

200936005A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 堂浦 克美

平成22年(2010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 1
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)

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 13
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 抗プリオン活性をもつアミロイド親和性化合物に関する研究 16
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 抗プリオン作用を持つ生薬類の探索 19
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 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に関する研究 21
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- 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 24
堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)
- カクテル療法を目指した抗プリオン化合物の開発に関する研究 27
片 岡 泰 文 (福岡大学薬学部)
- 異常型プリオン蛋白検出プローブの開発に関する研究 30
工 藤 幸 司 (東北大学未来医工学治療開発センター)
- プリオン病に対する体内埋め込み型微量注入器具を用いたペントサン
ポリサルフェート脳室内持続投与療法に関する研究 41
坪 井 義 夫 (福岡大学医学部)

プリオン病治療過程における蛋白重合度変化と病態への関与の解析 佐々木健介（九州大学大学院医学研究院）	．．．． 44
骨髄由来間葉系幹細胞の末梢投与によるプリオン病治療効果の検討 堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）	．．．． 48
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）	．．．． 57
Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表	．．．． 63
Ⅳ．研究成果の刊行物・印刷	．．．． 69

総括研究報告

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 21 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、治療効果判定のための蛋白生化学的な定量的解析とその妥当性評価を進めた。主な成果として、副作用である硬膜下水腫が生じる時期や脳委縮との関係を明らかにした。また、プリオン蛋白オリゴマーの評価が、治療効果判定に役立つことを *ex vivo* 系でも確認した。

（２）については、優れた治療予防薬候補である糖誘導体の安全性試験・動態試験、抗プリオン活性を発揮する各種アミロイド親和性化合物の特徴解析、抗プリオン活性を発揮する生薬の薬効成分解析、治療薬開発の新たな標的因子の探索、プリオン蛋白異常化とヒートショック蛋白質の関係解析、プリオン蛋白 siRNA の最適化、幹細胞移植療法の作用機序解析について研究を進めた。主な成果として、糖誘導体の安全性を確認し、治療効果発現と密接に関係する組織所見を明らかにした。また、新たな抗プリオン活性をもつ化合物としてシンナミック酸誘導体を発見し、新たな創薬標的因子候補として LRP1 と Hevin を発見した。さらに、末梢投与した骨髄由来間葉系幹細胞が脳内に移行するメカニズムを明らかにし、脳内で神経細胞保護因子を産生することにより罹患動物で延命効果があることを示した。

（３）については、 $[^{11}\text{C}]$ BF-227 による PET の探索的臨床研究、近赤外線蛍光プローブの最適化研究、髄液を用いた診断技術の開発を進めた。主な成果として、 $[^{11}\text{C}]$ BF-227PET の GSS 患者における有用性を改めて確認した。また、新たな基本化学構造をもつ近赤外線蛍光プローブとして THK-8XY を開発した。さらに、MMP-9/TIMP-1 比の鑑別診断マーカーとしての有用性を明らかにし、高感度・高特異度である 14-3-3 蛋白 ELISA キットを開発した。

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
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科・教授
佐藤 克也	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師

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有者の存在を背景に、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、治療や診断技術において患者に直接還元できる成果を目指した。

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

これまでに引き続き坪井は、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。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るとともに、プリオン持続感染細胞を用いて治療効果とプリオン蛋白オリゴマーとの関係を解析した。

(2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

堂浦は糖誘導体の皮下投与による安全性について、昨年度不明であった毒性所見の休薬後の回復性について検討するとともに、長期間にわたる動態試験を実施して糖誘導体の組織分布と消失半減期を調べた。また、糖誘導体の薬理作用について培養細胞を用いた解析を進め、抗プリオン作用を発揮する実行因子の探索研究に取り組んだ。

また、堂浦は抗プリオン活性を発揮する各種アミロイド親和性化合物について、共通する特徴を抽出する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成分の同定を行った。また、

プリオン蛋白の異常化におけるシャペロン蛋白の機能について *in vitro* で解析を行った。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因子の同定研究を行い、プリオン複製増殖における役割の解明に取り組んだ。

片岡は引き続き脳内移行型 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。

堀内は引き続き骨髄由来間葉系幹細胞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い、作用機序に関して検討した。

(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プリオンアミロイド・イメージング 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応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。

佐藤は髄液を用いた早期診断法・病態診断法の開発を行った。また、髄液診断法として既に報告のある 14-3-3 蛋白検出法に関して、より高感度・高特異度を持つ検出法の開発を行った。

(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開始された。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因子要因について例年通りの分析を行い、

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おり、投与開始3カ月以降に出現することを確認した。

- ・ 病理学的な治療効果の評価では、PPS療法を受けた剖検例でプリオン蛋白オリゴマー形成が抑制されていることを既に明らかにしているが、プリオン感染細胞を用いた研究でも治療効果発現とプリオン蛋白オリゴマー形成抑制が密接に関係していることを確認した。

(2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

- ・ 末梢投与において優れた治療予防効果を発揮する糖誘導体について、昨年度の検討で回復性が不明であった毒性所見について、改めてハムスターとビーグル犬で回復性を調べたところ、血液学的毒性所見は休薬により正常に回復する一過性のものであることが明らかとなった。一方、組織学的な変化である泡沫状マクロファージの出現は、血液学的毒性所見とは異なり休薬後の消失や減少は明らかではなかった。糖誘導体は組織中のマクロファージにどん食されて長期間にわたり組織に滞留し、少しずつ分解されることが示唆された。また、この泡沫状マクロファージの出現は糖誘導体の効果発現と密接に関係していることが示唆された。一方、糖誘導体の作用機序解明に取り組み、細胞培養系で作用因子の絞込みを行い、約300個の候補因子を得た。
- ・ 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、シナミック酸誘導体が活性成分として含まれていることを明らかにした。
- ・ 各種アミロイド親和性化合物について、プリオン産生阻害能とA β アミロイド形成阻害能の比較を行ったが、両

者に相関は見られないことより、阻害能は蛋白質の一次構造の影響を受けることが示唆された。また、アミロイド親和性化合物のスクリーニング過程で、N167感染細胞でプリオンと複合体形成を促進する一方で、RML感染細胞ではプリオン産生抑制する化合物プレムリンを発見した。

- ・ 治療薬開発の標的候補となるプリオン産生に関連する宿主因子として、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 LRP1 を同定し、その機能阻害タンパク質 RAP の効果を確認した。また、プリオン産生速度の異なる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、新規ターゲットとして Hevin を発見した。
- ・ Hsp90 が示すプリオン蛋白の構造変換活性は、銅イオンとヌクレオチドによって機能制御を受ける可能性を示した。
- ・ 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を昨年度報告したが、種々の改良を試みたにもかかわらず効果を回復させることはできなかった。
- ・ プリオン感染動物において、間葉系幹細胞の末梢静脈内投与において治療効果を発揮することを確認し、同細胞の中樞神経系への移行のメカニズムとして罹患脳で産生される CCL3、CCL5、IL-1 β 、TNF α などが関与していることが示唆された。また、同細胞の効果として同細胞が産生する神経保護作用因子群が関与していることが示唆された。

(3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

- ・ 改めてGSS症例でBF-227化合物を用いた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、新たな基本化学構造をもつ化合物THK-8XYを発見した。このTHK-8XY、昨年度発見したTHK-265、18F標識PETプローブであるFACTのいずれの化合物もプリオンアミロイドに結合することが確認された。

- ・ 昨年度報告したMMP-9、TIMP-1について、さらに詳細に検討を重ねたところ、MMP-9/TIMP-1比は脳炎・髄膜炎・アルツハイマー型認知症では優位に高く、CJDでは低値を示し、鑑別診断に有用であることが明らかとなった。
- ・ プリオン病の診断基準のひとつである髄液14-3-3蛋白検出法の開発を行い、ELISAキットを作製した。同キットを用いると、プリオン病患者112症例の検討では感度は84.4%、特異度は98.6%であった。

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治療例のフォローアップを行ない、これまでの分析結果を改めて確認した。臨床的にPPS療法の有効性や安全性を評価するには、患者の経過を長期間フォローアップする必要がある、プリオン病の多彩な病型に対して症例数が少ないこともあり、過去の未治療例との比較で有効性を判断せざるを得ない状況であり、臨床的にPPS療法の改良点を模索することまでは困難であった。また、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・生化学検査法・神経学的評価法等を駆使しても適切に治療効果を評価するのは困難であり、何らかの鋭敏で絶対的な病勢診断マーカーの開発が必要であるが、本研究班でこれまでに開発した新規診断技術で満足に病勢診断ができるかどうかは、今後の検討課題である。

- ・ 昨年度の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。今年度、プリオン感染細胞を用いた研究より治療効果とプリオン蛋白オリゴマー形成阻害がパラレルであることが示され、PPS治療の有効性が改めて生化学的に確認できた。病型や症例の個体差によるバリエティを考慮すると、さらに症例数を重ねてこの新たな知見を確認するのが望ましい。

(2) 新規治療候補薬の実用化準備と新規治療開発

- ・ 末梢からの投与で著明な治療予防効果を発揮する糖誘導体の投与により生じる毒性変化のうち、血液学的変化は休薬後に一定期間を経た後に正常に復することが明らかとなった。また、貧血などの血算検査異常は免疫抑制剤の併用で抑えられることも明らかとなった。これらの結果は、糖誘導体の実用化が全く不可能でないことを示している。また、糖誘導体の効果は年単位に及ぶため、これらの毒性変化は作用機序と直接結びついているとは考えられない。むしろ、長期間にわたり観察される組織学的な所見(泡沫状マクロファージの存在)が効果発現に関連している可能性がある。糖誘導体の効果の発現に、毒性変化発現の機序が関与しているのかどうかを明らかにし、毒性が生じないように糖誘導体を最適化する必要がある。
- ・ 高い抗プリオン活性を有する生薬成分の精製に成功し、成分の一つがシナミック酸誘導体であることを発見した。今後は *in vivo* での有効性を検証しつつ、化合物の最適化が必要がある。
- ・ プリオンの産生に関与している宿主因子として LRP1 と Hevin を新たに発見した。前者に関しては、関与の特異

性を確認済みであるが、後者に関しては未確認であり、今後の宿題である。さらに、これらが創薬の新たなターゲットとなり得るかどうかを検討する必要がある。

- これまでの研究で、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可能性が示唆されているが、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。
- 脳移行型としてデザインした RVG-9R 結合型 siRNA が、異常型プリオン蛋白産生阻害効果を発揮できないことが明らかとなったが、その原因についてさらに研究を進め改善点を見出す必要がある。
- 抗プリオン活性を持つアミロイド親和性化合物の解析から、活性の発現にはタンパク質の一次構造も関与していることが示唆された。一方、プリオン株により抗プリオン活性の発現に差が見られることが改めてプリムリンの例で示された。この差が何に起因するものであるのかを解明することは、プリオン株に依存しないプリオン病治療薬の開発には必要不可欠である。
- *in vivo* で効果が見られた末梢投与による間葉系幹細胞を用いた新規治療開発は、将来に明るい展望をもたらす成果といえる。より効果が期待できる幹細胞の選択や投与方法等の最適化を検討する必要がある。

(3) 新規診断技術の評価と次世代診断技術の開発

- BF227-PETの探索的臨床研究ではGSS症例でその診断有用性を改めて確認したものの、CJD症例では無効であり、またGSSやCJD以外の病型での診断有用性は不明である。特に、脳内にプリ

オンアミロイド沈着を伴う病型において継時的な解析を行い、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新たな基本化学構造を有する化合物が得られたが、今後さらに安全性や脳移行性も踏まえた最適化を行い、3-5年後には探索的臨床研究を実施する。
- MMP-9/TIMP-1比は、単独では早期診断に期待できないが、他の診断マーカー（Tau蛋白、14-3-3蛋白等）と組み合わせることで、臨床早期に類似疾患との鑑別が可能となる。また、新たに開発した14-3-3蛋白ELISAキットは、単独でも優れた感度と特異度を持っており、MMP-9/TIMP-1比やTau蛋白検査と組み合わせることで、診断の特異度や感度が格段に向上することが期待できる。今後は、様々な病型での特異度や感度を検討するとともに、発病からの経時的変動についても症例数を重ねて検討することで、病勢診断のツールとしても期待できるかどうかを明らかにする必要がある。

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 療法実施例をフォローアップし、PPS 療法の有用性と問題点を改めて確認した。
- PPS 療法実施例の脳で観察されたプリオン蛋白オリゴマー形成阻害について、治療効果を反映していることを *ex vivo* 系で示した。

(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糖誘導体の血液学的毒性変化は回復することを示した。
- 糖誘導体投与で出現する組織所見が、効果の発現に関連することを明らかにした。

- ・優れた抗プリオン活性を持つ生薬エキスの成分を同定した。
- ・抗プリオン活性を持つアミロイド親和性化合物の特徴を明らかにした。
- ・新たな創薬標的候補を発見した。また、プリオン蛋白の構造変換に必要なシヤペロンの条件を明らかにした。
- ・探索的研究として siRNA や幹細胞を利用した治療開発に取り組み、間葉系幹細胞の効果発現メカニズムを明らかにした。

(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 (BF227-PET) の有用性を GSS 症例で改めて確認した。
- ・新たな診断薬として近赤外線蛍光プローブの最適化研究を継続した。
- ・診断を助けるマーカーとして MMP-9/TIMP-1 比の意義を明らかにした。
- ・高感度・高特異度な 14-3-3 蛋白 ELISA キットを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. FEBS Lett. 584(6):1193-8, 2010

Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37(5):934-41, 2010

Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K,

Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K: Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. Acta Neurol Scand. 121(2):127-30, 2010

Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. Neuropathology. 29(5):632-6, 2009

Nomura S, Miyasho T, Maeda N, Doh-ura K, Yokota H: Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy. Proteomics. 9(16):4029-35, 2009

Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y: Lipopolysaccharide-Activated Microglia Induce Dysfunction of the Blood-Brain Barrier in Rat Microvascular Endothelial Cells Co-Cultured with Microglia. Cell Mol Neurobiol 30(2) : 247-253, 2009

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 29 :309-16, 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 449:71-5, 2009
- Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Neurol Sci. 285. 100-105. 2009
- Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins in vitro and in vivo. J Neurochem. 1009. 1648-1657. 2009
- Okamura N, Fodero-Tavoletti MT, Kudo Y, Rowe CC, Furumoto S, Arai H, Masters CL, Yanai K, Villemagne VL: Advances in molecular imaging for the diagnosis of dementia. Expert Opin. Med. Diagn. 3. 705-716. 2009
- Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, Kudo Y, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL: In vitro characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. Eur J Pharmacol. 617. 54-58. 2009
- Minaki H, Sasaki K, Honda H, Iwaki T: Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns. Neuropathology 29 (5): 536-542, 2009
- Sasaki K, Minaki H, Iwaki T: Development of oligomeric prion-protein aggregates in a mouse model of prion disease. J Pathol 219 (1): 123-130, 2009
- Matsui Y, Tanizaki Y, Arima H, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, Sasaki K, Iida M, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y: Incidence and survival of dementia in a general population of Japanese elderly: the Hisayama Study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80 (4): 366-370, 2009
- 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, 83:3852-3860, 2009.
- Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M: Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. J Virol, 83: 5918-5927, 2009.
- Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M.: Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. Virology, 394: 200-207, 2009
- Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M: Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. J Gen Virol, 91 (Pt2) : 563-569, 2009
- Satoh K, et al: Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of the cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. Lab Invest, in press
- Mutsukura K, Satoh K, et al: Familial

- Creutzfeldt-Jakob disease with the V180I mutation: comparative analysis with pathological findings and diffusion-weighted images. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 28(6):550-7, 2009
- 照屋健太、堂浦克美：最新事情 プリオン病のメカニズムと治療戦略。 *メディカルバイオ* 7:48-55, 2010
- 堂浦克美：プリオン病の治療予防開発。 *臨床神経学* 49:946-8, 2009
- 工藤幸司：アミロイドーシスの分子イメージング。 *医学のあゆみ*. In”アミロイドーシス UPDATE” 企画 山田正仁. 299 巻. 第 5 号 p 430-435. 2009 年. 医歯薬出版、東京
2. 学会発表
- Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. Prion 2009, Thessaloniki, September 23-25, 2009
- Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Nakagawa S, Shuto H, Yamauchi A, Niwa M, 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. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference, Sendai, Nov., 2009
- Takata F, Dohgu S, Wakigawa T, Harada E, Matsumoto K, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y: Activated protein C inhibits TNF- α -induced MMP-9 production in the brain pericytes. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference, Sendai, Nov., 2009
- Takata F, Dohgu S, Wakigawa T, Matsumoto J, Harada E, Matsumoto K, Yamauchi A, Kataoka Y: TNF- α stimulates MMP-9 secretion in the brain pericytes by activating ERK1/2, JNK and PI3 kinase signaling pathway. 12th international symposium, Signaling at Blood-Brain and Blood Retinal Barriers, London, 2009
- Dohgu S, Takata F, Obara T, Yamauchi A, Kataoka Y: Increased blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein in high fat diet-induced obese mice with impaired glucose tolerance: A comparison study among ICR, C57BL/6J, and db/db mice. 12th international symposium, Signaling at Blood-Brain and Blood Retinal Barriers, London, 2009
- Nishioku T, Sumi N, Dohgu S, Takata F, Machida T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y: Activation of Microglia and Migration of Brain Pericytes are Involved in Disruption of the Blood-brain Barrier Caused by Lipopolysaccharide. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), Kyoto, Nov, 2009
- Yamauchi A, Toyoda M, Nakagama K, Fujimoto K, Sejima E, Shuto H, Kataoka Y: Effect of Olanzapine on Glucose Transport System in 3T3-L1 Adipocytes. The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), Kyoto, Nov, 2009
- Sugi. K, Okamura. N, Furumoto. S, Tashiro. M, Furukawa. K, Funaki. Y, Arai. H, Kudo. Y, Iwata. R, Yanai. K: [18F]FACT PET is Useful for Noninvasive Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. Barcelona, Oct 9-14, 2009
- Okamura N, Furumoto S, Tashiro M,

- Funaki Y, Kikuchi A, Shiga Y, Furukawa K, Arai H, Doh-ura K, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: [11C]BF-227 PET Study in Protein Conformational Diseases. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. Barcelona, Oct 9-14, 2009
- Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: PET imaging for mild cognitive impairment with FDG and beta-amyloid tracer, 11C-BF-227. International Conference on Alzheimer's Disease (Imaging Consortium). Vienna, July 11-16, 2009
- Arai H, Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Yaegashi N, Kase Y: A traditional medicinal herb Paeonia suffruticosa and its active constituent 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and vivo. International Conference on Alzheimer's Disease. Vienna, July 11-16, 2009
- Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: PET imaging for mild cognitive impairment with FDG and beta-amyloid tracer, 11C-BF-227. International Conference on Alzheimer's Disease. Vienna, July 11-16, 2009
- Okamura N, Kikuchi A, Takeda A, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Noninvasive Detection of α -synuclein Deposits In Human Brain Using [11C]BF-227 PET. International Conference on Alzheimer's Disease. Vienna, July 11-16, 2009
- Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M: Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M: Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M.: Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- Horiuchi M: Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, Oct. 30, 2009.
- 堂浦克美:プリオン病治療薬開発の現状。第28回日本認知症学会学術集会、仙台、2009年11月21日
- 堂浦克美:ヤコブ病研究 治療・発症機序。第3回食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座、名古屋、2009年10月31日
- Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. 2009年プリオン研究会、宮城、2009年8月29、30日
- 逆瀬川裕二、西澤桂子、高橋智子、小熊歩、木村朋寛、堂浦克美:プリオン持続感染に関与する宿主内因子の探索。2009年プリオン研究会、宮城、2009年

8月29、30日

堂浦克美: プリオン病への治療予防開発.
第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月22日

工藤幸司: タウイメーシング. 第28回日本認知症学会(シンポジウム)、仙台、2009年11月20日~11月22日

岡村信行、古本祥三、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: 神経原線維変化を検出する18F標識PETプローブの開発. 第28回日本認知症学会、仙台、2009年11月20日~11月22日

藁谷正明、岡村信行、古川勝敏、谷内一彦、工藤幸司、荒井啓行: 軽度認知障害の予後予測におけるBF227-PETとMRIの比較検討. 第28回日本認知症学会、仙台、2009年11月20日~11月22日

岡村信行、古本祥三、杉健太郎、谷内一彦、田代学、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司: アミロイドイメーシング用プローブ[18F]FACTのアルツハイマー病早期診断における有用性の検討. 第16回東北脳循環カンファレンス、仙台、2009年11月28日

古本祥三、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦: ポジトロン標識アミロイド画像化プローブの開発研究. 第37回薬物活性シンポジウム、仙台、2009年10月9日

杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、鷺野谷利幸、工藤幸司、谷内一彦: [11C]BF227-PETによるアルツハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 第49回日本核医学会学術総会、旭川、2009年10月1日~3日

岡村信行、古本祥三、田代学、古川勝敏、杉健太郎、船木善仁、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦: アルツハイマー病診断における[18F]FACT-PETの有用性の検討. 第49回日本核医学会学術総会、旭川、2009年10月1日~3日

工藤幸司、福田順也: タウイメーシングによるアルツハイマー病診断. 東北大学イノベーションフェア2009 in 仙台、仙台、2009年10月14日

岡村信行、工藤幸司: PETを用いたアルツハイマー病の超早期診断法の確立と普及について. 第15回サイプリス交流会、東京、2009年8月27日

杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、工藤幸司、谷内一彦: [11C]BF227を用いたアルツハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 日本分子イメージング学会第4回総会・学術集会、千葉、2009年5月14日・15日

工藤幸司: アルツハイマー病診断のTR(トランスレーショナルリサーチ). 東北大学橋渡し研究支援推進プログラム. 4回基盤整備進捗会議・シーズ進捗会議、仙台、2009年4月20日

杉健太郎、岡村信行、古本祥三、加藤元久、森雅憲、田代学、岩田錬、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦: [11C]BF-227-PETを用いた軽度認知障害段階でのアルツハイマー病の早期診断. 82回日本薬理学会年会、横浜、2009年3月16日~18日

森雅憲、岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦: 近赤外線蛍光プローブX50による脳内アミロイドの検出. 第82回日本薬理学会年会、横浜、2009年3月16日~18日

工藤幸司: タウイメーシングによるアルツハイマー病診断. 内閣府主催 第3回ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会、東京、平成21年1月28日

尾畑十善、坪井義夫、井上展聡、馬場康彦、山田達夫: 左手失行と半側空間無視を呈した一側性Creutzfeldt-Jakob病(CJD)の1例. 第185回日本神経学会九州地方会. 福岡、2009年3月28日

石原健司、菊池雷太、山崎貴博、杉江正行、河村 満、坪井義夫、佐々木健介、

中野今治：人工硬膜移植 25 年後に発症しペントサン硫酸治療を受けた C J D 剖検例。第 50 回日本神経病理学会総会。高松。2009 年 6 月 4-6 日

佐々木健介、岩城徹：多彩なプリオン蛋白沈着パターンを示した MM1+2 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の剖検例。第 50 回日本神経病理学会。高松。2009 年 6 月

本田裕之、皆木晴彦、柴野智子、佐々木健介、岩城徹：ペントサンポリ硫酸治療症例におけるプリオン蛋白重合度変化の解析。第 50 回日本神経病理学会。高松。2009 年 6 月

柴野智子、佐々木健介、皆木晴彦、岩城徹：プリオン持続感染細胞株におけるプリオン蛋白重合度の解析。第 50 回日本神経病理学会。高松。2009 年 6 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 50 回日本神経病理学会。高松。2009 年 6 月
六倉和生、佐藤克也、江口勝美、調 漸、長郷国彦、岸田日帯、黒岩義之、三條伸夫、水澤英洋：クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) における血液脳関門 (BBB) についての検討。第 50 回日本神経学会総会、仙台、2009 年 5 月 20-22 日

佐藤克也、調 漸、六倉和生、江口勝美、新 竜一郎、西田教行：CJD 患者における髄液中の異常プリオン蛋白の検出。第 50 回日本神経学会総会、仙台、2009 年 5 月 20-22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

北本哲之、堂浦克美、他：変異タンパク質の製造方法。特願 2009-180098、2009 年 7 月 31 日、東北大学、株式会社ベネシス

工藤幸司、古本祥三、岡村信行：ベンゾキサゾール誘導体。PCT/JP2007/063350、2009 年 7 月 4 日、東北大学

工藤幸司、古本祥三、岡村信行：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。特願 2007-176366、2009 年 7 月 4 日、東北大学

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、河田 真樹、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糖誘導体について、安全性試験と動態試験を実施した。昨年度の検討で回復性が明らかでなかった毒性所見について、改めてハムスターとビーグル犬で回復性を調べたところ、血液学的毒性所見は休薬により正常に回復する一過性のものであることが明らかとなった。一方、組織学的な変化である泡沫状マクロファージの出現は、血液学的毒性所見とは異なり休薬後の消失や減少は明らかではなかった。糖誘導体は組織中のマクロファージにどん食されて長期間にわたり組織に滞留し、少しずつ分解されることが示唆された。また、この泡沫状マクロファージの出現は糖誘導体の効果発現と密接に関係していることが示唆された。

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糖誘導体について前臨床試験として安全性と体内動態について検討した。

B. 研究方法

ハムスターにおける単回投与後2ヶ月回復試験

糖誘導体をハムスターの皮下に4g/kg単回投与後、1週毎に血清生化学検査と血算検査を実施した。また、投与後0.5ヶ月目と2ヶ月目に組織検査を実施した。

ビーグル犬における2ヶ月投与後6ヶ月回復試験

糖誘導体液(50mg/ml) 40~70ml/回を2回/週の割合で2ヶ月間にわたり皮下投与(総投与量4.5g/kg)した。投与終了時より0.5ヶ月、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月目に血清生化学および血算検査を実施した。

毒性現象に対する免疫抑制薬の効果検討
糖誘導体投与による泡沫状マクロファージの出現、血清脂質低下や貧血に対する、

免疫抑制薬(リンデロン、プログラフ)投与の影響を検討した。糖誘導体をハムスターの皮下に4g/kgを単回投与後、2週間にわたりリンデロン(160ng/g体重/day)やプログラフ(100ng/g体重/day)を投与し、投与終了後に血清生化学検査、血算検査、組織検査を実施した。

長期体内動態試験

放射性同位元素で標識した糖誘導をマウスの皮下に50mg/body単回投与後の全身組織内分布を6ヶ月間にわたり定量全身オートラジオグラムにより検討した。また、投与6ヶ月目の皮膚、肝臓、顎下腺および腎臓のホモジネート上清をHPLC分析して、標識した糖誘導体の分子量分布を調べた。

(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

ハムスターにおける単回投与後2ヶ月回復試験

血清生化学検査と血算検査では、投与後2週目まで軽度の貧血と軽度の血清脂質（総コレステロール・中性脂肪・リン脂質）低下が見られたが、その後は正常に復した。一方、組織検査ではリンパ網内系、副腎、脳脈絡叢等に泡沫状マクロファージを散在性に認め、投与後0.5ヶ月目と2ヵ月目で差はなかった。

ビーグル犬における2ヶ月投与後6ヶ月回復試験

同一部位への反復投与にもかかわらず、投与部位の固結・変色・圧痛を認めなかった。血清生化学検査と血算検査では、0.5ヶ月、1ヶ月目に中性脂肪の軽度低下を認める以外は正常であった。

毒性現象に対する免疫抑制薬の効果検討
ステロイドや免疫抑制剤の投与では、貧血は改善されたが、泡沫状マクロファージの出現や血清脂質の低下は改善されなかった。

長期体内動態試験

投与後2週目では、副腎皮質に最も高い放射能が認められ、血液の1.3倍であった。つぎにリンパ液、皮膚および顎下腺に高く、血液の7~6倍が認められた。膀胱、胃、脾臓、甲状腺、脳脊髄液、下垂体、膵臓、ハーダー腺、骨髄、肝臓、褐色脂肪、精巣、心臓および副腎髄質は血液の5~1.5倍であり、他の組織は血液と同程度か血液より低かった。いずれの組織も消失は緩慢であり、組織内放射能濃度の消失半減期は、精巣上体、骨格筋、副腎皮質、腸内容物、胃内容物、副腎髄質、脳および精巣では450日~300日であった。

一方、皮下投与後6ヵ月目のマウスにおける皮膚、肝臓、顎下腺および腎臓のホモジネート上清をHPLC分析したところ、いずれの組織とも投与した糖誘導体の溶出時間8.9分よりも早い溶出時間7.5分から8.0分にかけてピークトップを示した。このことは、糖誘導体が組織中で低分子化されていることを示している。

D. 考察

昨年度の検討で、糖誘導体の2週間皮下投与に続く2週間の休薬では、血清生化学検査や血算検査で観察された異常所見の回復性は明らかではなかった。今回、改めてハムスターとビーグル犬で回復試験を実施したところ、これらの異常所見の回復が観察されたことより、これらの所見は休薬により時間が経過すれば正常に回復する一過性の毒性変化であることが明らかとなった。

一方、組織学的な変化である泡沫状マクロファージの出現は、血液学的毒性変化とは異なり休薬後の消失や減少は明らかではなかった。また、放射性同位元素で標識した糖誘導体を用いた動態試験では、組織により消失のスピードは異なるものの主な組織では消失の半減期は単回投与後450日~300日と極めて長期間であることが判明した。泡沫状マクロファージの出現頻度と標識糖誘導体の組織分布がほぼ相関していることより、糖誘導体はマクロファージにどん食されて長期間にわたり組織に滞留し、マクロファージ内で少しずつ分解されることが推察される。

毒性所見の出現に免疫系が関与している可能性を、免疫抑制剤投与を行い調べた結果では、血算検査の異常所見のみが改善され、他の毒性変化は影響を受けなかったことより、血清脂質の低下や泡沫状マクロファージの出現は免疫系とは関係がないことが示唆された。

また、糖誘導体の効果は単回投与でも年単位にわたるものであること、その効果は免疫抑制剤により影響を受けないことを考え合わせると、糖誘導体の効果の発現は、血液学的異常や血清脂質異常の結果ではないと考えられる。むしろ、泡沫状マクロファージの出現と密接に関係しており、泡沫状マクロファージが抗ブリオン活性因子の産生に関与していると考えられるが、その詳細については今後解明すべき課題である。

E. 結論

治療予防薬候補である糖誘導体の安全性試験と動態試験を実施し、血液学的毒性所見は一過性であるものの、泡沫状マクロファージが出現する組織学的所見は長期間変化がないことが判明した。この泡沫状マクロファージの出現と治療効果が密接に関係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

1. 論文発表

Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 584(6):1193-8, 2010

Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [¹¹C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 37(5):934-41, 2010

Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K: Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand.* 121(2):127-30, 2010

Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology.* 29(5):632-6, 2009

Nomura S, Miyasho T, Maeda N, Doh-ura K, Yokota H: Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera

of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Proteomics.*

9(16):4029-35, 2009

照屋健太、堂浦克美:最新事情 プリオン病のメカニズムと治療戦略. *メディカルバイオ* 7:48-55, 2010

堂浦克美:プリオン病の治療予防開発. *臨床神経学* 49:946-8, 2009

2. 学会発表

Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [¹¹C]BF-227 PET. Prion 2009, Thessaloniki, September 23-25, 2009

堂浦克美:プリオン病治療薬開発の現状. 第28回日本認知症学会学術集会、仙台、2009年11月21日

堂浦克美:ヤコブ病研究 治療・発症機序. 第3回食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座、名古屋、2009年10月31日

Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [¹¹C]BF-227 PET. 2009年プリオン研究会、宮城、2009年8月29、30日

逆瀬川裕二、西澤桂子、高橋智子、小熊歩、木村朋寛、堂浦克美:プリオン持続感染に関与する宿主内因子の探索. 2009年プリオン研究会、宮城、2009年8月29、30日

堂浦克美:プリオン病への治療予防開発. 第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

北本哲之、堂浦克美、他:変異タンパク質の製造方法. 特願2009-180098、2009年7月31日、東北大学、株式会社ベネシス

抗プリオン活性をもつアミロイド親和性化合物に関する研究

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：照屋 健太、濱中 大一 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

現在までに様々なスクリーニング法によって抗プリオン活性をもつ化合物が報告・分類されている。アミロイド親和性化合物はその一つのグループを形成している。しかしながら、その作用機序は明らかにはなっていない。そこで幾つかの化合物についてプリオン持続感染細胞での PrP^{res} 産生抑制能と抗 A β アミロイド形成能との比較を行った。その結果、両者に関して相関はみられなかった。また、アミロイド親和性の抗プリオン活性のスクリーニングの過程において、N167 感染細胞で異常型プリオン蛋白質複合体形成を促進する一方で、RML 感染細胞では PrP^{res} 産生抑制する化合物プレムリンを見出した。

A. 研究目的

硫酸化多糖類を基本骨格とする薬剤ではその荷電と高分子鎖が抗プリオン活性にとって重要な特性であり、特にヘパリンにおいては、鎖中に現れるある二糖構造が重要であることを報告している。このことは、低分子化や荷電の変換によって、プリオン病の実質的な変性部位である脳へ効率的に移行させることが困難であることを示している。末梢投与可能な抗プリオン薬が求められている現状[1]においては、速やかに脳に移行することが可能な薬剤の検索が必要である。我々は持続感染細胞においてきわめて高い PrP^{res} 産生抑制を有する、あるアミロイド親和性化合物を以前に報告している[2]。速やかな脳への移行の反面、脳からの離脱も速やかであったためプリオン感染マウスにおいては期待していたほどの治療効果を得ることはできなかった。そこで、プリオン持続感染細胞での抗プリオン活性に A β のアミロイド形成阻害能を評価の軸として加えることで、アミロイド親和性化合物の基本的な特性について調査した。

B. 研究方法

(A) 既報を含む、16種類のアミロイド親和性化合物をサンプルとして用い、
(1) ScN2a 細胞 (N2a 細胞に RML プリオン株が感染) を上記の化合物の濃度系列のもとで培養した。培養後細胞を溶解し、プロテアーゼ K で処理し、その後遠心することによって PrP^{res} を含む画分を得た。ウエスタンブロットによって PrP^{res} の含有量を求め、化合物の濃度系列に対してプロットすることでプリオン持続感染細胞に対する化合物の EC50 を算出した。
(2) 可溶化した A β ペプチド溶液を調製しアミロイド形成反応を共存させたチオフラビンの蛍光増大を指標として評価した。この系を化合物の濃度系列のもとで行うことによって、化合物の EC50 を算出した。
(3) A β アミロイドはヘパリンと結合する性質を有している。アミロイド親和性化合物による、この結合の競合的阻害能を調べた。
(B) アミロイド親和性化合物「プレムリン」について、ScN2a 細胞と N167 細胞 (N2a 細胞に 22L プリオン株が感染) を各