

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

プリオン持続感染細胞 (ScN2a) において遺伝子ノックダウンスクリーニングにより異常型プリオン蛋白の産生を阻害する因子として Gabrb1 を同定した。

Gabrb1 の遺伝子ノックダウンでは、N2a において正常型プリオン蛋白の発現亢進が mRNA レベルおよび蛋白質レベルで見られるにもかかわらず、ScN2a において異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。レスキュー実験として siRNA が標的とする配列に変異を加えた変異 Gabrb1 発現ベクターと siRNA を同時に導入したところ、変異 Gabrb1 導入細胞では異常型プリオン蛋白産生抑制効果が中和された。この結果は siRNA による効果がオフターゲットによるものでなく Gabrb1 遺伝子発現抑制によることを支持した。さらにこの分子に対する特異的阻害剤 SCS でも検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。

しかし、GABAA 受容体の $\beta 1$ 以外のサブユニットである $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ 、 δ のノックダウンでは異常型プリオン蛋白の産生抑制は見られなかった。また、GABAA 受容体のアゴニストやチャンネルブロッカーの添加によっても異常型プリオン蛋白産生に目立った変化は見られなかった。

Gabrb1 蛋白の検出は、小麦胚芽抽出物による無細胞発現系での発現産物をポジティブコントロールとした実験では、免疫沈降とウエスタンブロッティングで検出が可能であったが、細胞抽出液からは免疫沈降、ウエスタンブロッティング共に検出がうまくいかなかった。

D. 考察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や受容体に関連する分子、

脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。今回の遺伝子ノックダウン研究で異常型プリオン蛋白の産生阻害を示した Gabrb1 は、抑制性神経伝達物質である GABA の受容体である GABAA 受容体の構成蛋白である。GABA 受容体は GABAA、GABAB、GABAC に分類され、A と C は 4 回膜貫通型のサブユニットで構成されるイオンチャンネル型受容体であり、B は G 蛋白共役型の 7 回膜貫通型蛋白で構成される代謝型受容体である。GABAA 受容体は 5 量体からなり、構成するサブユニットは $\alpha 1 \sim 6$ 、 $\beta 1 \sim 3$ 、 $\gamma 1 \sim 3$ 、 δ 、 ϵ 、 θ 、 π などに分類されており、16 種類が見つかっている。

この $\beta 1$ サブユニットのノックダウンにより、異常型プリオン蛋白産生を減少させるにもかかわらず正常型プリオン蛋白の発現が亢進するという興味深い結果が得られた。ノックダウン実験の結果が、siRNA のオフターゲットによるアーチファクトでないことは今回のレスキュー実験や特異的阻害剤 SCS の結果から支持されたが、 $\beta 1$ サブユニットがプリオン蛋白とどのように関係しているかを解明することについては、今後の課題である。

$\beta 1$ サブユニット以外の GABAA 受容体サブユニットのノックダウンで異常型プリオン蛋白産生抑制が見られないことや、GABAA 受容体チャンネルブロッカーやアゴニストでも効果が見られないことから、GABAA 受容体そのものが異常型プリオン蛋白産生に関与しているというよりは、 $\beta 1$ サブユニットが単独で関与している可能性が考えられる。

プリオン病患者では臨床早期より周期性同期性放電といった脳波異常やミオクローヌスといった痙攣症状が出現することより、GABA 系ニューロンの機能が臨床早期から障害されることが指摘されている。また、アンカーレスプリオン蛋白発現動物を用いた研究 (Trifilo MJ, et al. Journal of Virology, 20:9890-9899, 2008) では、

RML プリオン株に感染させると GABAA 受容体サブユニット群の発現亢進が認められ、プリオン病と GABAA 受容体との関連が示唆されている。これらのことは、GABAA 受容体と異常型プリオン蛋白との間に何らかの関係があることを想像させる。今回の発見は、異常型プリオン蛋白とプリオン病の病態を結び付ける新たな手がかりとなる可能性があり、Gabrb1 蛋白がプリオン蛋白に直接作用する可能性をはじめ、どのように相互作用するかについて今後検討を進めたい。

E. 結論

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 $\beta 1$ “Gabrb1” を発見した。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。

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。

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

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 東北大学大学院医学系研究科

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正常型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、他の代表的なヒートショック蛋白質、Grp94、Grp78、Hsp70 のプリオン蛋白構造変換活性を測定し、Hsp90 と比較した。その結果、1) Hsp90 だけでなく、小胞体に局在する Hsp90 のホモログ Grp94、同じく小胞体に局在する Hsp70 のホモログ Grp78 も同等のプリオン蛋白構造変換活性を示すこと、2) 100 μ M 銅イオン存在下では、Hsp90 と Grp94 がヌクレオチド依存的に活性を示すのに対し、Grp78 は活性を示さないこと、3) Hsp70 は銅イオンの存在に関わらず活性を示さないことが明らかとなった。これらの結果は、Hsp90 およびそのホモログ Grp94 は銅イオン存在下においてもプリオン蛋白の構造変化に関与できる可能性を示している。

A. 研究目的

Hsp90 が示す正常型プリオン蛋白 (PrPC) に対する構造変換活性を、他の代表的なヒートショック蛋白と比較検討した。

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) と構造変換活性因子を含む 20ml の反応液 [50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、2 mM MgCl₂、2 mM ATP] 中にて 16°C、15 分間保温した。1 μ g/ml になるようにトリプシンを添加し、さらに 20 分間消化反応を行った。消化産物は、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、3F4 抗体によって検出した。

ヒートショック蛋白の精製

マウス Hsp90 α 、Grp94、Grp78、Hsp70 をコードする遺伝子をマウス cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅し、N 末端側にヒスチジンタグを付加するように遺伝子を改変した後、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°C、一晚培養することによって各リコンビナント蛋白を発現誘導

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。

(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

リコンビナントヒートショック蛋白 (rHsp) は、大腸菌発現システム pET を利用して、大腸菌中に可溶性分画に過剰発現した。N 末端側に付加されたヒスチジンタグによって、金属アフィニティークロマトグラフィーと陰イオンクロマトグラフィーによって、ほぼ均一に精製された。Grp94 と Grp78 は、シグナルペプチドを除いた成熟蛋白として合成した。インビトロ PrPC 高次構造変換試験によって、各 rHsp の活性を測定したところ、Grp94、Grp78 は濃度依存的に活性を示し、rPrP と等モル以上において最大活性を示した。一方、ウシ血清アルブミンや Hsp70 は活性を全く示さなかった。PrPC は銅イオン存在下において N 末端のヒスチジン残基を含むオクタペプチドの繰り返しとそれに引き続くヒスチジン残基によって最大 6 個の銅イ

オンと結合することができ、高次構造も変化することが報告されている。そこで、銅イオン存在下での各 rHsp の活性を測定した。その結果、ATP などのヌクレオチドが存在しない場合は、いずれの rHsp も活性を示さなかったが、ATP 存在下では Hsp90 α と Grp94 は活性を示すことが明らかとなった。

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を報告してきた。本年度の研究では、1) Hsp90 だけでなく、Hsp90 のホモログ Grp94 や Hsp70 のホモログ Grp78 が rPrP の高次構造を変換させること、2) Hsp90 と Grp94 は ATP 存在下において銅結合 rPrP の高次構造を変換できるのに対して Grp78 は活性を示さないことを示した。Hsp90 と Grp94 は局在は異なるが、高いアミノ酸配列のホモロジーを示すファミリー蛋白である。特に、PrPC は小胞体内腔を經由して細胞膜上に提示されるため、Grp94 は PrPC の高次構造変換に関与する可能性が高い。事実、小胞体ストレスを受けた細胞内では、Grp94 と PrPC の複合体を検出していることが報告されている。

一方、Grp78 は小胞体に局在する Hsp70 のホモログであるが、前者は活性を示すのに対し、後者は活性を示さない。現在のところ、この差異がどこに由来するのかは不明

であるが、両者の C 末端側ペプチド結合ドメインのホモロジーは低いことから説明できるかもしれない。変異 PrPC と Grp78 が結合することが報告されているが、PrPC との相互作用については不明である。

銅イオンと結合した PrP に対する構造変換活性は Hsp90 と Grp94 だけが示し、その活性には ATP や GTP などのヌクレオチドが必須であった。小胞体はサイトソルから細胞外へ銅イオンを排出する際の経路となっており、小胞体を通過する PrPC も大きく影響を受けると考えられる。銅イオン存在下でも機能を発揮できる Grp94 は小胞体における PrPC の機能や代謝を調節する構造変換因子である可能性がある。

E. 結論

Hsp90 だけでなく、Grp94 や Grp78 もインビトロにおいて rPrP 構造変換活性を示した。これらのヒートショック蛋白は小胞体における PrPC の機能や代謝を調節する構造変換因子である可能性がある。

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

10頁-11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に関する研究

研究分担者： 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

研究協力者： 渡辺 拓也 福岡大学薬学部

研究要旨

作用機序の異なる抗プリオン薬を改良・開発することにより、複合的なプリオン病治療法の開発を目指した。ケミカルシャペロンであるGN8の構造を改変することにより、抗プリオン活性が有意に高い誘導体を得た。また、抗プリオン作用を示す脳指向性siRNA製剤を開発するため、プリオン蛋白の発現を抑制するsiRNAを確立した。脳指向性ドラッグデリバリー素材となるRVG-9RとのsiRNA複合体は、プリオン蛋白の発現を抑制しなかった。しかし、蛍光標識siRNAを用いた検討において、RVG-9RはsiRNAを細胞内に移行させることを確認した。今後、さらに改良を積み重ね有効なプリオン病治療薬の開発を目指す。

A. 研究目的

プリオン病に対して、新規コンセプトにおける治療法開発と臨床研究支援を目的に研究を行った。

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。

B. 研究方法

以下のプロジェクトについて検討した。

①新規ケミカルシャペロンGN8の構造最適化

②ペントサン硫酸(PPS)脳内動態解明によるPPS療法の改良ならびPPSの高分子構造評価による抗プリオン作用機序の解析

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

いずれの研究においても抗プリオン活性をプリオン持続感染細胞(GT/FK cell)を用いて解析し、ウェスタンブロット法等を実施して効果を検証した。

C. 研究結果

①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い、PrP結合能が高い約50種の誘導体を合成した。その誘導体の中でGN8と比較して異常型PrPの産生抑制効果が有意に高い5つの誘導体が認められた。さらに、*in vitro*血液脳関門(BBB)モデルを用いた検討では、5つの誘導体はBBB透過能も向上した。

②得られた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かった。

③有効なsiRNAを確立するため、導入剤にlipofectamineを用いてPrPのknock-down効果が予測される5種類の配列のsiRNAを検討した。Neuro2a細胞(非感染細胞)の正常型PrPのwesternblot法を用いた解析

(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

では、2つの siRNA において PrP の knock-down 効果が認められたが、そのうち 1 つは off-target 効果が認められた。off-target 効果がなく、PrP の knock-down 効果が認められた siRNA (siPrP) を今後用いることとした。siRNA は mRNA を標的としているため、実際に PrP mRNA が減少しているか、real-time PCR 法を用いて、siPrP の効果を検討した。無処置のものと比較して、siPrP/lipofectamine は 90% 近く PrP mRNA を減少させた。siPrP が異常型 PrP を減少させるか検討するため、感染細胞 (GT/FK) を用いて、異常型 PrP の発現量を western blot 法で解析した結果、siPrP/lipofectamine は異常型 PrP の発現量を減少させた。次に RVG-9R と siPrP の結合能を gel-shift assay を用いて検討した。この際、9R の立体異性体の違い (d, l) による siPrP との結合能も確認したところ、d 体は l 体よりも結合能がわずかに高く、siPrP:RVG-9R=1:50 で結合した。また、蛍光標識 siPrP と RVG-9R を用いてフローサイトメトリーを行った結果、蛍光標識 siPrP は細胞内に移行していた。siPrP/RVG-9R を GT/FK に処置したが、異常型 PrP の発現量の減少は認められなかった。同様に PrP mRNA の変化も認められなかった。

D. 考察

- ①構造最適化により得られた GN8 類縁体は、プリオン病治療に有用であることが示唆される。
- ②PPS は多糖という分子の性質上、免疫認識がされにくいものと推測された。
- ③RVG-9R によって siPrP は、細胞内に移行するが、PrP の knock-down 効果が認められなかったことから、何らかの原因で PrP mRNA と siPrP が結合しないことが考えられ

た。

E. 結論

今回得られた GN8 類縁体は、BBB 透過能も向上しており、プリオン病治療薬として期待できる。RVG-9R を用いた脳指向性 siRNA 製剤は、knock-down 効果が認められなかったが、細胞内に移行していることから、さらなる検討により改善されることが期待できるだろう。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y:

Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol.*, in press, 2009

Takata F, Dohgu S, Nishioku T, Takahashi H, Harada E, Makino I, Nakashima M, Yamauchi A, Kataoka Y:

Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway. *Neurosci Lett.* 449, 71-75, 2009

Takata F, Sumi N, Nishioku T, Harada E, Wakigawa T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y:

Oncostatin M induces functional and structural impairment of blood-brain

barriers comprised of rat brain capillary endothelial cells. *Neurosci Lett.* 441, 163-166, 2008

Dohgu S, Nishioku T, Sumi N, Takata F, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y: Adverse effect of cyclosporin A on barrier functions of cerebral microvascular endothelial cells after hypoxia-reoxygenation damage in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 889-899, 2007

2. 学会発表

Takata F, Dohgu S, Sumi N, Nishioku T, Kodama K, Shuto H, Nakagawa S, Niwa M, Yamauchi A, Kataoka Y: Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain pericytes is mediated by the dephosphorylation of MLC through cAMP/PKA signaling pathway. 11th International Symposium on Signal transduction in the BBB. Amsterdam, September 2008

Sumi N, Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Kodama K, Shuto H, Nakagawa S, Niwa M, Yamauchi A, Kataoka Y:

Involvement of the activated microglia in the impairment of the blood-brain barrier induced by lipopolysaccharide. 11th International Symposium on Signal transduction in the BBB. Amsterdam, September 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

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

なし

3. その他

なし

異常型プリオン蛋白検出プローブの開発に関する研究

研究分担者：	工藤幸司	東北大学未来医工学治療開発センター・教授
	佐々木健介	九州大学大学院医学研究院神経病理学・助教
	坪井義夫	福岡大学医学部内科学大5・准教授
	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・教授
研究協力者：	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野
	古本昭三	東北大学加齢医学研究所機能画像医学
	谷内一彦	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野

研究要旨

[¹¹C]BF-227 のプリオン病患者様における探索的臨床研究を実施し、GSS 患者様の3例全例に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、また1例の同患者様死後脳の病理染色においても生前の PET 画像を裏付ける所見が得られた。以上より [¹¹C]BF-227 は GSS 患者における有用性の高い診断プローブであることが示唆された。

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、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1) PET プローブ [¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究の実施、次に2) [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3) 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可能にするために同プローブを最適化することである。

B. 研究方法

1) [¹¹C]BF-227 の探索的臨床研究

平成20年6月に延べ3例目のゲルストマン・ストライヤー・シャインカー病 (GSS) 患者様のPET画像を撮影した。これら3例とすでに撮影済みの孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) 患者様2例のPET画像を併せて考察した。

2) GSS 患者様脳標本における BF-227 の染色像

GSS 患者様脳標本のBF-227染色を実施した。そのうち1例は [¹¹C]BF-227・PET画像を撮影後お亡くなりになられた患者様脳標本であり、免疫染色、BF-227染色とも九州大学 佐々木健介、福岡大学 坪井義夫両先生によって実施された。

3) [¹⁸F]標識プローブの開発

分担者らによって開発された [¹⁸F]FACT の非標識体（すなわち FACT）の GSS 患者様

脳標本における染色性を検討した。

4) 近赤外線蛍光プローブの開発

分担者らによって見いだされたβシート構造を有する蛋白に親和性を有するプロトタイプ近赤外線蛍光プローブ、THK-265のGSS患者脳標本における染色性を検討した。

(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

5例のプリオン病患者のうち、sCJD患者様2例では特記すべきPET画像は得られなかったが、GSS患者様においては3例全例で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(添付図1)。

2) GSS患者様脳標本におけるBF-227の染色像

GSS患者様小脳標本における免疫染色との比較ではコアをもつアミロイド斑にBF-227染色像が観察された(添付図2)。また、[¹¹C]BF-227・PET画像を撮影後お亡くなりになられたGSS患者様側頭葉標本に

においても免疫染色でコアをもつアミロイド斑にBF-227染色像が観察された(九州大学 佐々木健介、福岡大学 坪井義夫先生らのデータ)。

3) [¹⁸F]標識プローブの開発

FACTはGSS患者様小脳標本においてアミロイド斑に結合することが確かめられた。

4) 近赤外線蛍光プローブの開発

分担者らによって見いだされたプロトタイプ近赤外線蛍光プローブ、THK-265はGSS患者様小脳標本においてアミロイド斑に結合することが確かめられた。

D. 考察

GSS患者様においては3例全例で異常型プリオン蛋白と[¹¹C]BF-227との結合が示唆されるPET画像が得られたことから、[¹¹C]BF-227はGSS患者における有用性の高い診断プローブであることが示唆された。

E. 結論

[¹¹C]BF-227のプリオン病患者様における探索的臨床研究を実施し、GSS患者様の3例全例に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、また1例の同患者様死後脳の病理染色においても生前のPET画像を裏付ける所見が得られた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

古本祥三、工藤幸司：アミロイド斑の可視化によるアルツハイマー病の早期診断、

ISOTOPE NEWS, 2008, No. 655, 2-6

荒井啓行、工藤幸司：アルツハイマー病治

療の現状と近未来像. 細胞. 2008. 40. 17-20

荒井啓行、古川勝敏、工藤幸司: アルツハイマー病バイオマーカー開発の現況と Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Human science. 2008. 19. 12-17.

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

2. 学会発表

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-(2-(Thiazolo-5-yl)benzoxazole Derivative for In Vivo Imaging of Amyloid Deposits. 2008 World Molecular Imaging Congress. Nies. 2008 年9月10-13日

Mori M, Okamura N, Furumoto S, Sugi K, Kudo Y, Arai H, Yanai K: Non-invasive detection of amyloid- β deposits by near-infrared fluorescence imaging. XI WORKSHOP ON APOPTOSIS IN BIOLOGY AND MEDICINE. Sendai. 2008 年9月12日-14日

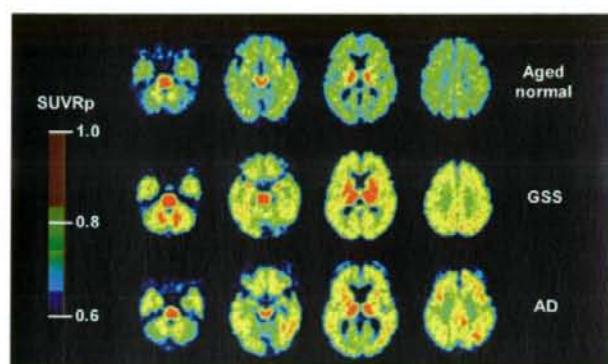
Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Mori M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. Alzheimer's Imaging Consortium In "International conference on Alzheimer's disease". Chicago. 2008 年7月26日

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 年7月26日-31日

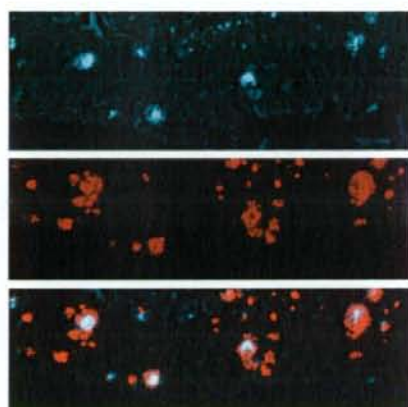
Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Mori M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. International conference on Alzheimer's disease. Chicago. 2008 年7月26日-31日

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 年6月14日-18日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



添付図 1. Aged normal、ゲルストマン・ストライヤー・シャインカー病 (GSS)、アルツハイマー病 (AD) 患者脳における $^{[11C]}$ BF-227・PET 画像 (参照部位は橋)



添付図 2. GSS 患者様小脳標本における BF-227 染色 (上段)、抗プリオン蛋白抗体 (3F4、中段) 染色および両染色のマージ (下段)。(九州大学佐々木健介先生に染色していただきました)

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研究

研究分担者：坪井 義夫 福岡大学医学部神経内科学・准教授
研究協力者：山田 達夫 福岡大学医学部神経内科学

研究要旨

プリオン病は、病型により経過、予後が異なるが、いずれも進行性、致死性の経過をたどる点では共通であり、これまでに有効な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。我々は、プリオン病に対する新規の治療としてペントサンポリサルフェート(PPS)の脳室内持続投与を本邦で始めて臨床研究を行い、今年度もその治療継続と効果及び副作用の検討を行った。概略として、2004年11月から、2007年3月までにプリオン病11例に対して同治療が開始された。病型は孤発性CJD6例(うちMM2型1例)、硬膜移植後医原性CJDが2例、家族性CJD3例(V180I2例、GSS1例)。発症から治療開始まで9ヶ月から31ヶ月で、体内埋め込み型微量注入器具および脳室内カテーテルの留置手術脳室内カテーテル留置後、PPS注入を始め、最終維持濃度は120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。日常生活動作の指標 modified Rankin Scaleでは治療前が2-5(平均3.5)で、現在は4-6(平均5.5)と低下しており症状の進行は防げなかった。しかし治療開始後3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。周術期の問題はなく、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。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

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、致死性の神経難病であり、その有効な治療法は見つかっていない。我々は人のプリオン病に対する効果的治療を確立する目的で、ペントサンポリサルフェート(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した。

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。

C. 研究結果

この臨床研究の対象は11例のプリオン病患者で、病型の内訳は孤発性CJD 6例(うちMM2型1例)、硬膜移植後医原性CJDが2例、家族性CJD 3例(V180I 2例、GSS 1例)であった。発症から治療開始まで9~31ヶ月で、体内埋め込み型微量注入器具および脳室内カテーテルの留置手術脳室内カテーテル留置後、PPS注入を始め、最終維持濃度は120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。日常生活動作の指標modified Rankin Scaleでは治療前が2-5(平均3.5)で、現在は4-6(平均5.5)と低下しており症状の進行は防げなかった。しかし、治療後の生存期間は22ヶ月(4-43)で現在生存している4例に関しては、33.7ヶ月(21-43)と長期生存例が見られた。11例中7例が死亡し、治療から平均15.2ヶ月(4-25)であった。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。周術期において大きな問題はなく、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。硬膜下水腫が神経症状に明らかに影響を及ぼした例は認めない。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

本研究はプリオン病患者に対して薬物を脳室内に持続投与する点において、これまでに行われていないはじめての研究である。今回の臨床試験継続における治療効果の評価として、経過の早い孤発性CJD 4例、硬膜移植後医原性CJDの2例とGSSの症例は治療開始後も症状の進行は防げなかった。一方で進行の緩徐は孤発性CJD 2例及び家族性CJD(V180I)の2例はこの1年間の状態はほぼ安定しており、生存期間もプリオン病としては長期に及んでいる。この研究に対応する海外の報告は英国のものであるが、特に変異型CJDのPPS治療を受けた2例がこれまでの最長の生存期間を認めていることと合わせて、すべての型ではなく、ある1群のプリオン病に対しては生命予後を改善する可能性が高い。安全面での評価としては、高率に出現する硬膜下水腫以外にはPPS脳室内持続投与法のプロトコールは現在のところ、全例比較的に行われている。硬膜下水腫も神経症状を悪化させるものはなく、脳萎縮に伴う脳脊髄液の硬膜下への漏出と考えられる。治療のエントリーは終了しているが今後も長期生存の4例に関して治療、臨床評価は継続しておこなう。今後も欧州で行われた他の治療結果や、英国での変異型CJD中心の症例における治療研究ともあわせて検討を進めてゆきたい。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。

E. 結論

本治療プロトコールは、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、今後も各種の評価法を用いて検討する必要がある。プリオン病は稀な神経難病であるが、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変異型CJD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うるものと考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)

2. 学会発表

1. 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)
2. 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

α -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)

3. 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)
4. 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-Sträussler-Scheinker病における画像と病理の対比- Prion Symposium 2008 文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業 (2008, 8. 29-30, 十勝・北海道サホロリゾート)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

海外で実施されている治験に関する調査分析

研究代表者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究分担者：坪井 義夫 福岡大学医学部・准教授

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、最新情報を収集し分析した。イタリア、ドイツ、フランスにおいて統一プロトコールによるドキシサイクリンに関する大規模な二重盲検試験が実施されている。治療に積極的な米国や英国では追従する動きは無く、ドキシサイクリンの動物実験における効果は極めて限定的であることより、その臨床効果には疑問視する意見もある。我国ではパイロット試験としてドキシサイクリンとシンバスタチンの併用療法を行っているものの、これまでに明らかな効果は観察されていない。

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に関して、最新情報を収集し分析して、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20年4月24日にミラノで開催されたプリオン病治療に関する国際会議 TheraPrion 2008 と平成20年10月8日～10日にマドリッドで開催されたプリオンに関する国際会議 NeuroPrion 2008 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。

（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3つの薬剤に関する治験が実施されている。
Quinacrine: 米国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、一昨年度でエントリーを終了した。英国、フランスもオープンラベル方式で実施中

である。

Doxycycline: イタリアのプロジェクトが一昨年より二重盲検法で始まっている。同じ治験プロトコールを用いてドイツ及びフランスが二重盲検法で実施中。

- ・ 英国で実施されている PPS の治験では、4例の vCJD 患者の内の3例が驚異的に長期間（いずれも5年以上）生存中であること、他の病型の患者も非治療患者の平均罹病期間を越えて生存していること、脳室カテーテル留置手術に伴う合併症の頻度が高いこと、PPS 脳室内投与は安全であることが報告された。
- ・ Tagliavini らはイタリアで二重盲検法での Doxycycline 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、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77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している。
- ・ Zerr らも49例の CJD 患者で Doxycycline のパイロット試験を実施しているが、その結果は公表されていない。
- ・ 治療に積極的な米国や英国では、イタリア、ドイツ、フランスに追従する動

きは無い。

- ・ ドキシサイクリンの動物実験における効果は極めて限定的である(Luigi AD, et al. The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection. PLoS ONE. 3(3):e1888, 2008)ことより、その臨床効果には疑問視する意見がある。
- ・ 我国ではパイロット試験としてドキシサイクリンとシンバスタチンの併用療法を行っているものの、これまでに明らかな効果は観察されていない。
- ・ 現在行われている治験の概要を資料1に示した。

D. 考察

昨年に続き、今回の調査からも、パイロット試験を経て二重盲検法による治験が、世界のスタンダードとなってきたことが印象付けられた。プリオン病は時間的・空間的に散発性に発生する亜急性に進行する希少疾患ではあるが、一つの研究室(Zerrらの研究室)が責任を持って国内のサーベイランスを行っているドイツでは、短期間に49例のパイロット試験を終わらせ、180例を目標とした二重盲検試験を開始しており、短期間に多数の患者に治験を導入するためには、ドイツのようなサーベイランスとリンクしたシステムが必要となる。

一方、エンドポイントに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のが現状であり、治験対象薬の効果がプリオン病そのものの進行を抑制しているのか、あるいは病気に伴う肺炎などの合併症を抑制して生命予後改善効果を発揮しているのか、慎重な解釈が必要となってくる。

E. 結論

海外で実施されている治験に関する最新情報を分析し、考察した。

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
10頁-11頁に記載。

資料1. 現在世界で行われているプリオン病の治験

Country	Agent	Study design	Entry	Results
Italy	Doxycycline	Open label	21 treated 77 controls	Longer survival time
	Doxycycline	RCT	(60) 23	-
Germany	Doxycycline	Open label	49	-
		RCT	(180)	-
France	PPS	Open label	15	-
	Doxycycline	RCT	(100)	-
USA	Quinacrine	RCT	42	-
UK	PPS	Open label	8	Longer survival time
Japan	PPS	Open label	11	Longer survival time

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

研究分担者：佐々木健介 九州大学大学院医学研究院神経病理学分野・助教

研究要旨

孤発性ヤコブ病症例および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を指標として、プリオン蛋白オリゴマーの病態への関与および治療による影響について検討した。プリオン蛋白オリゴマーの増加と正常プリオン蛋白モノマー減少の両方が病態に関与している可能性が考えられた。また、ペントサンポリ硫酸脳室内投与により異常プリオン蛋白オリゴマーの形成が抑制される可能性が示唆された。

A. 研究目的

孤発性ヤコブ病症例および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を指標として、プリオン蛋白オリゴマーの病態への関与および治療による影響の可能性を検討する。

B. 研究方法

遠心カラムを用いた簡便なゲル濾過サイズ分画法を応用して、罹病期間の異なる孤発性ヤコブ病対照群6例と、非ヤコブ病対照群3例についてプリオン蛋白サイズ分画を行い、プリオン病の進行に伴う蛋白重合度の変化を確認した。次に、当施設にて病理解析を行ったペントサンポリ硫酸脳室内投与治療例（孤発性ヤコブ病、硬膜移植ヤコブ病、GSS 各1例）のプリオン蛋白重合度を解析して比較検討を行った。

（倫理面への配慮）

特記すべきことはない。

C. 研究結果

対照群の検討では、非ヤコブ病群においてほとんどのプリオン蛋白がモノマーとして検出されたのに対して、孤発性ヤコブ

病群では、罹病期間が長く脳重量が低下した症例ほどプリオン蛋白オリゴマーが増加していた。脳重量が1000g以下になるとオリゴマーの増加はプラトーに達した。一方で、モノマーの正常型プリオン蛋白は病理変化の軽い早期例でも減少傾向を示し、海綿状変化が進行して粗鬆化すると更に顕著に減少することを確認した。孤発性ヤコブ病群で検出された異常プリオン蛋白オリゴマーは、早期例においても大部分がプロテアーゼ抵抗性を示した。ペントサンポリ硫酸脳室内投与治療群では、3例で病型が異なるため単純な比較はできないが、脳重量低下に伴うプリオン蛋白重合度の変化、正常型プリオン蛋白の減少は、孤発性ヤコブ病対照群と比べるとやや軽い傾向がみられた。

D. 考察

ヒト材料を用いた今回の研究結果は、モデルマウスを用いたこれまでの研究で得られた知見といくつかの点で異なった。モデルマウスにおいては、病初期にプロテアーゼ感受性のプリオン蛋白オリゴマーが検出されたが、ヤコブ病症例ではいずれも

プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白が明瞭に検出された。モデルマウスでは病末期まで正常プリオン蛋白モノマーが共存していたが、ヤコブ病症例は脳のスポンジ状変化の進行と正常プリオン蛋白の減少が顕著であった。ヒト剖検脳の解析は、罹病期間は異なってもいずれにしても病末期像の検討であり、治療過程における薬剤の効果を判断するには限界があるが、本研究において、ペンタサノリ硫酸脳室内投与により異常プリオン蛋白オリゴマーの形成も抑制される可能性が示唆された。

ヤコブ病症例ではプリオン蛋白オリゴマーの増加と正常プリオン蛋白モノマーの減少が観察され、その両方が病態に関与している可能性が考えられた。今後病態の解析や治療効果を判定するにあたっては、従来のプロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白の解析だけでなく、蛋白重合度の変化を検討することの重要性が示唆された。

E. 結論

孤発性ヤコブ病における病理変化の進行とプリオン蛋白重合度の変化との相関を示した。プリオン蛋白オリゴマーの増加と正常プリオン蛋白モノマー減少の両方が病態に関与している可能性が考えられた。ペンタサノリ硫酸脳室内投与によるプリオン蛋白オリゴマー形成の抑制効果に関しては、症例の蓄積とともに、今後更に病理学的解析データなどとあわせて詳細に検討する必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujimi K, Sasaki K, Noda K, Wakisaka Y,

Tanizaki Y, Matsui Y, Sekita A, Iida M, Kiyohara Y, Kanba S, Iwaki T: Clinicopathological outline of dementia with Lewy bodies applying the revised criteria: the Hisayama study. Brain Pathol 18(3); 317-325, 2008

三好克枝、大八木保政、山崎貴男、姫野恵理、櫻井修、佐々木健介、門司晃、一宮厚、神庭重信、吉良潤一：
九州大学病院における神経内科・精神科共同もの忘れ外来. 神経治療学 25(5); 597-603, 2008

2. 学会発表

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
松崎尊信、藤見恒平、佐々木健介、松井幸子、関田敦子、谷崎弓裕、鈴木諭、清原裕、岩城徹：耐糖能異常とアルツハイマー病の病理学的関連. 第49回日本神経病理学会 東京 2008年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究分担者：長谷部 理絵 北海道大学大学院獣医学研究科

プリオン病学講座・助教

研究協力者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

宋 昌紘 同上

大澤 夏生 同上

研究要旨

プリオン病治療法の確立を目的として、抗 PrP 抗体と骨髄由来間葉系幹細胞（Bone marrow-derived Mesenchymal stem cells, MSC）のプリオン病の治療への応用について、プリオン感染マウスをモデルとして検討した。抗 PrP 抗体は、プリオン感染動物の脳内に投与した場合でもプリオン増殖抑制効果を示すことが知られている。そこで、抗 PrP 抗体の末梢投与が病気の進行に及ぼす影響を調べた。抗 PrP モノクローナル抗体（mAb）31C6 を、Chandler 株感染マウスの発病初期である接種後 120 日から尾静脈に投与を開始した。その結果、半数のマウスで、潜伏期が 160 日以上に延長した。陰性対照抗体を投与した群の平均潜伏期が 153.3 ± 4.3 日であったのに対し、潜伏期が延長したマウスの平均潜伏期は 166.8 ± 4.3 日であった。半数のマウスで延命効果が認められたことから、末梢から投与した抗体の脳内移行の効率を高めることができれば、抗 PrP 抗体はプリオン病の治療に応用可能であることが示唆された。また、ヒト不死化 MSCs（hMSCs）を Chandler 株感染マウスの脳内に移植した場合、あるいは尾静脈から移植した場合でも、延命効果の程度は低い、潜伏期が有意に延長した。今後より詳細な検討は必要であるが、MSCs を用いた再生医療もプリオン病の治療に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、プリオン Chandler 株感染マウスの臨床期に抗 PrP 抗体の脳室内持続投与を開始しても、延命効果が得られることを報告した。そこで、より侵襲性の低い、抗 PrP 抗体の末梢による延命効果について検討した。また、プリオン病の治療に再生医療を導入する目的で、骨髄由来間葉系幹細胞（Bone marrow-derived Mesenchymal stem cells, MSCs）がプリオン病の治療に有効であるかを検討した。

B. 研究方法

プリオン Chandler 株感染マウスを用いた。プリオン接種後 120 日（dpi）から、週一回の間隔で、mAb31C6（1 mg/ml, 200 μ l/匹）を尾静脈から投与した。また、Chandler 株感染マウスに、ヒト不死化骨髄由来間葉系幹細胞（hMSCs）を脳室内に移植（ 1×10^5 個）、あるいは尾静脈から投与した（ 1×10^6 個）。これらのマウスの経過を観察した。

（倫理面の配慮）