

201128018A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 堂浦 克美

平成24年（2012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 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	
セルロース誘導体の安全性に関する研究 9
岡村 信行 (東北大学大学院医学系研究科)	
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 (1) 13
逆瀬川 裕二 (東北大学大学院医学系研究科)	
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 (2) 16
堂浦 克美 (東北大学大学院医学系研究科)	
セルロース誘導体に関連する低分子化合物に関する研究 18
上高原 浩 (京都大学大学院農学系研究科)	
セルロース誘導体の最適化に関する研究 22
工藤 幸司 (東北大学未来医工学治療開発センター)	
既製品の薬効評価に関する研究 24
木村 朋寛 (東北大学大学院医学系研究科)	
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 33

總 括 研 究 報 告

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。CEの作用機序において、CE作用を抑制する免疫系細胞群の存在を明らかにし、それらの細胞機能を抑えることでCE効果が驚異的に増強されることを発見した。これまでの研究成果を考え併せると、CE作用の制御には特定の胸腺細胞群が中心的役割を果たし、実行因子としてサイトカインや糖代謝因子が関わっている可能性がある。一方、CEに関連した低分子化合物やその類縁体の構造活性相関で発症遅延効果をもつ単糖レベルでの化学構造が固まってきた。高分子のCEに比肩する効果はないものの、単糖体での有効な化学構造の発見は構造最適化研究を加速させるものと期待できる。また、CE作用の実行因子群の中で、既製薬品として治験中あるいは実用化されているものの検討を進め、効果の程度は低いもののCE作用を代行できるものとしてサイトカインや糖アナログを確認した。CEそのものをリスク保有者や患者に使用するという方向から、CE作用機序解明に基づく安全性の高いCE関連低分子化合物の開発及び介入手段の開発や、CE効果を代行する既製薬品の探索に研究内容をシフトさせており、CE効果の実用化に向けて着実に成果を重ねている。

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系研究科・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) CE作用機序の解明

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。

また、CEの効果に違いが見られるマウス系統間で、遺伝子発現の違いをゲノム構造解析やDNAマイクロアレイ解析で調べた。さらに、それらの結果をもとに遺伝子改変マウス等を用いてCE効果の違いを調べた。

2) 薬物最適化研究

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合成し、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。

3) 毒性克服研究

既製薬物との併用でCEの毒性を低減させる可能性がないかどうかを検討した。また、CE関連低分子化合物の毒性について検討した。

4) CE作用関連の既製薬物の評価

CE作用機序解明から、実行因子候補として挙げられているものの中で、既製薬物が応用できるものについて、それらの効

果をプリオン感染マウスで検討した。

(倫理面の配慮)

動物実験は施設の動物実験委員会の審査を受け、施設管理者の許可を得て動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1) CE作用機序の解明

CEの体内投与により変動する因子群として、新たに Dtk, IFN alpha/beta R1, IL-12 p40/p70, IL-3R alpha, MIP-2, MMP-9, Soggy-1, TCA-3, Urokinase を同定した。これらの因子がどのようにかかわっているか、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動物で解析を行っている。一方、CEの効果が著しく低いマウスである Tga20 マウスとCEの効果が高い Tg7 マウス間で、遺伝子発現の違いをゲノム構造解析やDNAマイクロアレイ解析で調べたところ、Tga20 マウスでは、Tリンパ球機能に障害があり免疫系に関連する様々な遺伝子の発現変動が見られた。そこで、Tリンパ球機能に障害があるマウスで詳しく調べたところ、CE作用を抑制する胸腺細胞の存在が判明した。新生児期に胸腺を除去した Tg7 マウスではCE効果が驚異的に増強されることを発見した。

2) 薬物最適化研究

CE関連低分子誘導体 33 種類を化学合成し、プリオン感染細胞やプリオン感染マウスを用いて検討したところ、6 種類の低分子化合物に弱いながらもプリオン病発症遅延効果を認めた。活性を改善する必要が残されているものの、これら化合物の発見はプリオン病予防薬開発の可

能性を一步前進させた。

また、プリオン持続感染細胞で抗プリオン効果が顕著であったグルコシド化合物についても、新たに7種類の誘導体を化学合成し、同様に検討したが、新たに有効なものはない。

3) 毒性克服研究

免疫抑制作用をもつ既製薬物との併用でCEの毒性を低減させる可能性について検討したところ、CEの抗プリオン効果や毒性に影響しなかった。一方、CE関連低分子化合物で相当量を市販で入手可能な一部の化合物について毒性を検討したが、効果が見られた投与量では毒性が観察されなかった。

4) CE作用関連の既製薬物の評価

これまでの解析から、CEの作用機序に糖代謝因子(DPP4 や sodium-glucose cotransporter(SGLT))やサイトカイン(GM-CSF や CXCL5)の関与が考えられた。GM-CSFの投与実験では、CE効果と同様に、Tg7 マウスでは効果は見られたが、Tga20 マウスでは効果は乏しいという結果が得られた。CXCL5についてはプリオン感染マウスでの検討を継続している。一方、糖代謝に影響する因子としてSGLT阻害剤やSGLT選択的透過糖誘導体、さらにはPPAR γ アゴニストやレプチンをプリオン感染マウスで検討した。検討した中ではSGLT選択的透過糖誘導体が最も効果があり、SGLT阻害剤との併用では効果が減弱した。DPP4についてはプリオン感染マウスでの検討を継続している。

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た。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場所であるが、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が原因である。一方、昨年度の研究で体内に投与した際には有効性は高いが、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、毒性所見の出現は予防的効果と関係している可能性があり、今回の免疫抑制剤との併用実験でも、CEの効果と毒性所見を切り離すことはできなかった。

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、CE関連低分子化合物やその類縁体を中心とした化合物群が開発や展開の容易さで有利であるが、今年度までに構造展開した40種類の化合物では6種類で弱いながらも活性が見られ、そのうち毒性を検討した1種類では毒性が観察されないことを確認した。引き続き、メチル化単糖をはじめとする低分子化合物の最適化は重要な課題の一つである。

作用機序解明研究については、昨年度の発見を踏まえ、相互の関連解析やより詳

細なメカニズムの解明を続けるとともに、既製薬品が応用できないかどうかを検討してきた。まだ結論が出ていない継続中のものが多いが、GM-CSF の効果はCE効果と共通した振る舞いを呈し、マウス系統による違いが見られた。したがって、CE効果の一部はGM-CSF に依っていると考えられる。さらに、今年度の研究において特筆すべき成果はCE作用を抑制する胸腺細胞の存在を明らかにしたことである。胸腺細胞の除去でCE効果が驚異的に増強されることより、特定の胸腺細胞がどのようにCE効果に関わっているかを解明することが、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、新たな創薬の開発に繋がる可能性がある。

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。引き続き、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や新たな創薬シーズの開拓に重点的に取り組み、CE効果の実用化に向けて成果を積み重ねていくことが重要である。

E. 結論

CE効果の実用化研究として、最適化研究・薬物送達研究・作用機序解明研究を実施し、CEに関連した低分子化合物の発見、CE効果を代行する既製薬品の効

果確認、作用機序におけるCE効果を抑制する胸腺細胞の発見をなした。CE効果の代用品の開発・実用化に向けて着実に成果を積み重ねている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology* 32 : 124-132, 2012.

Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A and Its Synthetic Analogues to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors. *J Mol Biol* 413(3):667-683, 2011.

Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem* 46(7):2917-2929, 2011.

Kasuya M, Meguro K, Okamura N, Funaki Y, Ishikawa H, Tanaka N, Iwata R, Yanai K. Greater Responsiveness to Donepezil in Alzheimer Patients With Higher Levels of Acetylcholinesterase Based on

- Attention Task Scores and a Donepezil PET Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* In press.
- Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation* 125(3):556-557, 2012.
- Harada R, Furumoto S, Yoshikawa T, Ishikawa Y, Shibuya K, Okamura N, Iwata R, Yanai K. Synthesis of [11C]interleukin 8 using a cell-free translation system and L-[11C]methionine. *Nucl Med Biol* 39(1):155-160, 2012.
- Kaneta T, Okamura N, Minoshima S, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Fukuda H, Takahashi S, Yanai K, Kudo Y, Arai H. A modified method of 3D-SSP analysis for amyloid PET imaging using [¹¹C]BF-227. *Ann Nucl Med* 25(10):732-739, 2011.
- Yanai K, Zhang D, Tashiro M, Yoshikawa T, Naganuma F, Harada R, Nakamura T, Shibuya K, Okamura N. Positron emission tomography evaluation of sedative properties of antihistamines. *Expert Opin Drug Saf* 10(4):613-622, 2011.
- Fujiwara H, Takayama S, Iwasaki K, Tabuchi M, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Kase Y, Arai H, Yaegashi N. Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid β proteins in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience* 180:305-313, 2011.
- Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright GA, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, Kudo Y, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 134(Pt 4):1089-1100, 2011.
- 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* 23(1):37-48, 2011.
- Kubo N, Senda M, Ohsumi Y, Sakamoto S, Matsumoto K, Tashiro M, Okamura N, Yanai K. Brain histamine H1 receptor occupancy of loratadine measured by positron emission topography: comparison of H1 receptor occupancy and proportional impairment ratio. *Hum Psychopharmacol* 26(2):133-139, 2011.
- Enomoto-Rogers, Y.; Kamitakahara, H.; Yoshinaga, A.; Takano, T.: Water-soluble low-molecular-weight cellulose chains radially oriented on gold nanoparticles. *Cellulose* 18(4): 929-936, 2011.

- Enomoto-Rogers, Y.; Kamitakahara, H.; Yoshinaga, A.; Takano, T.: Synthesis of diblock copolymers with cellulose derivatives 4. Self-assembled nanoparticles of amphiphilic cellulose derivatives carrying a single pyrene group at the reducing-end. *Cellulose* 18(4): 1005-1014, 2011.
- Nakagawa, A.; Kamitakahara, H.; Takano, T. Synthesis of blockwise alkylated (1→4)-linked trisaccharides as surfactants: Influence of configuration of anomeric position on their surface activities. *Carbohydrate Research* 346: 1671-1683, 2011.
- Nakagawa, A.; Fenn, D.; Koschella, A.; Heinze, T.; Kamitakahara, H. Physical properties of diblock methylcellulose derivatives with regioselective functionalization patterns: first direct evidence that a sequence of 2,3,6-tri-*O*-methyl-glucopyranosyl units causes thermoreversible gelation of methylcellulose. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49 (21): 1539-1546, 2011.
- Nakagawa, A.; Fenn, D.; Koschella, A.; Heinze, T.; Kamitakahara, H., Synthesis of diblock methylcellulose derivatives with regioselective functionalization patterns. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49 (23): 4964-4976 2011.
- Ichihara, N.; Takano, T.; Sakakibara, K.; Kamitakahara, H.; Nakatsubo, F.: Preparation of 6-azafulleroid-6-deoxy-2,3-di-*O*-myristoylcellulose. *Carbohydr. Res.* 346: 2515-2518, 2011.
- Enomoto-Rogers, Y.; Kamitakahara, H.; Yoshinaga, A.; Takano, T.: Comb-shaped graft copolymers with cellulose side-chains prepared via click chemistry. *Carbohydrate Polymers* 87 (3): 2237-2245, 2012.
- Kamitakahara H., K. Murata-Hirai, Y. Tanaka. Synthesis of blockwise alkylated tetrasaccharide-quantum dot complexes and their utilization for live cell labeling with low cytotoxicity. *Cellulose* 19(1): 171-187, 2012.

2. 学会発表

国際学会

Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2011. Karuizawa, July10-11, 2011.

Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2011. Karuizawa, July10-11, 2011.

Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. Acidic CC Chemokines are Upregulated in RML-Prion-Infected Neuroblastoma N2a Cells. Prion2011. Montreal, May16-19, 2011.

Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T, Doh-ura K, Ando T, Ohmoto A. Anti-Prion Activity of Protein-Bound

Polysaccharide K in Prion-Infected Cells and Animals. Prion2011. Montreal, May16-19, 2011.

の精密合成 - 自己組織化によるナノ構造の制御と機能発現-」2012年3月1-2日

国内学会

堂浦 克美. プリオン病研究の最前線. 第16回日本神経感染症学会学術集会. 東京, 2011年11月5日

堂浦 克美. ヤコブ病克服の基礎研究. 第5回食と医療の安全関わるプリオン病の市民講座 プリオン病・口蹄疫・インフルエンザ・放射能. 福岡, 2011年10月23日

中川 篤、上高原 浩、高野 俊幸. Huisgen 反応によるジブロック型メチルセルロース類縁体の合成とその熱ゲル化能. セルロース学会第18回年次大会、長野県長野市信州大学工学部、2011年7月14-15日

馬場 啓弘、上高原 浩、高野 俊幸. セロオリゴ糖誘導体とオリゴペプチド誘導体からなるジブロック体の合成. セルロース学会第18回年次大会、長野県長野市信州大学工学部、2011年7月14-15日

ロジャース有希子、上高原 浩、吉永 新、高野 俊幸. 水分散性のセルロース自己組織化金ナノ粒子. セルロース学会第18回年次大会、長野県長野市信州大学工学部、2011年7月14-15日

ロジャース有希子、上高原 浩、吉永 新、高野 俊幸. 還元性末端にピレンを有する両親媒性セルロースの自己組織化ナノ粒子. セルロース学会第18回年次大会、長野県長野市信州大学工学部、2011年7月14-15日

上高原 浩. 第36回応用糖質懇話会「セルロース系ジブロックコポリマー

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：セロオリゴ糖誘導体およびその製造方法

出願人：京都大学

発明者：上高原 浩、中坪 文明、Dieter Klemm

出願番号（出願年月日）：特願2006-548688, PCT/JP2005/0121127 (2005年6月30日)

公開番号(公開年月日)：W02006/067883, (2006年6月29日)

特許番号(登録年月日)：第4749339号 (2011年5月27日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告

セルロース誘導体の安全性に関する研究

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：濱中 大一 難治性疾患克服研究事業リサーチレジデント

研究要旨

これまでの研究で、セルロース誘導体の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の安全性試験では、毒性所見（貧血、泡沫状貪食細胞）が出現し、投与終了後6ヶ月間の回復試験では毒性所見の回復傾向が認められた。そこで、免疫抑制作用をもつ既製薬物との併用でCEの毒性所見を低減させる可能性がないかどうかを検討した。その結果、免疫抑制剤はCEの毒性所見（泡沫状貪食細胞）に影響しないことが明らかとなった。一方、プリオン感染動物で効果が認められたCE関連低分子化合物のうち、相当量を市販で入手可能なメチルグルコシドについてマウスで毒性を検討した。その結果、効果が見られた投与量では毒性が観察されなかった。

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、臨床での投与方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が、毒性所見（貧血、泡沫状貪食細胞）の出現は変わらず、投与終了後6ヶ月間の回復試験では回復傾向にあったものの一部の毒性所見（泡沫状貪食細胞）は残った。そこで、免疫抑制作用をもつ既製薬物との併用でCEの毒性所見を低減させる可能性について検討した。一方、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、相当量を市販で入手可能なメチルグルコシドに

ついてマウスで毒性を検討した。

B. 研究方法

CEの500 mg/kgをddYマウスに2回/週で8週間（合計16回）静脈内投与し、その後2週間にわたりリンデロン（160 ng/g 体重/日）やプログラフ（100 ng/g 体重/日）を腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を投与した。投与終了後2週目に血液学的解析と病理組織学的解析を行った。一方、メチルグルコシドの毒性を効果的に検討するため、300 μ g/日までの量を4週間にわたり持続的にTg7マウスの脳室内に投与し、8~10週間にわたり全身状態・行動の異常の有無、反射異常の有無を検討した。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の審査

を受け、施設管理者の許可を得て動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

昨年度報告した結果と同様に、CEを2ヶ月間にわたり間歇静脈内投与した場合には、対象群では毒性所見（貧血、泡沫状貪食細胞）が観察された。一方、リンデロン投与群やプログラフ投与群でも毒性所見が観察され、貧血の程度は対照群より軽く改善傾向を示したが、泡沫状貪食細胞の出現程度は対照群と有意な差は見られなかった。

一方、メチルグルコースは300 μ g/日までの脳室内投与量では、糖代謝異常に基づく全身状態・行動の異常や反射異常は出現しなかった。

D. 考察

免疫学的機序によるCEの毒性所見の出現を仮定し、免疫抑制剤の使用によりCEの毒性所見が軽減あるいは消失することを期待したが、貧血の改善傾向は観察されたものの、泡沫状貪食細胞出現の改善は明らかではなかった。昨年度の研究で、6カ月の休薬期間で貧血は回復し、泡沫状貪食細胞は改善傾向ではあるものの残るという結果と良く似た結果となった。なお、リンデロンやプログラフといった免疫抑制剤がCE効果に影響しないことは、以前の研究で確認している。昨年度と同じような考察になるが、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。一方、メチルグルコシドはD-グルコースなどの生理的に存在する糖と同様に糖輸送系を介して細胞内に取込まれるが、細胞内では全く代謝されない。従って、この物質が細胞内に蓄積すると何らかの異常が出現する可能性がある。メチルグルコシドは、糖代謝が活発である神経細胞への取り込みも知られている。そこで、神経細胞への影響を見るため高濃度のメチルグルコシドを脳室内に長期間持続投与し、神経系の異常が観察されないかどうかを検討したが、300 μ g/日までの濃度では異常は観察されなかった。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低分子化合物のメチルグルコシドに毒性が認められなかった意義は大きい。

E. 結論

免疫抑制作用をもつ既製薬物がCEの毒性所見を低減できないかどうかを検討したが、組織中の泡沫状貪食細胞の出現程度には影響しなかった。一方、CE関連低分子化合物で相当量を市販で入手可能な一部の化合物について毒性を検討したが、効果が見られた投与量では毒性が観察されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasuya M, Meguro K, Okamura N, Funaki Y, Ishikawa H, Tanaka N, Iwata R,

- Yanai K. Greater Responsiveness to Donepezil in Alzheimer Patients With Higher Levels of Acetylcholinesterase Based on Attention Task Scores and a Donepezil PET Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* In press
- Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation* 125(3):556-557, 2012.
- Harada R, Furumoto S, Yoshikawa T, Ishikawa Y, Shibuya K, Okamura N, Iwata R, Yanai K. Synthesis of [11C]interleukin 8 using a cell-free translation system and L-[11C]methionine. *Nucl Med Biol* 39(1):155-160, 2012.
- Kaneta T, Okamura N, Minoshima S, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Fukuda H, Takahashi S, Yanai K, Kudo Y, Arai H. A modified method of 3D-SSP analysis for amyloid PET imaging using [¹¹C]BF-227. *Ann Nucl Med* 25(10):732-739, 2011.
- Yanai K, Zhang D, Tashiro M, Yoshikawa T, Naganuma F, Harada R, Nakamura T, Shibuya K, Okamura N. Positron emission tomography evaluation of sedative properties of antihistamines. *Expert Opin Drug Saf* 10(4):613-622, 2011.
- Fujiwara H, Takayama S, Iwasaki K, Tabuchi M, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Kase Y, Arai H, Yaegashi N. Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid β proteins in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience* 180:305-313, 2011.
- Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright GA, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, Kudo Y, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 134(Pt 4):1089-1100, 2011.
- 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* 23(1):37-48, 2011.
- Kubo N, Senda M, Ohsumi Y, Sakamoto S, Matsumoto K, Tashiro M, Okamura N, Yanai K. Brain histamine H1 receptor occupancy of loratadine measured by positron emission tomography: comparison of H1 receptor occupancy and proportional impairment ratio. *Hum Psychopharmacol* 26(2):133-139, 2011.

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

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（1）

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

セルロース誘導体の体内投与により変動する因子群として、新たに Dtk, IFN alpha/beta R1, IL-12 p40/p70, IL-3R alpha, MIP-2, MMP-9, Soggy-1, TCA-3, Urokinase を同定した。これらの因子がどのようにかかわっているか、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動物で解析中である。

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、プロテインチップ等を利用して網羅的に検討した。長期間にわたり変動する因子群について、プリオン感染細胞やプリオン感染マウスで解析を行い、CE効果や毒性との関係を調べた。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の審査を受け、施設管理者の許可を得て動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、CE投与マウスにおいて長期間にわたり変動が観察される因子について解析を続けたところ、新たに Dtk, IFN alpha/beta R1, IL-12 p40/p70, IL-3R alpha, MIP-2, MMP-9, Soggy-1, TCA-3, Urokinase が血液中で長期間にわたり変動する因子として同定された。Dtk, IFN alpha/beta R1 は増加しており、その他の因子は減少していた。これらの因子が抗プリオン作用を発揮するかどうかを、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

解析中である。

D. 考察

昨年度に、C E 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）の変動が観察されることを報告した。その中でも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の中でも、特に経時的にも長期間にわたり観察された泡沫状貪食細胞と直接関連する可能性があるものとして、GM-CSF を昨年度報告した。GM-CSF は、プリオン感染マウスへの投与実験で、臨床症状の改善及び生命予後の改善が観察されたが、効果の程度は低かった。GM-CSF 以外の他の体液性因子も C E 効果に関与している可能性があり、今年度引き続き研究を続けたところ、新たに 9 種類の体液性因子が長期間にわたり変動することを発見した。GM-CSF を含め、これらの因子が C E の効果や毒性にどのようにかかわっているか、相互の関連や細胞との関連を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

セルロース誘導体の体内投与により変動する因子群として、増加するものとして 2 種類の体液性因子と減少するものとして 7 種類の体液性因子を新たに発見した。これらの因子がどのようにかかわっているか、プリオン感染細胞やプリオン感染動物で解析中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology* 32 : 124-132, 2012.

Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A and Its Synthetic Analogues to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors. *J Mol Biol* 413(3):667-683, 2011.

Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem* 46(7):2917-2929, 2011.

2. 学会発表

国際学会

Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2011. Karuizawa, July10-11, 2011.

Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2011. Karuizawa, July10-11, 2011.

Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A,
Doh-ura K. Acidic CC Chemokines are
Upregulated in RML-Prion-Infected
Neuroblastoma N2a Cells. Prion2011.
Montreal, May16-19, 2011.

Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T,
Doh-ura K, Ando T, Ohmoto A.
Anti-Prion Activity of Protein-Bound
Polysaccharide K in Prion-Infected
Cells and Animals. Prion2011.
Montreal, May16-19, 2011.

国内学会

堂浦 克美. プリオン病研究の最前線.
第 16 回日本神経感染症学会学術集会.
東京, 2011 年 11 月 5 日

堂浦 克美. ヤコブ病克服の基礎研究.
第 5 回食と医療の安全関わるプリオン
病の市民講座 プリオン病・口蹄疫・
インフルエンザ・放射能. 福岡, 2011
年 10 月 23 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

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23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（2）

研究分担者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
研究代表者：逆瀬川 裕二 東北大学大学院医学系研究科・助教
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

セルロース誘導体（CE）の効果が著しく低い動物である Tga20 マウスと CE の効果が高い Tg7 マウス間で、遺伝子発現の違いをゲノム構造解析や DNA マイクロアレイ解析で調べたところ、Tga20 マウスでは、Tリンパ球機能に障害があり免疫系に関連する様々な遺伝子の発現に違いが見られた。そこで、Tリンパ球機能に障害があるマウスで詳しく調べたところ、CE作用を抑制する胸腺細胞の存在が判明した。新生児期に胸腺を除去した Tg7 マウスでは CE 効果が驚異的に増強されることを発見した。

A. 研究目的

本研究では、CE の効果の実用化に向けて、作用機序の解明につながる手掛かりを得るため、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、CE 効果が異なるマウス群で探索した。また、その結果を踏まえ、各種モデル動物にて検討し、CE の作用機序解明につながる手掛かりを探った。

B. 研究方法

CE の効果が著しく低いマウスである Tga20 マウスと CE の効果が高い Tg7 マウス間で、脾臓での遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析で調べた。次に、両マウスにおける遺伝子発現の違いをゲノム構造解析で調べた。さらに、各種免疫異常マウスを用いて、CE 効果が修飾さ

れるかどうかを調べた。

（倫理面の配慮）

動物実験は施設の動物実験委員会の審査を受け、施設管理者の許可を得て動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

CE の効果が著しく低いマウスである Tga20 マウスと CE の効果が高い Tg7 マウス間で、脾臓での遺伝子発現を調べたところ、免疫系とくに Tリンパ球に関する遺伝子発現に大きな違いが観察された。次に、両マウスにおける遺伝子発現の違いをゲノム構造解析で調べたところ、Tga20 マウスでプレ T 細胞受容体 α に異常があることが判明し、Tga20 マウスの胸腺において、その遺伝子発現が観察されなかった。そこで、Tリンパ球機能と CE 効果との関連をさらに探るため、各

種免疫異常マウスを用いて、CE効果が修飾されるかどうかを調べた。β2ミクログロブリンノックアウトマウスやCD4遺伝子異常マウスでは、CE効果は変化しなかった。しかし、新生児期に胸腺を除去したTg7マウスでは、CE効果は顕著に増強され、ほぼ寿命一杯まで生存するものもでてきた。胸腺除去マウスと非除去マウスで泡沫状貪食細胞の出現頻度を調べたが、両群で有意な差は観察されなかった。

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リンパ球によ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かった。今回の研究では、胸腺細胞がCEの効果を抑制していること、それがαβ+Tリンパ球系以外の細胞であることを発見した。この成果は、CEの作用機序を解明するうえで画期的なものであり、どのような胸腺細胞が、どのようなメカニズムでCE効果を抑制しているかを明らかにできれば、胸腺除去に依らずCE効果を高めること

が可能である。一方、泡沫状貪食細胞が胸腺除去による効果増強と有意な関係を示さなかったことから、泡沫状貪食細胞の数がCE効果を反映していないことが明らかとなった。CE効果がきわめて乏しいTga20マウスでも泡沫状貪食細胞がTg7マウスと同程度あるいはそれ以上に観察されることも考え併せると、CEの作用点は泡沫状貪食細胞の出現以降でαβ+Tリンパ球系以外の胸腺細胞で制御される系にあると考えられる。

E. 結論

セルロース誘導体の作用機序において、セルロース誘導体の効果を抑制する胸腺細胞の存在を明らかにした。各種免疫異常マウスを用いた研究から、αβ+T細胞系以外の胸腺細胞がセルロース誘導体の効果を抑制していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

14、15 ページに記載