

201024065A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

プリオン病予防の実用化に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 堂浦 克美

平成23年（2011年）3月

目 次

	ページ
I. 総括研究報告書	
プリオン病予防の実用化に関する研究 堂浦 克美 (東北大学大学院医学系研究科) 1
II. 分担研究報告書	
セルロース誘導体の静脈内投与の安全性に関する研究 工藤 幸司 (東北大学未来医工学治療開発センター) 9
セルロース誘導体に関連した低分子化合物の探索と作用機序解明に関する研究 岡村 信行 (東北大学大学院医学系研究科) 13
セルロース誘導体の作用機序解明に基づく治療予防開発に関する研究 逆瀬川 裕二 (東北大学大学院医学系研究科) 16
セルロース誘導体の最適化に関する研究 上高原 浩 (京都大学大学院農学研究科) 20
セルロース誘導体の修飾による最適化に関する研究 木村 朋寛 (東北大学大学院医学系研究科) 24
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27
IV. 研究成果の刊行物・印刷 31

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22年度 総括研究報告書

プリオン病予防の実用化に関する研究

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

プリオン病発症リスク保有者に対する発症予防法として、セルロース誘導体（CE）効果の実用化を目指している。臨床での投与方法を想定した2ヶ月間の間歇静脈内投与では毒性所見（貧血、泡沫状貪食細胞）が出現し、その回復に時間を要することが判明した。CEの治療予防的効果を保持しながらも、これらの毒性所見が出現しないCE関連化合物を探索し、メチル化単糖やその類縁体に優れた治療予防効果を発見した。CEの安全性試験結果では、高分子であるが故にCEの毒性所見の出現やその回復に時間がかかることが明らかとなったことから、化学構造が明確であるCE関連の低分子化合物の方が開発に有利であり、メチル化単糖などの低分子化合物の最適化研究は次年度の重要課題の一つである。一方、CEの作用機序に糖代謝変動やサイトカインの誘導などが関与していることを発見した。同じような所見を発現する既製薬品があることより、発症予防効果や治療効果を確認できれば、早期にリスク保有者や患者への応用が可能である。

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
岡村 信行	東北大学大学院医学系研究科・准教授
逆瀬川 裕二	東北大学大学院医学系研究科・助教
上高原 浩	京都大学大学院農学研究科・助教
木村 朋寛	東北大学大学院医学系研究科・助手

A. 研究目的

プリオン病発症リスク保有者は、数千～数万の規模で存在していると推定されているものの、リスク保有者の発症予防を目的とした予防手段の開発は行われていない。これまでの基礎研究成果では、発症後に治療的介入を行っても病気の進行を止めることは不

可能であるものの、潜伏期の予防的介入では発症を寿命一杯まで遅らせるところまで達成可能である。研究代表者らは、日常経口摂取しているセルロース誘導体（CE）が、プリオン病に対して長期間にわたる優れた発病抑制効果を発揮することを発見しており、プリオン病発症リスク保有者に対す

る発症予防法として、このCE効果の実用化を目指している。

B. 研究方法

1) 静脈内投与の安全性確認

臨床での投与法を想定した2ヶ月間の間欠静脈内投与の安全性試験および投与終了後6ヶ月間の回復試験をマウスにおいて3濃度で実施した。昼夜行動・外表・摂水摂食・体重の観察、血液検査、血液生化学検査、解剖検査、病理組織学的検査を実施した。

2) 修飾による最適化研究

体内（皮下、腹腔内、静脈内、脳室内）への投与に比べ、経口投与ではCEの予防効果が低下する。各種CE修飾体を作製し、効果の高いCE構造の特徴についてプリオン感染マウスで検討した。

3) CE関連低分子化合物の探索

化学構造が明確で構造展開が容易であるCE関連の低分子化合物群を中心に、プリオン感染細胞やプリオン感染マウスを用いて治療予防効果を持つ化合物を探索した。

4) CE作用機序解明に基づく治療予防開発

マウスにおいてCEの体内投与により変動する因子群を、DNAマイクロアレイ法、プロテオミクス、プロテインチップ等を利用して検討した。変動する因子群の中で、プリオンの産生や分解に関連すると考えられるパスウェイ上の主な因子について、遺伝子ノックダウンや遺伝子導入による遺伝子発現変動や、組換え蛋白質・特異抗体・選択的阻害剤等を用いて、プリオ

ン感染細胞で解析を行い、予防治療効果との関連を検討した。

(倫理面の配慮)

動物実験は施設の動物実験委員会の許可を受け、動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1) 静脈内投与の安全性確認

これまでの研究で、皮下投与の効果は単回大量投与ではほぼ寿命一杯まで発症を予防できるほど優れているものの、毒性所見（貧血、血清脂質低下、泡沫状貪食細胞）が出現した。そこで、臨床での投与法を想定した静脈内投与の安全性試験および回復試験を実施したが、いずれの濃度においても、投与期間中、血液検査において貧血傾向がみられ、諸臓器に泡沫状貪食細胞が増加したことから、無毒性量は100mg/kg未満と考えられた。また、回復性に関しては、6ヶ月間の休薬によって貧血傾向は回復し、諸臓器の泡沫状貪食細胞の泡沫状の変化に回復傾向が認められた。

2) 修飾による最適化研究

CEの陽イオン型、陰イオン型、疎水型などの修飾体とともに、6糖低分子CEの修飾体を検討したが、効果が高いCE構造の特徴としては親水性で分解されにくい構造を持つことが明らかとなった。

3) CE関連低分子化合物の探索

CEの分解代謝物と想定される様々な糖化合物や類似低分子化合物をプリオン感染マウスにおいて検討し、メチル化単糖やその類縁体に優れた発

症予防効果を発見した。また、グリコシドにはプリオン感染細胞で、プリオン産生を抑える効果をもつものも見られた。

4) CE作用機序解明に基づく治療予防開発

CEの作用機序に、sodium-glucose cotransporter を介する糖代謝変動やG-CSF/GM-CSFなどのサイトカインの誘導が関与していることを発見した。また、グリコシドによるプリオン産生抑制にはJAK-STAT系の抑制が関与していた。

D. 考察

研究代表者らは、生体不活性物質として知られ、私たちの日常生活の極めて多様な分野で使われているセルロース誘導体(CE)が、プリオン感染動物で劇的な発症遅延効果を示すことを発見している。感染早期にCEを体内に単回投与すれば、ほぼ生涯にわたり発症が抑えられる。また、驚くべき事にCEを皮下に単回投与した1年後に、プリオンを脳内に直接感染させた場合であっても、発症は劇的に遅延する。CEは経口摂取に関しては、安全性が確立されているため、経口投与で有効であれば、すぐにでも臨床に応用できるところであるが、経口投与での有効性は劣る。これは経口投与したCEの数%しか腸管から吸収されないこと(Pharmacometrics 5:1-4, 1971)が原因である。一方、体内に投与した際には有効性は高いが、今回の臨床での投与方法を想定した間歇静脈内投与では、毒性所見(貧血、泡沫状貪食細胞)が出

現した。6ヶ月間の回復試験では毒性所見の回復が観察されたが、泡沫状貪食細胞は低減するものの残存することが判明した。CEが高分子の生体不活性物質である点と長期間にわたる予防的効果から推測すると、泡沫状貪食細胞の出現自体が予防的効果と関係している可能性はあるので、同細胞が残存する状況を毒性所見と捉えることが正しいかどうかは不明であり、研究を進めていく中でその解答が得られるものと思われる。また、これらの毒性所見が、ステロイド等と併用することで軽減あるいは消失するかどうかは今後検討する必要がある。

一方、CEの治療予防的効果を保持しながらも毒性所見が出現しないCE関連化合物を開発する上で、開発や展開が容易であるCE関連低分子化合物(メチル化単糖やその類縁体を中心とした化合物群)の発見の意義は大きい。高分子であるが故にCEの毒性所見の出現やその回復に時間がかかることが明らかとなったことから、CE関連の低分子化合物の方が開発に有利であり、メチル化単糖をはじめとする低分子化合物の最適化は今後の重要な課題の一つである。

また、作用機序解明研究での発見(sodium-glucose cotransporter を介する糖代謝変動、CSF/GM-CSFなどのサイトカインの誘導、JAK-STAT系の抑制)については、プリオンに対する宿主制御系を解明する上で重要と考えられ、相互の関連解析やより詳細なメカニズムの解明が、新たな創薬の開発に繋がる可能性がある。さらに、同じ

ような所見を発現する既製薬品があることより、これらの発症予防効果や治療効果が複数のプリオン病動物モデルで実証できれば、早期にリスク保有者や患者への応用が可能となる。

これまでの国内外の研究成果を見ても、CEを凌ぐ発症予防的効果や治療効果を発揮する手段は、プリオン蛋白の発現を完全に無くしてしまうこと (Cell 73, 1339-1347, 1993; Science 302, 871-874, 2003) 以外にはない。現時点で実現可能な手段で、現実的なプリオン病克服の戦略としては、CE効果の実用化以外には考えられない。しかし、今回の安全性試験の結果を踏まえると、CEをそのままリスク保因者や患者に使用するという方向から、CEの毒性を持たない治療予防効果に優れた関連低分子化合物の開発や、作用機序解明に基づくCEの効果を代行する既成薬品の評価に研究内容をシフトさせ、CE効果の実用化に向けて着実に成果を重ねて行くことが重要である。

E. 結論

CEの実用化研究として、安全性試験・最適化研究・薬物送達研究・作用機序解明研究を実施し、CEの毒性、CEに関連した低分子化合物の発見、作用機序における3つのパスウェイの関与の発見をなした。これらの研究成果は、次年度の研究展開の方向を、CEそのものの実用化から、CE効果の代用品の実用化にシフトさせるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. Biochem Biophys Res Commun. 405:285-90, 2011
- Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K. Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells. Protein J. 29:493-500, 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. 37:934-941. 2010
- 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. 584:1193-8, 2010
- Kamitakahara H, Nakatsubo F: ABA- and BAB-triblock cooligomers of tri-O-methylated and unmodified

- cello-oligosaccharides: Syntheses and structure-solubility relationship. *Cellulose* 17:173-86, 2010
- Kamitakahara H, Funakoshi T, Nakai S, Takano T, Nakatsubo F: Synthesis and Structure/Property Relationships of Regioselective 2-O-, 3-O- and 6-O-Ethyl Celluloses. *Macromolecular Bioscience* 10:638-47, 2010
- Enomoto-Rogers Y, Kamitakahara H, Yoshinaga A, Takano T: Radially oriented cellulose triacetate chains on gold nanoparticles. *Cellulose* 17:923-36, 2010
- Akagi T, Suzuki Y, Ikegami A, Kamitakahara H, Takano T, Nakatsubo F, Yonemori K: Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *J Japan Soc Hort Sci.* 79:275-81, 2010
- Morikawa Y, Yoshinaga A, Kamitakahara H, Wada M, Takabe K: Cellular distribution of coniferin in differentiating xylem of *Chamaecyparis obtusa* as revealed by Raman microscopy. *Holzforschung* 64:61-7, 2010
- Tobimatsu Y, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F: Studies on the dehydrogenative polymerization of monolignol beta-glycosides. Part 6: Monitoring of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of monolignol glycosides by GPC-PDA. *Holzforschung* 64:173-81, 2010
- Tobimatsu Y, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F: Reactivity of syringyl quinone methide intermediates in dehydrogenative polymerization. Part 2: pH effect in horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of sinapyl alcohol. *Holzforschung* 64:183-92, 2010
- Tobimatsu Y, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F: Reactivity of syringyl quinone methide intermediates in dehydrogenative polymerization I: high-yield production of synthetic lignins (DHPs) in horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of sinapyl alcohol in the presence of nucleophilic reagents. *J Wood Sci.* 56:233-41, 2010
- Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y. In vivo Detection of Amyloid Plaques in the Mouse Brain using the Near-Infrared Fluorescence Probe THK-265. *J Alzheimers Dis.* in press, 2010
- Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matsuda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda

- H, Yanai K. Voxel-based analysis of amyloid positron emission tomography probe [C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 30:101-11, 2010
- Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain.* 133:1772-8, 2010
- Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. *J Neurol.* 257:721-7, 2010
2. 学会発表
国際学会
- Sakasegawa Y, Nakabayashi S, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. CC chemokines are upregulated in prion-infected neuroblastoma cells. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
- Kimura T, Nishizawa K, Doh-ura K. Search for endogenous factors involved in the abnormal PrP formation in prion-infected cells. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
- Teruya K, Doh-ura K. A thioflavin derivative facilitates cross-linking of abnormal PrP but not normal PrP. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
- Hamanaka T, Sakasegawa Y, Oguma A, Nishizawa K, Doh-ura K. Anti-prion activities of PSK in vitro and in vivo -further evaluation of its function-. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
- Kamitakahara H, Tanaka Y: Synthesis and Cellular Uptake of Blockwise Alkylated Tetrasaccharide/Hydrophobic Dye Complexes: Evaluation as Probes for a Novel Drug Delivery System. 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Tokyo (Makuhari), August 1-6, 2010
- Kamitakahara H, Hirai K, Tanaka Y: Syntheses of Amphiphilic Tetrasaccharides as Drug Carriers for Hydrophobic Compounds. BIT's 1st Annual World Congress of NanoMedicine 2010, Beijing, October 23-25, 2010

Kamitakahara, H; Nakagawa, A;
Yoshinaga, A; Ishizu, C; Takano,
T; Imai, T; Sugiyama, J; Hirai, K;
Tanaka, Y; Steiniger, F; Sarbova,
V; Fenn, D; Koschella, A Heinze,
T : Structure-property
relationships of cellulose ethers
with regioselective and blockwise
substituent patterns 241st ACS
National Meeting & Exposition,
Anaheim, CA, United States, March
27-31, 2011 (2011), CELL-126

国内学会

堂浦克美: ヤコブ病の克服研究 第4
回プリオン病の市民講座 食と医療
の安全、東京、2010年11月23日

逆瀬川裕二、堂浦克美: 熱ショック蛋
白質 Hsp90 のリコンビナントプリオ
ン蛋白質に対する部分変性活性は低
濃度 Cu (II) イオンによって可逆的
に制御される。第33回日本分子生物
学会・第83回日本生化学会合同大会、
神戸、2010年12月7日-10日

ロジャース有希子、上高原 浩、吉永
新、高野俊幸: 金ナノ粒子状における
セルローストリアセテート分子鎖の
配向制御。セルロース学会第17回年
次大会、香川県さぬき市、2010年7
月15-16日

中川篤、石津智世、上高原 浩、高野
俊幸、Velina Sarbova, Andreas
Koschella, Thomas Heinze: 天然セル
ロースからの 2-O-methyl- 及び
3,6-di-O-methyl-cellulose の合成。
セルロース学会第17回年次大会、香
川県さぬき市、2010年7月15-16日

上高原 浩: 思いどおりのものをつく
る。セルロース学会関西支部 せと
うちの若手セミナー「セルロース誘
導体 長い歴史とそのチカラ」 兵
庫県赤穂市、2010年9月2-3日

上高原 浩: セルロース系コポリマ
ー・コオリゴマーの精密合成と機能
発現。セルロース学会関西支部主催
セルロース学会第16回マイクロシ
ンポジウム「よくわかる! セルロ
ース誘導体のすべて」関西大学、吹田、
2011年1月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 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22年度 分担研究報告書

セルロース誘導体の静脈内投与の安全性に関する研究

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
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：佐々木 幹夫 株式会社イナリサーチ

研究要旨

これまでの研究で、セルロース誘導体の皮下投与の効果は単回大量投与でほぼ寿命一杯まで発症を予防できるほど優れているものの、毒性所見（貧血、血清脂質低下、泡沫状貪食細胞）が出現した。そこで、臨床での投与法を想定した2ヶ月間の間歇静脈内投与の安全性試験および投与終了後6ヶ月間の回復試験をマウスにおいて3濃度で実施した。その結果、いずれの濃度においても、投与期間中、血液検査において貧血傾向がみられ、諸臓器に泡沫状貪食細胞が増加したことから、無毒性量は100mg/kg未満と考えられた。また、回復性に関しては、6ヶ月間の休薬によって貧血傾向は回復し、諸臓器の泡沫状貪食細胞の泡沫状の変化に回復傾向が認められた。

A. 研究目的

これまでの研究で、セルロース誘導体（CE）の皮下投与の効果は単回大量投与でほぼ寿命一杯まで発症を予防できるほど優れているものの、毒性所見が出現した。そこで、単回大量投与の毒性所見を減らすため、臨床での投与法を想定した間歇静脈内投与の安全性について検討を行った。

には生理食塩液を同様の方法で投与した。対照群と500 mg/kg群については、その後12又は24週間（いずれも雌雄各5匹）の休薬による回復性を調べた。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の許可を受け、動物実験指針を遵守して行った。

B. 研究方法

CEの100及び500 mg/kgを1群雌雄各6又は7匹（100 mg/kg群）又は18匹（500 mg/kg群）のSlc:ddYマウスに3又は4日間間隔で8週間（合計16回）静脈内投与して、その反復投与毒性を調べた。対照群（雌雄各18匹）

C. 研究結果

投与期間中、100 mg/kg群の雌1例が投与50日の投与終了直後、500 mg/kg群の雄1例が投与40日の投与直前に死亡した。100及び500 mg/kg群の雌雄の一部の動物で、尾部の暗紫色化、黒色化、創傷、欠落又は痂皮形成がみ

られた。500 mg/kg 群の雌雄で投与中期以降の体重が対照群に比べて高値であった。血液学的検査において、100 mg/kg 群の雌雄で網赤血球比/数に高値、100 及び 500 mg/kg 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量又は平均赤血球血色素濃度に低値がみられた。血液生化学的検査において、100 mg/kg 群の雌でアルブミンの低値、500 mg/kg 群の雌雄でカルシウム、総蛋白及びアルブミンの低値、雄で LD 活性、クレアチニン、総コレステロール及びリン脂質に低値が認められた。剖検では、髄外造血に伴う変化として、対照群の雌 1 例、100 及び 500 mg/kg 群の雌雄各 1～2 例で脾臓が大きかった。器官重量では、100 mg/kg 群の雌雄の脾臓重量及び 500 mg/kg 群の雌雄の肝臓重量が高値であった。病理組織学的検査において、100 及び 500 mg/kg 群で、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、下垂体、甲状腺及び大脳の脈絡叢に泡沫状又は空胞状の細胞（大食細胞、内皮細胞、クッパー細胞）が増加してみられた。被験物質群では、投与部位（尾）において投与部血管周囲の炎症細胞浸潤、出血、浮腫、壊死又は血管壁壊死がみられ、皮膚潰瘍も認められた。

休薬期間中、500 mg/kg 群の一般状態では、投与期間から引き続き認められた投与部位（尾）の損傷に治癒が認められた。500 mg/kg 群の体重では投与期間から引き続き高値又は高値傾向が認められた。500 mg/kg 群の血液学的検査では、12 週の休薬期間終了時の検査で雄の網赤血球数、雌のヘモグロ

ビン濃度にそれぞれ低値がみられ、24 週の休薬期間終了時にはこれらの変動は認められなかった。500 mg/kg 群の血液生化学的検査では、12 週の休薬期間終了時の検査で雌の LD 及び CK 活性に低値がみられ、24 週の休薬期間終了時の検査で雄の ALT 活性に低値並びに総コレステロール及びリン脂質に高値、雌のカルシウムに高値が認められた。剖検では、500 mg/kg 群の 24 週の休薬期間終了時に投与部位の痂皮形成がみられたが、その他には被験物質投与に関連した異常は認められなかった。器官重量では、投与期間終了時にみられた変動は認められなかった。病理組織学的検査では、500 mg/kg 群の 12 週の休薬期間終了時において、投与期間終了時にみられた泡沫状又は空胞状の細胞が甲状腺を除くすべての観察対象器官に引き続き認められた。同群の 24 週の休薬期間終了時においても、泡沫状又は空胞状の細胞がなおみられたが、いずれの器官においても大部分が軽度であり、回復傾向が認められた。

D. 考察

以前の C E 単回大量皮下投与による毒性の所見と薬物動態の所見を踏まえ、臨床応用可能と考えられる 2 ヶ月間の間欠静脈内投与を行ったが、C E の 100 及び 500 mg/kg の静脈内間歇投与によって、投与期間中、血液検査において貧血傾向がみられ、各種器官に泡沫状又は空胞状の細胞が増加したことから、無毒性量は 100 mg/kg 未満と考えられた。また、回復性に関して

は、24週間の休薬によって貧血傾向は回復し、各種器官の食細胞系細胞の泡沫状又は空胞状の変化に回復傾向が認められた。しかし、毒性所見の出現を抑えることを期待した投与方法にても、毒性所見は出現し、毒性からの回復には長期間（休薬後6カ月以上）を要することがあらためて確認された。最大効果を生む投与量(250 mg/kg)は、毒性量域にあり、無毒性量域からは離れている。しかし、CEが高分子の生体不活性物質である点と長期間にわたる予防的効果から推測すると、泡沫状食細胞の出現自体が予防的効果と関係している可能性があり、同細胞が残存する状況を毒性所見と捉えることが正しいかどうかは不明であり、今後研究を進めていく中でその答えが得られる可能性がある。また、これらの毒性所見が、プリオンに影響しないステロイド等の投与を併用することで軽減あるいは消失するかどうかは今後検討する必要がある。

E. 結論

臨床での投与方法を想定した2ヶ月間のCE間歇静脈内投与の安全性試験をマウスにおいて実施し、投与期間中の無毒性量は100mg/kg未満と判明した。また、回復性に関しては、500mg/kg投与後では6ヶ月間の休薬によって貧血傾向は回復し、諸臓器の泡沫状食細胞の泡沫状の変化に回復傾向が認められた。

F. 健康危険情報

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)C]BF-227 PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37(5):934-941, 2010

Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y. In vivo Detection of Amyloid Plaques in the Mouse Brain using the Near-Infrared Fluorescence Probe THK-265. J Alzheimers Dis. in press, 2010

Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matsuda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K. Voxel-based analysis of amyloid positron emission tomography probe [C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 30:101-11, 2010

Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled

2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. Brain. 133:1772-8, 2010
Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. J Neurol. 257:721-7, 2010

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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22年度 分担研究報告書

セルロース誘導体に関連した低分子化合物の探索と作用機序解明に関する研究

研究分担者：岡村 信行	東北大学大学院医学系研究科・准教授
研究代表者：堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科・教授
研究分担者：上高原 浩	京都大学大学院農学系研究科・助教
研究協力者：小熊 歩	東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：西澤 桂子	東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

セルロース誘導体の分解代謝物と想定される様々な糖化合物や類似低分子化合物をプリオン感染マウスやプリオン感染細胞において検討し、メチル化単糖やその類縁体に優れた発症予防効果や抗プリオン活性を見出した。これらの化合物の作用機序として、sodium-glucose cotransporter を介する糖代謝変動や、JAK-STAT 系の抑制が発症予防効果や抗プリオン効果に関与していることを発見した。

A. 研究目的

毒性が明らかとなった高分子であるセルロース誘導体（CE）の最適化や作用機序解明において、プリオン病に対する予防治療効果を発揮する最小化学構造が解れば、創薬開発が容易となり実用化への道のりは短縮化できる。

B. 研究方法

CEの分解代謝物と想定される様々な糖化合物や類似低分子化合物をプリオン感染マウスにおいて検討した。具体的には、2週間連続投与可能なアルゼ浸透圧ポンプからのカテーテルをマウス脳室内に留置し、ポンプ内には各種糖化合物や類似低分子化合物を充てんした。脳内感染後から発症末

期まで、投与マウスを観察し潜伏期間を調べ、発症予防効果があるかどうか検討した。また、プリオン感染細胞の培養上清中に各種糖化合物や類似低分子化合物を加え、プリオンの産生を抑える効果をもつかどうかや、正常型プリオンタンパク代謝や局在への影響がみられるかどうかを検討した。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の許可を受け、動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

CEの分解代謝物と想定される様々な糖化合物や類似低分子化合物のうち、商業的に入手可能な糖化合物や類似低分子化合物の約80種と、新たに

東京化成工業で合成した 10 種について、プリオン感染マウスおよびプリオン感染細胞において検討したところ、メチル化単糖およびその類縁体が、発症抑制効果を持つことが判明した。これらの化合物に共通の特徴は、sodium-glucose cotransporter (SGLT) により細胞内に取り込まれる点であった。そこで、メチル化単糖以外の SGLT で取り込まれる化合物や glucose transporter で取り込まれる化合物をプリオン感染マウスで検討したところ、SGLT で取り込まれる化合物ではメチル化単糖と同様な効果が観察されたが、glucose transporter で取り込まれる化合物には効果が見られなかった。

一方、単糖でグリコシド 9 と呼んでいる化合物やグリコシド 50 と呼んでいる化合物では、検討した 2 系統のプリオン感染細胞のいずれにおいてもプリオンの産生を抑えた。これらの化合物はピラノース環の 6 位と、2 位/3 位に $O-CH_3-C_6H_6$ の共通構造をもっていた。これらの化合物の作用機序を DNA マイクロアレイや RT-PCR 法で調べたところ、インターフェロンで誘導される遺伝子群の発現が抑制されていることが明らかとなった。インターフェロン投与によりプリオンの産生が増えること、インターフェロンのシグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の抑制系因子である SHP の活性を変動させることにより、プリオン産生量が変化することを、プリオン感染細胞で明らかにした。

D. 考察

C E の治療予防的効果を保持しながらも毒性所見が出現しない C E 関連化合物を開発する上で、開発や展開が容易である低分子化合物の発見の意義は大きい。安全性試験の結果では、高分子であるが故に C E の毒性所見の出現やその回復に時間がかかることが明らかとなったことから、関連低分子化合物の方が開発に有利であり、メチル化単糖をはじめとする低分子化合物の最適化は今後の重要な課題の一つである。

一方、これらの化合物の作用機序として sodium-glucose cotransporter を介した糖代謝変動や、JAK-STAT 系の抑制が明らかとなった。これらの発見は、プリオンに対する宿主制御系を解明する上で重要と考えられ、相互の関連解析やより詳細なメカニズムの解明が、新たな創薬の開発に繋がる可能性がある。さらに、SGLT 関連薬剤や JAK-STAT 経路の抑制剤は新世代の糖尿病薬や抗炎症薬として盛んに開発されているところであり実用化に近いものがある。それらの発症予防効果や治療効果が複数のプリオン病動物モデルで実証できれば、早期にリスク保有者や患者への応用が可能となる。

E. 結論

開発や展開が容易である C E 関連低分子化合物をプリオン感染マウスおよびプリオン感染細胞で検討し、メチル化単糖やその類縁体に優れた発症予防効果や抗プリオン活性を見出した。これらの化合物の作用機序として、

sodium-glucose cotransporter を介した糖代謝変動や、JAK-STAT 系の抑制を明らかにした。

F. 健康危険情報

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)C]BF-227 PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37(5):934-941, 2010

Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y. In vivo Detection of Amyloid Plaques in the Mouse Brain using the Near-Infrared Fluorescence Probe THK-265. J Alzheimers Dis. in press, 2010

Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matsuda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K. Voxel-based analysis of amyloid positron emission tomography probe [C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 30:101-11, 2010

Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S,

Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled

2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. Brain. 133:1772-8, 2010

Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. J Neurol. 257:721-7, 2010

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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22年度 分担研究報告書

セルロース誘導体の作用機序解明に基づく治療予防開発に関する研究

研究分担者：逆瀬川 裕二 東北大学大学院医学系研究科・助教
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：西澤 桂子 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：河田 真樹 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

マウスを用いたセルロース誘導体の作用機序解明研究において、投与後長期間にわたる泡沫状貪食細胞の出現を踏まえ、網羅的解析を行ったところ、G-CSF/GM-CSF/M-CSFなどのサイトカインが投与後長期間にわたり誘導されていることを発見した。この発見をもとに、プリオン感染マウスに感染末期よりGM-CSFを投与したところ、臨床症状の改善及び生命予後の改善が観察された。G-CSF/GM-CSFは既製薬品であることより、早期にリスク保有者や患者への応用が可能である。

A. 研究目的

セルロース誘導体（CE）の実用化において、その毒性の低減および効果の向上のためには、CEの作用機序を解明することが必要である。本研究では、これまでに得られているCEの安全性試験や動態試験の結果を踏まえ、CEのプリオン病予防効果に関連する因子群を網羅的に探索し、それらの効果をプリオン感染マウスで検証した。

B. 研究方法

CE投与動物における投与後長期間にわたる泡沫状貪食細胞の出現を踏まえ、マウスにおいてCEの体内投与により変動する因子群をDNAマイクロアレイ法、プロテオミクス、プロテ

ンチップ等を利用して網羅的に検討した。変動する因子群の中で、プリオンの産生や分解に関連すると考えられるパスウェイ上の主な因子について、遺伝子ノックダウンや遺伝子導入による遺伝子発現変動や、組換え蛋白質・特異抗体・選択的阻害剤等を用いて、プリオン感染細胞やプリオン感染マウスで解析を行い、予防治療効果との関連を検討した。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の許可を受け、動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

CE投与マウスにおける投与後長期

間にわたる泡沫状貪食細胞の出現とともに様々な体液性因子（ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、成長因子等）の経時的な変動が観察された。糖代謝にかかわるもの、血管新生にかかわるもの、マクロファージや他の炎症性細胞の遊走にかかわるものの変動は、経時的にも長期間にわたり観察された。その中でもマクロファージにかかわるものとして G-CSF/GM-CSF/M-CSF に注目した。これらのサイトカインはいずれも投与直後から経時的に観察した半年後まで、高値を続けた。この発見をもとに、長期間の投与での安全性、マウス型 CSF の入手可能性、既成薬品の存在などを考え、GM-CSF をプリオン感染マウスに感染末期より 5 回～7 回（一日 1 回）を、ヒトでの薬容量に相当する量を腹腔内に投与した。その結果、臨床症状（活動量、摂食摂水量、神経症状、全身栄養状態など）に顕著な改善がみられ、生命予後の有意な改善が観察された。

D. 考察

生体不活性物質として知られ、私たちの日常生活の極めて多様な分野で使われている CE が、プリオン感染動物で劇的な発症遅延効果を示す作用機序については、かなり熱心に解析を行ってきたが、未だに良く解っていない。特に、感染早期に CE を体内に単回投与すれば、ほぼ生涯にわたり発症が抑えられることや、CE を皮下に単回投与した 1 年後に、プリオンを脳内に直接感染させた場合であっても、発症は

劇的に遅延するメカニズムは、B リンパ球や T リンパ球が関与する獲得免疫が関与している可能性を示唆している。しかし、これまでの研究では B リンパ球や T リンパ球の関与を積極的に支持するデータは得られていない。今回、CE の毒性所見と考えられる投与後長期間にわたり観察される泡沫状貪食細胞の存在と CE の作用機序との関連が、体液性因子の解析から示唆された。G-CSF/GM-CSF/M-CSF などのサイトカインが CE 投与後長期間にわたり誘導されていることを発見した。マクロファージの機能分化に関与する GM-CSF に注目し、プリオン感染マウスに感染末期より GM-CSF を投与したところ、臨床症状の改善及び生命予後の改善が観察された。GM-CSF は既製薬品として米国では多数の患者に使用され、その安全性が確立しているところである。したがって、さらに複数のプリオン病動物モデルでの検討で同様な効果が引き続き観察されれば、早期にリスク保有者や患者への応用が可能である。

E. 結論

セルロース誘導体のプリオン病予防治療効果の作用機序として GM-CSF などの体液性因子が関与していることを発見した。プリオン感染マウスの感染末期に GM-CSF を投与すると、臨床症状の改善と生命予後の改善が観察された。GM-CSF は既成薬品であり、患者への応用が早期に期待できる。