

動物実験は北海道大学大学院獣医学研究科の実験動物委員会で承認された動物実験計画書（実験番号 8040）に従って実施した。

C. 研究結果

尾静脈から投与した抗体が脳実質に移行するかについて調べたところ、Chandler株接種後130日目には、抗体が脳実質内で検出されたことから、静脈投与でも抗体は脳実質に移行することが判明した（結果は示さず）。Chandler株感染マウスにmAb31C6を尾静脈投与した群では、潜伏期が160日以上であったマウスを効果ありと判定した。陰性対照抗体を投与した群（ 153.3 ± 4.3 日）と比較して、半数のマウスで潜伏期が160日以上となり、その平均は 166.8 ± 4.3 日であった（図1）。また、潜伏期が延長したマウスでは、体重の減少も陰性対照群と比較して有意に遅延していた（図1）。

hMSCsをChandler株感染マウスの90dpiに脳内に移植した場合は（ 158.0 ± 6.4 日）、非移植群（ 149.7 ± 2.1 日）と比較して潜伏期が平均8日延長した。また、120dpiにhMSCsを尾静脈投与した場合は7匹中4匹で延命効果が認められた（ 154.3 ± 5.9 日）。この差も、陰性対照群と比較して統計学的に有意であった（図2）。

D. 考察

抗PrP抗体の末梢投与を、Chandler株接種後120dpiから開始した場合に、半数のマウスで効果が認められた理由は判らない。Chandler株感染マウス（120dpi）に尾静脈から投与した抗体は脳内に移行するが（結果は示さず）、その効率は低いと考えられる。抗体の脳実質への移行量の違いが、効果の有無に関係するのかもしれない。

しかし、半数のマウスで効果が得られたことから、抗体の脳内移行の効率を改善できるならば、より顕著な効果が期待できると考えられる。

hMSCsは脳内に移植した場合でも、末梢から移植した場合でも、プリオン病の神経病変部に移行する（Song et al., submitted for publication）。今回、Chandler株感染マウスにhMSCsした場合、効果は小さいが、有意な延命効果が認められたことから、MSCによる再生医療がプリオン病の治療に応用できる可能性がある。hMSCsはプリオン感染マウスの脳内で、神経栄養因子を産生し、また、一部は神経系の細胞に分化する（Song et al., submitted for publication）。しかし、現時点では、hMSCsが潜伏期を延長する機構は不明である。hMSCsはマウス脳内で一時的に増殖するが、長期間生着しないと考えられる（Song et al., submitted for publication）。今後、マウスMSCを用いたモデル実験により、MSCのプリオン病治療効果をより厳密に評価する必要がある。

E. 結論

プリオンChandler株感染マウスの臨床期に抗PrP抗体を末梢から投与しても、半数のマウスで延命効果が認められた。また、hMSCsを脳内移植した場合、あるいは末梢から移植した場合でも延命効果が認められた。今後詳細な検討は必要であるが、これらは、プリオン病の治療法の候補になり得ると考えられる。

F. 健康危機情報

本研究の実施に起因する、健康上の問題を生じた事例は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. J Virol, in press.

長谷部理絵：プリオン病の ABC。Small Animal Clinic, 2008: 152; 4-9.

2. 学会発表

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

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

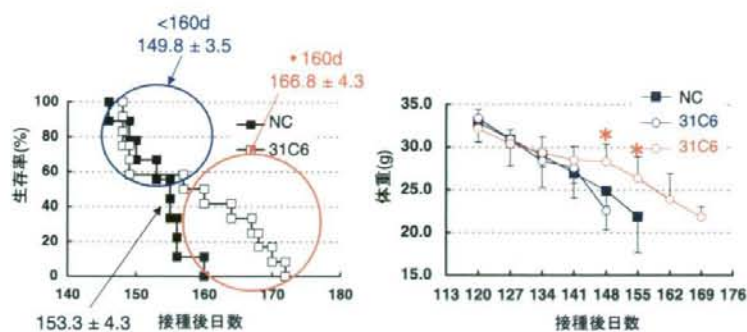


図1. 抗PrP抗体(mAb31C6)の静脈内投与がChandler株感染マウスに及ぼす影響。

(左) 生存曲線。mAb31C6を静脈内投与した場合、半数のマウスで潜伏期が160日以上に延長した(赤円)。(右) 体重の変化。陰性対照抗体投与マウス(黒)、潜伏期が延長したマウス(赤)、延長しなかったマウス(青)の体重の変化を示した。*は陰性対照マウスに対して有意に体重が異なることを示す(Dunnett検定)。NC, 陰性対照抗体(mAb P2-284)投与マウス

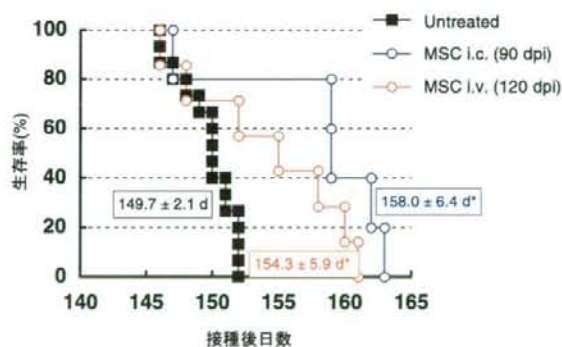


図2. hMSCsの移植がChandler株感染マウスの潜伏期に及ぼす影響。

hMSCsをChandler株感染マウス(90 dpi)の脳内に移植(青)、あるいは120 dpiに尾静脈から移植した(赤)。図中には各群の平均潜伏期を示す。*は陰性対照群に対して、有意に潜伏期が延長したことを示す(Cox-Mantel検定)。

新たなサロゲートマーカーの開発に関する研究

研究分担者：佐藤 克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
展開医療科学（第1内科）・助教

研究要旨

2000年以降プリオン病患者での治療候補薬が報告され、治療が開始されている。プリオン病患者での早期診断・早期治療は極めて重要性を増している。我々は平成18年度プリオン病患者での早期診断マーカーについて報告しているものの、さらに多数例における検討を行い、既存マーカーでは鑑別しにくい、脳炎・脳症などの急性に意識障害・認知機能障害をきたす疾患群との区別が可能である血清における新規マーカーを発見し・分析した。現在まで脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症のみに認められ、CJDにはないスポットに注目した。その中でS-100b蛋白、MMP-9、TIMP-1が確認された。さらにプリオン病患者・健常者・アルツハイマー型認知症・脳症群（急性髄膜炎・脳炎・脳症）・多発性硬化症についてそれぞれ18症例ずつについてS-100b蛋白、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1について検討を行った。血清中のS-100b蛋白、MMP-9、TIMP-1は今まで鑑別が難しかった疾患特に脳炎・脳症・髄膜炎、多発性硬化症との鑑別に有効であった。

A. 研究目的

2002年から2008年までプリオン病患者での早期診断マーカーの確立と新たな診断マーカーの検索を研究の目的とした。現在までの診断マーカーで約80-90%程度の感度・特異度を示している。しかしながら脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症は髄液中の既存の生化学的マーカーで鑑別困難疾患であり、これらの疾患と鑑別できる生化学的マーカーの検討を本年度の研究の目的とした

B. 研究方法

1. まず我々は2002年から2008年までプリオン病患者での早期診断マーカーとして報告した193症例における診断マーカー（14-3-3蛋白、総タウ蛋白、S-100b蛋白、拡散強調画像）について検討を行った。
2. 脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症患者とCJD患者における血清での2次元電気泳動を行い（現在までCJDのみ認められるスポットを検討したが、今回は脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症のみに認められ、CJDにはないスポットの検討）新

規スポットについて検討した。

（倫理面の配慮）

既に長崎大学倫理委員会の承認を得ており、長崎大学の倫理規程に準拠し、その内容に則って患者検体を全て匿名化して管理している。個人情報に関しては厳重に保管し、ことに患者情報ファイルは施錠できる書庫に保管しており、生命倫理的観点からも問題はない。

C. 研究結果

1. 2003年から2008年までのプリオン病の症例は193症例であり（表1）、現在では196症例中14-3-3蛋白20/196（86.5%）、総タウ蛋白29/36（80.5%）、S-100b蛋白7/36（19.4%）、拡散強調画像34/36（94.4%）と極めて総タウ蛋白とMRI拡散強調画像の検出率が高い（表2、図1）。
2. 脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症患者とCJD患者の血清での2次元電気泳動にて検討を行い、現在までCJDのみ認められるスポットを検討したが、今回は脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎・橋本脳症のみに認められ、CJDにはないスポットに注目

した。その中でS-100b 蛋白、MMP-9、TIMP-1が確認された。

さらにプリオン病患者・健常者・アルツハイマー型認知症・脳症群（急性髄膜炎・脳炎・脳症）・多発性硬化症についてそれぞれ18症例ずつについてS-100b 蛋白、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1について検討を行った。

血清中のS-100b 蛋白、MMP-9、TIMP-1は今まで鑑別が難しかった疾患と区別可能であった（図2, 3, 4, 5）。

D. 考察

1) 日本における診断マーカーの確立という点では症例数の関係もあるが、ほぼ90%程度の感度・特異度を示すことが可能となった。特に画像検査と髄液検査を結びつけることで90%以上鑑別可能となった。

2) 脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎患者とCJD患者の血清の血清マーカーでのMMP-9/TIMP-1、S-100 蛋白ではかなりの症例で鑑別可能である。

3) さらなる検討

このS-100b 蛋白、MMP-9、TIMP-1は報告では血液脳関門における血清のマーカーとして利用されており、現在までCJD患者での血液脳関門の検討はされていない。そのためCJD患者での血液脳関門の評価を生化学的マーカーと画像検査にて評価した。しかしながらいずれの画像検査では明らかな血液脳関門を示す所見は認められなかった。（表3）

E. 結論

1) 日本における診断マーカーの確立という点では症例数の関係もあるが、ほぼ90%程度の感度・特異度を示すことが可能となった。特に画像検査と髄液検査を結びつけることで90%以上鑑別可能となった。

2) 脳炎・髄膜炎・ヘルペス脳炎患者とCJD患者の血清の血清マーカーでのMMP-9/TIMP-1、S-100 蛋白ではかなりの症例で鑑別可能である。

3) さらなる検討

このS-100b 蛋白、MMP-9、TIMP-1は報

告では血液脳関門における血清のマーカーとして利用されており、現在までCJD患者での血液脳関門の検討はされていない。そのためCJD患者での血液脳関門の評価を生化学的マーカーと画像検査にて評価した。しかしながらいずれの画像検査では明らかな血液脳関門を示す所見は認められなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 原著論文による発表

1. Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K. et al. Bone marrow stromal cells are susceptible to prion infection. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;377:957-961

2. 佐藤克也, 本村政勝. 【透析患者診療のための診断基準・重症度スコア 適切な病態評価のために】 臨床所見・徴候からのアプローチ 麻痺. Vol. 24, 2008:814-816

3. 中桶了太, 浜田久之, 佐藤克也 et al. 地域での臨床医学教育の実践 長崎大学へき地病院再生支援・教育機構の取り組み. Vol. 39, 2008:100.

2. 学会発表

1) 国内

口頭発表

1. 立石洋平, 辻野 彰, 徳田昌紘, 福田卓, 佐藤克也, 西浦義博, 中村龍文, 本村政勝, 吉村俊朗, 江口勝美, 赤司良平, 芦澤直人, 林 徳眞吉 孤立性左室心筋緻密化障害による心原性脳塞栓症の1例 日本神経学会九州地方会 福岡 2008. 03. 15

2. 徳田昌紘, 六倉和生, 立石洋平, 辻野彰, 福田 卓, 佐藤克也, 西浦義博, 本村政勝, 吉村俊朗, 江口勝美 急性非ヘルペス性脳炎の自験3症例: BIS モニターの有用性と臨床的検討 日本内科学会講演会 東京 2008. 04. 11-13

3. 西浦義博, 中村龍文, 福田 卓, 佐藤 克

也、辻野 彰、本村政勝、吉村俊朗、中村英樹、井田弘明、江口勝美 HTLV-I 関連脊髄症患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験 (第 2 報) およびその機序の解析 日本神経免疫学会 西澤正豊 新潟 2008. 04. 17-18

4. 佐藤克也、福田 卓、辻野 彰、西浦義博、本村政勝、江口勝美、吉村俊朗、中村龍文、柴山弘司 体幹失調を主体としたクサフグ中毒の 4 症例 日本内科学会九州地方会 宮崎 2008. 05. 10

5. 吉村俊朗、福田 卓、徳田昌紘、佐藤克也、辻野 彰、調 漸、竹尾 剛、中村龍文、本村政勝長崎県下地区別における筋萎縮性側索硬化症の発生率 日本神経学会総会 横浜 2008. 05. 15-17

6. 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

7. 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

8. 本村政勝、石飛進吾、辻野 彰、福田卓、徳田昌紘、立石洋平、佐藤克也、西浦義博、吉村俊朗、江口勝美 重症筋無力症の嚥下機能評価に関する検討 日本神経学会総会 横浜 2008. 05. 15-17

9. 植木郁子、上田康雄、森田茂樹、木下郁夫、大坪まゆみ、阿比留教生、山崎浩則、川崎英二、佐藤克也、江口勝美 高齢発症 1 型糖尿病におけるアルツハイマー病 日本糖尿病学会年次学術集会 東京 2008. 05. 22-24

10. 佐藤克也、福田 卓、徳田昌紘、立石洋平、辻野 彰、西浦義博、吉村俊朗、中村龍文、林 徳真吉、田川 努、永安武、本村政勝、江口勝美 タクロリムス長期投与中に赤芽球瘍を合併した重症筋無力症(MG)の 1 例 日本神経学会九州地方会 鹿児島 2008. 06. 14

11. 大久保佑美、福田 卓、佐藤克也、徳田昌紘、立石洋平、江口博人、辻野 彰、

西浦義博、本村政勝、中村龍文、吉村俊朗、江口勝美、福田智美、高橋晴雄労作時呼吸困難で発症し、薬物療法の効果を認めた Meige 症候群の 1 例 日本神経治療学会総会 神奈川 (横浜) 2008. 06. 26-27

12. 福田 卓、松本佳代、本村政勝、徳田昌紘、立石洋平、佐藤克也、辻野 彰、西浦義博、中村龍文、吉村俊朗、柴山弘司、西野一三、鈴木重明、江口勝美抗 signal recognition particle (SRP) 抗体陽性多発筋 (PM) の 1 例 日本神経学会九州地方会 久留米 2008. 9. 20

13. 徳田昌紘、本村政勝、立石洋平、佐藤克也、辻野 彰、江口勝美、山下和範、余繩雅彦、長谷敦子、江石清行 低体温療法が有効と思われた縊頸による低酸素脳症に伴う痙攣重積の一例 日本蘇生学会第 27 回大会 長崎 2008. 10. 10-11

14. 立石洋平、辻野 彰、徳田昌紘、福田卓、佐藤克也、西浦義博、中村龍文、本村政勝、吉村俊朗、江口勝美 孤立性心筋緻密化障害を有し脳梗塞症を繰り返した 2 症例日本栓子検出と治療学会 (エンボラス学会) 倉敷 2008. 10. 31-11. 1

15. 前田泰宏、立石洋平、辻野 彰、六倉和生、佐藤克也、西浦義博、中村龍文、本村政勝、吉村俊朗、江口勝美 血小板減少症に脳静脈洞血栓症を合併した 1 例日本栓子検出と治療学会 (エンボラス学会) 倉敷 2008. 10. 31-11. 1

16. 六倉和生、佐藤克也、占部有人、江口博人、福田 卓、辻野 彰、本村政勝、江口勝美、吉村俊朗、中村龍文 特異的な筋力低下の分布を認め、糖負荷検査で著明な高インスリン血症を来した低カリウム性周期性四肢麻痺の 1 例日本内科学会九州地方会 熊本 2008. 11. 16

17. 佐藤 桂、立石洋平、福田 卓、栢田智子、坂井無二子、徳田昌紘、佐藤克也、辻野 彰、本村政勝、吉村俊朗、江口勝美 Rubinstein-Taybi 症候群に合併した前大脳動脈解離の一例 日本神経学会九州地方会 2008. 12. 13

2) 海外
口頭発表
なし
ポスター

1. Katsuya Satoh (First Department of Internal Medicine, Nagasaki University), Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF NeuroPrion Spain . 2008 Oct 8-10

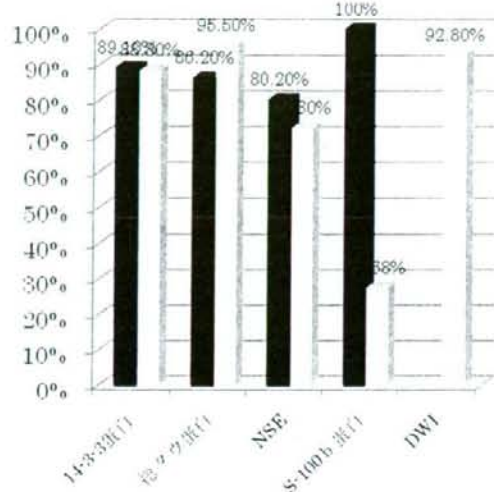
2. Yuki Matsui (Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University), Katsuya Satoh (First Department of

Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University), 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 NeuroPrion Spain . 2008 Oct 8-10

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

図1. DWI と髄液中の生化学的マーカーの検討



黒：ヨーロッパ 白：日本

図2. 血清中 MMP-9 濃度

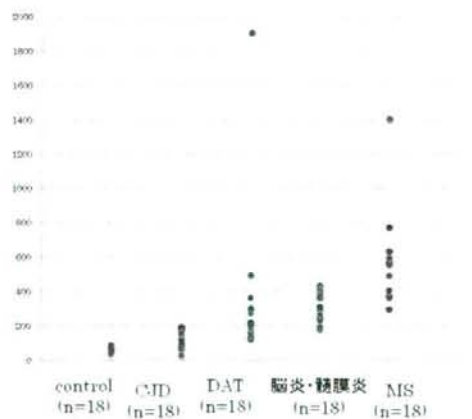


図3. 血清中 TIMP-1 濃度

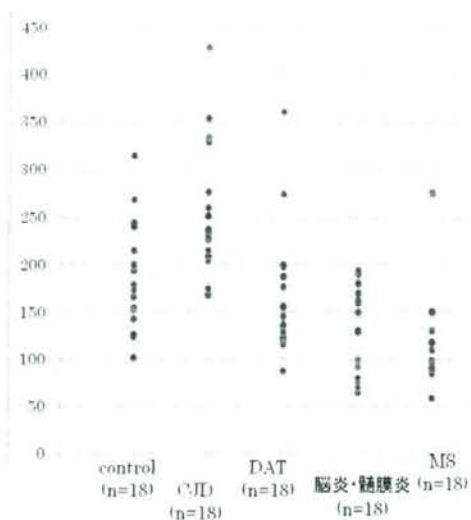


図4. MMP-9/TIMP-1 (血清)

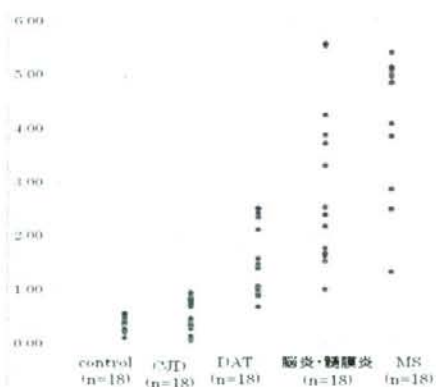


図4. S-100 蛋白

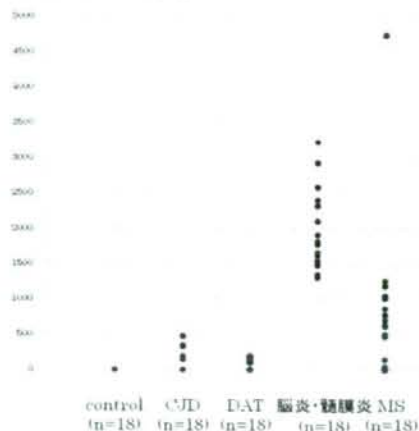


表1. CJD 193 症例

	総数
古典型 CJD	157 例
MV 非典型	1 例
MM2 皮質型	8 例
家族性	
V180I	10 例
M232R	2 例
144 塩基対挿入	2 例
硬膜移植後 CJD	8 例
GSS	6 例
	193 例

表2. CJD 193 症例の検査結果のまとめ

	総数	14-3-3 蛋白	総タウ 蛋白	DWI
古典型 CJD	157 例	88.7%	95.9%	95.5%
MV 非典型	1 例	0.0%	0.0%	100.0%
MM2 皮質型	8 例	50.0%	100.0%	100.0%
家族性				
V180I	10 例	50.0%	80.0%	100.0%
M232R	2 例	0.0%	100.0%	100.0%
144 塩基対挿入	2 例	0.0%	50.0%	0.0%
硬膜移植後 CJD	8 例	100.0%	100.0%	100.0%
GSS	6 例	0.0%	33.3%	0.0%
	193 例	86.5%	95.5%	92.8%

表3. CJD 患者における画像評価

性別	年齢	病型	臨床経過	MRI T1Gd(+)	SPECT
				BBB の破壊を示す所見の有無	
女	64	sporadic	typical	無	無
女	70	sporadic	typical	無	無
女	74	sporadic	typical	無	無
男	67	sporadic	typical	無	無
男	67	sporadic	typical	無	無
男	64	sporadic	typical	無	無
女	65	sporadic	typical	無	無
男	72	sporadic	typical	無	無
女	79	sporadic	typical	無	無
女	71	sporadic	typical	無	無
女	82	sporadic	typical	無	無
男	69	genetic	V180I	無	無
男	70	genetic	V180I	無	無
女	70	genetic	V180I	無	無
女	67	genetic	V180I	無	無
女	57	sporadic	atypical	無	無
男	70	sporadic	typical	無	無
男	71	sporadic	typical	無	無

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
照屋健太、 堂浦克美	「プリオン」	山口恵三、 戸塚恭一 編	KEY WOR D感染症 第二版	先端医学社	日本	2008	258-259

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, <u>Doh-ura K</u>	Amyloidophilic compounds for prion diseases.	Infect Disord Drug Targets	9(1)	15-22	2009
Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, <u>Doh-ura K</u> , 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, <u>Hasebe R</u> , 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, <u>Hasebe R</u> , Horiuchi M	The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP ^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain.	J Virol	in press		
Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, <u>Satoh K</u> , et al.	Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection.	Biochem Biophys Res Commun	377	957-961	2008

<u>工藤幸司</u> 、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	66	300-306	2008
岡村信行、谷内一彦、古川勝敏、荒井啓行 <u>工藤幸司</u>	アミロイドイメージングPET.	日本臨床	66	288-292	2008
岡村信行、古本祥三、 <u>工藤幸司</u>	アミロイドイメージング	分子精神医学	2	188-190	2008
<u>坪井義夫</u>	症状の進行はあるが家族性CJD2例は2年以上生存.	Medical Tribune	41(25)	14	2008
田中美紀、 <u>坪井義夫</u> 、井上貴仁、山田達夫	プリオン病、SSPE.	Modern Physician	28(5)	729-734	2008
<u>長谷部理絵</u>	プリオン病のABC。	Small Animal Clinic	152	4-9	2008

研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷

プリオン

● Prion

プリオン (prion) とは

プリオンはヒトおよび動物の脳において伝達性(感染性のある)海綿状変性を起こし、異常型プリオン蛋白質(異常型 prion protein (PrP))が蓄積する一連の疾患(伝達性海綿状脳症(transmissible spongiform encephalopathy : TSE))における「感染因子」を指す。蛋白質性感染粒子(proteinaceous infectious particle)がその名称の由来であり、TSEは原因因子の名称をもってプリオン病ともよばれる。プリオン病は、臨床的には亜急性に進行する神経症状・認知症を呈し、死に至る。病理組織学的には、脳において神経細胞脱落・海綿状変化・グリア細胞の増生・異常型PrPの沈着がみられる。米国のPrusiner博士らはヒツジのプリオン病であるスクレイピー(scrapie)について研究をおこない、スクレイピーの脳から精製した桿状の蛋白質性の線維の伝達実験および生化学的解析から、1982年に感染因子が蛋白質であることを提唱した。構成蛋白質の配列が1985年に同定され、宿主が発現している蛋白質(プリオン蛋白質)であることが判明した。ヒトではプリオン蛋白質遺伝子は第20番染色体上に位置している。感染因子に核酸が関与していることは現在までにさまざまな研究から否定されている。

プリオン蛋白質

現在のところプリオンの主成分(あるいはプリオンそのもの)で、かつ唯一同定されている成分が異常型PrPである。プリオンの増殖は蛋白質レベルにおいての事象ととらえられ、異常型PrPが宿主内で発現している正常型PrPの高次構造を変化させることによって異常型が複製されると考えられている。正常型PrPは図①に示すようなドメイン構造を有する膜蛋白質であり、翻訳後

修飾を受ける。正常型PrPの生理的機能としては、いまだ決定的なものは同定されていない。異常型PrPの生化学的な特徴、すなわち、正常型との差異は蛋白質分解酵素に対する部分的な抵抗性であり、proteinase Kによる消化抵抗性が指標になっている。異常型は抵抗性が高く、抵抗性コアがウエスタンブロットで検出される(図②)。プロテアーゼ抵抗性と感染力価は必ずしも同義ではないことが近年示されているが、PrPの異常化の指標として広く利用されている。さらにプリオン病には株と干渉の概念が存在する。これらは異常型PrPの高次構造のバリエーションと考えられている。異常化は多量体化を含むPrPの高次構造変化であると考えられているが、株に加えて基質となる宿主のプリオン蛋白質遺伝子の多型との組み合わせにより、臨床像や病理像や潜伏期間などに多様性が生じる。

プリオン感染

ヒトプリオン病にはクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease : CJD)が含まれ、その罹患の経緯によって、感染性、家族性(遺伝性)、孤発型に分類されている。CJDは5類感染症で全数把握疾患に指定されており、1999年にCJDサーベイランス委員会が設立され、疾患発生の調査にあたっている。調査結果によると新規登録罹患患者数は年間100人前後であり、感染型CJDはその7.8%を占めている。比較的稀少な疾患ではあるものの、人獣共通感染症であり食の安全などの観点から社会的関心が高い。感染の拡大はこの感染因子を含む食物の摂取、感染者の血液や生体材料、とくに脳硬膜移植による感染例が指摘されている。わが国ではこの脳硬膜移植例が諸外国にくらべて多く、重大な問題点として指摘されている。通常滅菌操作によって感染力の低下がみられないことから、脳外科手術器具を介した感染の拡大が懸念されている。

以上のような背景のもと、異常型PrPの検出法の高感度化、プリオンの不活化法、試験管内での異常型PrP増幅法、MRIによる早期診断などの技術の進歩が注目、期待されている。治療に関してはquinacrineやpentosan polysulfateといった

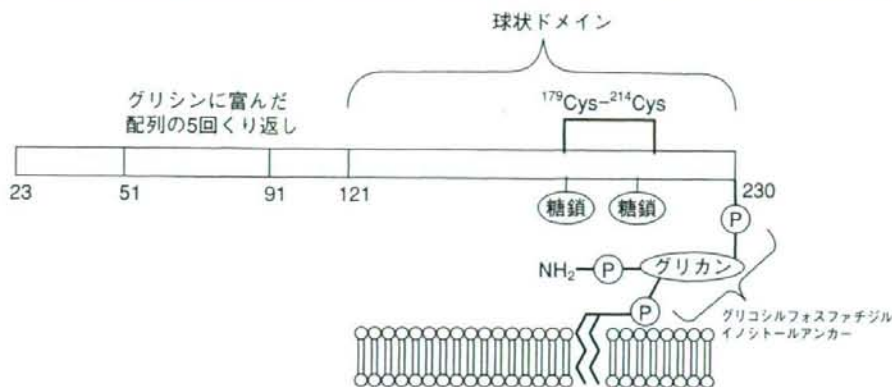


図1 プリオン蛋白質ドメイン構造の模式図

プリオン蛋白質はカルボキシ末端側に球状ドメインを有しており、1組のSS結合と2カ所の糖鎖修飾を受ける部位をもっている。翻訳後修飾によりグリコシルフォスファチジルイノシトール化を受け、細胞膜に係留される。図中の数字はアミノ酸残基番号を示し、アミノ末端側22残基は蛋白質成熟過程において除去される。Pはリン酸エステルを示す。

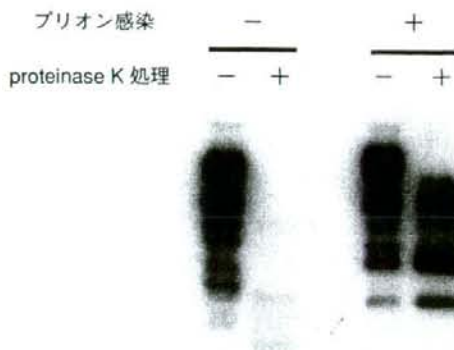


図2 持続性プリオン感染細胞を用いた異常型プリオン蛋白質の検出

抗プリオン蛋白質抗体で検出したウエスタンブロットを示す。プリオン感染していない細胞ではプリオン蛋白質は proteinase K により分解され検出されないが、プリオン感染細胞では蛋白質分解抵抗性のプリオン蛋白質のコアが検出される(一番右のレーン)。

まとめ

プリオン病は致死性の疾患である。感染因子プリオンはおもに異常型 PrP よりなると広く受け入れられている。正常型 PrP は宿主が発現しており、構造異性体である異常型 PrP よりなるプリオンの診断・感染防止・治療には、蛋白質性感染因子という特徴を念頭に置いた戦略が必要である。

(照屋健太/堂浦克美)

レビュー文献

- クロイツフェルト・ヤコブ病、スローウイルス感染とプリオン、山内一也、立石潤監修、近代出版、東京、1995
- 立石潤：PNE モノグラフ プリオンとプリオン病、共立出版、東京、1998
- 日詰正樹、篠原もえ子、八谷如美ほか：プリオン病、日本臨牀 65：1373-1459、2007

薬剤を用いた実験的治療が実施されているものの、根本的な治療には至っていない。

〔同義語〕

伝達性海綿状脳症病原体 (infectious agents of transmissible spongiform encephalopathy)
スクレイビー関連線維 (scrapie associated fibrils : SAF)

〔関連語〕

クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease : CJD)
クールー (Kuru)
スクレイビー (scrapie)
ウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy : BSE)
シカ慢性消耗病 (chronic wasting disease : CWD)

Amyloidophilic Compounds for Prion Diseases

Kenta Teruya,¹ Keiichi Kawagoe,² Tomohiro Kimura,¹ Chun-jen Chen,² Yuji Sakasegawa¹ and Katsumi Doh-ura^{*}

¹Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan, and ²Tokyo R & D Center, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan

Abstract: Recent outbreaks of variant Creutzfeldt-Jakob disease and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease have aroused great concern in many countries and have necessitated the development of suitable therapies. We have demonstrated that sulfated glycans such as pentosan polysulfate and fucoidan, and amyloidophilic compounds such as amyloid dye derivatives, styrylbenzazole derivatives, and phenylhydrazine derivatives have efficacies in prion-infected animals. Amyloidophilic compounds present potentialities not only as therapeutic candidates but also as prion amyloid imaging probes for use in nuclear medicine technology such as positron emission tomography. A representative of styrylbenzazole compounds has been used recently for clinical trials of brain prion amyloid imaging in patients. On the other hand, a representative of phenylhydrazine compounds, compB, displays excellent effectiveness in prolonging the incubation times of infected animals when given orally. However, both its anti-prion effectiveness *in vitro* and its therapeutic efficacy *in vivo* are consistently dependent on the prion strain. This prion-strain-dependency is similarly observed in other amyloidophilic compounds. Therefore, aside from further improvement of the safety profiles and pharmacokinetic properties of such compounds, elucidation and management in the mechanism of the prion strain-dependent effectiveness is necessary. Nevertheless, because compB studies suggest that amyloidophilic compounds are also therapeutic candidates for Alzheimer's disease, amyloidophilic compounds might be attractive as drug candidates for various conformational diseases and hasten development of therapeutic drugs for prion diseases.

Keywords: Sulfated glycan, amyloidophilic chemical, therapy, amyloid imaging, prion disease, Alzheimer's disease.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases are a group of fatal neurodegenerative disorders. They include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS) in humans, and scrapie, bovine spongiform encephalopathy, and chronic wasting disease in animals. These disorders are characterized by accumulation of an abnormally folded prion protein (PrP^{Sc}) in the central nervous system and the lymphoreticular system. This PrP^{Sc} is suggested to be the main component of prion or the prion itself and to be responsible for pathogenesis [1]. It is formed from the normal isoform of PrP (PrP^C) and contains more β -sheet composition in the secondary structure [2]; its accumulation is characterized by amyloid fibrils [3].

The mechanism of PrP^{Sc} formation from PrP^C remains controversial, but both the heterodimer formation [4] and seed-dependent polymerization [5] might be involved. Especially, enrollment of the seed-dependent polymerization is well supported by PrP^{Sc} amplification *in vitro* using the protein misfolding cyclic amplification method [6]. This mechanism is inferred also for formation of misfolded protein deposits observed in other conformational diseases such as amyloidosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease [7]. These misfolded protein deposits are well characterized as disease hallmarks detected by histochemical techniques and immunohistochemical techniques. Amyloid staining with amyloidophilic

chemicals such as Congo red and thioflavin S is a histochemical technique to detect those misfolded protein deposits in the tissues [8,9,10].

Recent outbreaks of acquired forms of prion diseases, such as variant CJD [11] through consumption of bovine-prion-contaminated foods and iatrogenic CJD [12] through use of cadaveric growth hormone or dura grafts, have necessitated the development of prophylactic and therapeutic interventions. Regarding the situation in Japan, 1072 cases of prion diseases were reported from April 1999 to February 2008; 75 of those cases (7.0%) had acquired prion diseases including one variant CJD and 74 dural iatrogenic CJD. Since the first case appeared in 1991, 132 cases of dural iatrogenic CJD have been recognized; many people remain at high-risk for dural iatrogenic CJD.

Pioneering studies for exploring therapeutic candidates using persistently prion-infected cells were done by Caughey and his colleagues [13,14]. They showed that Congo red and sulfated glycans inhibit PrP^{Sc} formation in prion-infected neuroblastoma cells. Following this discovery, Ingrosso and his colleagues [15] showed the potency of Congo red in prion-infected mice. Since the discovery of the therapeutic activity of Congo red, amyloidophilic chemicals such as amyloid dye derivatives and glucosaminoglycan mimetics have been recognized as one class of possible therapeutic candidates for prion diseases [16,17]. Herein, based on our findings, we review the usefulness and limitations of these chemicals as therapeutic candidates.

SULFATED GLYCANS AS GLYCOSAMINOGLYCAN MIMETICS

The PrP^C is characterized as a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface membrane protein [18]. Results

*Address correspondence to this author at the Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan; Tel: (+81)-22-717-8232, Fax: (+81)-22-717-7656; E-mail: doh-ura@mail.tains.tohoku.ac.jp

of earlier studies have suggested that PrPc binds to polyanionic compounds such as heparin, a highly sulfated glycosaminoglycan [14]. Along with this observation, immunohistochemical staining of the brain tissues from prion-infected hamsters and a patient with GSS revealed colocalization of sulfated glycosaminoglycans with abnormal PrP deposition presumably composed of PrPsc [19]. Thus, sulfated glycosaminoglycan mimetics such as sulfated glycans have been proposed to be drug candidates to inhibit the interaction between PrPc and PrPsc [13,14]. The first attempt to treat prion-infected animals with sulfated glycans such as dextran sulfate (Fig. 1a) and pentosan polysulfate (PPS) (Fig. 1b) was performed by Diringer and Ehlers [20]. The effectiveness of these sulfated glycans *in vivo*, however, was restricted to administration either before or soon after peripheral infection. Sulfated glycans injected intraperitoneally inhibit prion replication in the lymphoreticular system, which is involved in the delivery of prion from the gut to the brain [21,22]. Therefore, treatment with sulfated glycans was thought to be preventive only for those individuals with accidental inoculation in the periphery [23].

Fucoidan (Fig. 1c), a complex sulfated fucosylated polysaccharide, is a type of sulfated glycan that is abundantly present in foods that are consumed daily in Japan, such as seaweed. We previously reported delays of the disease onset in enterally prion-infected mice by oral ingestion of dietary seaweed fucoidan when given for 6 days after the infection, but not when given before the infection [24]. This effect reaches the maximum level at a concentration of 2.5% or less of fucoidan in feed. This effectiveness might result from some proportions of fucoidan that are absorbed from the gut into the blood [25], although little more is known of the detailed pharmacology of ingested fucoidan.

The sulfated glycans described above are such hydrophilic macromolecules that they penetrate only slightly into the brain, which is the main target organ of prion diseases. The blood-brain barrier (BBB) is an issue of utmost concern in the treatment of prion diseases because chemicals with large molecules or large electric charges have difficulty penetrating into the brain [26]. Aside from the BBB, the brain has barriers of two other types: the blood-cerebrospinal fluid barrier and the cerebrospinal fluid-brain barrier. Among them, the cerebrospinal fluid-brain barrier is the loosest: chemicals encountering difficulty in penetrating through the BBB can be expected to enter the brain parenchyma when injected into the cerebrospinal fluid spaces such as the cerebral ventricles.

That idea was verified through animal experiments [27] in which prion-infected mice treated with continuous PPS infusion into the cerebral ventricles survive remarkably longer than the non-treated prion-infected mice. Cerebroventricularly infused PPS suppresses abnormal PrP deposition as well as neurodegenerative changes and infectivity in the brain hemisphere of injection. On the opposite brain hemisphere, however, these are not well suppressed. The findings indicate the limitation of cerebroventricular administration treatment using large, strongly charged molecules. Cerebroventricular drug administration is an alternative treatment method to obviate the BBB hurdle, but drug

diffusion into the brain parenchyma remains vital for successful treatment.

Based on the animal experiments described above, a clinical approach with long-term cerebroventricular PPS administration has been carried out in more than 25 patients with various prion diseases [28]. Although its therapeutic efficacy remains to be confirmed, preliminary clinical experience indicates prolonged survival in several patients receiving long-term PPS [28,29,30]. Further prospective investigation of PPS administration is necessary to obtain high-quality evidence for its clinical benefits. However, this treatment has weaknesses, one of which has already been discussed. Another is the requirement for surgical implantation of a continuous infusion pump and a cerebroventricular catheter, which might come to obstruct extension of clinical trials because of the risks of prion contamination that are attendant with operating rooms and operation instruments.

AMYLOID DYE DERIVATIVES AND OTHER AMYLOIDOPHILIC CHEMICALS

As described earlier, Congo red (Fig. 1d) inhibits new formation of PrPsc in prion-infected cells and prolongs the incubation period of infected animals when administered prophylactically. Congo red binds to either PrPc or PrPsc and blocks the formation of PrPsc from PrPc [14,31]. However, Congo red can not be used as a therapeutic drug because of both its inability to cross the BBB and because of its teratogenic and carcinogenic properties. Since the discovery of Congo red, several structure-activity relationship studies of amyloid dye chemicals have been performed, but no promising candidates showing effectiveness *in vivo* were reported.

Recently, the most advanced progress with amyloidophilic compounds that readily permeate the BBB has been made in the field of diagnosis of Alzheimer's disease (AD) [32,33]. Many amyloidophilic chemicals have been developed as imaging probes to visualize amyloid deposits in the brains of AD patients using nuclear medicine technology such as positron emission tomography (PET) and single-photon emission computed tomography [34,35]. Some of these chemicals are also useful to portray abnormal PrP amyloid deposits in brain tissues affected by some prion diseases [36,37,38], which indicates that such amyloidophilic compounds are not disease-specific. Nevertheless, these chemicals are useful to evaluate amyloid deposits because anatomical distributions of pathological deposition differ among diseases. For example, A β plaques of AD are seldom observed in the cerebellum, although PrP amyloid plaques of GSS or variant CJD are abundantly observed there.

Figure 2 presents a diagram of hypothetical mechanism of therapeutic amyloidophilic chemicals. In a brain affected with prion disease or AD, it is suggested that normal protein molecules bind to abnormal protein seeds. They are subsequently converted into abnormal protein aggregates [5]. Thereafter, abnormal protein aggregates cause cell damage by unknown mechanisms. In the presence of amyloidophilic chemicals, they bind to normal protein molecules and abnormal protein seeds and stabilize them. Then, abnormal

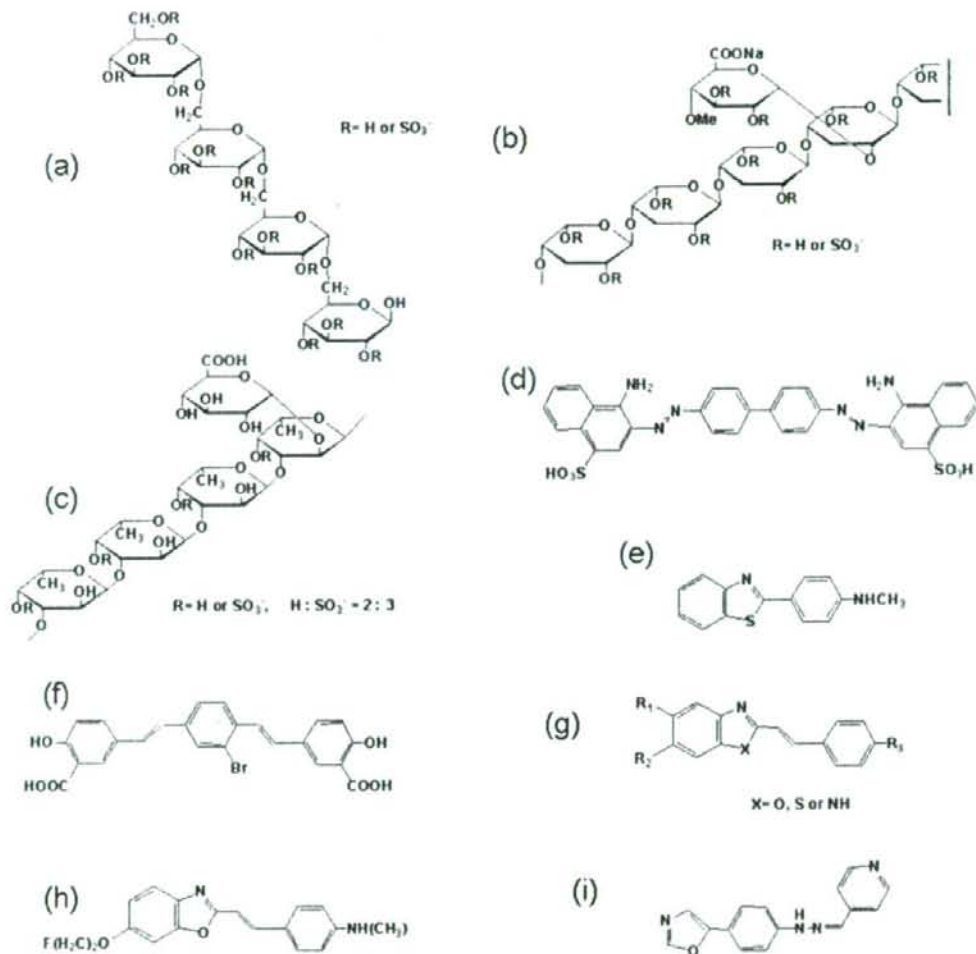


Fig. (1). Amyloidophilic compounds with therapeutic activities:

(a) dextran sulfate, (b) pentosan polysulfate, (c) fucoidan, (d) Congo red, (e) BTA-1, (f) BSB, (g) styrylbenzazole, (h) BF-168, and (i) compB.

protein aggregates are not produced, and no cell damage is caused. This context is also suggested in other conformational diseases [7]. Consequently, amyloidophilic chemicals might be applicable for therapy of the diseases.

BTA-1 AND BSB

To evaluate the applicability of recently developed amyloidophilic chemicals to therapeutic candidates for prion diseases, two candidate compounds were first examined: a thioflavin derivative, 2-[4'-(methylamino)phenyl] benzothiazole (BTA-1) [39] (Fig. 1e) and a Congo red derivative, (*trans, trans*)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl)-4-hydroxystyrylbenzene (BSB) [40] (Fig. 1f). Visualization of abnormal PrP deposition in the brain using BTA-1 or BSB was demonstrated using histopathological specimens from

prion disease patients. Both chemicals fluorescently labeled most of the compact PrP plaques in the cerebellar cortices of GSS patients [41]. In another experiment [42], BSB reactivity was observed with amyloid deposits in various amyloidotic conditions such as familial amyloidotic polyneuropathy, AA and AL amyloidosis, and dialysis-related amyloidosis.

Both compounds are potent in inhibiting PrP^{Sc} formation in neuroblastoma cells infected with the RML prion [41,43] (EC_{50} : 4 nM for BTA-1 and 1.4 μ M for BSB). However, neither chemical is effective in cells infected with the Fukuoka-1 prion or the 22L prion [41,44]. Treatment with an intravenous injection of BSB at 40 mg/kg body weight at day 45 and day 60 post-infection prolongs the incubation period

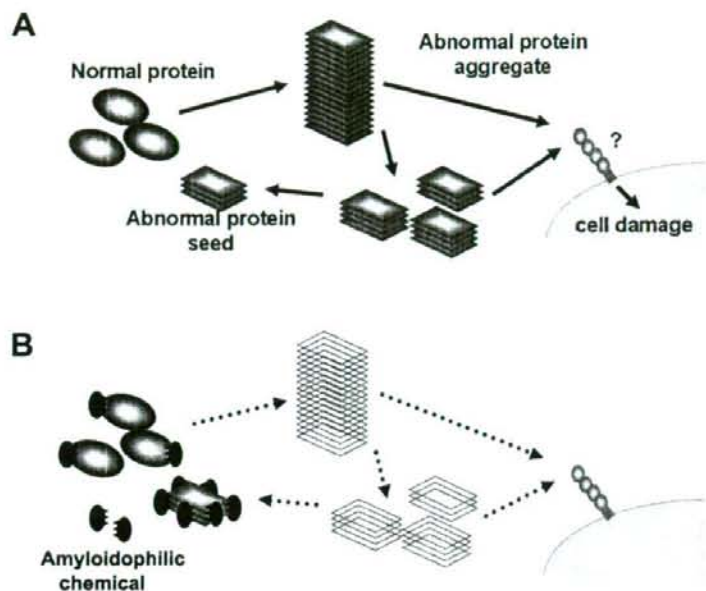


Fig. (2). Hypothetical mechanism of therapeutic amyloidophilic compounds.

A. Normal protein molecules bind to abnormal protein seeds. Then they are converted into abnormal protein aggregates. Thereafter, abnormal protein aggregates cause cell damage by unknown mechanisms.

B. In the presence of amyloidophilic compounds, they bind to normal protein molecules and abnormal protein seeds and stabilize them. Consequently, abnormal protein aggregates are not produced; no cell damage is caused.

of Tga20 mice [45] cerebrally infected with the RML prion by 13.6% (77.6 days in the BSB-treated group vs. 68.3 days in the vehicle control), although no significant prolongation is obtained from an identical treatment for Tg7 mice [46] infected with the 263K prion. Actually, BSB is less toxic than Congo red and is effective in prolonging the incubation period of the RML-infected Tga20 mice despite being introduced at a late stage of the infection. These characteristics suggest that these chemicals are candidates not only for use as imaging probes but also as therapeutic drugs for some prion diseases. Nevertheless, the chemicals have poor permeability into the brain.

STYRYLBENZOAZOLE DERIVATIVES

Most styrylbenzoazole derivatives (Fig. 1g) that have been tested display better permeability into the brain [47]. Some of them clearly label abnormal PrP aggregates in the brain specimens from human prion diseases. Most such chemicals inhibit abnormal PrP formation in RML prion-infected cells with EC_{50} values in the nanomolar range, indicating that they represent the most potent classes of inhibitor ever reported. Treatment with an intravenous injection of a representative chemical, 2-(5-(2-fluoroethoxy)benzo[d]oxazol-2-yl)vinyl)-N-methylbenzenamine (BF-168) (Fig. 1h), at 4 mg/kg body weight at days 28, 35, 42, and 49 post-infection prolongs the lives of mice that have been infected cerebrally with the RML prion by 8.4% (72.2 days in the BF-168-treated group vs. 66.6 days in the vehicle

control). However, BF-168 shows pathogen-dependent efficacy and no effects in mice infected with the 263K prion, similar to BSB.

Actually, BF-168 is excellent in wash-out from the brain as well as in permeability into the brain. Therefore, limited efficacy of BF-168 in prolonging the lives of prion-infected mice might be attributable to its prompt wash-out property. As might be expected, these properties of BF-168 are suitable for imaging probes rather than for therapeutic chemicals. In fact, one intravenous injection of BF-168 at 0.5 mg/kg body weight, which is a 20 times smaller dose than BSB used for *in vivo* PrP amyloid imaging, is sufficient to penetrate into the brain and bind to abnormal PrP aggregates *in vivo*. Clear PrP amyloid imaging by BF-168 is obtained one hour (at most) after injection, although 24 h is necessary for BSB to wash-out non-binding molecules from the brain.

Based on these findings, a clinical trial of brain PET imaging with BF-227, a BF-168 derivative, has been carried out in patients with prion diseases of various types. Although its diagnostic usefulness remains to be confirmed, preliminary experience indicates elevated uptake of the chemical in the brain of the patients with some prion diseases, such as GSS.

PHENYLHYDRAZINE DERIVATIVES

The efficacies of the chemicals described above are not remarkable. In fact, they are rather limited, possibly because

of the insufficiency of their persistence in the brain at sufficiently high concentrations to block PrPsc formation. Daily oral intake rather than several intravenous shots of a chemical are much easier and more suitable for maintaining elevated brain chemical levels, as long as the chemical is readily taken up into the brain when orally administered. Phenylhydrazine derivatives are potentially such orally available chemicals that have been newly developed (Table 1). One of them, 1-(4-(oxazol-5-yl)phenyl)-2-(pyridin-4-yl)methylenehydrazine (compB) (Fig. 1i), has been thoroughly tested for both its antiprion activity *in vitro* and its therapeutic efficacy *in vivo* [48].

This compound inhibits PrPsc formation in prion-infected neuroblastoma cells in a prion-strain-dependent manner similarly to amyloidophilic chemicals described above: effectively for RML prion and marginally for 22L prion and Fukuoka-1 prion. It extends the incubation period to 2.3 times that of the control when the highest dose (300 mg/kg/day) is given orally to cerebrally RML prion-infected mice from inoculation until the terminal stage of disease (Fig. 3). The compound exerts therapeutic efficacy in a prion

strain-dependent manner such as that observed in the cell culture study: most effective for RML prion, less effective for 22L prion or Fukuoka-1 prion, and marginally effective for 263K prion. Its effectiveness depends on an early start of administration. The glycoform pattern of PrPsc in treated mice is modified and shows predominance of the diglycosylated form resembling that of 263K prion, suggesting that diglycosylated forms of PrPsc might be least sensitive or resistant to the compound.

Phenylhydrazine derivatives described here were originally designed as lead chemicals for either the amyloid imaging probes or the therapeutic drugs of AD [49]. In fact, radio-labeled compB administered intravenously easily penetrates into the brain and binds to A β deposits (senile plaques) in the brain of AD model mice modified from Tg2576 [50] (Fig. 4). In addition, compB and other phenylhydrazine chemicals are very effective *in vitro* in inhibiting either A β amyloid formation or A β amyloid-heparin binding [49,51] (Table 1). Moreover, preliminary studies have demonstrated that compB has inhibitory efficacy for A β deposition in AD model mice [51].

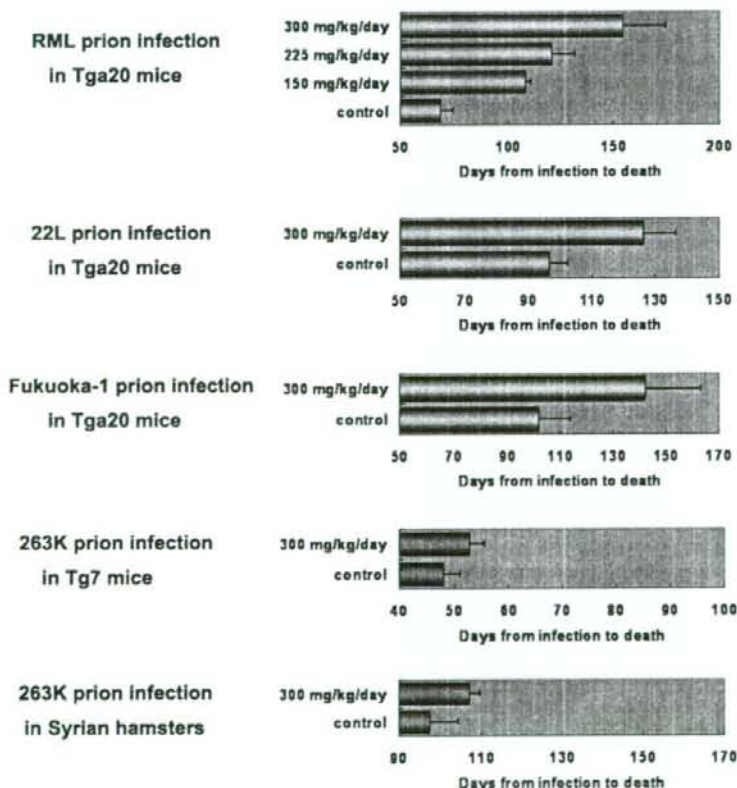


Fig. (3). Therapeutic effects of compB in prion disease mouse models.

Treatment with oral compB administration commences immediately after the cerebral infection and continues to the terminal stage of disease.