

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 長崎大学医歯薬学研究科感染分子・講師

研究要旨

プリオン病の治療法の臨床治験及び新規薬剤の開発が急速に進行しつつあり、プリオン病の早期診断法の確立が一層重要性を増している。そのためプリオン病の早期診断のための特異的診断マーカーが求められる。

平成20年度見つけ出したバイオマーカー(MMP-9/TIMP-1)の検討を行い、平成21年度多数例での検討を行った。MMP-9/TIMP-1では脳炎・髄膜炎・アルツハイマー型認知症では優位に高く、CJDでは低値を示した。プリオン病患者のMMP-9/TIMP-1の比の意義付け及びその原因について検討した。MMP-9/TIMP-1はBBBの破壊のマーカーであり、脳炎・髄膜炎のMMP-9/TIMP-1の上昇は炎症性サイトカインや白血球の進入にて起こる事を示し、プリオン病患者のMMP-9/TIMP-1は低値よりBBBの破壊は起こっていない事を意味している。又BBBを評価できうる他の数種類のマーカーによる検討を行った。同様の結果であった。

同時にプリオン病（特にクロイツフェルト・ヤコブ病:CJD）の診断基準のひとつである14-3-3蛋白のELISAの開発を行い、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。

A. 研究目的

プリオン病の治療法の臨床治験及び新規薬剤の開発が急速に進行しつつあり、プリオン病の早期診断法の確立が一層重要性を増している。そのためプリオン病の早期診断のための特異的診断マーカーが求められる。

又プリオン病の治療法の臨床治験及び新規薬剤の開発においてはBBBの評価は極めて重要である。

本年度我々はプリオン病の早期診断のための特異的診断マーカーの検討とBBBの評価を行った。

B. 研究方法

1) 平成20年度血液中寻找出したバイオマーカー(MMP-9/TIMP-1)の検討を行い、さらに多数での検討を行った。

2) 平成21年度よりプリオン病患者のMMP-9/TIMP-1の比の意義付け及びその原因について検討した。

MMP-9/TIMP-1はBBBの機能評価として利用されることが多いことよりBBBに関与していると考えられているサイトカインの検討を行った。

3) BBBの機能評価として利用されているS-100蛋白、MMP-2について検討を行った。

4) プリオン病患者における画像検査(MRIT1強調画像、SPECT)によるBBBの評価を行った。

5) 同時にプリオン病（特にクロイツフェルト・ヤコブ病:CJD）の診断基準のひとつである14-3-3蛋白のELISAの開発を行った。

（倫理面への配慮）

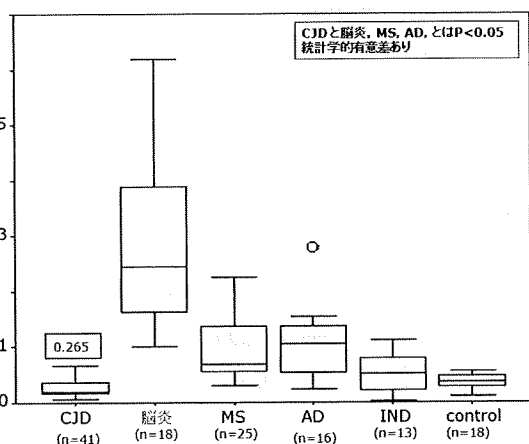
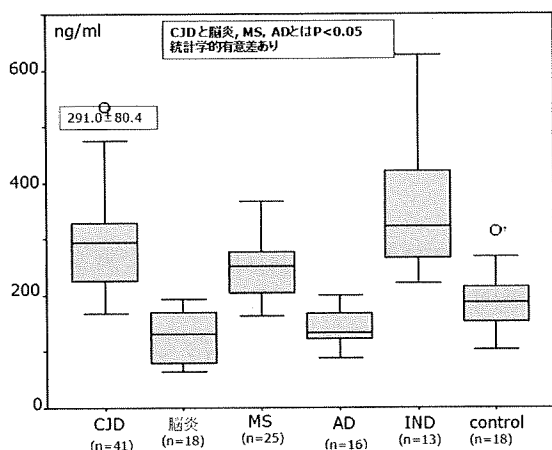
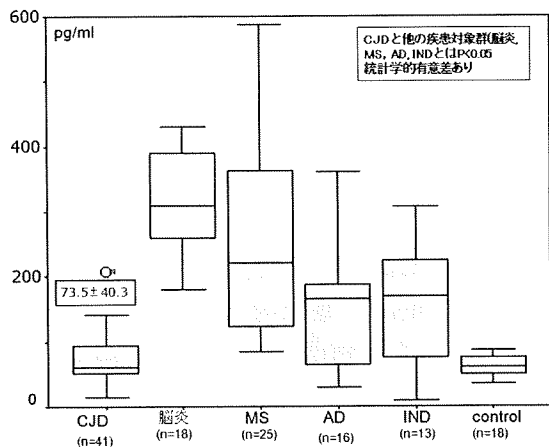
既に長崎大学倫理委員会の承認を得ており、長崎大学の倫理規程に準拠し、その内容に則って患者検体を全て匿名化して管理している。個人情報に関しては厳重に保管しておりことに患者情報ファイ

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ない。

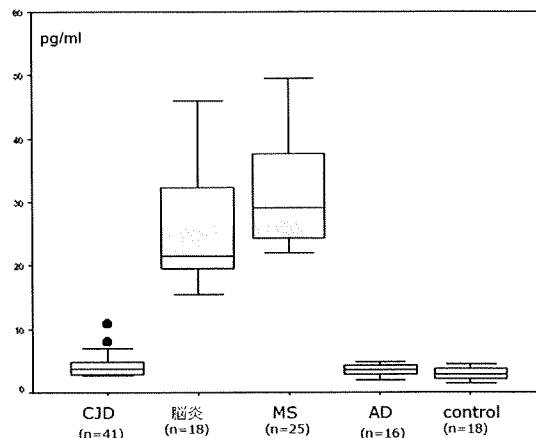
2) サイトカインの結果では血清中の IL-1 β の結果

C. 研究結果

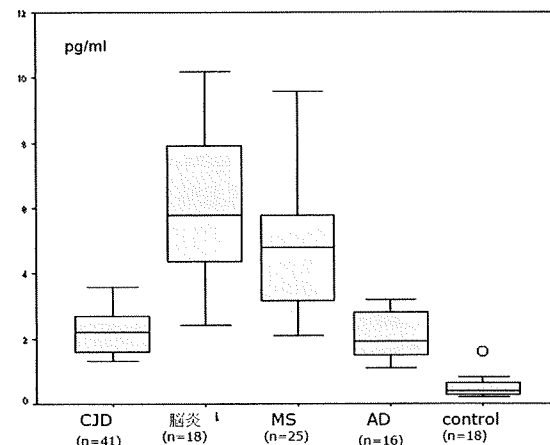
1) MMP-9/TIMP-1 の多数例での検討では



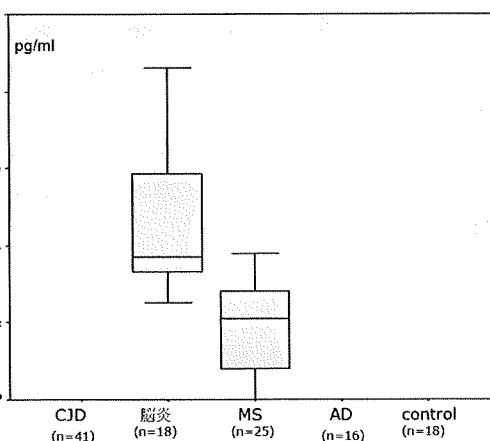
では明らかに脳炎・髄膜炎において MMP-9/TIMP-1 の発現は高く、プリオン病では健常者とはほぼ優位さはなかった。



髄液中の IL-1 β の結果



髄液中の IL-6 の結果は

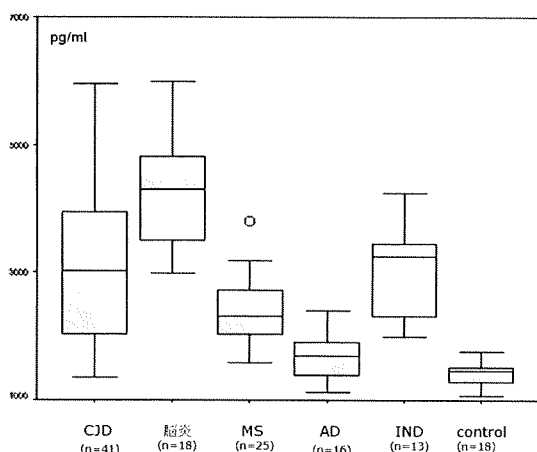


MMP-9/TIMP-1 比は主に血液脳関門 (blood-brain-barrier:BBB) の指標であり、MMP-9/TIMP-1 比は脳炎・髄膜炎では極めて高く、BBB が破壊されている

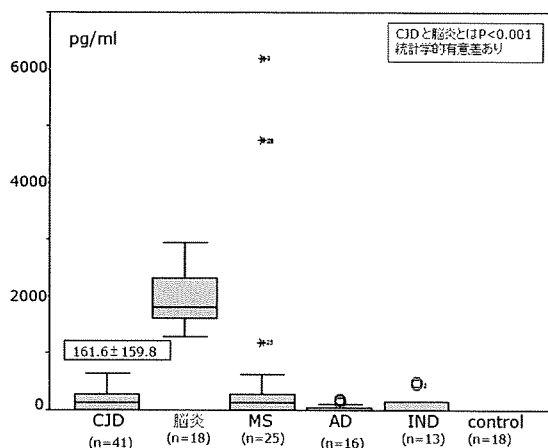
ことを示した。一方プリオン病では MMP-9/TIMP-1 比は健常人より若干高いものの、ほぼ同程度であることより BBB の破壊は起こっていない。この MMP-9/TIMP-1 の上昇は IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインや白血球の進入にて起こる事を示した。

3) 他の BBB の破壊の評価マーカーの検討

1) MMP-2



2) S-100 蛋白



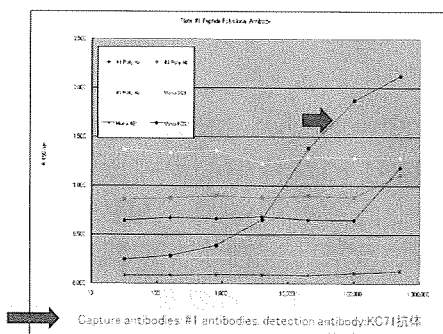
プリオン病患者での MMP-9/TIMP-1 を含めた BBB の数種類のマーカーによる検討を行った。その中で MMP-2 の発現が高かった。現在までの論文での検討を含め、プリオン病患者での BBB は可逆的に障害されているが、不可逆的に障害はされていないことを明らかにした。

4) 画像診断においては

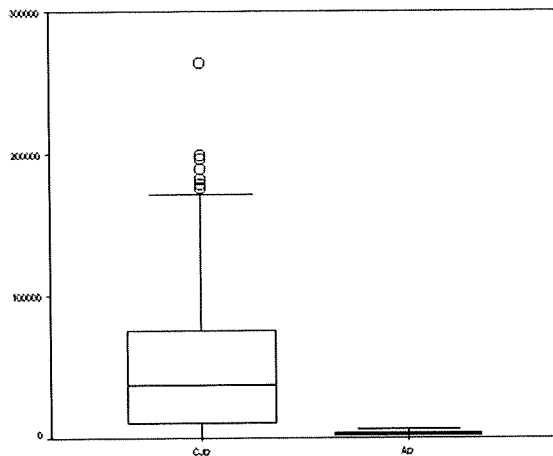
性別	年齢	病型	臨床経過	MRI T1Gd 造影	SPECT の所見
F	64	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	70	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	74	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	67	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	67	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	64	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	65	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	72	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	79	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	71	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	82	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	69	genetic (V180I)	atypical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	70	genetic (V180I)	atypical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	70	genetic (V180I)	atypical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	67	genetic (V180I)	atypical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
F	57	sporadic	atypical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	70	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし
M	71	sporadic	typical	異常なし	BBB 破壊の所見なし

画像診断では BBB の破壊を示唆する所見は認めなかった。

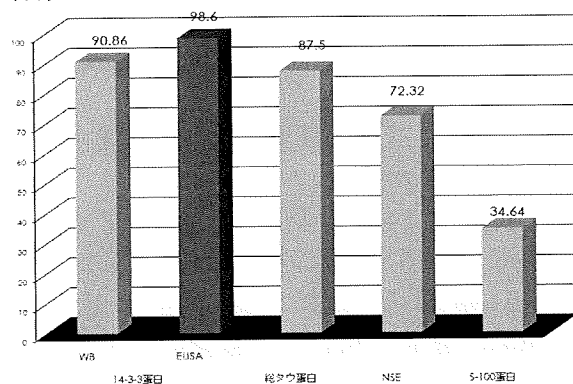
5) 我々は 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームを免疫し、5 種類の抗体を作成した。その 5 種類の抗体の組み合わせにて Sandwich ELISA 法の開発を行った。



その ELISA にて検討を行った。



現在 14-3-3 蛋白の ELISA の開発に成功した。(現在特許申請中である)。感度は 84.4% 特異度は 98.6%であり、極めて有効なキットであると考えられた。



D. 考察

プリオン病患者での MMP-9/TIMP-1 を含めた BBB の数種類のマーカーによる検討を行った。その中で MMP-2 の発現のみが高かった。現在までの論文での検討を含め、プリオン病患者での BBB は可逆的に障害されているが、不可逆的に障害はされていないことを明らかにした。この結果はヒトプリオン病患者の薬物投与において重要な情報になりえると考えら得る。

E. 結論

プリオン病患者での BBB は可逆的に障害されているが、不可逆的に障害はされていないことを明らかにした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Laboratory and Investigaton, 2009 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. 2009 in press

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Dementia and geriatric cognitive disorders 2007. 24(3): 207-212

Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. J Neurol. 2007 254 (11): 1509-17

Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Dec 19;377(3):957-61

K. Satoh, S. Shirabe, A. Tsujino, H. Eguchi, M. Motomura, H. Honda, I. Tomita, A. Satoh, M. Tsujihata, H. Matsuo, M. Nakagawa, K. Eguchi. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 24(3): 207-212. 2007

K. Satoh, S. Shirabe, H. Eguchi, A. Tsujino, M. Motomura, A. Satoh, M. Tsujihata, K. Eguchi. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 23 (6): 372-381. 2007

佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. 【プリオン病と遅発性ウイルス感染症 最新の基礎・臨床研究】 プリオン病 ヒト・プリオン病の臨床病型と診断 孤発性プリオン病(孤発性古典型 CJD, 視床型 CJD, MM2 皮質型 CJD). *日本臨床*. 65(8): 1423-1432. 2007

2. 学会発表

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. 5. 20-5. 22

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. 5. 20-5. 22

佐藤克也, 調 漸, 江口勝美: プリオン病患者の脳脊髄液中診断マーカーの比較検討 第 49 回日本神経学会総会 横浜 2008. 5. 15-5. 17

六倉和生, 佐藤克也, 辻野 彰, 本村政勝, 調 漸, 江口勝美: クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者における簡易診断キットの有効性 第 49 回日本神経学会総会 横浜 2008. 5. 15-5. 17

調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 志賀裕正, 浜口 毅, 山田正仁, 三條伸夫, 水澤英洋: 日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討 第 48 回日本神経学会総会 名古屋 2007. 5. 16-5. 18

佐藤克也, 重松和人, 西田教行, 調 漸, 江口勝美: プリオン感染腎特異的遺伝子発現の検討とヒトプリオン病での意義 第 48 回日本神経学会総会 名古屋 2007. 5. 16-5. 18

Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T: Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF *Neuro Prion* 2008. Madrid, Spain 2008. 10. 8-8. 10

Matsui Y, Satoh K, Kataoka K, Shirabe S: 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 *Neuro Prion* 2008. Madrid, Spain

2008. 10. 8-8. 10

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

14-3-3 蛋白の ELISA の開発にて特許申請中。

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
<u>工藤幸司</u>	アミロイドーシスの分子イメージング	山田正仁	アミロイドーシス UPDATE	医歯薬出版	東京	2009	430-435

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
<u>Tsuboi Y</u> , <u>Doh-ura K</u> , Yamada T	Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases	Neuropathology	29	632-636	2009
Nomura S, Miyasho T, Maeda N, <u>Doh-ura K</u> , Yokota H	Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy	Proteomics	9	4029-4035	2009
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	15-22	2009
Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, <u>Kataoka Y</u>	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, <u>Kataoka Y</u>	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, <u>Kataoka Y</u>	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
Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, <u>Kudo Y</u> , Arai H	Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease	J Neurol Sci	285	101-105	2009
Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, <u>Kudo Y</u> , Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H	A traditional medicinal herb <i>Paeonia suffruticosa</i> 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, <u>Kudo Y</u> , 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, <u>Kudo Y</u> , Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL	In vitro characterization of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies	Eur J Pharmacol	617	54-58	2009
Minaki H, <u>Sasaki K</u> , Honda H, Iwaki T	Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns	Neuropathology	29 (5)	536-542	2009
<u>Sasaki K</u> , 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, <u>Sasaki K</u> , 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., <u>Horiuchi, M</u>	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., <u>Horiuchi, M</u>	Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions	J Virol	83	5918-5927	2009
<u>Horiuchi, M</u> , 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., <u>Horiuchi, M</u>	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
Mutsukura K, <u>Satoh K</u> , 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)	550-557	2009
Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, <u>Doh-ura K</u>	GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells	FEBS Lett	584 (6)	1193-1198	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 Imag	37 (5)	934- 941	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- 130	2010
Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T	Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF	Lab Invest		in press	2010
堂浦克美	プリオン病の治療予防開発	臨床神経学	49	946- 948	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	Medical Bio	7	48-55	2010

研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷

アミロイドーシスの分子イメージング

Molecular imaging of amyloidosis



工藤 幸司

Yukitsuka Kudo

東北大学未来医工学治療開発センター前臨床応用部門

◎アミロイドーシス患者における病理像としてのアミロイドの蓄積量およびその空間的分布を *in vivo* で非侵襲的に画像として評価することが可能となれば、アミロイドーシスのあらたな客観的診断法となる可能性が高い。著者らによって開発された PET プローブ [^{11}C] BF-227 の、アミロイドーシス診断用プローブとして応用できる可能性を検証した。BF-227 は各種アミロイドーシス患者標本のアミロイドに特異的選択的に結合し、また [^{11}C] BF-227 はアミロイドーシスモデルマウスにおけるアミロイドに結合することが、オートラジオグラフィおよび小動物 PET を用いた試験で確かめられた。 [^{11}C] BF-227 の健常人における探索的臨床研究の結果、 [^{11}C] BF-227 にアミロイドーシス診断用 PET プローブとして高い有用性が示唆された。



画像診断, PET, [^{11}C] BF-227

アミロイドーシスは、 β シート構造をとった特異な線維状蛋白アミロイドが全身諸臓器の細胞外に沈着して機能障害を引き起こす疾患群である。その診断には、同病が示唆される臨床症状、すなわち全身倦怠感、体重減少、浮腫、心不全、低血圧、難治性下痢・便秘、呼吸不良症候群、肝脾腫、腎機構障害、巨舌、末梢神経障害、手根管症候群、甲状腺・唾液腺の腫大、皮下・口腔粘膜下出血などから、血液・生化学的検査、心電図検査などを経て、確定診断には生検で取り出した組織中のアミロイド沈着をコンゴレッドで染色し、同染色陽性所見が得られることによっている^{1,2)}。当然、生検部位はアミロイドが沈着している組織、胃、十二指腸、結腸、直腸などである^{1,2)}が、侵襲性が高く生検をためらう腎、または生検が不可能な心臓にもアミロイドが蓄積するアミロイドーシスが存在する。アミロイドーシス患者における病理像としてのアミロイドの蓄積量およびその空間的分布を *in vivo* で非侵襲的に評価することが可能となれば、アミロイドーシスのあらたな客観的診断法となる可能性が高い。

アミロイドイメージングとそのストラテジー

そこで近年注目を浴びつつあるのがアミロイドに特異的選択的に結合するアミロイドイメージング用 PET(陽電子断層撮影装置)プローブを用いて *in vivo* でアミロイドを非侵襲的に画像化する診断法である。1990年代、Alzheimer 病の代表的脳内病理像であるアミロイド β 蛋白に親和性の高いプローブ(低分子有機化合物)を開発し、これを同病診断に用いようとする動きがあらたに起こってきた。現在ではアミロイドイメージングとしてよく知られている診断法である。アミロイドイメージングに用いられるプローブはアミロイド β 蛋白の β シート構造を認識しているが、アミロイドーシスにみられるアミロイドもコンゴレッド染色陽性、すなわち β シート構造をとっていることから、Alzheimer 病診断に用いられているアミロイドイメージングプローブはまた、アミロイドーシス診断に用いることができる可能性の高いことが強く示唆される。

アミロイドイメージングは、病理像を追跡し、その病理像から疾病(アミロイドーシス)を診断し

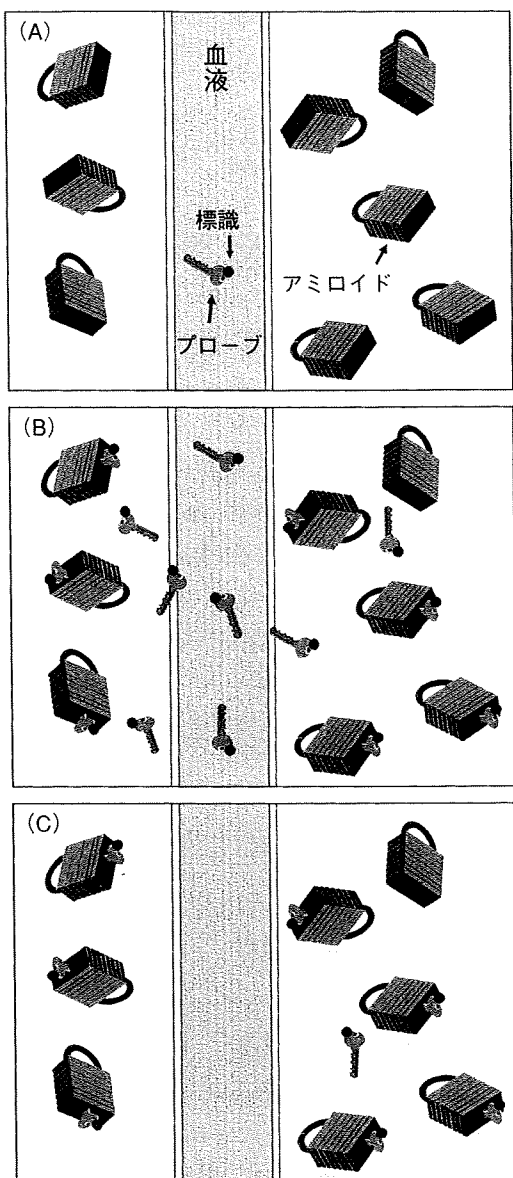


図1 アミロイドーシス患者におけるアミロイドイメージングのストラテジー概念図
 A: 標識プローブを静脈内投与する。
 B: 標識プローブはアミロイドに結合する。
 C: 一定時間後には非結合プローブは洗い流され、アミロイドに結合したプローブのみが残る。

ようとする技術である。それではこの診断法はいかなるストラテジーに基づくか、その詳細について解説すると、概念は以下のとおりである(図1)。

- ① アミロイドーシスの病理学的主徴アミロイドのほとんどは β シート構造をとっている。
- ② 同シート構造をとったアミロイドに特異的選択的に結合する低分子有機化合物を見出す。
- ③ この化合物を、PETで扱うことが可能な核

種で標識する。

- ④ これをプローブとして、生体に静脈内投与する。
- ⑤ プローブは β シート構造をとったアミロイドに結合する。一定時間後には非結合プローブは洗い流され、 β シート構造をとったアミロイドに結合したプローブのみが組織内に残る。
- ⑥ これをPETを用いイメージング画像として取り込み、プローブの集積量(= β シート構造をとったアミロイド蓄積量)の定量およびその空間的分布からアミロイドーシスを診断する。

アミロイドイメージングPETプローブとしての $[^{11}\text{C}]$ BF-227

著者らは1990年代の後半からAlzheimer病診断用PETプローブの開発に取り組み、これまでに $[^{11}\text{C}]$ BF-227³⁾, $[^{18}\text{F}]$ FACTを用いた探索的臨床研究を実施してきた(図2)。これら以外のプローブとしては、ピッツバーグ大・Klunkらの $[^{11}\text{C}]$ PIB⁴⁾および $[^{18}\text{F}]$ F3'-PIB, ペンシルベニア大・Kung夫妻らの $[^{11}\text{C}]$ SB-13⁵⁾, $[^{18}\text{F}]$ BAY94-9172⁶⁾, $[^{18}\text{F}]$ AV-45などがある(図2)。図2に示したプローブ群はいずれもアミロイド β 蛋白の β シート構造を認識することは明らかであるが、アミロイドーシスのアミロイドに対する結合性は著者らのBF-227以外は検討されていないのが現状のようである。

著者らは、山口大学の星井嘉信・石原得博両先生より各種アミロイドーシス患者標本を提供いただき、非標識BF-227のアミロイドーシス標本における染色性を検討した。そのデータを紹介すると、図3~6に示したようにBF-227は一般に感度が高いことが知られている蛍光物質であるが、各種アミロイドーシス患者標本のアミロイドに結合し、コンゴレッド染色で弱い橙赤色しか示さない標本においても明瞭な染色像を示した。

つぎに脾にアミロイドが蓄積するアミロイドーシスモデルマウスにおける $[^{11}\text{C}]$ BF-227の*in vitro*オートラジオグラフィを検討したところ、脾における放射能集積像と同一切片におけるコンゴ

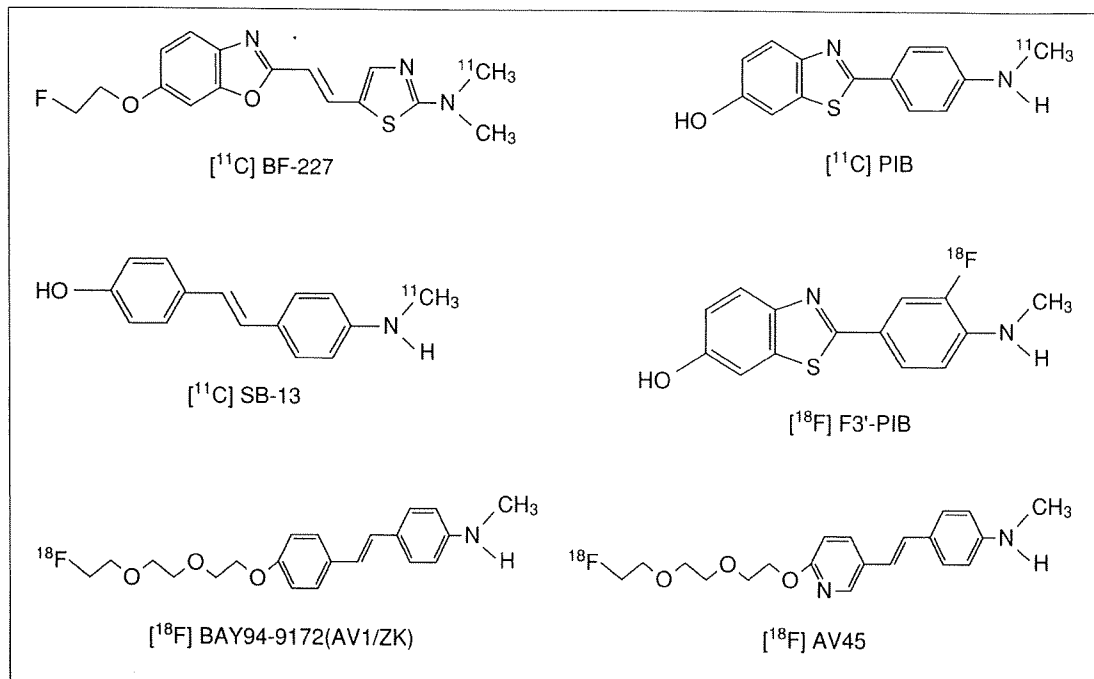


図 2 アミロイドイメージング用PETプローブの化学構造



図 3 ALアミロイドーシス患者標本(心臓)におけるBF-227染色と隣接切片におけるコンゴレッド染色の比較
A: コンゴレッド染色, B: BF-227 染色, C: A の偏光顕微鏡下での観察像。

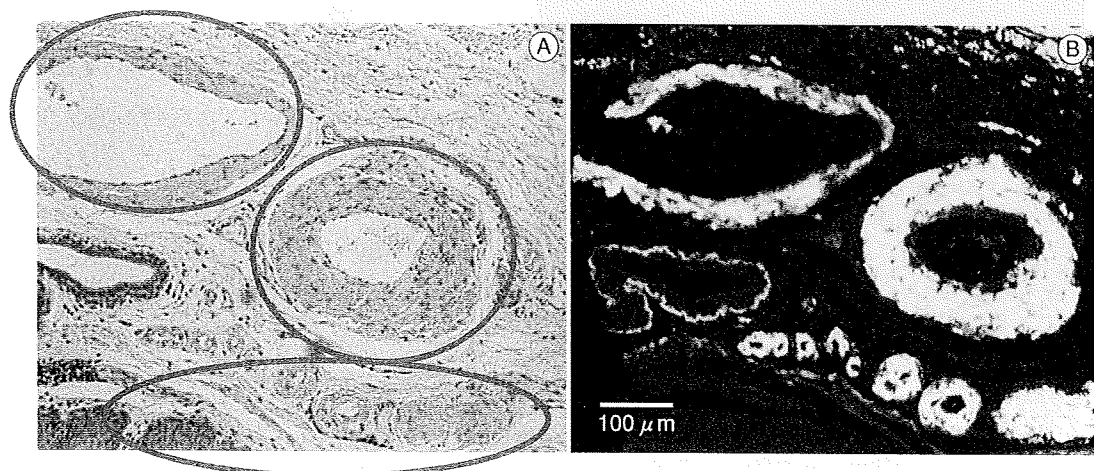


図 4 ALアミロイドーシス患者標本(食道)におけるBF-227染色(B)と、隣接切片におけるコンゴレッド染色(A)の比較

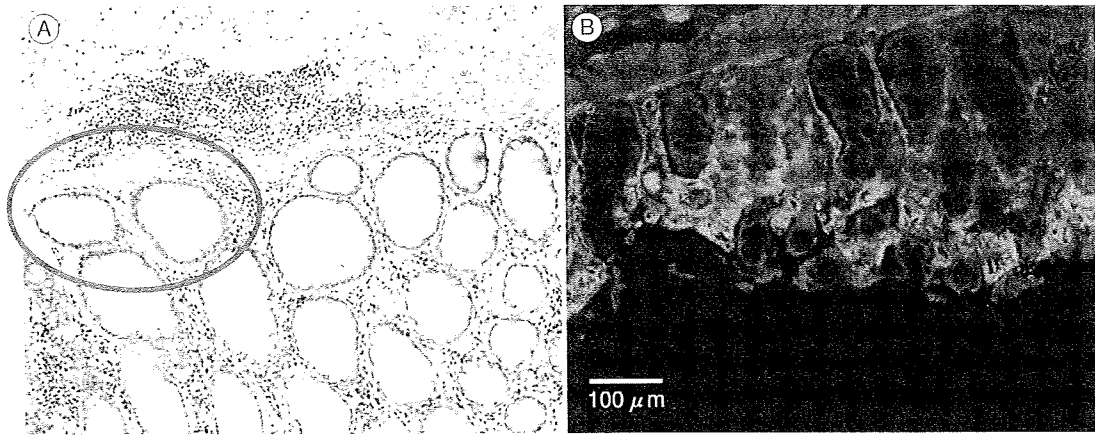


図 5 AAアミロイドーシス患者標本(直腸)におけるBF-227染色(B)と、隣接切片におけるコンゴレッド染色(A)の比較

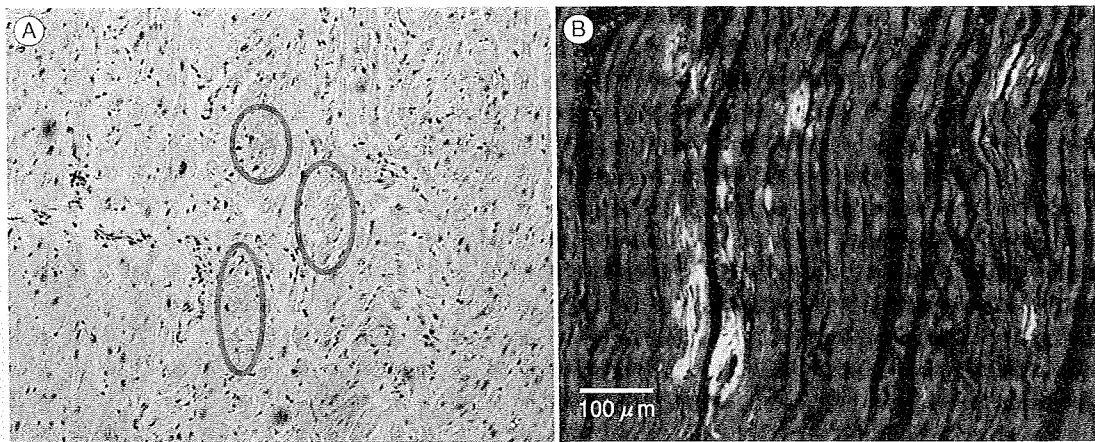


図 6 ATTRアミロイドーシス患者標本(心臓)におけるBF-227染色(B)と、隣接切片におけるコンゴレッド染色(A)の比較

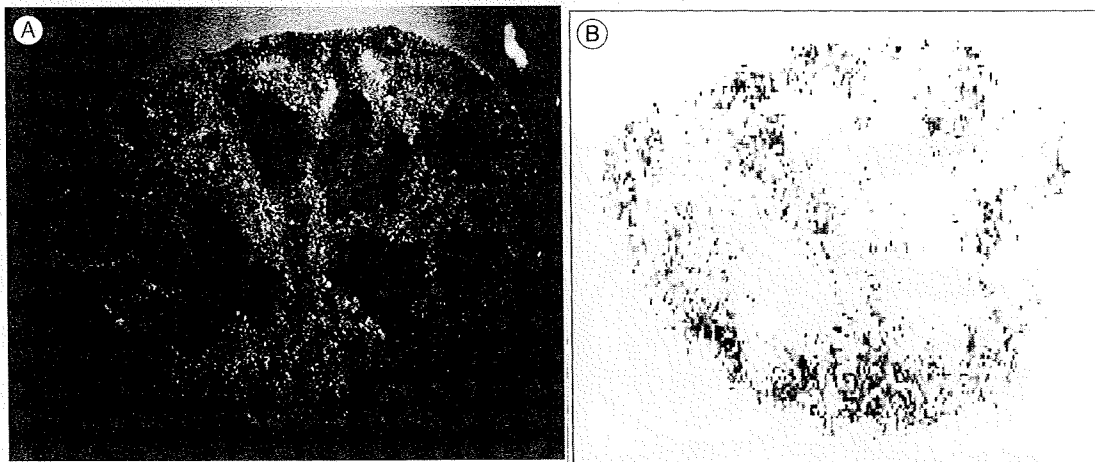


図 7 アミロイドーシスモデルマウス脾における $[^{11}\text{C}]$ BF-227の*in vitro*オートラジオグラフィ(B), および同一切片におけるコンゴレッド染色・偏光顕微鏡下での観察像(A)

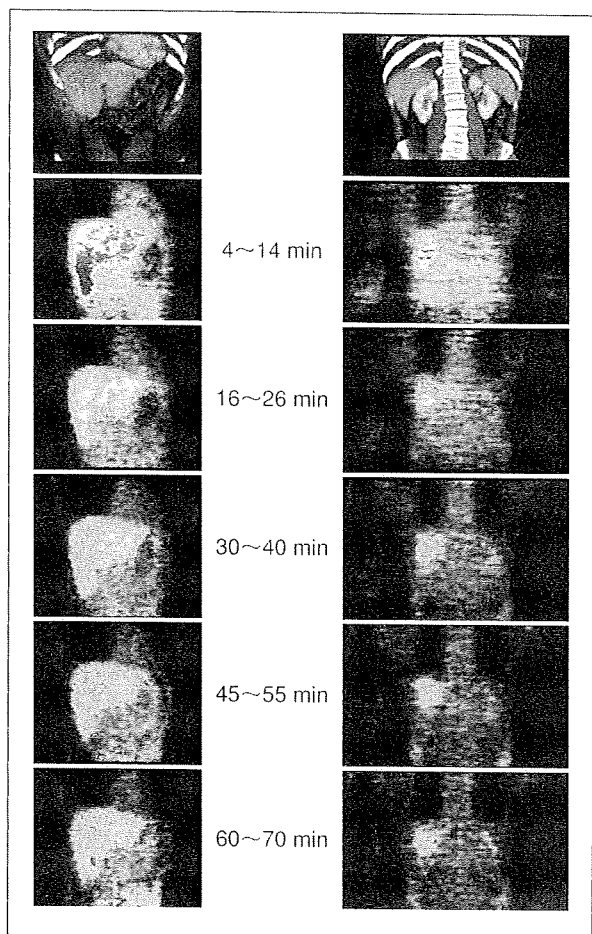


図 8 健常人における $[^{11}\text{C}]$ BF-227・PET画像

レッド染色像に十分な対応がみられた(図 7)。一方、コントロールマウスでは $[^{11}\text{C}]$ BF-227 の集積像は認められなかった。

さらなる検証として、 $[^{11}\text{C}]$ BF-227 をアミロイドーシスモデルマウスに静脈内投与して小動物用 PET を用いて *in vivo* 画像を撮影したところ、脾において $[^{11}\text{C}]$ BF-227 の明らかな集積像がみられたが、コントロールマウスでは同集積像は認められなかった(データは示さず)。

これら以外にもいくつかの検証を積み重ね、 $[^{11}\text{C}]$ BF-227 にアミロイドーシス診断用 PET プローブとして高い有用性が示唆されたことから、探索的臨床研究を目的として東北大学倫理委員会および同利益相反委員会へ必要書類を提出し、同臨床研究を実施することが承認された。

アミロイドーシス診断用 PET プローブの備えるべき特性としては、アミロイドに特異的選択的に結合することはもちろんであるが、プローブの

おもな代謝臓器がアミロイドの好蓄積臓器と重複しないこともそのひとつにあげられる。とくにアミロイドの好蓄積臓器である腎が代謝臓器である場合には、 $[^{18}\text{F}]$ FDG を用いた癌検診における尿路系と同様、腎におけるアミロイドの蓄積を定量化できない可能性がある。

2009 年 1 月末までに 2 名の健常人の PET 画像を撮影したが、ヒトアミロイドーシス患者において知られているアミロイドの好蓄積臓器または部位に特記すべき $[^{11}\text{C}]$ BF-227 の集積は認められなかった(図 8)。ただし、投与直後から主代謝臓器と考えられる肝に集積像がみられたが、これは時間依存的に集積が低下することから、肝にアミロイドが集積する患者では後半の画像を用いることで対応できると考えられる。

2009 年 1 月末現在、将来像として、アミロイドーシスを生検することなしに、アミロイドとこれに親和性の高い PET プローブとの結合像の空間的分布と定量から、アミロイドーシスを診断できる時代の扉が開こうとしている。今後いよいよ、アミロイドーシス患者において $[^{11}\text{C}]$ BF-227 による探索的臨床研究を実施する予定であるが、結果は追って報告したい。

$[^{11}\text{C}]$ 標識体の半減期は約 20 分であるが、 $[^{18}\text{F}]$ 標識体のそれは約 110 分と約 5.5 倍長く、臨床現場での使いやすさでは後者のほうが優れている。 $[^{11}\text{C}]$ BF-227 に有用性が見出されたならば、 $[^{18}\text{F}]$ 標識アミロイドイメージングプローブが登場してくるのは必然であろう。また、より安全で、より低コストが可能となる光技術を用いたアミロイドイメージング技術も見受けられるようになってきた⁷⁾。今後ますます感度・特異度に優れ、かつ安全で、低コストなアミロイドーシス診断法が登場してくるのもまた必然であろう。

謝辞：稿を終えるにあたりアミロイドーシス標本を提供していただきました山口大学情報解析医学専攻病理形態学分野・星井嘉信先生、石原得博先生(現・同大学名誉教授)に深謝いたします。ここで記しました内容の多くは、東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野修士課程修了者・藤川陽介(現・エーザイ株式会社)の業績です。また、PET 画像撮影に取り組んでいただ

きました関係諸氏に感謝いたします。

文献

- 1) 関島良樹：アミロイドーシスの基礎と臨床(石原得博監)。金原出版，2005，pp.28-33.
- 2) 星井嘉信，石原得博：アミロイドーシスの基礎と臨床(石原得博監)。金原出版，2005，pp.34-38.
- 3) Kudo, Y. et al. : *J. Nucl. Med.*, **48** : 553-561, 2007.
- 4) Klunk, W. E. et al. : *Ann. Neurol.*, **55** : 306-319, 2004.
- 5) Verhoeff, N. P. L. G. et al. : *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **12** : 584-595, 2004.
- 6) Rowe, C. C. et al. : *Lancet Neurol.*, **7** : 129-135, 2008.
- 7) Hintersteiner, M. et al. : *Nat. Biotech.*, **23** : 577-583, 2005.

* * *

Symposium: Prion diseases — Updated

Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: Clinical trial against prion diseases

Yoshio Tsuboi,¹ Katsumi Doh-ura² and Tatsuo Yamada¹¹Department of Neurology, Fukuoka University, Fukuoka, and ²Department of Prion Research, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

Prion diseases are progressive neurological disorders due to abnormal prion protein (PrP^{Sc}) deposition in the central nervous system. At present, there is no effective treatment available for any form of prion disease. Pentosan polysulfate (PPS) has been shown to prolong significantly the incubation period in mice with PrP^{Sc} infection when administered to the cerebral ventricles in preclinical trials. In human studies conducted in European countries and Japan, intraventricular PPS was administered to patients with different forms of prion disease and was well tolerated. We report 11 patients with prion disease treated with intraventricular PPS at Fukuoka University from 2004. Cases included three familial CJD (two with V180I mutation, one GSS with P102L mutation), two iatrogenic CJD, and six sporadic CJD cases. At present, average survival period after treatment was 24.2 months (range, 4–49). Seven cases died of sepsis and pneumonia. Subdural effusion with various degrees was seen on CT scan in most cases. Except for these, adverse effects did not occur in the treatment period. Although our preliminary study of the new treatment with PPS by continuous intraventricular infusion showed no apparent improvement of clinical features in patients with prion disease, the possibility of extended survival in some patients receiving long-term PPS was suggested.

Key words: clinical trial, continuous intraventricular infusion, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), prion disease, pentosan polysulfate (PPS).

INTRODUCTION

Prion diseases, also known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are adult-onset, relentlessly pro-

gressive neurodegenerative disorders. Human prion diseases are categorized as sporadic (or idiopathic), genetic (or familial), and acquired (or infectious) forms according to their etiology. All forms of prion diseases have abnormal prion protein (PrP^{Sc}) deposition in the central nervous system leading to neuronal dysfunction and death.¹ Human prion diseases include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS), kuru, and fatal familial insomnia. Recently, two acquired forms of human prion diseases have become widely known to the public: variant CJD (vCJD), which is reportedly caused by consuming animal products contaminated with prions that cause bovine spongiform encephalopathy,² and iatrogenic CJD transmitted by contaminated cadaveric dura mater grafts or growth hormones.³

At present, there is no proven specific or effective treatment available for any form of prion disease. However, sulfated polysaccharides may be effective in inhibiting PrP^{Sc} formation *in vitro*⁴ and in prolonging disease incubation time in peripherally prion-infected animal models.^{5–11} Pentosan polysulfate (PPS), a large polyglycoside molecule with weak heparin-like activity, is one of the most potent compounds among them. Even after the brain is affected with prion, PPS is remarkably effective in prolonging the incubation period and inhibiting PrP^{Sc} formation therein, when administered into the cerebral ventricle in cerebrally prion-infected animal models.¹² Therefore the introduction of intraventricular PPS infusion into humans has aroused new expectations of remedy for human prion diseases. Here, we review an ongoing clinical trial of long-term intraventricular PPS infusion in Japanese patients with prion diseases.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This clinical trial of long-term intraventricular PPS infusion was approved by the ethics committee of Fukuoka

Correspondence: Yoshio Tsuboi, MD, Department of Neurology, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan. Email: tsuboi@cis.fukuoka-u.ac.jp

Received 11 April 2009; revised 23 July 2009 and accepted 24 July 2009.