

濃度系列のもとで培養した。あるいは、プリオン持続感染細胞の溶解液を調製しプリムリンを添加し、経時的にサンプリングした。これらのサンプルは、前実験と同様な処理をおこない、濃度や時間に対する PrP^{res} の量をウエスタンブロット上で判定した。定量などの必要に応じて糖鎖を除去したサンプルを調製した。

(倫理面への配慮)

ヒトに関する試料を用いた実験は行っていない。遺伝子組換え実験は所属する東北大学の取り決めに遵守した。

C. 研究結果

(A) (1) 16種類のアミロイド親和性化合物は ScN2a 細胞上で、0.50 nM - 4.3 μM の PrP^{res} 産生抑制能に関する EC50 を示した。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(2) Aβ アミロイド形成阻害能は、0.30 μM - 25 μM の範囲であった。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(3) Aβ アミロイド-ヘパリン結合阻害能は、ほとんどの化合物で、0.30 - 1.9 μM 程度の値を示したが、いくつかの化合物は 50 μM 以上の濃度でないと阻害能を示さなかった。明確な構造活性相関は見出されなかった。

(B) 「プリムリン」を添加して培養した N167 細胞の PrP^{res} は、プリムリンの用量依存的に 35kDa - 55kDa に新たなバンドを生じた(以下 35k バンドと呼ぶ)。一方、ScN2a 細胞では用量依存的な PrP^{res} 産生抑制能を示した。このときの EC50 は 1.0 μM 程度であった。プリオン持続感染細胞の溶解液とプリムリンの混合実験では、プリオン株によらず時間依存的な 35k バンドの増加がみられた。このプリムリンによる 35k バンドの形成促進反応は、PK 処理前に行う方が PK 処理後に行うのに比べて速度が速かった。

D. 考察

(A) プリオン持続感染細胞での抗プリオ

ン活性と Aβ のアミロイド形成阻害能との間に相関関係はみられなかった。

培養細胞中での各化合物のバイオアベイラビリティに関する検討が必要であるものの、アミロイド親和性化合物によるアミロイド形成阻害能は「アミロイド」という束一的な性質を持った物に対する効果ではなく、アミロイドを構成しているタンパク質への親和性が重要であることを示唆している。

その一方で、アミロイド親和性化合物のうち、Aβ アミロイドと PrP^{res} への阻害活性の高かったものは、フェニルオキサゾール環やピリジンメタンイミンのいずれかの化学構造を共通して有していた。

Aβ アミロイド-ヘパリン結合阻害能の結果から、Aβ アミロイドへのアミロイド親和性化合物の結合の様式は一つではなく、複数の様式があることが示唆される。

(B) PrP^{res} との強固な複合体形成を促進するアミロイド親和性化合物を見出した。

SDS-PAGE サンプルバッファーでの煮沸でも解離しない PrP^{res} と複合体を構成するもの(35k バンド)は、プロテアーゼ耐性コアをもち、PrP と同様の糖鎖修飾を受けており、PrP^{res} と同様な分子量をもっていることが判明した。

この化合物「プリムリン」は、チオフラビン T の基本的な骨格であるベンゾチアゾリンを分子内に 2 個有している。この分子骨格からタンパク質分子とのクロスリンクが可能な反応機序は想定できない。

一方、細胞溶解液を用いた実験ではプリオン株依存性を示さず複合体を形成した。正常型 PrP には、このような複合体を形成する作用を示さなかった。異常型 PrP においては、プロテアーゼ耐性コアへの作用よりも、インタクトな異常型 PrP に対しての作用の方が効率的であった。このことはプリムリンの作用はインタクトの異常型 PrP 選択的であることを示している。

プリムリンによるこの PrP^{res} 複合体の

形成は時間に対して、近似的に一次反応で進行した。また、この複合体形成反応の進行において、新規に取り込まれる正常型 PrP は検出されなかった。すなわち、正常型から異常型への PrP のコンバージョンはおこさず、試験管内にすでにあるインタクトの異常型 PrP が複合体を形成すると考えられる。

以上を総合すると、ウエスタンブロット上に新たに形成された 35k バンドは異常型 PrP の二量体であることが想定される。この二量体では、PrP 上のプロテアーゼ耐性コアどうし、糖鎖を介さずにクロスリンクしていることになる。このような存在様式の PrP^{res} の性質は報告されておらず、この生成機序とクロスリンクしている部分を同定することで PrP^{res} の構造についての知見と、アミロイド親和性化合物のプリオン持続感染細胞における PrP^{res} 産生抑制機序に関する知見が得られるかもしれない。

E. 結論

(A) プリオン持続感染細胞での抗プリオン活性と A β のアミロイド形成阻害能との間に相関関係はみられなかった。

(B) PrP^{res} との強固な複合体形成を促進するアミロイド親和性化合物を見出した。

[参考文献]

- [1] Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y and Doh-ura K. Amyloidphilic compounds for prion diseases. *Infectious Disorders Drug Targets*. 2009 : 9 ; 15-22.
- [2] Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y and Doh-ura K. Orally administered amyloidphilic compound is effective in prolonging the incubation periods of cerebrally infected prion disease animals in a prion strain-dependent manner. *Journal of Virology*. 2007 : 81 ; 12889-12898.

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

15 頁に記載。

抗プリオン作用を持つ生薬類の探索

分担研究者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者：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、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、その1成分が cinnamic acid 誘導体である可能性を示した。

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け出す試みが既になされている。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、昨年度報告した生薬エキスの抗プリオン活性成分の部分精製とNMR解析を行い、抗プリオン活性化合物の同定を試みた。

B. 材料と方法

スクレイパー由来のプリオン株 RML と 22L に持続感染したマウス神経芽腫細胞株 N2a 細胞 (Sc84 細胞および N167 細胞) を用いて、以下に示す抗プリオン活性の測定を行った。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。細胞溶解液を調製し、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により、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抗プリオン活性を示す成分を3種のクロマトグラフィーによって部分精製した。その結果、分子量 1,000 以下の疎水性度の異なる2種類の活性成分 L と D (各 400 μ g、50 μ g) を得た。これらの部分精製標品について NMR 構造解析を行ったところ、化合物 D が cinnamic acid 骨格をもつことが明らかとなった。そこで、cinnamic acid およびその誘導体について抗プリオン活性を調べたところ、cinnamic acid 自身には抗プリオン活性はなかったものの、複数の誘導体が 0.1～10 μ g/ml において RML プリオン感染細胞に抗プリオン活性を示すことが判明した。

D. 考察

2つのプリオン株に最も高い抗プリオン活性を示す生薬エキス中に、少なくとも2種類以上の低分子活性成分があること

を昨年報告した。今回、その部分精製標品の構造解析により 1 つは cinnamic acid 骨格および糖成分をもつことが明らかとなった。cinnamic acid 自身には抗プリオン活性がまったく無かったものの、誘導体の複数化合物が抗プリオン活性を示すことから、生薬エキス中に存在する抗プリオン活性成分の本体の一つは、cinnamic acid 誘導体である可能性が示唆された。

E. 結論

抗プリオン活性を示す生薬#15 の活性成分の一つは cinnamic acid 誘導体である可能性が高い。

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

15 頁に記載。

治療薬開発の標的候補となるプリオン増殖複製関連因子に関する研究

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

異常型プリオン蛋白（プリオン）の産生に影響する宿主因子の同定を目指して、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、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1“LRP1”を発見した。RNA干渉実験の特異性を確認するとともに、機能阻害タンパク質“RAP”の影響を検討した。また、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間でのDNAマイクロアレイ解析により、新規ターゲットとしてHevinを見出した。

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、2候補を同定した。その中の一つ“LRP1”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。また、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間でのDNAマイクロアレイ解析により、プリオン蛋白の異常化に関与する新規ターゲットを見出したので、この因子についてRNA干渉による遺伝子発現抑制法を用いてプリオン蛋白の異常化への影響を調査した。

B. 材料と方法

1) shRNA発現ベクターとsiRNA

各遺伝子に特異的な21塩基配列を標的として選択し、shRNA用にデザインした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。一方、化学合成型siRNAはInvitrogen社のStealth Selectを用いた。

2) 培養細胞への遺伝子導入

マウス神経芽腫細胞N2a細胞を宿主と

し、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shRNA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。

3) 異常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテナーゼK処理後に精製し、ウ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。シグナルは解析ソフトを用いて概ね数値化し、shRNA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。

4) 標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

shRNAあるいはsiRNA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 β -actinもしくはGAPDHを用いて相対的な定量を行った。

5) LRP1蛋白の検出

N2a細胞の溶解液から免疫沈降により精製・濃縮した。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。

6) マイクロアレイ解析

N2a 細胞を宿主とし、22L プリオン株に持続感染した培養細胞 (N167) に正常型プリオン蛋白に対する siRNA もしくは導入試薬のみ (mock) を導入した。導入処理後 15 日目における導入試薬群 (mock) と siRNA 処理群との遺伝子発現量を DNA マイクロアレイで解析した。

(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

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 LRP1 を同定した。

LRP1 の遺伝子ノックダウンでは、ScN2a において異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。ターゲットである LRP1 の mRNA およびタンパク質レベルでの発現抑制も確認でき、ノックダウンが働いていることが確かめられた。またプリオン蛋白の mRNA は影響を受けていなかったため異常型プリオン蛋白の産生抑制はプリオン蛋白の発現低下によるものではないと考えられる。レスキュー実験として siRNA が標的とする遺伝子配列に変異を加えた変異 LRP1 発現ベクターと siRNA を同時に導入したところ、変異 LRP1 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 LRP1 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機能阻害タンパク質 “RAP” の強制発現を検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。以上の実験結果から、LRP1 が特異的に異常型プリオン蛋白の産生に関与していることが明らかとなった。

一方、正常型プリオン蛋白に対する siRNA を導入すると、3 日後、6 日後においては検出限界程度まで異常型プリオン蛋白が減少するが、その後再び検出され

るようになり、更にそれは徐々に増加してくる。18 日後までは鋭い増加傾向を示し、その後は増加速度が鈍くなりほぼ横ばいとなった。導入 15 日後における DNA マイクロアレイ解析により、siRNA 導入群において Sparcl1 (Hevin) の発現亢進が認められた。このことはリアルタイム PCR での解析によっても確かめられた。Hevin に対して標的配列が異なる 9 種類の siRNA を試したところ、3 種類の siRNA において異常型プリオン蛋白産生抑制が認められた。また、そのうちの 2 種類の siRNA では細胞傷害性がほとんど無いことが確かめられた。

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 LRP1 は、細胞膜上に存在する多機能受容体である。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機能阻害タンパク質 “RAP” の強制発現実験の結果から支持されたが、LRP1 がプリオン蛋白の産生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。

一方、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析から見つけ出された Hevin においては、2 種類の siRNA で目立った細胞傷害を起こすことなく異常型プリオン蛋白産生が抑制された。この結果が、特異的なものであるかどうかは、レ

スキュー実験等により慎重に解析していく必要があるが、薬剤試験等で ScN2a 細胞に比べて効果が出にくい N167 細胞でも異常型プリオン蛋白産生抑制効果が顕著に観察されたことから、これまでに発見した GABAA 受容体 β サブユニット 1 や LRP1 よりもプリオン蛋白構造変換において中心的な役割を担っている可能性が考えられ、創薬標的因子としても期待できる。

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、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 “LRP1” の特異性を確認した。また、新たな因子として Hevin を発見した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表及び知的所有権の出願状況

15 頁に記載。

新規治療薬開発を目指したプリオン蛋白構造変換因子の解析に関する研究

分担研究者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者：逆瀬川 裕二 東北大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨

これまでにヒートショック蛋白質 Hsp90 が試験管内において銅イオン (Cu^{2+}) 存在下で、ヌクレオチド (ATP や ADP) 依存的にリコンビナント正常型プリオン蛋白質 (rPrP) の構造変換を起こすことを報告してきた。今回、生化学的手法を用いて、銅イオン存在下での構造変換活性のメカニズムについて、1) 銅イオン存在下では、分子量 700kDa を超えるポリマーを形成すること、2) Hsp90 ポリマーは rPrP の分子中央部に対する構造変換活性を消失すること、3) ATP や ADP などのヌクレオチド存在下において Hsp90 は脱ポリマー化し、rPrP の構造変換活性を回復すること、4) Hsp90 の脱ポリマー化には ATP の加水分解エネルギーは必要でないことを明らかにした。これらの結果は、Hsp90 が示す rPrP 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ている。

A. 研究目的

銅イオン (Cu^{2+}) 存在下における Hsp90 の正常型プリオン蛋白 (PrP^c) に対する構造変換活性の特性を生化学的手法により明らかにする。

B. 研究方法

リコンビナント PrP^c (rPrP) の調製

3F4 エピトープをもつマウスプリオン蛋白を大腸菌発現系 pET システムによって、不溶性封入体として発現し、8M 尿素、25 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl に溶解後、HiTrap IMAC (GE ヘルスサイエンス) に吸着させ、イミダゾールによって溶出精製した。1M アルギニン HCl (pH8.0)、1mM 酸化型グルタチオンに急速希釈によるリフォールディングによって α ヘリックスに富む可溶性単量体を得た。

ヒートショック蛋白質 Hsp90 の精製

マウス Hsp90 α 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、pET システムによって発現させた。大腸菌破

砕液から Ni イオンにチャージした HIS-Select (Sigma) および UNO-Q (Bio-Rad) により順次精製した。

インビトロ PrP^c 高次構造変換試験系

100ng の rPrP と構造変換活性因子を含む 20 μ l の反応液 [50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、2 mM MgCl_2 、1 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。

ショ糖密度勾配遠心分画法

5-20%のショ糖を含む 25mM HEPES-KOH (pH7.5) によって 2ml の密度勾配を作製し、その上層にサンプルを添加したのち 20,000 g、4h の超遠心にて分離した。各分画は SDS-PAGE および CBB 染色あるいは免疫ブロット法にて解析した。

(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

ホモ 2 量体からなる分子量 180 kDa の可溶性蛋白 rHsp90 α は、100 μ M の Cu^{2+} を含む反応液中では、速やかにポリマー化し、5-20% のショ糖密度勾配遠心によって 700 kDa を超える高分子量分画に分画された。また、 Cu^{2+} によってポリマー化した Hsp90 は低濃度トリプシン (1 μ g/ml) 消化に対して部分的な耐性を獲得し、rPrP に対する構造変換活性は消失した。しかし、一旦ポリマー化した rHsp90 α は、1 mM ATP 存在下で、脱ポリマー化し、ショ糖密度勾配遠心によって、ダイマーと同じ分画に分画された。また、rHsp90 α ポリマーは rPrP に対する構造変換活性を消失したが、ATP 存在下で、その活性を回復した。上記反応には ADP や、加水分解しない ATP ホモログ (AMP-PNP や ATP γ S) も同等の効果を示したが、AMP は効果を示さなかった。上記の結果は、rHsp90 α の脱ポリマー化や rPrP に対する構造変換活性の回復には、Hsp90 へのヌクレオチドの結合が必要で、ヌクレオチドの加水分解 (エネルギー) は必要でないこと示唆している。

D. 考察

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 Cu^{2+} 存在下では、ヌクレオチド依存的に rPrP の構造変換を起こすことを報告してきた。本年度の研究では、生化学的手法を用いて、銅イオン存在下での構造変換活性のメカニズムについて、1) 銅イオン存在下では、分子量 700kDa を超えるポリマーを形成すること、2) Hsp90 ポリマーは rPrP の分子中央部に対する構造変換活性を消失すること、3) ATP や ADP などのヌクレオチド存在下において Hsp90 は脱ポリマー化し、PrP の構造変換活性を回復すること、4) Hsp90 の脱ポリマー化には ATP の加水分解エネルギーは必要でないことを明らかにした。

今回我々が見出した Cu^{2+} による

Hsp90 のポリマー化とヌクレオチドによるリバーシブルな脱ポリマー化についての報告はなく、新規の知見である。興味深いことに、Hsp90 のポリマー化/脱ポリマー化は、PrP の構造変換活性に強くリンクしており、Hsp90 の機能制御に関わる可能性がある。PrP^c の分子中央部は、次の 2 つの点で重要である。1) PrP^c 分子は細胞膜上と細胞内のエンドソームをリサイクルしているが、その一部は分子中央部を切断され、中間代謝物として細胞膜上に係留される、2) PrP^c の分子中央部は異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) への構造変換に必須であり、この領域を切断されると PrP^{Sc} への変換が阻害される。Hsp90 はまさに PrP^c のこの領域を構造変換させることから、PrP^c の代謝とプリオンへの構造変換に直接関与する可能性がある。神経細胞においては、シナプス間隙に高濃度の Cu^{2+} が分布すること、加えて、PrP^c は Cu^{2+} と結合すると分子中央部のプロテアーゼ感受性が減少することから、シナプス間隙に局在する PrP^c の代謝には Hsp90 などの高次構造に関与する細胞内因子が必要と思われる。

近年、サイトソルや核内に局在すると考えられてきた Hsp90 が細胞外マトリクスに分泌されていること、細胞外への分泌小胞であるエクソソームに PrP^c や PrP^{Sc} とともに局在すること、PrP^c と相互作用する分子として Hsp90 が同定されるなど報告されている。今後、Hsp90 と PrP^c の *in vivo* での相互作用を明らかにし、Hsp90 のシャペロン活性や局在などを変化させる化合物のスクリーニングを展開することによって、プリオン病の治療薬、予防薬の開発につながる可能性がある。

E. 結論

Hsp90 が示す PrP 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ている。

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
15 頁に記載。

カクテル療法を目指した抗プリオン化合物の開発に関する研究

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化合物を探索・開発することにより、各化合物の効果を補い、相乗的に抗プリオン効果を示す複合的なプリオン病治療法（カクテル療法）の開発を最終的な目標として研究を行った。異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）のもととなる正常型プリオン蛋白質（PrP^C）の mRNA を標的とする脳指向性 siRNA 製剤を開発するため、脳指向性薬物送達素材候補である RVG-9R と siRNA との複合体を作製した。しかし、この複合体は PrP^{Sc} 抑制効果を示さなかった。PPS（ペントサン硫酸）療法の改良を目指し、PPS の脳内動態を把握するため、PPS に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。PPS/DMMB 凝集体を免疫したマウスから得た血清は、Dot blot assay により免疫前血清よりも免疫反応の上昇を示した。本研究では有用な化合物は開発出来なかった。しかし、今後、siRNA キャリアー改良による遺伝子治療法開発、また PPS 定量化法の構築による PPS 脳内動態の解明に関する成果が、より有用性の高いカクテル療法確立へと結実されることが期待される。

A. 研究目的

プリオン病に対する有効な治療薬は未だ確立されていない。プリオン病治療法の確立の問題点として、薬物の脳移行能、副作用の発現、候補化合物単一での効果不足が挙げられる。そこで、プリオン病発症機序仮説における複数の段階を標的とした抗プリオン化合物の探索・開発を行い、各薬物の効果を補い、相乗的に抗プリオン効果を示す複合的なプリオン病治療法の開発を目的に研究を行った。

- ① PrP^C 発現抑制可能な siRNA の脳特異的ドラッグデリバリーシステムの開発
- ② PPS モノクローナル抗体の作製
- ③ 新規ケミカルシャペロン GN8 の構造最適化

B. 研究方法

プリオン蛋白質（PrP）発現量の検討
神経細胞株 N2a, GT1-7 細胞とプリオン持続感染細胞株 GT/FK 細胞に、化合物を処

置または PrP mRNA を標的とした small interfering RNA (siRNA) を導入し、任意の時間で PrP mRNA と PrP を回収した。PrP mRNA 発現量は real-time PCR 法を用いて、PrP 発現量は western blot 法を用いて行った。

RVG-9R, RVMAT-9R の合成

Fmoc 基で保護したアミノ酸を用いたペプチド固相合成法を用いて、ペプチドを合成した。合成したペプチドは HPLC により分離精製し、MALDI-TOF-MS を用いて確認を行った。

siRNA/RVG-9R 複合体の細胞移行

siRNA と RVG-9R、RVMAT-9R を混合したものをアガロースゲル電気泳動し、複合体の形成を確認した。蛍光標識した siRNA と RVG-9R、RVMAT-9R を混合したものを、細胞に処置し、一定時間後、蛍光顕微鏡で観察した。

1,9-dimethyl methylene blue (DMMB) と PPS 凝集体による免疫

免疫を行う前に採血を行った。PPS/DMMB凝集体とアジュバントをマウスに皮下投与した。10日後に抗原とアジュバントを腹腔内投与した（×3回）。最終免疫後、3日目に採血を行った。

抗体のスクリーニング

DMMBをPVDF膜に結合させた後にPPSを結合させたDot blot法を用い実験した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

①PrP^C発現抑制可能なsiRNAの脳特異的ドラッグデリバリーシステムの開発

siRNAとRVG-9Rを1:50の割合で混合したsiRNA/RVG-9R複合体をGT/FK細胞に処置した。しかし、PrP mRNA量（処置後24時間）・PrP^{Sc}発現量（48, 72時間）は減少しなかった。RVG-9R濃度増加は細胞死を誘発するため、siRNAとRVG-9Rの混合比を変え1:20の割合で検討したが、PrP^{Sc}発現量に影響しなかった。また、9Rの立体異性体(d, 1)であるRVG-9R(1)を検討したが、PrP^{Sc}発現量に影響しなかった。GAPDHを標的としたsiRNAを用いて検討を行った。Lipofectamineによる導入はGAPDH mRNA量を減少したが、RVG-9Rによる導入はGAPDH mRNA量に影響しなかった。蛍光顕微鏡による観察では、siRNA/RVG-9R複合体は細胞に移行したが、siRNA/RVMAT-9Rは細胞に移行しなかった。

②PPSモノクローナル抗体の作製

PPS/DMMB凝集体を免疫したマウスからの血清は免疫前血清よりも免疫反応の上昇を示した。

③新規ケミカルシャペロンGN8の構造最適化

PrP^{Sc}産生抑制効果が高いGN8誘導体の化学的特性（質量分析）を解析した。

D. 考察

①標的の異なるsiRNA (PrP, GAPDH) を使用したが、両者ともにRVG-9R複合体はknock down効果を示さなかった。siRNA/RVG-9R複合体は、細胞表面に結合したが細胞内に移行しない、あるいは細胞内に移行したがRVG-9RとsiRNAが解離できずsiRNAがmRNAに結合できない、ことが示唆された。

②PPS/DMMB凝集体もしくはPPSに結合する抗体が作製されている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、有効な抗プリオン化合物を探索・開発することは出来なかった。今後、siRNAキャリアーの改良による遺伝子治療、PPS脳内動態解析によるPPS療法の改良ならびにGN8誘導体の薬剤開発により、プリオン病に対して有効性が高く副作用が少ないカクテル療法が期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 2009 in press

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

2. 学会発表

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

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

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・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	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野
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

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最終目的とした。分担研究者らによって開発された $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 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 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 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（Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted)）。また分担研究者らによって開発された $[^{18}\text{F}]$ 標識プローブ $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ の非標識体（すなわちFACT）およびプロトタイプ近赤外線蛍光プローブ、THK-265 およびTHK-8XY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。

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 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の探索的臨床研究の実施、次に2) $[^{11}\text{C}]$ 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 $[^{18}\text{F}]$ 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) $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の探索的臨床研究

平成21年11月末日までに5例のプリオン病患者、すなわち遺伝性のプリオン病であるゲルストマン・ストライヤー・シャインカー病（GSS）患者様3例、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）患者様2例のPET画像を撮影した。

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 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ ・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) $[^{18}\text{F}]$ 標識プローブの開発

分担者らによって開発された $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ 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 および THK-8XY の GSS 患者様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 (図 1 および 2、Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted))。

2) GSS 患者様脳標本における BF-227 の染色像

[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おいても免疫染色でコアをもつアミロイド斑に一致して BF-227 染色像が観

察された (図 3、Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted))

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 (図 4)。

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 および THK-8XY は GSS 患者様小脳標本におけるアミロイド斑に結合することが確かめられた (図 5 および 6)。

D. 考察

[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。また分担研究者らによって開発された [¹⁸F]標識プローブ [¹⁸F]FACT の非標識体 (すなわち FACT) およびプロトタイプ近赤外線蛍光プローブ、THK-265 および THK-8XY 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。

アミロイド斑に結合するプローブにはプリオン病の異常型プリオン蛋白に結合するそれらと、全く結合しないそれらとに分けられる (Boxer et al. Neurology .2007.69: 283-290) が、分担研究者らによって開発された、または見いだされたプローブはすべてアミロイド斑型異常型プリオン蛋白に結合することから、プリオン病診断プローブとして有用性が高いものと思われる。

E. 結論

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、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ PET. Eur J Nuc Med. (accepted)

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

工藤幸司 :

アミロイドシスの分子イメージング。医学のあゆみ。 In” アミロイドシス 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

Sugi. k, Okamura. N, Furumoto. S, Tashiro. M, Furukawa. K, Funaki. Y, Arai. H, Kudo. Y, Iwata. R, Yanai. K :

$[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ PET is Useful for Noninvasive Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. 2009年10月9日~14日。スペインバルセロナ

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. :

$[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ PET Study in Protein Conformational Diseases. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. 2009年10月9日~14日。スペインバルセロナ

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, $^{11}\text{C-BF-227}$. International Conference on Alzheimer's Disease

(Imaging Consortium) 2009年7月11日～16日. Vienna, Austria
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. 2009年7月11日～16日. Vienna, Austria
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. 2009年7月11日～16日. Vienna, Austria
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. 2009年7月11日～16日. Vienna, Austria
工藤幸司 :
タウイメージング. 第28回日本認知症学会(シンポジウム). 2009年11月20日～11月22日. 東北大学百周年記念会館
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(ポスター). 2009年11月20日～11月22日. 東北大学百周年記念会館
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. 2009年11月20日～11月22日. 東北大学百周年記念会館
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 :
アミロイドイメージング用プローブ[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. 2009年11月28日. 仙台江陽グランドホテル
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. 2009年10月9日(金) 仙台東北薬科大学
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. 2009年10月1日～3日. 旭川市民文化会館、旭川グランドホテル
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. 2009年10月1日～3日. 旭川市民文化会館、旭川グランドホテル
工藤幸司、福田順也 :
タウイメージ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. 2009年10月14日. 仙台国際センター

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. 2009年8月27日. 東京都江東区タイム 24 ビル

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 を用いたアツル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. 2009年5月14日・15日. 千葉市学術総合センター

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 2009年4月20日東北大学病院管理棟4F 第1会議室

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を用いた軽度認知症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. 2009年3月16日～18日. パシフィコ横浜

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. 2009年3月16日～18日. パシフィコ横浜

工藤幸司：

タウイメージ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. 平成21年1月28日. 日本科学未来館 (東京・お台場)

H. 知的財産権の出願・登録状況
次ページ参照

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他
なし

特許出願状況

	出願/ 登録の 別	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	未登録	PCT/JP2007/0633 50	ベンゾキサゾール 誘導体	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	<u>工藤幸司</u> 古本祥三 岡村信行
2	未登録	特願 2007-176366	フッ素およびヒド ロキシ基で置換さ れたアルコキシ基 を有する PET プロ ーブ	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	<u>工藤幸司</u> 古本祥三 岡村信行

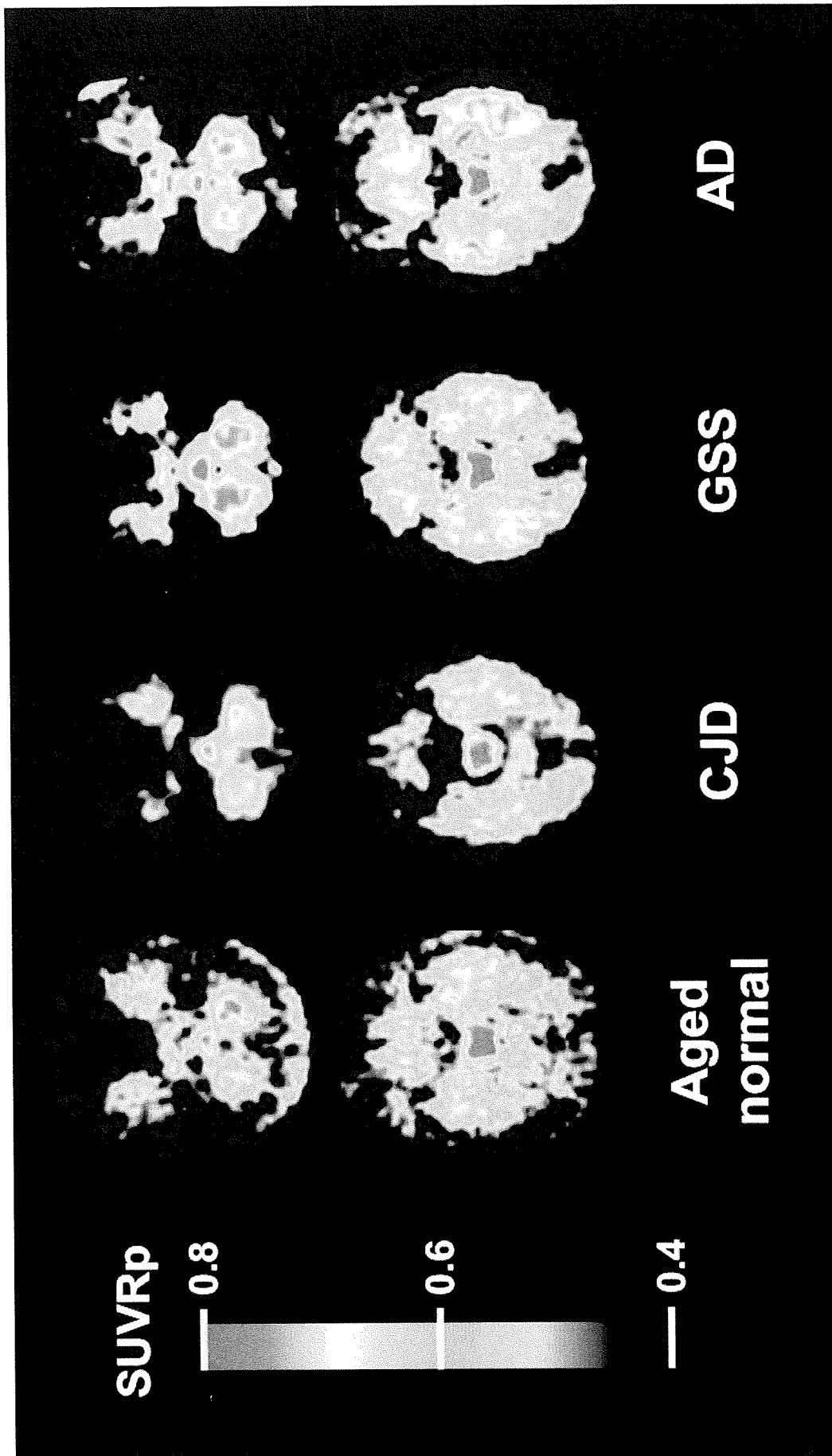


図 1. 常高齢者、弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者、ゲルストマン・ストライヤー・シヤインカー (GSS) 病患者、ツハイマー病 (AD) 患者における ^{11}C BF-227 PET 画像 (Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted))