症例では確認できていない。ドキシサイクリンの動物実験での効果も極めて限定的であり、生命予後改善効果がプリオン病の病態修飾ではなく合併症（細菌感染症）の予防によっている可能性は排除できない。
- ・ 高い抗プリオン活性を有する生薬成分の部分精製に成功した。今後、精製を進め活性成分の特定や *in vivo* での有効性を検証する必要がある。
- ・ Gabrb1 の GABAA 受容体と関係しない別の機能がプリオンの産生に関与していることが示唆された。どのような機能であるかを明らかにし、創薬の対象となり得るかを検討する必要がある。
- ・ 今年度までの研究で、ヒートショック蛋白が正常型プリオン蛋白の代謝および異常型プリオン蛋白への構造変換に関与することが示唆された。実用化探索研究として、様々な蛋白質の機能に影響を与えず、プリオン産生だけを抑制する方策がないかどうかを検討する必要がある。
- ・ 抗プリオン活性を有する新規 GN8 誘導体化合物について、更なる構造最適化を行うと共に、*in vivo* で治療効果を検証する必要がある。
- ・ 脳移行型としてデザインした RVG-9R 結合型 siRNA を改良し、異常型プリオン蛋白産生阻害効果を発揮する条件や脳移行性を検討する必要がある。
- ・ リード化合物である CompB や GN8 の最適化研究では、一部にリード化合物以上の優れた活性を示すものが見つかったものの、実用化には遠い道のりである。引き続き研究を継続するが、*in vivo* で成果が見られた抗 PrP 抗体、間葉系幹細胞を用いた新規治療開発も継続し、将来に明るい展望をもたらす成果を目指したい。

## (2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

- ・ 今年度明らかとなった2週間連日投与による毒性変化の出現は、優れた治療予防薬候補である多糖化合物の実用化への障壁となる可能性があり、そのメカニズムの解明と毒性変化の改善が新たな課題として加わった。作用機序と毒性変化がどのように結びついているのかという点も、明らかにしなければならぬ。

## (3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

- ・ BF-PETの探索的臨床研究ではGSS症例でBF-PETの有効性を確認したものの、他の病型での有効性は不明である。特に、緩徐進行性の病型において継続的な解析を行い、病勢診断にも有用であるかどうかを明らかにする必要がある。
- ・ 近赤外線蛍光プローブとして得られた基本化学構造は、今後さらに化合物を



最適化し、3-5年後には探索的臨床研究の実施を目指す。

- ・新たに発見した血清マーカーは、早期診断や病勢診断のマーカーとして期待できる可能性があり、既存の髄液マーカーとの組み合わせで診断特異性や感度が向上する可能性がある。感度、特異性、経時的変動について、様々な症例を検討するとともに、症例数を重ねて検証する必要がある。

## E. 結論

### (1) 現行の治療手段の改善と新たな治療手段の検討

- ・ PPS 実施生存例のフォローアップを継続し、PPS 療法の有用性と安全性を改めて確認した。
- ・ 病理学的に PPS 療法の有用性を示唆する所見が得られた。
- ・ 海外ではドキシサイクリンを用いた治療が盛んに行われている。我国で実施しているドキシサイクリンとシンバスタチンの併用によるパイロット試験では、これまでに安全性は確認されているが、効果は明らかではない。

### (2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

- ・ 治療予防効果に優れた多糖化合物について、2週間連日投与で毒性変化が出現することを明らかにした。
- ・ 抗プリオン活性を持つ生薬エキス成分の部分精製に成功した。
- ・ 治療薬リード化合物である compB と GN8 については、構造の最適化研究を継続した。
- ・ 新たな標的分子候補として Gabrb1 や ヒートショック蛋白を発見した。
- ・ 探索的研究として siRNA、抗体、幹細胞を利用した治療開発に取り組んだ。

### (3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

- ・ アミロイド・イメージング (BF-PET) は、GSS 症例で有効であることを確認した。
- ・ 新たな診断薬として近赤外線蛍光プロ

ープの最適化研究を継続した。

- ・ 疾患診断マーカー候補として3種の血清マーカーを発見した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, Doh-ura K: Amyloidophilic compounds for prion diseases. Infect Disord Drug Targets. 9(1):15-22, 2009
- Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML: Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine. Bioorg Med Chem. 16(14):6737-46, 2008
- Song C-H, Furuoka H, Kim C-L, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M: Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. J Gen Virol 89:1533-1544, 2008.
- Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M: The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP<sup>Sc</sup> is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. J Virol, in press.
- Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K. et al. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochem Biophys Res Commun. 377:957-961, 2008
- 照屋健太、堂浦克美：「プリオン」山口恵三、戸塚恭一編、KEY WORD感染症 第二版、先端医学社、2008、258-259
- 工藤幸司、古本祥三、岡村信行：アミロイド画像化用プローブ。日本臨床。2008。66。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. 66. 288-292.
- 岡村信行、古本祥三、工藤幸司：アミロイドイメージング。分子精神医学。2008. 2. 188-190.
- 坪井義夫。症状の進行はあるが家族性CJD2例は2年以上生存。Medical Tribune 2008, 41 (25):14
- 田中美紀、坪井義夫、井上貴仁、山田達夫。プリオン病、SSPE. Modern Physician 2008, 28 (5) : 729-734
- 長谷部理絵：プリオン病のABC。Small Animal Clinic, 2008: 152; 4-9.
2. 学会発表
- Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K: Heat shock protein 90 (Hsp90) stimulates polymerization of a copper-loaded prion protein. Prion2008, Madrid, October 8-10, 2008
- Teruya K, Wakao T, Nishimura T, Kimura Y, Sakasegawa Y, Suda Y, Doh-ura K: Binding of mouse prion protein to heparin. Meeting of 17th Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), Sapporo, August 26-29, 2008
- Furumoto S, Okamura N, Kato M, Ishikawa Y, Mruyama M, Iwata R, Yanai K, Higuchi M, Sahara T, Kudo Y: A Fluorine-18 Labeled 2-(Thiazolo-5-yl)benzoxazole Derivative for In Vivo Imaging of Amyloid Deposits. 2008 World Molecular Imaging Congress. Nies. 2008. 9. 10-13
- Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Mori M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. Alzheimer's Imaging Consortium In "International Conference on Alzheimer's disease". Chicago. 2008. 7. 26
- Mori M, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Yanai K, Arai H: Noninvasive detection of Amyloid deposits by near infrared fluorescence probe THK-265. International Conference on Alzheimer's disease. Chicago. 2008. 7. 26-31
- Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Mori M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. International Conference on Alzheimer's Disease. Chicago. 2008. 7. 26-31
- Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Furukawa K, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: In vivo imaging of brain amyloid deposits using BF-227 and its derivative. 55th SNM Annual Meeting. New Orleans. 2008. 6. 14-18
- Song C-H, Honmou O, Furuoka, H, Hasebe R, Horiuchi M: Migration of mesenchymal stem cells to brain lesions of prion disease. Prion2008, Madrid, October 6-8, 2008.
- Shindo R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M: Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. Prion2008, Madrid, October 6-8, 2008.
- Satoh K: Establishment of standardization of 14-3-3 protein assay as a diagnostic tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF. NeuroPrion2008, Madrid, 2008 Oct 8-10
- Matsui Y, Satoh K: The useful application of rapid diagnostic screening system of heart-type fatty acid binding protein in CSF of CJD patients as a quick bed-side diagnostic tool. NeuroPrion2008, Madrid, 2008 Oct 8-10
- 堂浦克美：ヤコブ病克服プロジェクトの成果と課題—治療・発症機序研究。食と医療の安全に関する市民講座「プリオンから見た食と医療の安全：プリオンはもう怖くないの？ ウシ海綿状脳症(BSE)とヤコブ病(CJD)」、札幌、2008年9月14



日

木村朋寛、西村有起、堂浦克美：プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白産生に関与する内因性因子。2008年プリオン研究会、新得（北海道）、2008年8月29日、30日  
逆瀬川裕二、堂浦克美：持続性プリオン感染細胞における PrPres の産生を抑制する新規ヒートショック蛋白質 90 阻害剤。2008年プリオン研究会、新得（北海道）、2008年8月29日、30日

濱中大一、川越敬一、陳忠正、照屋健太、堂浦克美：抗プリオン活性を有するアミロイド親和性化合物の構造的特徴。2008年プリオン研究会、新得（北海道）、2008年8月29日、30日

戸邊美智子、宮庄拓、野村幸子、伊藤暁史、松田一哉、川崎ゆり、堂浦克美、毛利資郎、横田博：スクレイピーマウス血清中における疾患特異的蛋白質の検出。2008年プリオン研究会、新得（北海道）、2008年8月29日、30日

樋口正晃、坪井義夫、高野浩一、藤見恒平、佐々木健介、山田達夫、クロイツフェルトヤコブ病患者の MRI と病理所見の比較。第 49 回日本神経学会総会（2008, 5. 15-17 横浜）

徳田隆彦、笠井高士、石神紀子、中川正法、坪井義夫。CJD 患者髄液中では  $\alpha$ -synuclein の断片ペプチドが増加している。第 49 回日本神経学会総会（2008, 5. 15-17 横浜）

坪井義夫、山田達夫、堂浦克美。プリオン病ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法。第 49 回日本神経病理学会総会シンポジウム II（2008, 5. 20-22 タワーホール船堀）

坪井義夫、田中美紀、岡村信行、志賀裕正、堂浦克美、本田裕之、佐々木健介、山田達夫：BF-227 を用いたプリオンアミロイド イメージング - Gerstmann-Straussler-Scheinker 病における画像と病理の対比。2008年プリオン研究会、新得（北海道）、2008年8月29日、30日

佐々木健介、皆木晴彦、岩城徹：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。第 49 回日本神経病理学会 東京 2008年5月

本田裕之、皆木晴彦、柴野智子、佐々木健介、岩城徹：プリオン病の病理形態学のおよび蛋白生化学的定量解析の試み。第 49 回日本神経病理学会 東京 2008年5月

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。第 49 回日本神経病理学会 東京 2008年5月  
堀内基広、瓜生匡秀、山崎剛士、中満智史、長谷部理絵：マウス神経芽腫細胞 Neuro2a におけるプリオンの細胞間伝播にはエクソソーム以外の因子が関与する。第 146 回日本獣医学会、宮崎、2008年9月

宋昌鉉、長谷部理絵、堀内基広：プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月

佐藤克也、調 漸、江口勝美：プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討。日本神経学会総会、横浜 2008. 05. 15-17

六倉和生、佐藤克也、辻野 彰、本村政勝、調 漸、江口勝美：クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者における簡易診断キットの有効性。日本神経学会総会、横浜 2008. 05. 15-17

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

堂浦克美：コンフォメーション病医薬組成物。PCT/JP2007/058566 国内移行 カナダ（2008年10月14日）、米国（2008年10月20日）、豪州（2008年11月4日）、欧州（2008年11月14日）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



分 担 研 究 報 告

末梢投与可能な次世代型治療予防薬開発に関する研究

研究代表者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授  
研究協力者：小熊 歩、西澤 桂子、赤間 寛人、鈴木 美砂子、高橋 智子、  
木村 朋寛、照屋 健太、逆瀬川 裕二 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

末梢投与において優れた治療予防効果を発揮する多糖化合物について、昨年度に引き続き安全性試験を実施した。昨年度報告した安全性試験のうち「2週間反復投与毒性試験及び2週間回復性試験」は投与薬液濃度に大きなミスがあり、再度この試験を実施した。200 mg/kg/day の2週間皮下投与において、血液検査及び病理組織学的検査で毒性変化が認められたことから、無毒性量は200 mg/kg/day 未満と考えられた。また、2週間の休薬によって、投与部皮下の変化には回復傾向がみられたが、その他の変化の回復性は明らかではなかった。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、末梢投与で優れた効果を発揮した多糖化合物について前臨床試験として安全性について検討した。

B. 研究方法

2週間反復投与毒性試験及び2週間回復性試験

カニクイザル（雄、6匹）を陰性対照群（溶解液のみ）、低用量群（200 mg/kg/day）、高用量群（400 mg/kg/day）の3群に分け、40mg/ml あるいは80mg/ml 濃度の化合物溶解液を背部皮下に1回/日で2週間連日投与を行い、その後2週間休薬した。一般状態観察（投与開始前7日から休薬2週目まで、1回/日の頻度で連日）、体重測定（投与開始前7日から休薬2週目まで、1回/週の頻度で）、血液学的検査および血液生化学的検査（投与開始前、投与2週目、休薬2週目）を実施した。さらに、休薬2週間後に剖検を行い、肉眼的観察、器官重量測定、病理組織学的検査を実施した。

（倫理面への配慮）

動物の取扱いについて、施設の動物倫理委員会の承認を受けたのち、動物の愛護及び管理に関する法律を遵守し実施した。

C. 研究結果

2週間反復投与毒性試験及び2週間回復性試験

2週間の皮下投与により、局所性の変化として、200及び400 mg/kg 群の全例で投与部位の隆起がみられ、投与10日までは、いずれも翌日の投与前には消失したが、400 mg/kg 群では投与11又は13日以降には、翌日の投与前にも隆起が認められた。200及び400 mg/kg 群において、赤血球数、ヘモグロビン濃度又はヘマトクリット値の低値、400 mg/kg 群で血小板数及び白血球数の低値、並びにPT及びAPTTの延長傾向がみられた。200及び400 mg/kg 群において、総コレステロール、中性脂肪又はリン脂質の低値が認められた。剖検において、投与部皮下が暗赤色を呈し、200 mg/kg 群では巣状、400 mg/kg 群では瀰漫性にみられ、400 mg/kg 群では皮下組織の肥厚を伴っていた。病理組織学的検査において、200及び400 mg/kg 群の各種臓器に泡沫状のマクロファージがみられ、膀胱及び脈絡叢の上皮に空胞化が認められた。両群では、投与部皮下に炎症細胞浸潤、出血等が認められた。一般状態における全身性の変化並びに体重及び臓器重量に異常は認められなかった。



2週間の休薬において、400 mg/kg 群で投与部位の隆起の継続及び発赤がみられた。200 及び400 mg/kg 群で投与期間に引き続き赤血球数、ヘモグロビン濃度又はヘマトクリット値の低値が、400 mg/kg 群で白血球数の低値並びにPT 及びAPTT の延長傾向がみられた。200 及び400 mg/kg 群で総コレステロール又はリン脂質の低値が認められた。剖検では、200 及び400mg/kg 群の投与部皮下に斑状の暗赤色部がみられ、皮下組織の肥厚を伴っていた。病理組織学的検査では、200 及び400 mg/kg 群において、泡沫状のマクロファージが投与期間終了時にみられた各種臓器にほぼ同様にみられ、上皮の空胞化が脈絡叢で認められた。投与部皮下では線維化が認められた。

#### D. 考察

多糖化合物の2週間皮下投与において、200 mg/kg/day において血液検査及び病理組織学的検査において毒性変化が認められたことから、無毒性量は200 mg/kg/day 未満と考えられた。また、2週間の休薬によって、投与部皮下の変化には回復傾向がみられたが、その他の変化の回復性は明らかではなかった。

昨年度の催不整脈評価検討試験、単回投与毒性試験においては、2000 mg/kg の高用量においても異常は観察されなかったが、今回は反復投与により毒性が観察された。これは、昨年度の動態試験で皮下投与後2週間目の体内には17.6%の化合物が残留しており、本化合物の残留性が高いことと関係している。今後、治療予防効果はあるものの毒性は出ないという「低濃度での投与方法」について検討するとともに、今回観察された血液検査及び病理組織学的検査における毒性変化が回復性のものであるかどうかを検討する必要がある。

#### E. 結論

治療予防薬候補である多糖化合物の安全性試験を実施し、残留性があるため2週間反復投与では毒性変化が出現することが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, Doh-ura K: Amyloidophilic compounds for prion diseases. *Infect Disord Drug Targets*. 9(1):15-22, 2009

Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML: Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine. *Bioorg Med Chem*. 16(14):6737-46, 2008

照屋健太、堂浦克美：「プリオン」山口恵三、戸塚恭一編、KEY WORD感染症 第二版、先端医学社、2008、258-259

##### 2. 学会発表

Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K: Heat shock protein 90 (Hsp90) stimulates polymerization of a copper-loaded prion protein. *Prion2008*, Madrid, October 8-10, 2008

Teruya K, Wakao T, Nishimura T, Kimura Y, Sakasegawa Y, Suda Y, Doh-ura K: Binding of mouse prion protein to heparin. Meeting of 17th Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), Sapporo, August 26-29, 2008

堂浦克美：ヤコブ病克服プロジェクトの成果と課題—治療・発症機序研究。食と医療の安全に関する市民講座「プリオンから見た食と医療の安全：プリオンはもう怖くないの？ ウシ海綿状脳症(BSE)とヤコブ病(CJD)」、札幌、2008年9月14日

木村朋寛、西村有起、堂浦克美：プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白産生に関与する内因性因子。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日  
逆瀬川裕二、堂浦克美：持続性プリオン感染細胞におけるPrPresの産生を抑制する新規ヒートショック蛋白質90阻害剤。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、



2008年8月29日、30日

濱中大一、川越敬一、陳忠正、照屋健太、  
堂浦克美：抗プリオン活性を有するアミ  
ロイド親和性化合物の構造的特徴。2008  
年プリオン研究会、新得（北海道）、2008  
年8月29日、30日

坪井義夫、田中美紀、岡村信行、志賀裕正、  
堂浦克美、本田裕之、佐々木健介、山田  
達夫：BF-227を用いたプリオンアミロイ  
ドイメーキングー  
Gerstmann-Straussler-Scheinker病にお  
ける画像と病理の対比。2008年プリオ  
ン研究会、新得（北海道）、2008年8月  
29日、30日

戸邊美智子、宮庄拓、野村幸子、伊藤暁史、  
松田一哉、川崎ゆり、堂浦克美、毛利資  
郎、横田博：スクレイピーマウス血清中  
における疾患特異的蛋白質の検出。2008  
年プリオン研究会、新得（北海道）、2008  
年8月29日、30日

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

堂浦克美：コンフォメーション病医薬組成  
物。PCT/JP2007/058566 国内移行 カナ  
ダ（2008年10月14日）、米国（2008年  
10月20日）、豪州（2008年11月4日）、  
欧州（2008年11月14日）

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

末梢投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究

研究代表者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究協力者：濱中 大一、照屋 健太、逆瀬川 裕二

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、構造活性相関研究を行った。compB の oxazole 構造が抗プリオン活性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに、アミロイド親和性化合物 compB の経口投与が、プリオン脳内感染マウスの生存期間を有意に延長させることを報告している。今回、compB の抗プリオン活性の構造的・物理的要因を明らかにするため、compB と類似の基本骨格構造を有するアミロイド親和性低分子化合物 3 種類（分子量 277~340）および compB とは異なる母核構造を有する低分子化合物 5 種類（分子量 294~546）について、プリオン持続感染細胞における PrPres 産生抑制能の比較を行い、それぞれの化合物の構造的特徴について考察を行った。

B. 研究方法

D7, D8 は compB と比較して水溶性等の物理的・化学的性質を改善した誘導体、D9 はアミロイドへの結合様式が異なる compB の誘導体、D10, D11, D12, D13, D14 は compB とは異なる基本骨格構造を有している。これらの各化合物をプリオン持続感染細胞に 72 時間接触させた後、ウェスタンブロット法を用いて細胞内の PrPres 発現状態を解析した。

（倫理面への配慮）

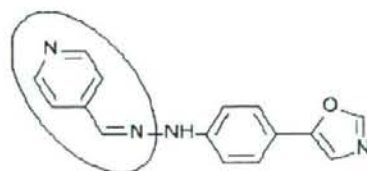
本研究に倫理面に配慮すべき実験は含まれていない。

C. 研究結果

ScN2a 細胞を使用したウェスタンブロット法による評価系では、いずれの化合物も 1  $\mu$ M 以下の添加濃度で細胞障害活性を示すことなく PrPres の発現が検出限界以下となった。中でも compB の誘導体である D7, D8, D9 は強い活性を有しており、それぞれ 100 nM, 10 nM, 1 nM の添加濃度で PrPres は検出限界以下となった。

D. 考察

compB と compB の物理化学的性質を改善した D7（分子量 340）、D8（分子量 341）、およびアミロイドへの結合様式が compB とは異なる D9（分子量 277）は、ベンゼン環に芳香族複素 5 員環が結合している構造を有している点が共通している。特に、5-phenyloxazole が抗プリオン活性に中心的な役割を担っていることが推測される。さらに、compB のニトロ基側の芳香環（図の囲み部分）を修飾した D8 および D9 の活性は、compB の 5 員環側を修飾した D7 の活性と比較し、明らかに減弱していた。以上のことから、compB の oxazole 構造が抗プリオン活性に重要な役割を果たしていることが考えられた。



CompB

#### 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 において、oxazole 構造が抗プリオン活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表及び知的所有権の出願状況

10頁-11頁に記載。



## 抗プリオン作用を持つ生薬類の探索

研究代表者：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

これまでに 101 種類の生薬エキス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のスクリーニングを行い、13 の生薬エキスに抗プリオン活性を見出している。今回、2 つのプリオン株に対して抗プリオン活性を示した 6 種の生薬エキスの中から、最も高い抗プリオン活性を示した生薬エキスより活性成分の精製を試み、2 種類の成分を部分精製した。

#### A. 研究目的

これまでの米国 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げ出す試みは既になされている。日本を始めアジアで医薬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、昨年度報告した抗プリオン活性を示す生薬エキスの中から抗プリオン活性成分の単離を行った。

#### B. 材料と方法

プリオン持続感染細胞には、スクレイパー由来のプリオン株 RML と 22L にそれぞれ感染するマウス神経芽腫細胞株 N2a 細胞（Sc84 細胞および N167 細胞）を用いた。生薬#15 の 50%エタノールエキス 150mg より、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにて活性成分の分画を行った。各分画は 100~500,000 倍に希釈して細胞培養液中に加え、2 日間培養を行った。細胞を回収し、細胞溶解液をプロテイナーゼ K で消化した後に、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ェ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）

本研究では倫理面に配慮する実験は含まれていない。

#### C. 研究結果

生薬#15 の 50%エタノールエキスから 3 種のクロマトグラフィーによって、分子量 1,000 以下で、疎水性度の異なる 2 種類の活性成分 L および B（各 400  $\mu$ g、50  $\mu$ g）を部分精製した。L および B は Sc84 細胞にのみ抗プリオン活性を示した（L: ED50 = 2  $\mu$ g/ml, B: ED50 = 0.2  $\mu$ g/ml）。N167 細胞に抗プリオン活性を示す成分は、クロマトグラフィーの過程で分散・消失した。

#### D. 考察

前年度の結果より、多く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。今回、2 つのプリオン株に抗プリオン活性を示す生薬エキスの中から比活性の最も高い生薬#15 から少なくとも 2 種類以上の低分子活性成分があることが判明した。

#### E. 結論

抗プリオン活性を示す生薬エキスから抗プリオン活性を示す 2 種類以上の低分子化合物を部分精製することに成功した。

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  
10頁-11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

研究代表者：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

治療薬開発の標的候補となるプリオン増殖複製関連因子の探索において、プリオン持続感染細胞において RNA 干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングを行い、GABAA 受容体サブユニット  $\beta 1$  “Gabrb1” を発見した。RNA 干渉実験の特異性を確認するとともに、 $\beta 1$  以外の他のサブユニットの関与に関する検討や各種 GABAA 受容体作用化合物の影響を検討した。その結果、Gabrb1 の GABAA 受容体と関係しない別の機能がプリオンの産生に関与していることが示唆された。

### 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(プリオン)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。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与する宿主因子の探索を行い、3 候補を同定した。その中の一つについて、結果の特異性を確認するとともに、その関連因子の関与等に関して調査した。

### B. 材料と方法

#### shRNA 発現ベクターの作製

細胞膜に発現する分子を主な標的とし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。デザインした DNA をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。

#### 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、RML プリオン株に持続感染した培養細胞 (ScN2a)、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞を継代した翌日にプラスミドベクターもしくは化学合成型 siRNA を細胞に導入した。培地交換を行い、3 日間培養した。

#### 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ズ K 処理後に精製し、ウエスタン

ブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクター型 siRNA の場合は空ベクターを導入した細胞 (mock)、化学合成型 siRNA の場合は導入試薬のみを添加した細胞 (mock) を対照とした。

#### 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 (ScN2a および N2a) の溶解液に含まれる総プリオン蛋白量 (N2a の場合は正常型プリオン蛋白) をウエスタンブロット法により検討し、mock と比較した。

#### 標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

遺伝子を導入した細胞の全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準に  $\beta$ -actin もしくは GAPDH を用いて相対的な定量を行った。

#### Gabrb1 蛋白の検出

N2a 細胞の膜画分を調製し、免疫沈降によって精製・濃縮を行った。免疫沈降に用いた抗体は、プロテイン G ビーズに結合させて BS3 で架橋させた。免疫沈降のポジティブコントロールには小麦胚芽抽出物による無細胞発現系で発現させた Gabrb1 を用いた。

(倫理面への配慮)