

201231009A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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24年度 総括研究報告書

研究代表者 堂浦 克美

平成25年（2013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最適化に関する研究 工藤 幸司 (東北大学未来医工学治療開発センター)	. . . . . 11
低分子セルロース誘導体関連化合物に関する研究 上高原 浩 (京都大学大学院農学研究科)	. . . . . 14
セルロース誘導体の薬物送達に関する研究 岡村 信行 (東北大学大学院医学系研究科)	. . . . . 19
セルロース誘導体の作用機序解明に関する研究 逆瀬川 裕二 (東北大学大学院医学系研究科)	. . . . . 22
セルロース誘導体の毒性克服に関する研究 堂浦 克美 (東北大学大学院医学系研究科)	. . . . . 25
既製品の薬効評価に関する研究 濱中 大一 (東北大学大学院医学系研究科)	. . . . . 28
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	. . . . . 31
IV. 研究成果の刊行物・印刷	. . . . . 35

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
平成24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

本研究では、プリオン病の発症をほぼ寿命一杯にわたり阻止できる手段としてセルロース誘導体化合物（CE）の実用化開発を行った。CEの体内投与で毒性所見が観察されたことから、CEの治療予防的効果を高めながら、毒性に乏しいCE関連化合物の開発や投与方法をめざし、CEおよびCE関連化合物の薬物最適化研究・薬物送達研究・作用機序解明研究を当該年度に実施した。

これらの研究では、各種のCE修飾体の検討に加えて、開発や展開が容易であるオリゴ糖体の薬物最適化も行った。また、これまでの研究成果を踏まえて、安全で効率的な送達方法や安全性が高いCE効果増強手段の開発研究や、CE効果を代行する可能性のある既製薬品の薬効評価研究を実施した。さらに、これまでの作用機序解明研究で有力と考えられた貪食細胞-胸腺細胞(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)系とホルモン・サイトカイン系について、相互の関連解析や動作機構等を含む詳細な解析を実施して、創薬開発の効率化とともに、プリオンに対する宿主制御系の解明をめざした。

当該年度の研究成果として、CEの効果を毒性から切り離せる手段を発見し、経口投与での有効性を飛躍的に向上させるとともに毒性を改善することに成功し、CEの実用化に大きく前進した。一方、CEの作用メカニズムについては、その本流と考えられていた泡沫状貪食細胞-胸腺細胞(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)系やホルモン・サイトカイン系は、詳細な検討を重ねた結果、直接的な実行因子群あるいは近傍因子群ではないことが強く示唆されたが、これらの解析の中から、プリオンに対する宿主制御系を解明する新たな手掛かりも得られており、最終年度として発展性がある成果を全般的に上げることができた。

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
上高原 浩	京都大学大学院農学研究科・准教授
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

## A. 研究目的

プリオン病患者の約9割は原因が不明で60～70歳代に発症する。高齢化とともに患者数は増加しており、医療行為による二次感染のリスクも高まっている。一方、二次感染による医原性発症リスク保有者やプリオン蛋白遺伝子変異キャリアーは、世界的には数千～数万の規模で存在していると推定されている。好発年齢者やリスク保有者に対してワクチンのような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。予防手段を実用化できれば、プリオン病を克服できる可能性がある。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が、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、食品添加物等として日常経口摂取しているセルロース誘導体化合物（CE）が、体内への投与では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、プリオン病の発症予防法として、このCE効果の実用化を目指している。CEの経口摂取での安全性は確認されているものの、経口投与の有効性は腸管吸収がネックとなり体内投与に比較すると格段に劣っている。一方、体内投与の効果は末梢感染では単回投与でほぼ寿命一杯まで発症を阻止できるほど優れているものの、体内投与では毒性（貧血、血清脂質低下、泡沫状細胞）が出現し、その回復に時間を要することが判明した。

そこで申請研究は、薬物動態に基づいた毒性が低く治療予防効果に優れたCE関連化合物の開発、作用機序解明に基づいた安全性が高い介入手段の開発やCE

効果を代行する既製薬品の探索等、を実施してCE効果の実用化をめざした。

## B. 研究方法

申請研究はCE効果の実用化開発として、CEおよびCE関連化合物の薬物最適化研究・薬物送達研究・作用機序解明研究・安全性試験を実施した。また、これまでの研究成果を踏まえて毒性克服研究や既製薬品の薬効評価研究を実施した。さらに、研究の進捗次第では臨床研究準備を行う予定であった。

### 1. 薬物最適化研究

現状で最も効果があるCEは高分子ヒドロキシプロピルメチルセルロースであるが、これまでに明らかとなった安全性試験の結果と低分子CEでの最適化研究の成果を踏まえ、①安全性が高く効果にも優れたCE修飾体の選抜と、②化学構造が明確なCE関連低分子化合物の構造活性相関を、プリオンを脳内感染させたマウスを用いたビゴ実験で実施した。

### 2. 薬物送達研究

これまでの動態研究の結果や作用機序解明研究の成果を踏まえ、①腸管吸収の高いCE修飾体の選抜、②腸管吸収を高める媒体の探索、③CEの効果を高める媒体の探索を、マウス腸管を用いたビトロ実験やマウスを用いたビゴ実験で実施した。また、④低分子化合物での最適化研究の成果を踏まえ、低分子化合物の動態研究やビトロでの毒性研究を行い、低分子化合物の最適化を支援するデータを収集した。

### 3. 作用機序解明研究

これまでの研究成果から、CEの作用機序として①泡沫状貪食細胞-胸腺細胞

(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)を軸とした免疫系の関与、②ホルモン・サイトカインといった体液性因子の関与が考えられることより、これらの点についてより詳細にCE作用制御メカニズムの解析を進めた。DNAマイクロアレイ・サイトカインマイクロアレイや遺伝子操作技術による遺伝子発現変動や、組換え蛋白質・特異抗体・選択的阻害剤投与等の可能な手段を用いて、プリオン感染細胞やプリオン感染マウスで解析を行い、メカニズムの解明を進めるとともに創薬の効率的な開発展開に使える標的を探索した。また、①②に関連した因子群の機能障害マウスも用いて、ピボでの検証を進めた。

#### 4. 毒性克服研究

①CEの予防的効果に影響せずに、CEの毒性所見(貧血・血清脂質低下・諸組織中の泡沫状貪食細胞の出現)を抑える手段を開発するため、CEの効果の発現と毒性所見の発現が乖離するかどうかを引き続き検討した。さらに、②胸腺除去はCE効果を驚異的に増強することを前年度に発見したが、各種免疫機能の抑制下でCE投与量低減化を行い、効果と安全性の両者を確保できるかどうか調べた。

#### 5. 既製品の薬効評価研究

これまでの研究成果をもとに、①GM-CSFや②糖代謝修飾剤(DPP4阻害剤やSGLT阻害剤)などの既製薬品について、発症予防効果や治療効果をプリオン感染マウスで検討した。プリオン株やマウス系統により効果に違いが見られる可能性があるため、少なくとも2種以上のプリオン株・マウス系統の組み合わせを用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、所属機関の承認を

受け、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、安全対策と拡散防止措置をとった。動物を用いた実験は、所属機関の動物実験審査委員会の審査を受け機関管理者の承認のもと、動物愛護に十分配慮して実施した。プリオン感染実験における安全対策は、厚生労働省「遅発性ウイルス感染調査研究班」の指針、農林水産省「動物の伝達性海綿状脳症実験指針検討会」の指針、および国立大学法人動物実験施設協議会の指針に従った。

### C. 研究結果

#### 1. 薬物最適化研究

①安全性が高く効果にも優れたCE修飾体の選抜では、特定の疎水性修飾CEが極めて高い効果を発揮するとともに、毒性所見に乏しいものがあることを発見した。これらの疎水性修飾体は、未修飾体の約1.5倍の予防効果を発揮したが、毒性所見(特に泡沫状貪食細胞の出現)が出現しないものがあった。

②化学構造が明確なCE関連低分子化合物の構造活性相関では、検討したCE関連単糖分子、CE関連2糖分子の中で弱いながらも発症予防効果を発揮するのが6個発見された。しかし、いずれも高分子であるCEの1/10以下の効果しか観察されなかった。①で発見した特定の疎水性修飾により低分子化合物でも活性が飛躍的に向上するかどうかは、今後の検討課題である。

#### 2. 薬物送達研究

①腸管吸収の高いCE修飾体の選抜では、特定の疎水性修飾CEが極めて良好な吸収を示した。未修飾体の1.5倍以上の吸収効率であった。

②腸管吸収が高まる媒体の探索では、高脂肪食と低脂肪食でC E腸管吸収の違いを検討したところ、高脂肪食で5倍程度腸管吸収が向上した。したがって、媒体として油性媒体の存在に加えて①の修飾により、飛躍的にC Eの腸管吸収は向上すると考えられる。

③C Eの効果を高める媒体の探索では、生体毒性に乏しい両親媒性高分子体が、C Eの予防効果を驚異的に増強させた。脳内感染マウスでは、媒体なしのC Eでは潜伏期間がC Eなしに比べて2~3倍に延長されるところを、両親媒性高分子体共存下ではマウスは寿命一杯まで発症が阻止された。

④低分子化合物の動態研究やビトロでの毒性研究では、低分子化合物でC Eに比肩できる程度の予防的効果を発揮するものが発見できなかったため、研究は進まなかった。

### 3. 作用機序解明研究

①泡沫状貪食細胞-胸腺細胞(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)を軸とした免疫系の関与については、クロドロン酸リポゾームによるマクロファージ除去マウス、抗 $\gamma\delta$ T細胞受容体抗体投与マウス、 $\gamma\delta$ T細胞受容体遺伝子欠損マウス、IL-7 遺伝子欠損マウス、SCID マウス、ヌードマウス、NODマウス、ベージュマウスを用いて詳細に検討したが、貪食細胞以外に免疫系細胞の関与を証明できなかった。また、C E低感受性マウスで新生時期胸腺摘除を行ったが、C E効果の増強は観察されなかった。

②ホルモン・サイトカインといった体液性因子の関与については、C E投与により各種サイトカン(IL-2R $\alpha$ , c-MET, TNFSF5, CX3CL1, IL-23p19, CXCL5, uPAR,

IFN $\alpha/\beta$ R1, CD123, CXCL2, OPG, OPN, PF4)の減少やホルモン(プロラクチン、TRH)の減少が観察された。そこで、各サイトカインに対する中和抗体や各ホルモンを減らす薬剤をマウスに持続的に投与し、発症予防的効果を調べたが、極めて限定的な効果しか観察されなかった。また、①とも関連してサリドマイド、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤を持続的に投与して、C Eの発症予防的効果への影響を調べたが、影響は極めて限定的であった。また、NK細胞を活性化させるGalCer(C12)やGalCer(C26)を持続的に投与してC Eの発症予防効果への影響を調べたが、結果は同様であった。さらに、ブスルファン投与による骨髄抑制の影響や、C E投与動物から採材した骨髄細胞や脾細胞の移植の影響を、C E投与マウスおよび非投与マウスで検討したが、いずれの処置も限定的なC E効果への影響や発症遅延効果にとどまった。以上の結果から、作用機序で主流に位置すると考えてきた泡沫状貪食細胞-胸腺細胞(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)系やホルモン・サイトカイン系は、直接的な実行因子群あるいは近傍因子群ではないことが強く示唆された。

### 4. 毒性克服研究

①C E効果と毒性との関係を明らかにするため、泡沫状細胞の局在とC Eの分布との関係を解析した。その結果、泡沫状細胞の局在とC Eの分布とは必ずしも一致せず、泡沫状細胞の方が広範な組織に分布することが判明した。C Eは、リンパ系組織や疎水性ホルモンを分泌する内分泌系組織に分布する傾向にあった。また、C Eの毒性所見(貧血・血清脂質低下・諸組織中の泡沫状貪食細胞の出現)の程度とC Eの予防効果とは必ずしも相

関しないことが判明した。一方、CEの毒性所見は、I型ゴーシェ病の病理所見と類似性があるため、I型ゴーシェ病のサロゲイトマーカーをCE投与マウスで調べたところ、一部で共通点が見られた。そこで、 $\beta$ グルコシダーゼ阻害剤 (conduiritol-B-epoxide) を持続投与して作製したI型ゴーシェ病モデルマウスで、プリオン病予防効果を調べたが、その効果は極めて限定的であった。以上の結果や1-①の結果から、CE効果とCE毒性は切り離せることがわかった。

②胸腺除去によるCE効果の顕著な増強は、3-①, ②の結果からも貪食細胞以外の免疫機能に絡むメカニズムではないことが強く示唆された。またサリドマイド、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤による免疫抑制下でも、毒性を克服できなかった。

#### 5. 既製品の薬効評価研究

①GM-CSFの発症遅延効果は、一部のプリオン病動物モデルに限定されていた。検討した他の2つのプリオン株・マウス系統の組み合わせでは効果は明らかではなかった。

②糖代謝修飾剤(DPP4阻害剤やSGLT阻害剤)についても、同様に発症遅延効果は一部のプリオン病動物モデルに限定されており、他の疾患動物モデルでは効果はなかった。

#### D. 考察

これまでのCEに関する研究では、体内に投与した際には有効性は高いが、毒性所見(貧血、血清脂質低下、泡沫状貪食細胞)が出現することを克服できなかった。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密接に関係している可能性があり、CEの効果と毒性所見を切り離すことはできないのではないかと推測されていた。しかしながら、CE実用化研究の最終年度として、プリオン病克服の実現に向けて大きな前進があった。すなわち、CEの効果発現と毒性発現を切り離すことが可能で、CE実用化の障壁となっていた2つの課題(体内投与では回復に長期間を要する毒性があることと、安全性が高い経口投与では有効性が低いこと)を同時に解決する手段として、CEの特定の疎水性修飾が極めて有効であることを見つけた。また、媒体としても腸管吸収とバイオアベイラビリティを高めるもの(脂質や両親媒性高分子体)が、飛躍的に有効性を増大させる(脳内感染でも寿命一杯まで発症を阻止する)ことを発見した。一方で、作用機序に関わる解明研究においては、胸腺除去によりCE効果が驚異的に増強されるが、泡沫状貪食細胞-胸腺細胞(非 $\alpha\beta^+$ T細胞)系やホルモン・サイトカイン系は、直接的な実行因子群や近傍因子群ではないことがわかった。最終年度として全体にわたり発展性のある成果を上げることができた。

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

C E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、C Eの毒性を低減させると同時にC E効果を高める工夫の開発に成功した。作用機序については、貪食細胞以外に免疫系細胞の関与を示す所見は得られなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[書籍]

上高原 浩. セルロースから作る新しいノニオン性界面活性剤. In: セルロース学会・編 セルロースのおもしろ科学とびっくり活用, 東京, 講談社, pp 194-195, 2012年

[雑誌]

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

Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y. A (18)F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol*

*Imaging Biol*, in press, 2013

Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Maruyama M, Higuchi M, Yoshikawa T, Arai H, Iwata R, Kudo Y, Yanai K. Comparison of the binding characteristics of [(18)F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40(1)125-132, 2013

Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Une K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Brain accumulation of amyloid  $\beta$  protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int*. 13(1)215-221, 2013

Hiraoka K, Okamura N, Funaki Y, Hayashi A, Tashiro M, Hisanaga K, Fujii T, Takeda A, Yanai K, Iwata R, Mori E. Cholinergic deficit and response to donepezil therapy in Parkinson's disease with dementia. *Eur Neurol*. 68(3)137-143, 2012

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*. 2012 ;26(2):113-118.

Shiraishi T, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F. Studies on

- electrooxidation of lignin and lignin model compounds. Part 1: Direct electrooxidation of non-phenolic lignin model compounds *Holzforschung* 66: 303-309, 2012
- Shiraishi T, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F. Studies on electro-oxidation of lignin and lignin model compounds. Part 2: *N*-Hydroxyphthalimide (NHPI)-mediated indirect electro-oxidation of non-phenolic lignin model compounds *Holzforschung* 66 : 311-315, 2012
- Miyagawa Y, Takemoto O, Takano T, Kamitakahara H, Nakatsubo F. Fractionation and characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of *Eucalyptus globulus* residues left after MWL isolation. Part I: Analyses of hemicellulose-lignin fraction (HC-L) *Holzforschung* 66:459-465, 2012
- Nakagawa A, Kamitakahara H, Takano T. Synthesis and thermoreversible gelation of diblock methylcellulose analogues via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. *Cellulose* 19 (4) 1315-1326, 2012
- Nakagawa A, Ishizu C, Sarbova V, Koschella A, Takano T, Heinze T, Kamitakahara H. 2-*O*-methyl- and 3,6-di-*O*-methyl-celluloses from natural cellulose: synthesis and structure characterization. *Biomacromolecules* 13(9)2760-2768, 2012
- Nakagawa A, Steiniger F, Richter W, Koschella A, Heinze T, Kamitakahara H. Thermoresponsive hydrogel of diblock methylcellulose: Formation of ribbon-like supramolecular nanostructures by self-assembly. *Langmuir* 28(34)12609-12618, 2012
- Saito Y, Takano T, Sakakibara K, Kamitakahara H, Nakatsubo F. Synthesis of (zinc(II) phthalocyanine)-containing cellulose derivative using phthalocyanine-ring formation reaction. *Cellulose* 19(6) 2105-2114, 2012
- Kiyoto S, Yoshinaga A, Tanaka N, Wada M., Kamitakahara H, Takabe K. Immunolocalization of 8-5' and 8-8' linked structures of lignin in cell walls of *Chamaecyparis obtuse* using monoclonal antibodies (2013), *Planta*, 237, 705-715.
- 堂浦 克美. 神経ウイルス感染症の最前線  
プリオン病研究の最前線  
*NEUROINFECTION* 17 (1) 136-141, 2012
- 原田 龍一, 岡村 信行, 古本 祥三, 谷内 一彦. 【アルツハイマー病の診断と治療の最先端】 アルツハイマー病診断薬 florbetapir ([18F]AV45) について *PET Journal* 20 : 25-26, 2012
- 岡村 信行. 核医学の今(第1回) 認知症. *総合リハビリテーション* 40(10) 1321-1326, 2012
- 岡村 信行. 認知症早期診断のためのPETプローブ開発と臨床応用. *東北医学雑誌* 124(1)51-54, 2012

岡村 信行. アルツハイマー病におけるタウ蛋白画像化の試み. *老年期認知症研究会誌* 19(4)84-86, 2012

岡村 信行, 古本 祥三, 谷内 一彦. 老人斑を可視化する PET プローブの開発と臨床応用. *ナノ医工学年報* 5(1)121-130, 2012

岡村 信行. Basic Neuroscience 画像認知症のアミロイド分子イメージング. *Annual Review 神経* 2012 :50-58, 2012

上高原 浩 セルロース系ブロックコポリマー・コオリゴマーの精密合成と機能発現、*Cellulose Communications* 19 (2)57-62, 2012

## 2. 学会発表

[国際学会]

Sakasegawa Y, Doh-ura K. Extracellular heat shock protein 90 enhances PrPres production in prion-infected neuroblastoma N2a cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012 , Yokohama, July29-30, 2012

Kurahashi H, Doh-ura K. Applicational research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnq1  $\Delta$ 100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July29-30, 2012

Hamanaka T, Doh-ura K. Melanin-like substances extracted from insect cuticle reduce the PrPres levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July29-30, 2012

Sakai E, Doh-ura K. Glycerol enhances

the protease-resistance prion protein production in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July29-30, 2012

Sakasegawa Y, Goto Y, Hachiya N, Kaneko K, Doh-ura K. Dominant negative inhibition by GPI anchor-less recombinant prion proteins is observed in persistently prion infected N2a cells in a culture medium-dependent manner. Prion2012, Amsterdam, May09-12, 2012

Kamitakahara H, Baba A., Yoshinaga A., Takano T.: Design, synthesis, and nanostructure of cellulose triacetate-*block*-poly( $\cdot$ -benzyl L-glutamate), 0-17, p. 47 International Cellulose Conference 2012, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & SPA Resort, Sapporo, Japan, October 10-12, 2012

Kamitakahara H. Cellulosic diblock copolymers with fascinating properties. European-Japanese Workshop of Cellulose and Functional Polysaccharides. The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 3-4 October, 2012

[国内学会]

堂浦 克美. ヤコブ病治療研究の現状と課題. 第 6 回 食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座, 東京, 2012 年 12 月 2 日

坪井 義夫, 堂浦 克美. プリオン病に対する治療法の開発. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012 年 5 月 25

日

上高原 浩. セルロース誘導体の精密合成：合成戦略と機能発現. 第 37 回糖質科学懇話会、江ノ島、2012 年 11 月 30 日-12 月 1 日

上高原 浩. 細胞表面糖脂質の構造からヒントを得た糖のみからなる界面活性剤の開発. ネイチャー・インダストリー・アワード～若手研究者からの発信～. 大阪府大阪市大阪科学技術センタービル、2012 年 11 月 20 日

上高原 浩、須原 遼. セルロース系ジブロックコポリマーの合成と機能開拓. [第 10 回] 積水化学 自然に学ぶものづくりフォーラム、イイノホール&カンファレンスセンター、東京、2012 年 10 月 15 日

須原 遼、上高原 浩、高野 俊幸. アミノ酸含有セロビオースエーテル誘導体の合成と水中での会合挙動、P37、セルロース学会第 19 回年次大会、愛知県名古屋市 名古屋大学 野依記念学術交流館、2012 年 7 月 12-13 日

馬場 啓弘、上高原 浩、高野 俊幸. セルロース誘導体とオリゴペプチド誘導体からなるジブロックコポリマーの合成とその性質、P01、セルロース学会第 19 回年次大会、愛知県名古屋市 名古屋大学 野依記念学術交流館、2012 年 7 月 12-13 日

出願日：2007 年 4 月 20 日

特許番号（登録年月日）：第 4981036 号  
（2012 年 4 月 27 日）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称：コンフォメーション病医薬組成物

出願人：伊藤ハム株式会社，東北大学

発明者：堂浦 克美

出願番号：特願 2008-512153

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
平成24年度 分担研究報告書

セルロース誘導体の最適化に関する研究

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：河田 真樹 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：堺 英士 東北大学大学院医学系研究科  
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

安全性が高く効果にも優れたセルロース誘導体化合物（CE）修飾体の選抜では、特定の疎水性修飾CEが極めて高い効果を発揮するとともに、毒性所見に乏しいものがあることを発見した。これらの疎水性修飾体は、未修飾体の約1.5倍の予防効果を発揮したが、毒性所見（特に泡沫状貪食細胞）が出現しないものがあった。

### A. 研究目的

これまでの研究で、セルロース誘導体化合物（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、薬物動態に基づいた毒性が低く治療予防効果に優れたCE関連化合物を開発し、マウスで毒性と効果を検討して選抜した。

### B. 研究方法

現状で最も効果があるCEは高分子ヒドロキシプロピルメチルセルロースであるが、これまでに明らかとなった安全性試験の結果と低分子CEでの最適化研究の成果を踏まえ、安全性が高く効果にも優れたCE修飾体の選抜を、プリオンを脳内感染させたマウスを用いたビゴ実験で

実施した。

（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。プリオン感染実験における安全対策は、厚生労働省「遅発性ウイルス感染調査研究班」の指針、農林水産省「動物の伝達性海綿状脳症実験指針検討会」の指針、および国立大学法人動物実験施設協議会の指針に従った。

### C. 研究結果

安全性が高く効果にも優れたCE修飾体の選抜で、特定の疎水性修飾CEが極めて高い効果を発揮するとともに、毒性所見に乏しいものがあることを発見した。これらの疎水性修飾体は、未修飾体の約

1.5倍の予防効果を発揮したが、毒性所見（特に泡沫状貪食細胞）が出現しないものがあつた。

#### D. 考察

これまでのCEに関する研究では、体内に投与した際には有効性は高いが、毒性所見（貧血、血清脂質低下、泡沫状貪食細胞）が出現することを克服できなかった。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密接に関係している可能性があり、CEの効果と毒性所見を切り離すことはできないのではないかと推測されていた。しかしながら、今回の研究でCEの効果発現と毒性発現を切り離すことが可能で、CE実用化の障壁となっていた課題を解決する手段として、CEの特定の疎水性修飾が極めて有効であることを見つけた。

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、最適化研究を実施し、CEの毒性を低減させると同時にCE効果を高める工夫の開発に成功した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y. A (18)F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol*, in press, 2013

Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Maruyama M, Higuchi M, Yoshikawa T, Arai H, Iwata R, Kudo Y, Yanai K. Comparison of the binding characteristics of [(18)F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40(1)125-132, 2013

Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Une K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Brain accumulation of amyloid  $\beta$  protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int*. 13(1)215-221, 2013

##### 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  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
平成24年度 分担研究報告書

低分子セルロース誘導体関連化合物に関する研究

研究分担者：上高原 浩	京都大学大学院農学研究科・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
研究協力者：中川 篤	京都大学大学院農学研究科
研究協力者：上林 菜穂子	京都大学大学院農学研究科
研究協力者：入江 由美	京都大学大学院農学研究科
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：堺 英士	東北大学大学院医学系研究科
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

メチルセルロース関連グルコース誘導体3種類を合成し、全ての置換パターンを有するグルコース誘導体33種類の合成を達成した。さらに、カルボン酸を有する化合物1種類、これまでに得られたプリオン脳内感染マウスを用いた *in vivo* 実験の結果から有望と期待される置換パターンを有するセロビオース誘導体2種類、セロトリオース誘導体1種類、セロテトラオース誘導体1種類を合成した。次いで、これまでに合成した化合物のうち11種類（2糖誘導体4種類、位置特異的メチル化グルコース類縁体2種類、位置特異的かつブロック的メチル化セロトリオースおよびその類縁体5種類）のプリオン脳内感染マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。その結果、9種類の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。

A. 研究目的

これまでに研究代表者らにより、市販のメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースに異常型プリオン蛋白の産生を阻害する抗プリオン活性があることが見いだされている。しかしながら、不均一反応で調製される市販のメチルセルロースは化学構造的に不均一であるため、市販のメチルセルロースのメチル基の置換状態はグルコース内の3つの水酸基での置換状態の違い、分子鎖に沿ったメチル基の置換位置の偏り、分子鎖間でのメ

チル基置換度の違いが生じ、化学構造—活性相関を詳細に検討することは不可能である。

そこで、本研究では化学構造の明確なメチルセルロース誘導体および関連化合物を有機合成し、その化学構造が抗プリオン活性に与える影響を詳細に検討することとした。本年度はメチルセルロース関連低分子誘導体として、全ての置換パターンを有するグルコース誘導体33種類の化学合成を完了させることを第一目標とした。次いで、分子量の違いがプリ

オン病発症遅延効果に与える影響を調べるため、特定の置換パターンを有するメチル化セロオリゴ糖誘導体シリーズの合成法確立を目指した。最終的に、抗プリオン活性を与えるメチルセルロースの部分構造を明らかにし、より抗プリオン活性の高いメチルセルロース系低分子化合物の開発を目的とした。

## B. 研究方法

グルコース、メチル  $\alpha$ -D-グルコシド、セロビオースを原料とし、位置特異的な保護基の導入、メチル基の導入、グリコシル化、保護基の除去を検討した。目的化合物を得るために、複数の合成ルートを検討した。

次いで、プリオン脳内感染マウスを用い、感染後、脳室内に化合物を 14 日間投与し平均余命により効果評価を行った。

### (倫理面への配慮)

動物実験は所属機関の動物実験委員会の審査を受け、機関管理者の許可を得て、動物実験指針を遵守して行った。プリオン感染実験における安全対策は、厚生労働省「遅発性ウイルス感染調査研究班」の指針、農林水産省「動物の伝達性海綿状脳症実験指針検討会」の指針、および国立大学法人動物実験施設協議会の指針に従った。

## C. 研究結果

最終的に、メチル  $\alpha$ -D-グルコシド誘導体にグルコース誘導体を逐次グリコシル化してセロオリゴ糖誘導体を得る合成ルートを採用した。グリコシルアクセプターはメチル  $\alpha$ -D-グルコシドから 3 段階で、グリコシルドナーはグルコースから 9 段

階で合成した。その後、グリコシル化と一時的保護基であるアセチル基の除去を繰り返し、位置特異的にメチル基が導入されたセロオリゴ糖誘導体シリーズを得る方法を確立した。

次いで、本年度は合成した化合物のうち、セロビオース誘導体、セロトリオース誘導体を中心に 11 種の化合物のプリオン脳内感染マウスを用いたプリオン病発症遅延効果を検討した。その結果、9 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が、高分子量のメチルセルロースに匹敵するような高い活性を有する化合物を見いだすことは出来なかった。

## D. 考察

当初、反応段数の少ない合成法で位置特異的メチル化セロオリゴ糖誘導体を調製する方法を試みた。しかしながら、高分子のセルロース誘導体で一般的な保護基導入法をセロオリゴ糖誘導体の合成に適用しても位置特異的な反応を高収率で達成出来ないことが判明した。そこで、反応段数は多いが確実性の高い、グルコース誘導体を用いて逐次高重合度のセロオリゴマーを調製する方法論を採用した。この方法を利用すれば、位置特異的メチル化セロオリゴ糖誘導体の重合度の違いがプリオン病発症遅延効果に与える影響を詳細に、かつ効率的に検討することが出来る。

プリオン脳内感染マウスを用いた *in vivo* 実験の結果は、位置特異的メチル化セロビオース誘導体は弱いプリオン病発症遅延効果を持つことを示している。少なくとも試したセロビオース誘導体は期待した程の強い効果を持たなかった。す

なわち、本年度得られた結果は、3 量体以上の重合度を持つ位置特異的メチル化セロオリゴ糖誘導体の重合度の違いがプリオン病発症遅延効果に与える影響を調べる必要があるという事実を示している。しかしながら、本年度確立した位置特異的メチル化セロオリゴ糖の逐次合成法により 3 量体、4 量体の合成に成功した事実から、低分子セロオリゴ糖誘導体を基本構造とするプリオン病予防薬開発の可能性が高まったと言える。

#### E. 結論

メチルセルロース関連グルコース誘導体 3 種類を合成し、全ての置換パターンを有するグルコース誘導体 33 種類の合成を達成した。次いで、プリオン脳内感染マウスを用いたプリオン病発症遅延効果を検討した結果、合計 15 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。そして、有望であると考えたメチル基の置換パターンを絞り込むことに成功した。その結果に基づき、グルコース誘導体を用いて逐次高重合度のセロオリゴマーを調製する方法論を確立した。プリオン病発症遅延効果に及ぼすメチル基の置換位置や重合度の違いの影響を検討するためには、化学合成手法を駆使することが必須と言える。今後、本研究により開発された位置特異的メチル化セロオリゴ糖誘導体合成法により、安全性の高いプリオン病予防薬の開発に繋がると期待される。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

[書籍]

上高原 浩. セルロースから作る新しいノニオン性界面活性剤. In: セルロース学会・編 セルロースのおもしろ科学とびつくり活用, 東京, 講談社, pp 194-195, 2012 年.

[雑誌]

Shiraishi T, Takano T, Kamitakahara H., Nakatsubo F. Studies on electrooxidation of lignin and lignin model compounds. Part 1: Direct electrooxidation of non-phenolic lignin model compounds *Holzforschung* 2012; 66: 303-309.

Shiraishi T, Takano T, Kamitakahara H., Nakatsubo F. Studies on electro-oxidation of lignin and lignin model compounds. Part 2: *N*-Hydroxyphthalimide (NHPI)-mediated indirect electro-oxidation of non-phenolic lignin model compounds *Holzforschung* 2012; 66: 311-315.

Miyagawa Y, Takemoto O, Takano T, Kamitakahara H., Nakatsubo F. Fractionation and characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of *Eucalyptus globulus* residues left after MWL isolation. Part I: Analyses of hemicellulose-lignin fraction (HC-L) *Holzforschung* 2012; 66: 459-465.

Nakagawa A, Kamitakahara H, Takano T. Synthesis and thermoreversible gelation of diblock methylcellulose analogues via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. *Cellulose* (2012), 19 (4), 1315-1326.

Nakagawa A, Ishizu C, Sarbova V, Koschella A, Takano T, Heinze T, Kamitakahara H. 2-*O*-methyl- and 3,6-di-*O*-methyl-celluloses from natural cellulose: synthesis and structure characterization. *Biomacromolecules* 2012; 13(9): 2760-2768.

Nakagawa A, Steiniger F, Richter W, Koschella A, Heinze T, Kamitakahara H. Thermoresponsive hydrogel of diblock methylcellulose: Formation of ribbon-like supramolecular nanostructures by self-assembly. *Langmuir* 2012; 28 (34): 12609-12618.

Saito Y, Takano T, Sakakibara K, Kamitakahara H, Nakatsubo F. Synthesis of (zinc(II) phthalocyanine)-containing cellulose derivative using phthalocyanine-ring formation reaction. *Cellulose* 2012; 19 (6): 2105-2114.

Kiyoto S, Yoshinaga A, Tanaka N, Wada M., Kamitakahara H, Takabe K. Immunolocalization of 8-5' and 8-8' linked structures of lignin in cell walls of *Chamaecyparis obtuse* using monoclonal antibodies (2013), *Planta*, 237, 705-715.

上高原 浩. セルロース系ブロックコポ

リマー・コオリゴマーの精密合成と機能発現、*Cellulose Communications* 2012; 19 (2): 57-62.

## 2. 学会発表

[国際学会]

Kamitakahara H., Baba A., Yoshinaga A., Takano T.: Design, synthesis, and nanostructure of cellulose triacetate-*block*-poly( $\cdot$ -benzyl L-glutamate), 0-17, p. 47 International Cellulose Conference 2012, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & SPA Resort, Sapporo, Japan, October 10-12, 2012.

Kamitakahara H. Cellulosic diblock copolymers with fascinating properties. European-Japanese Workshop of Cellulose and Functional Polysaccharides. The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 3-4 October, 2012.

[国内学会]

上高原 浩. セルロース誘導体の精密合成：合成戦略と機能発現. 第37回糖質科学懇話会、江ノ島、2012年11月30日-12月1日

上高原 浩. 細胞表面糖脂質の構造からヒントを得た糖のみからなる界面活性剤の開発. ネイチャー・インダストリー・アワード ～若手研究者からの発信～. 大阪府大阪市大阪科学技術センタービル、2012年11月20日

上高原 浩. 須原 遼:セルロース系ジブロックコポリマーの合成と機能開拓. [第10回] 積水化学 自然に学ぶものづくりフォーラム、イイノホール&カ