

図1: JCV TAgによりMeCP2のプロモーター活性は亢進する

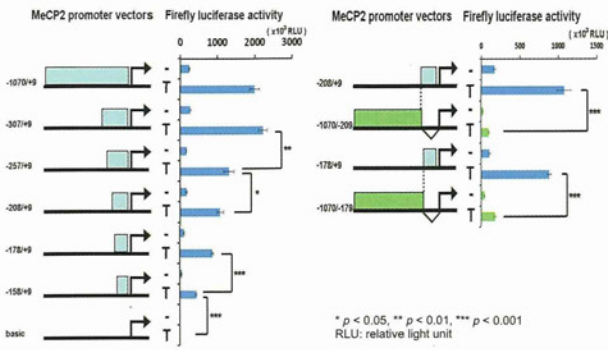


図3: JCV TAgはMeCP2タンパク質の発現に影響を与えない

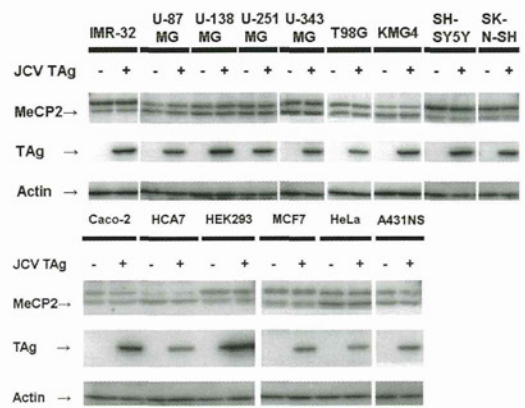


図2A: 各種ヒト細胞株においてJCV TAgはMeCP2A mRNAの発現に影響を与えない

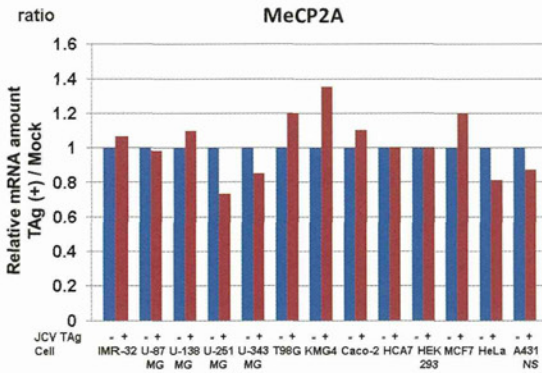


図4: JCV TAg共発現下において、MeCP2過剰発現によりJCV遺伝子転写調節領域の活性は亢進しない

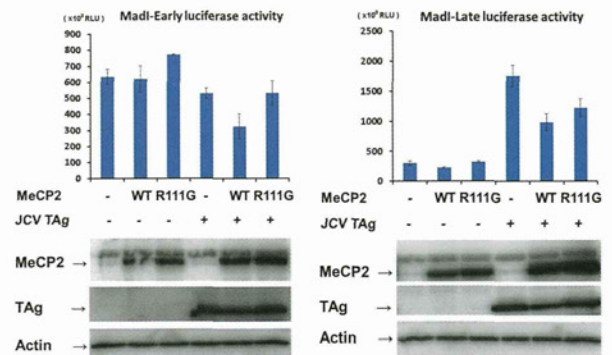


図2B: 各種ヒト細胞株においてJCV TAgはMeCP2B mRNAの発現に影響を与えない

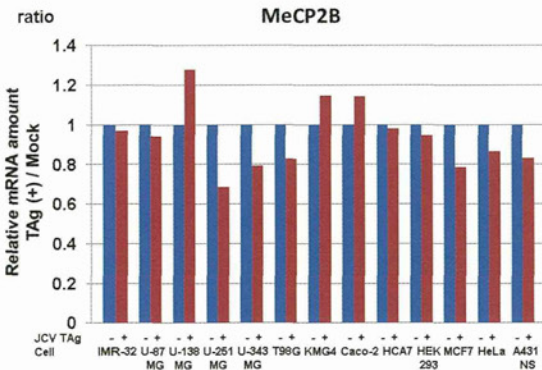
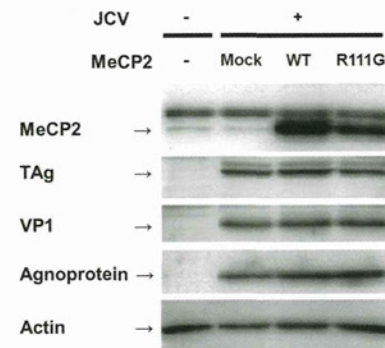


図5: MeCP2タンパク質の過剰発現はJCVタンパク質の発現に影響を与えない



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）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

## PARP-1阻害剤のin vitroにおけるJCウイルス増殖抑制効果について

研究分担者：奴久妻聡一	神戸市環境保健研究所微生物部
研究協力者：亀岡正典	神戸大学大学院保健学研究科
研究協力者：杉浦重樹	奈良県立医科大学組換えDNA実験施設
研究協力者：奴久妻智代子	東京ソアラクリニック
研究協力者：田崎隆史	金沢医科大学総合医学研究所生命科学領域
研究協力者：竹上 勉	金沢医科大学総合医学研究所生命科学領域

**研究要旨** 進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトを感染破壊し、亜急性に症状が進行する致死的な脱髄疾患で、1年以内に死に至る症例が多い。従来は免疫異常の基礎疾患の上に発症し、極めて稀な疾患であったが、近年エイズの流行に伴い患者数が増加している。しかし、治療に関しては、HIV-PML は臨床的には HAART 療法で死亡率が低下している。一方、非 HIV-PML は現在のところ有効な治療薬がない。本研究では細胞内酵素 Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) 阻害剤である 3-aminobenzamide 3-(AB) の JCV 増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞と JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて検討したところ、DNA replication assay と JCI 細胞を用いた長期間培養の結果から、3-AB により JCV の複製が抑制されることでウイルス産生が低下することは明らかになった。さらに、PARP-1 阻害剤添加による PARP-1 活性と細胞増殖への影響を調べたところ、IMR-32 細胞内の PARP-1 活性が低下し、二次的に JCV の複製が抑制された可能性が示唆された。

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(PML)は免疫異常の基礎疾患の上に、JC ウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトを感染破壊することで発症する極めて稀な疾患であったが、近年エイズの流行に伴い患者数が増加している。PML は亜急性に症状が進行し、1年以内に死に至る致死的な疾患が多い。しかし、治療に関しては、HIV-PML は臨床的には HAART 療法で死亡率が低下している。一方、非 HIV-PML は現在のところ有効な治療薬がない。過去の報告において、JCV をターゲットにした治療薬の探索が試みられているが、十分な効果が見られないのが現状である。近年、細胞内酵素である Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) 阻害剤の 3-AB が JCV と同じ仲間である SV40 のウイルス増殖を抑制すること、PARP-1 に対する RNAi が HIV-1 の複製を抑制すること、さらに HSV-1 の複製には PARP family である Trankyrase 1 が必須であることが報告されている。そこで、本研究では PARP-1 阻害

剤である 3-aminobenzamide (3-AB) の JCV 増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞と JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて検討すると同時に、PARP-1 阻害剤添加による PARP-1 活性と細胞増殖への影響を調べた。

### B. 研究方法

#### 1) 3-AB添加による細胞増殖への影響

3-ABの細胞毒性は極めて少ないと報告されているが、20 mMの濃度の3-ABをIMR-32細胞に添加し、5日後のIMR-32細胞の増殖をCell Proliferation Kit I (MTT法) で無添加群と比較した。

#### 2) 3-ABのJCV増殖抑制の解析

IMR-32細胞にM1-IMRb DNA (IMR-32細胞で最も良く増殖するJCV)を1 μgトランスフェクトし、3-ABを20 mMで添加した群(3-AB添加群)と添加しない群(DMSO群)から48、72時間後に低分子DNAを抽出し、Bam HIとDpn I消化により複製したDNAのみをDNA replication assayにより検出し、複製DNAのバンドをNIH Image Jを用いて数値化

した。

一方、JCV持続産生細胞であるJCI細胞に3-ABを20mMの濃度で長期間添加培養し、12日後と18日後にウイルス量を赤血球凝集反応で測定した。さらに、HAサンプルからDNAを抽出し、JC-VP1 (TaqMan probe)、JC-VP-F,R (primers)を用いたreal-time PCRにてJCV DNAを定量した。

### 3) 3-AB添加によるPARP-1への影響

3-ABがJCVと同じ仲間であるSV40の感染細胞からの放出を促進することでウイルス増殖を抑制することが報告されている。JCV複製抑制機構を解明するために、20 mMの3-ABをIMR-32細胞に添加し、72時間後のPARP-1活性を測定した。

### 4) 統計学的解析

データの統計学的解析はStudent's t-testで行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は臨床検体や実験動物を使用していないことから倫理面の問題がないと判断した。また、本実験で使用しているJCVはP2対応のウイルスであり、本研究は神戸市環境保健研究所のP2指定実験室にて安全性に留意して行われた。

## C. 研究結果

### 1) 3-AB添加による細胞増殖への影響

3-ABは20 mMではIMR-32細胞に対する細胞毒性は見られなかった。

### 2) 3-ABのJCV増殖抑制の解析

DNA replication assayにより3-AB添加群はDMSO群に比べて、48時間後は61.0%、72時間後では59.0%のJCVのDNA複製抑制率を示した。特に、72時間後ではDMSO群に比して、有意な複製抑制( $p < 0.05$ )を示した(図1)。

また、JCI細胞を用いた3-AB添加長期間培養では3-AB添加群がDMSO群に比して、12日後に60.0%、18日後に79.1%のHA価の抑制が見られた。さらに、HAサンプル中のJCV DNAを定量したところ、3-AB添加群がDMSO群より12日後で81.5%、18日後では75.0%の抑制率を示し、共に有意差が見られた( $p < 0.01$ )。

### 3) 3-AB添加によるPARP-1への影響

3-AB添加によるIMR-32細胞のPARP-1活性は3-AB添加群がDMSO群に比べて35.8%抑制した。

## D. 考察

近年、先進国でエイズが増えているのは日本だけで、それに伴ってPMLも増加している。免疫不全等の基礎疾患の上に発症するが、亜急性に症状が進行し1年以内に死に至る致命的な疾患で有効な治療薬がない。しかし、エイズ感染に関連して発症したHIV-PMLについてはHAART療法が有効であることが臨床的に明らかになっている。一方、非HIV-PMLは現在のところ有効な治療薬がない。従来の治療薬はJCVをターゲットにしたものが大半で、治療効果が不十分である上に生体に重篤な副作用を示す欠点がある。近年、細胞内酵素であるPARP-1阻害剤の3-ABがJCVと同じ仲間であるSV40のウイルス増殖を抑制すること、PARP-1に対するRNAiがHIV-1の複製を抑制すること、さらにHSV-1の複製にはPARP familyであるTrankyrase 1が必須であることが報告されていることから、本研究ではPARP-1阻害剤である3-ABのJCV増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞とJCV持続感染細胞であるJCI細胞を用いて検討すると同時に、PARP-1阻害剤添加によるPARP-1活性と細胞増殖への影響を調べた。

その結果、DNA replication assayとJCI細胞を用いた長期間培養実験において、3-ABによりJCVの複製が抑制されることでウイルス産生が低下することは明らかである。しかし、Gordon-Shaagらは3-ABがSV40の複製や外郭タンパクの産生を抑制するのではなく、感染細胞にnecrosisを誘導しウイルス放出を促進するPARP-1の活性を低下させることでウイルス増殖を抑制すると報告している。一方、KameokaらはPARP-1に対するRNAiがHIV-1の複製を抑制すること、さらにLiらはHSV-1の複製にはPARP familyであるTrankyrase 1が必須であることが報告している。本研究は3-ABの添加によりIMR-32細胞内のPARP-1活性が低下し、二次的にJCVの複製が抑制された可能性が示唆された。これらのことにより、3-ABの細胞毒性は極めて少ないことを考えれば、PARP-1をターゲットにした抗JCV薬の開発の新しいアプローチになると考えられる。

## E. 結論

本研究では3-ABの短期添加によるDNA replication assayとJCI細胞への長期間添加実験を

行ったが、3-AB により JCV の複製および増殖が抑制されることは明らかである。さらに、3-AB を添加することで IMR-32 細胞内の PARP-1 活性が低下したことから、二次的に JCV の複製が抑制された可能性が示唆された。一方、細胞増殖は低下していなかったことから、3-AB の細胞毒性は極めて少ないと考えられ、PARP-1 をターゲットにした抗 JCV 薬として有用であると思われる。

#### [参考文献]

- 1) Gordon-Shaag A, Yosef Y, El-Latif MA, Oppenheim A. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of Simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 77:4273-4282, 2003.
- 2) Kameoka M, Nukuzuma S, Itaya A, Tanaka Y, Ota K, Ikuta K, Yoshihara K. RNA interference directed against poly(ADP-ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells. *J Virol* 78:8931-8934, 2004.
- 3) Li Z, Yamauchi Y, Kamakura M, Murayama T, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus requires poly(ADP-ribose) polymerase activity for efficient replication and induces extracellular signal-related kinase-dependent phosphorylation and ICP0-dependent nuclear localization of tankyrase 1. *J Virol* 86:492-503, 2012.

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Beppu M, Kawamoto M, Nukuzuma S, Kohara N. Mefloquine improved progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 51:1245-1247, 2012.
- 2) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T. Suppressive effect of PARP-1 inhibitor on JC virus replication in vitro. *J Med Virol* 85:132-137, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) 奴久妻聡一, 亀岡正典, 杉浦重樹, 中道一生, 奴久妻智代子, 竹上 勉. HIV-1 Tatによる神経芽細胞腫でのJCウイルスの増殖促進. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

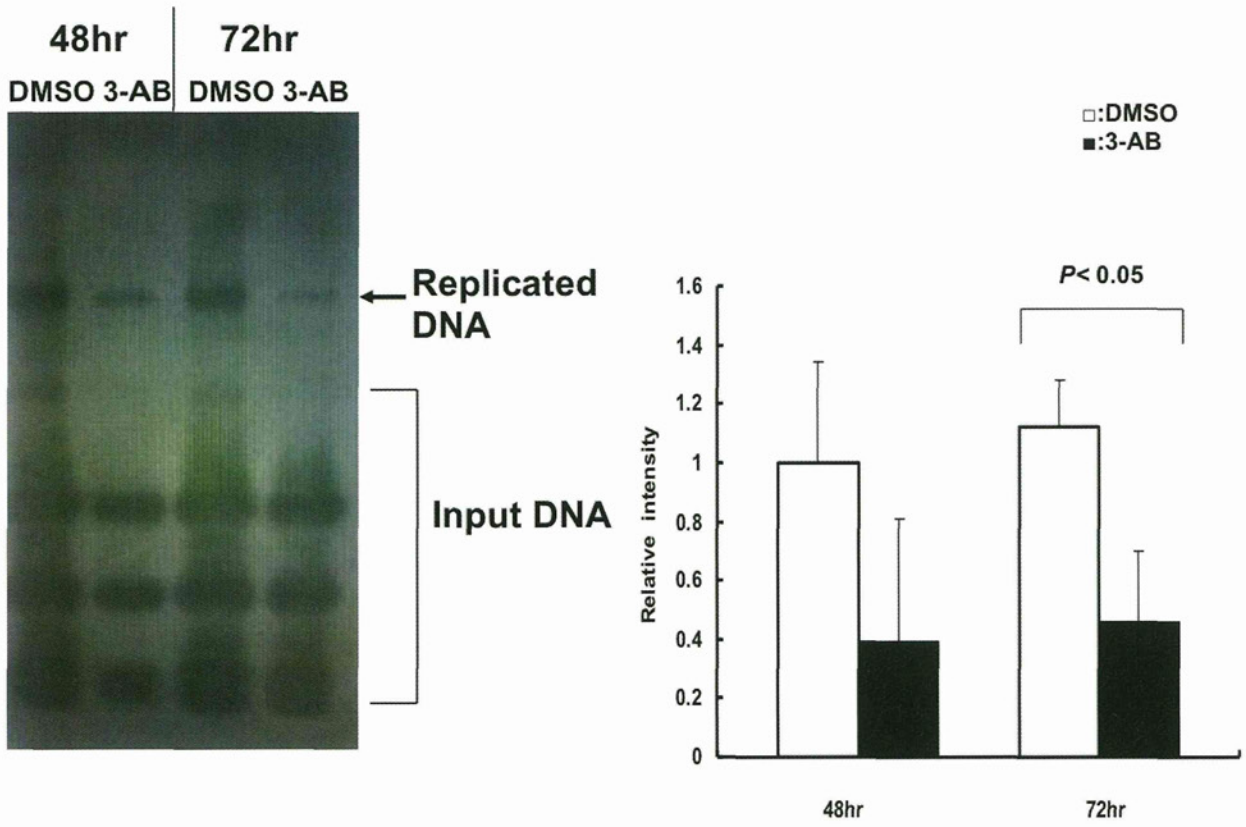


図 1 . IMR-32 細胞を用いた 3-AB の JCV DNA 複製抑制 (DNA replication assay)

### [Ⅲ] 研究成果

## 硬膜移植後CJDにおける臨床症状の進行と移植部位、病理学的サブタイプとの関連についての検討

研究代表者: 金沢大学大学院 脳老化・神経病態学(神経内科) 山田正仁

表. dCJD 症例の臨床症状

	全例 (n = 53)	テント上群 (n = 20)	テント下群 (n = 28)	p value
Pathologically confirmed cases (%)	18 (34)	9 (45)	7 (25)	ns
Initial manifestations (%)	(n = 39)	(n = 16)	(n = 19)	
Unsteady gait	12 (31)	4 (25)	7 (37)	ns
Dementia	11 (28)	6 (38)	5 (26)	ns
Vertigo	6 (15)	0 (0)	6 (32)	p < 0.05
Behavioral abnormality	6 (15)	4 (25)	2 (11)	ns
Ataxia	6 (15)	3 (19)	1 (5)	ns
Diplopia	5 (13)	0 (0)	4 (21)	p = 0.07
Sensory disturbance	2 (5)	1 (6)	1 (5)	ns
Extrapyramidal signs	1 (3)	1 (6)	0 (0)	ns
Visual disturbance	1 (3)	0 (0)	1 (5)	ns
Others	3 (8)	3 (19)	0 (0)	
Manifestations (%)				
Cerebellar signs	35/51 (69)	10/20 (50)	22/26 (85)	p < 0.05
Psychiatric feature	32/50 (64)	11/17 (65)	19/28 (68)	ns
Dementia	51/53 (96)	19/20 (95)	28/28 (96)	ns
Visual disturbance	21/51 (41)	8/19 (42)	12/27 (44)	ns
Myoclonus	50/52 (96)	20/20 (100)	25/26 (96)	ns
Extrapyramidal signs	30/51 (59)	12/20 (60)	17/26 (65)	ns
Pyramidal signs	40/51 (78)	18/20 (90)	19/26 (73)	ns

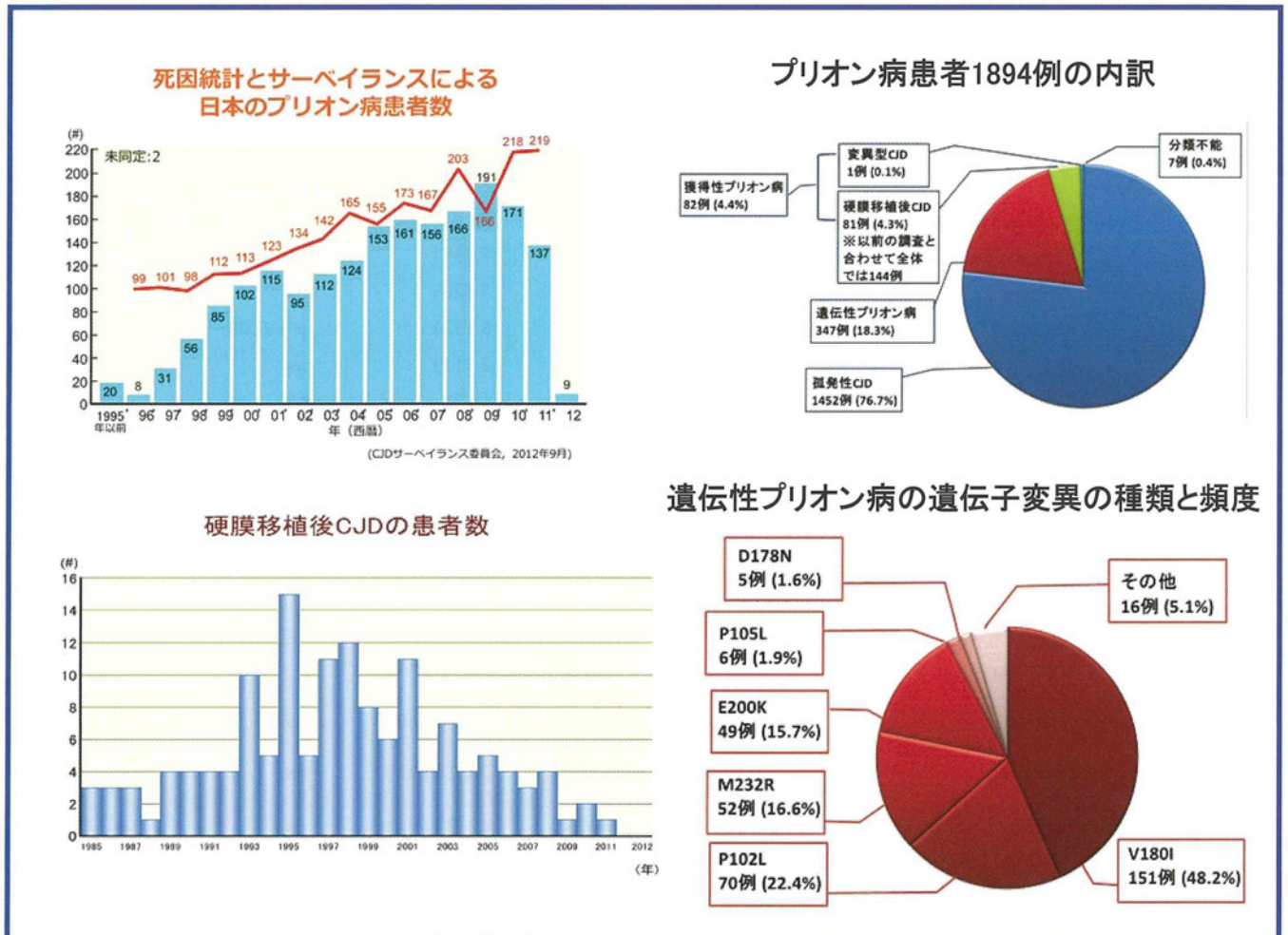
### 解 説

非プラーク型では、テント下領域への移植群にて脳幹小脳症状が有意に多く認められ、移植硬膜からのPrP<sup>Sc</sup>の直接的な進展を反映していると考えた。一方、プラーク型では同様の関連を認めなかった。

移植硬膜からのPrP<sup>Sc</sup>の直接的な進展では説明不可能な症状の出現・進行を示す場合があり、他の伝播経路についても解明が必要である。

## わが国におけるプリオン病のサーベイランス (2012年9月まで)

研究分担者: 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 水澤英洋



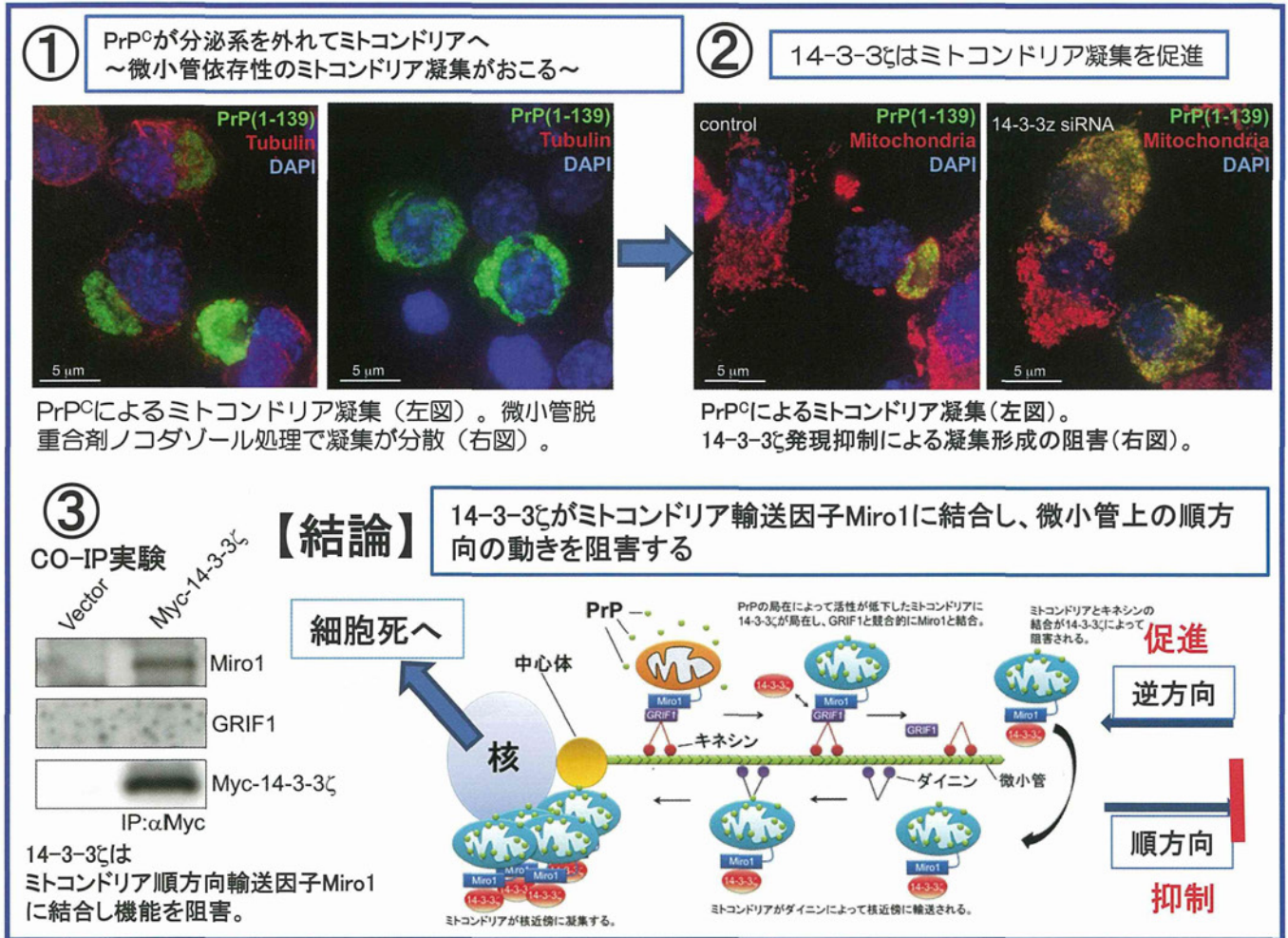
### 解説

1. サーベイランス委員会は1999年4月から2012年9月までに1894例のプリオン病を同定した。病型、および変異遺伝子ごとの頻度を図示した。プリオン病患者数は近年増加しているようにも見え、今後も注意深いサーベイランス調査が必要である。
2. 病型別の割合は孤発性CJDが1,452例(76.7%)、遺伝性プリオン病が347例(18.3%)、硬膜移植後CJDが81例(4.3%)であった。
3. 新たな変異型CJDの発症はなかった。硬膜移植例は2011年9月から2例増えて144例となった。獲得性プリオン病の新規発症例は減少傾向にある。
4. 遺伝性プリオン病の遺伝子変異ごとの頻度はV180Iが最多で48.2%、続いてP102Lが多く、M232R、E200Kと続いていた。V180I、M232Rは欧米にはほとんどなく、日本にほぼ特有の病型である。



## PrP<sup>C</sup>とミトコンドリアに依存する細胞死機構の解析

研究分担者：東京医科大学 医学部神経生理学講座 八谷如美

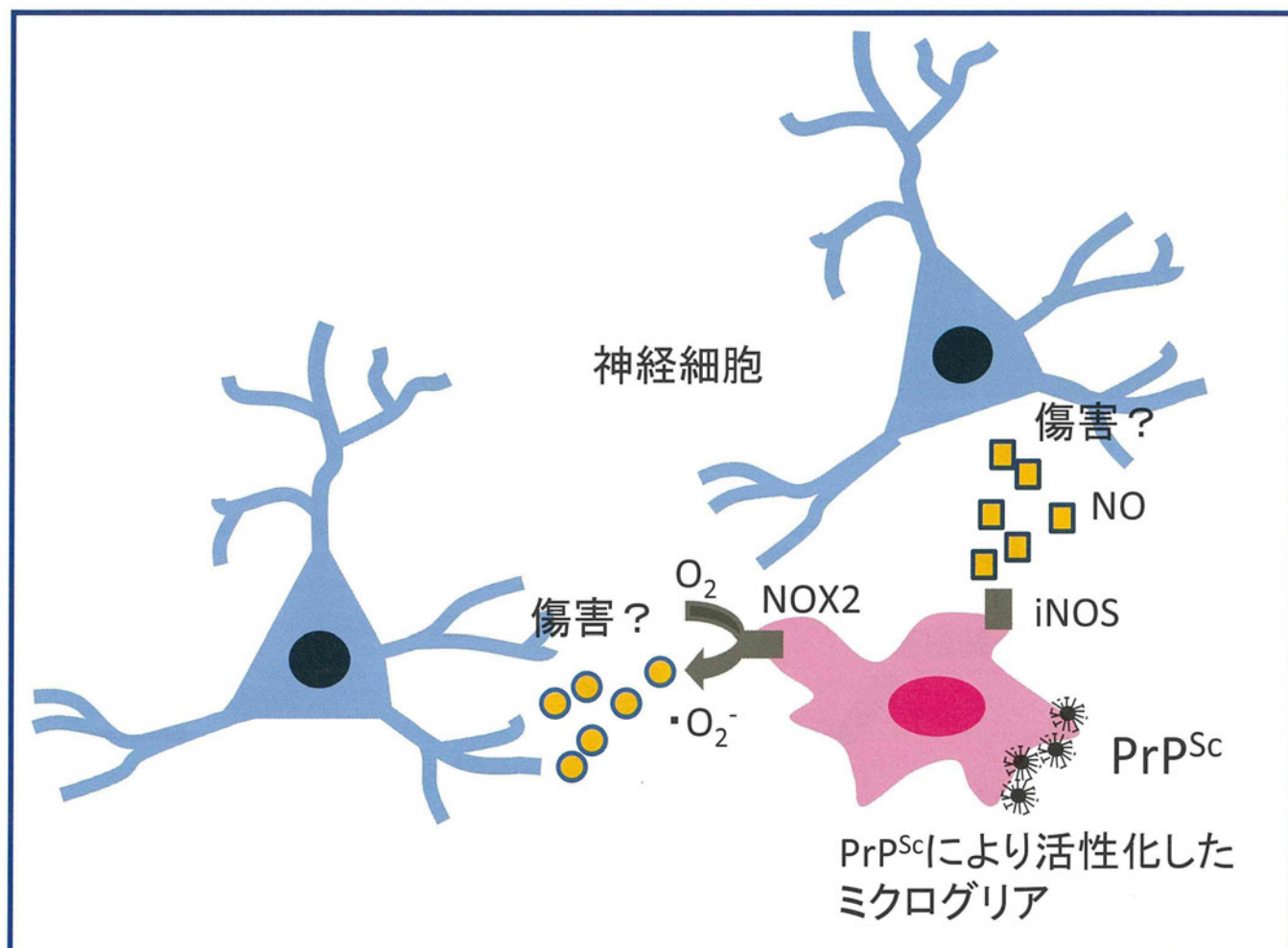


### 解説

1. 加齢や遺伝子変異によって、PrP<sup>C</sup>は分泌系を逸脱しミトコンドリアへ局在。
2. PrP<sup>C</sup>が局在するミトコンドリア同士が微小管依存性に凝集する。
3. 14-3-3 $\zeta$ はPrP<sup>C</sup>によるミトコンドリア凝集に必須。
4. 14-3-3 $\zeta$ はミトコンドリア外膜上の順方向への輸送因子Miro1と結合し機能を阻害、ミトコンドリアの順方向の移動を抑制。
5. 結果として、逆方向の輸送のみ促進、PrP<sup>C</sup>が局在するミトコンドリアは核近傍へ凝集し細胞死へ。

## プリオン病発症メカニズムの解析：酸化ストレスの関与

研究分担者：琉球大学医学部 作道章一

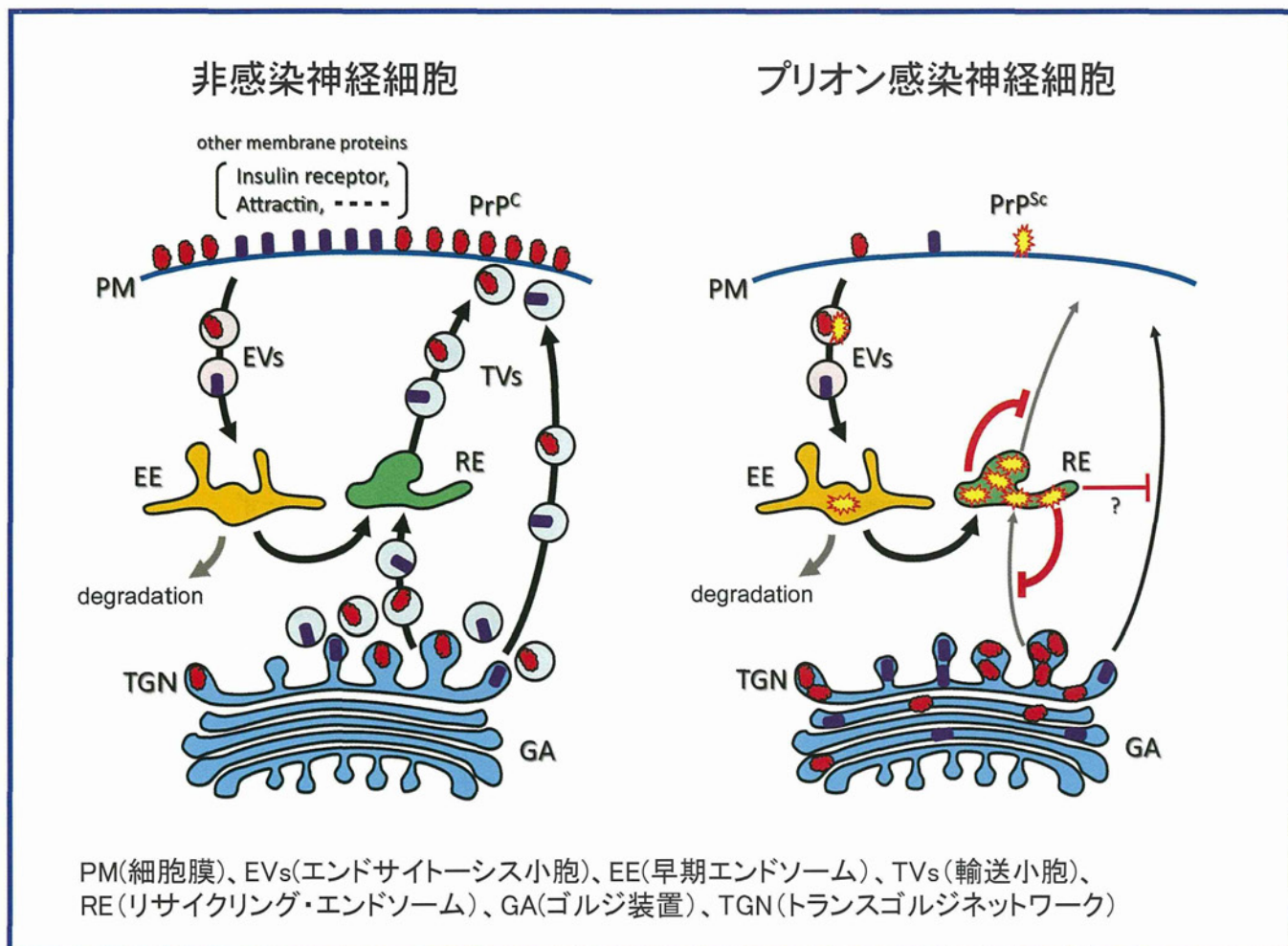


### 解説

1. プリオンに感染した動物の脳内では、異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積が起こるとともに、神経細胞等において、脂質、糖、蛋白質、DNAの酸化が亢進している。
2. また、ミクログリアで発現するNOX2やiNOSの発現上昇が見られることから、PrP<sup>Sc</sup>によるミクログリアの異常活性化が神経細胞傷害を引き起こすというメカニズムを考えることができる。

## プリオンは細胞内小胞輸送を障害し細胞死を引き起こす

研究分担者：徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門 坂口末廣

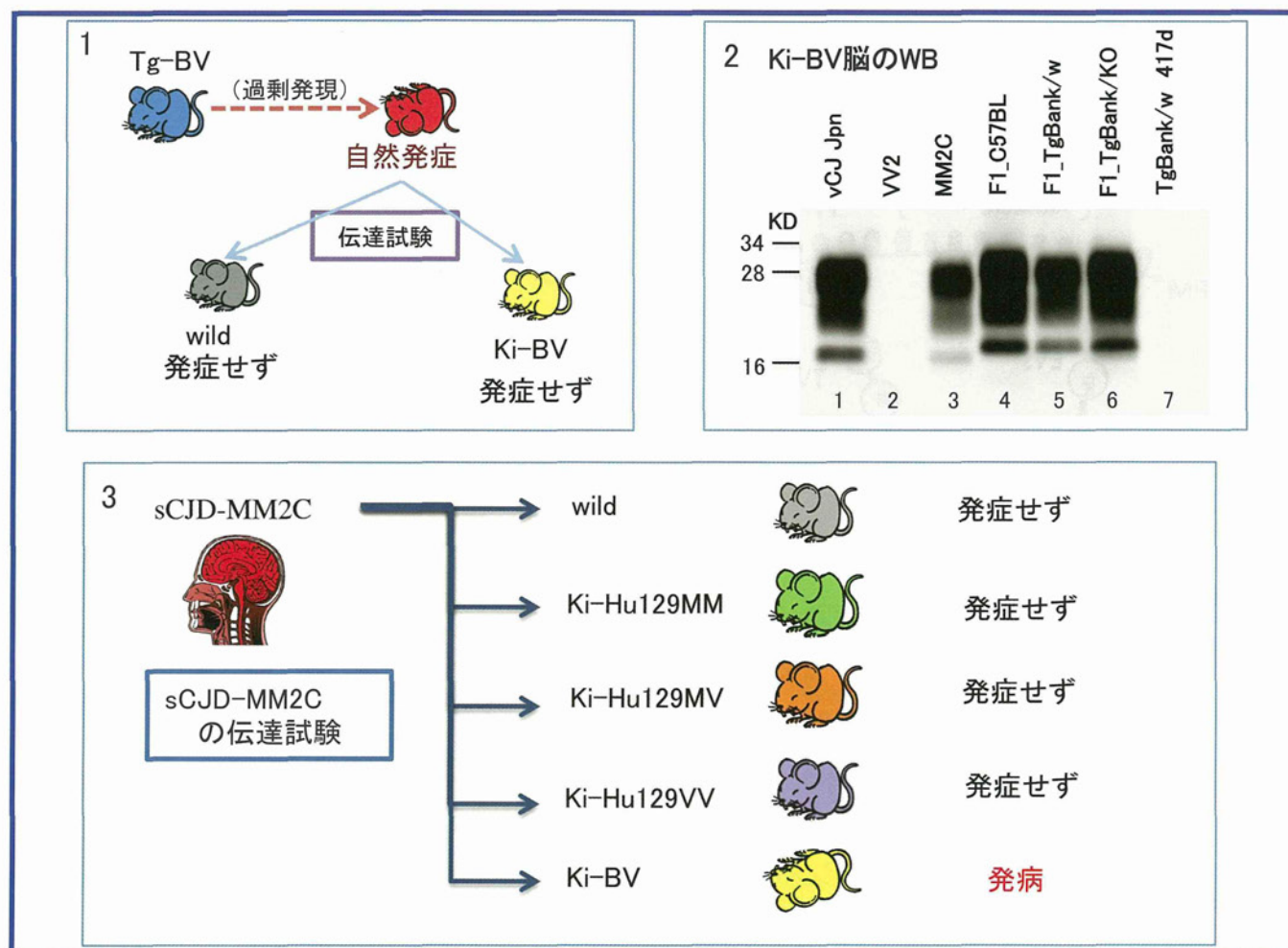


### 解説

1. 正常神経細胞では、細胞膜蛋白質は小胞体で合成された後、ゴルジ装置(GA)を経由して、リサイクリング・エンドソーム(RE)を介して細胞膜表面に運ばれる(上図、左)。
2. プリオンが感染すると、正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)に変換し、リサイクリング・エンドソーム(RE)に蓄積する。それにより、細胞膜蛋白質の輸送が障害され、細胞膜蛋白質は細胞膜に発現できなくなる(上図、右)。このメカニズムを介して、プリオンが感染すると神経細胞が死に至ると考えられる。

## 新たなモデルマウス(Ki-BV)により孤発性CJD-MM2 Cortical formが伝達出来た

研究分担者: 動物衛生研究所プリオン病研究センター 毛利資郎



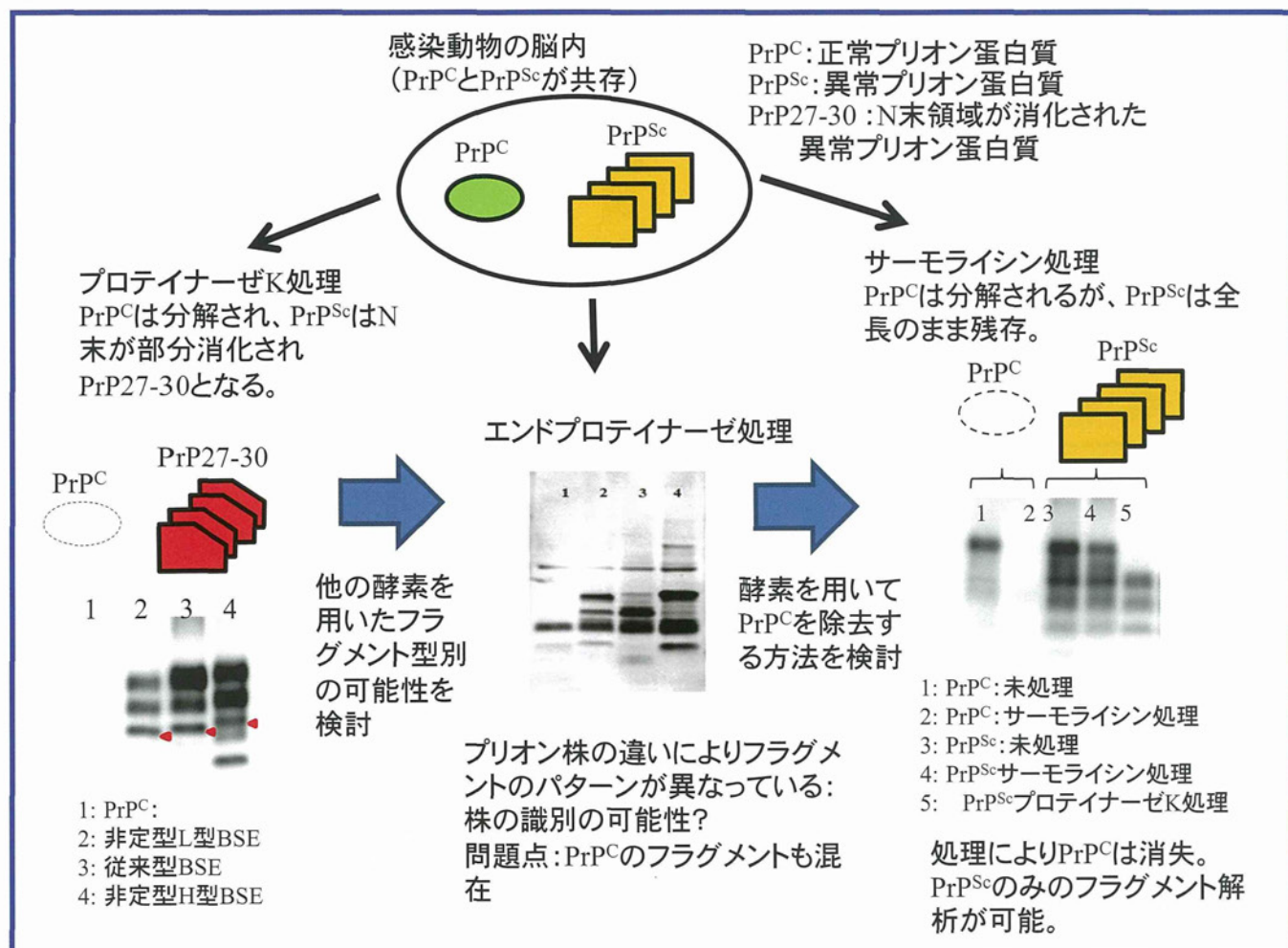
### 解説

伝達性海綿状脳症に広い感受性を有することが知られているbank vole (*Myodes glareolus*)のプリオンたんぱく質遺伝子を発するトランスジェニック(Tg-BV)マウスとノックイン(Ki-BV)マウスを作成し、CJDの接種を行った。

1. 過剰発現系Tg-BVマウスは400~500日で自然発症し、脳に異常プリオンたんぱく質の蓄積PrPを認めた。しかし、継代接種では野生型マウスにも同じ遺伝子の自然発現系のKi-BVにも伝達性が認められなかった。Tg-BVに蓄積する異常プリオンたんぱく質はpK感受性であった(2、レーン7)
2. Ki-BVへの伝達試験の結果vCJD、MM2C、CJDF1株が伝達出来た、しかし、VV2は伝達出来なかった。
3. これまで野生型マウス、およびヒト型遺伝子改変マウスへ伝達出来なかった孤発性CJD-MM2 Cortical form (MM2C)がこの遺伝子改変マウスにより、初めて伝達可能となった。

## 異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

研究分担者：動物衛生研究所プリオン病研究センター 横山 隆



### 解説

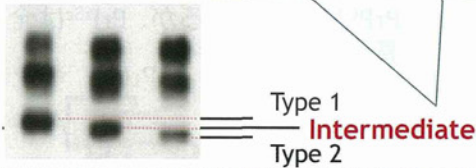
- 一部のプリオン株はプロテイナーゼK消化によるフラグメントの違いによる識別が可能である(左)。
- しかし、多くのプリオン株は同じ大きさのフラグメント(PrP27-30)となるため、他の酵素を用いた型別の可能性を検討した。
- エンドプロテイナーゼ処理による新たな識別の可能性が示唆されたが、このバンドにはPrPCのフラグメントも混在する(中)。
- サーモライシン処理によりPrPCが分解され、PrP<sup>Sc</sup>のみの型別が可能となった(右)。

## リコンビナントPrP<sup>C</sup>を用いたヒトプリオンの*in vitro*増幅

研究分担者: 東北大学大学院医学系研究科病態神経分野 竹内敦子

### 1. 背景

硬膜移植後CJDであり、遺伝子型が129M/Mであるにもかかわらず、プラーク沈着を示す非典型例が存在する(dCJD-PL,タイプは中間型)。このプリオンは129V/ヒト型ノックインマウスに高い感染性をもっているが、PMCA法でも同じ傾向が認められるか確認した



### 2. 材料と方法

Seed : 10% (w/v) 硬膜移植後CJD (dCJD、ブランクタイプ) 脳ホモジネート  
Substrate; 20% 293F細胞ライゼート (Hu129MまたはHu129V過発現)



FreeStyle™  
293-F Cells (Invitrogen)  
(ヒト胎児腎臓細胞)

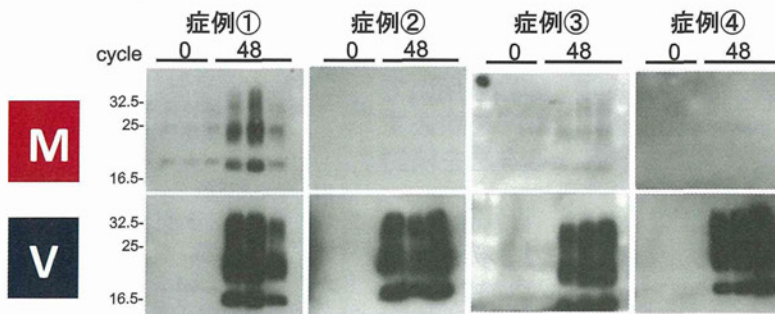


細胞を回収  
PMCAバッファー中で  
超音波ホモジナイザーにて破砕

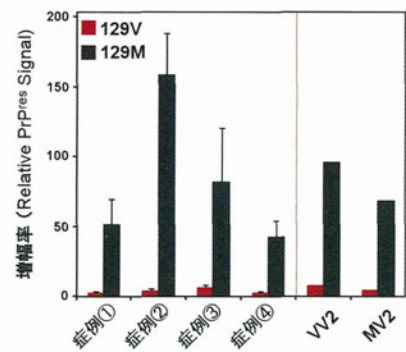
#### PMCA・PK処理

・交差超音波破砕器と反応装置使用 (エレコン株式会社)を用い、37℃で振とう培養  
・全量 100  $\mu$ l で反応  
・超音波条件:  
(5sec.ON + 1sec.OFF) x  
5 / 1hr を1 サイクルとし、48hr で1ラウンド  
・PK処理 (50 $\mu$ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 1hr)  
・ウェスタンブロッティング法にて検出

### 3. 結果: dCJD -PLプリオンのPMCA法による増幅効率



48サイクルのPMCA反応後、dCJD-PLプリオンの遺伝子型は129M/Mであるにもかかわらず、129MPrP<sup>C</sup>では殆ど増幅しない



VV2はたはMV2プリオンと同様に、129VPrP<sup>C</sup>により顕著にPrP<sup>Sc</sup>が増幅される

## 解説

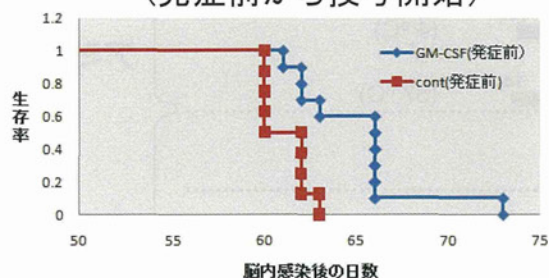
- ヒト型ノックインマウスを用いた動物実験と同様の傾向が*in vitro*の系でも認められた。今回用いた4症例すべてにおいて、dCJD-PLプリオンはその遺伝子型が129M/Mであるにもかかわらず、高効率で129VPrP<sup>C</sup>により顕著に増幅されることが明らかとなった。
- dCJD-PLはMV2またはVV2からの感染が強く疑われている。PMCA法によって、このような非典型的な症例に関して感染が疑われる場合において、迅速な診断方法として応用できる可能性が示唆された。

## プリオン病の治療予防に関する基礎研究

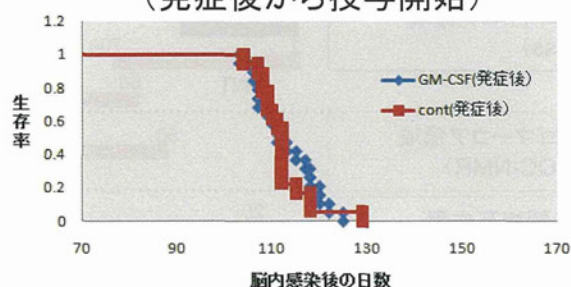
研究分担者: 東北大学大学院医学系研究科 堂浦克美

### 疾患モデルに依存するGM-CSFの効果

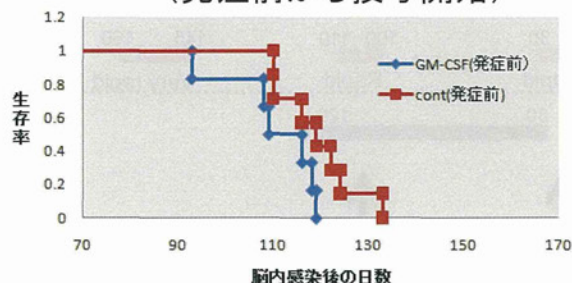
1. Tg7-263Kプリオン病動物  
(発症前から投与開始)



2. Tga20-22Lプリオン病動物  
(発症後から投与開始)



3. Tga20-22Lプリオン病動物  
(発症前から投与開始)

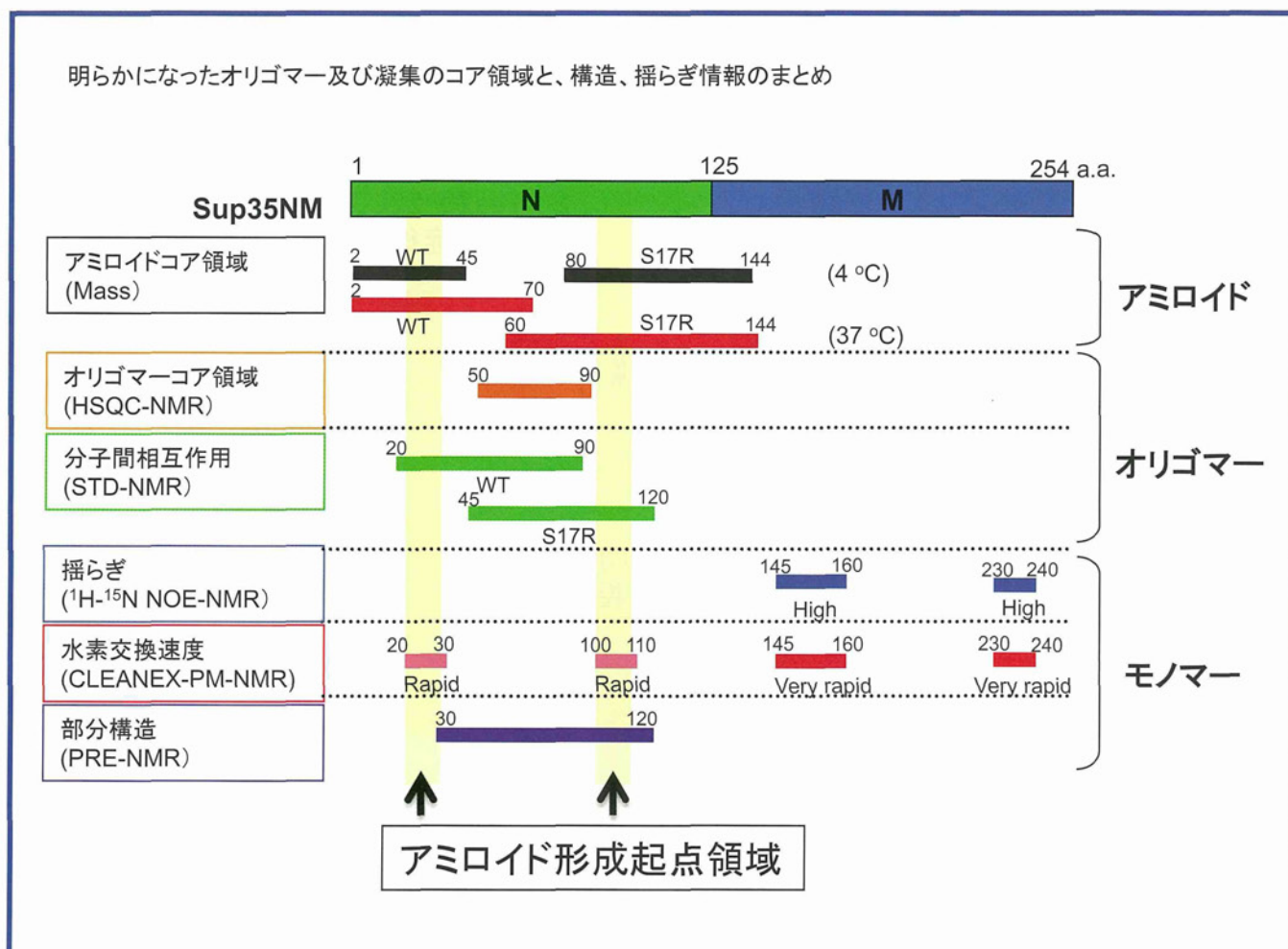


### 解説

1. GM-CSF(顆粒球単球コロニー刺激因子)は、Tg7-263K早発系プリオン病動物においては、感染後期(発症前)からの投与でも生命予後を改善する有効な薬剤である。
2. 発症期が明確に評価できるTga20-22Lプリオン病動物で、発症後のGM-CSF投与の効果を調べたが、生命予後を改善する効果は観察されなかった。
3. Tga20-22Lプリオン病動物で、感染後期(発症前)からのGM-CSF投与の効果も調べたが、Tg7-263Kプリオン病動物で認められたような効果は観察されなかった。GM-CSFの効果は、疾患モデルに依存していることが明らかとなった。このことは、プリオン病のタイプによってはGM-CSFの効果を期待できないものがあることを示唆している。

## 蛋白質の凝集体形成における揺らぎと部分構造の役割を解明

研究分担者: 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター 大橋祐美子



### 解説

1. 1アミノ酸置換S17Rによって誘導されるSup35-NMの凝集体多形について、前駆体蛋白質モノマー及びオリゴマーの揺らぎや部分構造に着目した研究を核磁気共鳴法(NMR)を用いて行い、Sup35-NMの配列内にアミロイド形成の起点として働く領域が二箇所存在することが明らかとなった。
2. アミロイド形成の起点となる領域は、溶媒に露出しているため、水素交換速度が速く、部分構造領域の両端に相当する。また、オリゴマー形成時にはこの領域に分子間相互作用が存在することが示された。
3. 起点領域のアスパラギン残基をアラニン残基に置換することで、起点としての機能を抑制することに成功した。



## メディカルシャペロンの役割

研究分担者: 岐阜大学連合創薬医療情報研究科 桑田一夫

### 1. 作用機構による抗プリオン化合物の分類

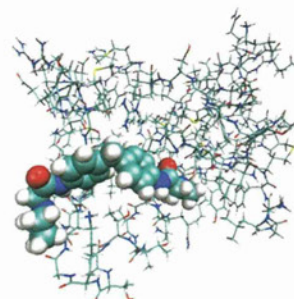
#### I. 特異的結合

(**メディカルシャペロン**)

#### II. 非特異的結合

#### III. タンパク質の凝集

#### IV. プリオンタンパク質以外に作用



### 2. シャペロンの分類

#### I. シャペロン(蛋白質フォールディングを助ける)

#### II. 化学シャペロン(溶媒に作用する)

#### III. 薬学シャペロン(酵素を安定化する基質アナログ)

#### IV. **メディカルシャペロン**(タンパク質の立体構造を制御)

## 解説

1. 核磁気共鳴法(NMR)と表面プラズモン共鳴(SPR)測定により、これまで発表された抗プリオン化合物を、その作用機構に基づいて分類した。これらの中でも、メディカルシャペロンは、特異的であり、かつ副作用が少ない。
2. これまで発表されてきたシャペロンを分類・整理した。メディカルシャペロンは、副作用が少なく、疾患の治療薬として最も有効である。

## 髄液や血清中のH-FABPの検出意義

研究分担者: 広島大学大学院生物圏科学研究科 堀内浩幸

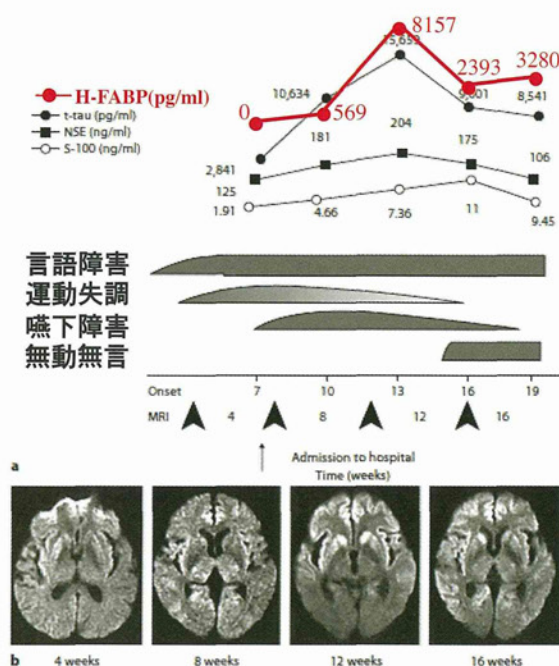


表1. 各種脳疾患患者における血清H-FABP

	血清H-FABP (pg/ml)
レビー小体型認知症	6073
レビー小体型認知症	9215
パーキンソン病	4794
パーキンソン病	5959
晩発性小脳皮質萎縮	2368
アルツハイマー病	1685
アルツハイマー病	3476
アルツハイマー病	1554

図1. CJD患者の経過に伴う症状と髄液検査

### 解説

図1. 論文 ( Satoh K, et al: *Dement Geriatr Cogn Disord*,2007;23,372 ) 中の Fig.2に髄液H-FABP検出のデータ(赤表示)を加えた。CJD患者の各種症状の経過に伴って髄液t-tau変動が認められる。同一髄液試料を用いてH-FABPを調べたところ、H-FABPはt-tauと類似の変動を示したことから、CJDの髄液検査におけるt-tau やH-FABP の診断的意義が推察される。

表1. 少数例ではあるが、レビー小体型認知症患者において血清H-FABPが高値であった。他論文も参照して考えると、認知症と血清H-FABPには正の相関が想像され、今後多数検体での検証が必要と思われる。

本研究は佐藤克也・西田教行(長崎大学)との共同研究成果である。

## 異常プリオン蛋白試験管内増幅法(Real-time QUIC法)とバイオマーカーを用いたヒトプリオン病の髄液診断法の確立

研究分担者:長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野 西田教行

### 1. 孤発性CJDのdefinite casesの内訳

日本	32	cases
オーストラリア	16	cases
韓国	4	cases
ドイツ	8	cases
スペイン	36	cases
総計	96	cases

### 2.RT-QUIC法を施行した非プリオン病患者の内訳

- アルツハイマー型認知症 200 cases
  - 前頭側頭型認知症 4 cases
  - 脳血管性認知症変性症 4 cases
  - 橋本脳症 6 cases
  - リンパ腫 2 cases
  - MELA 4 cases
  - 辺縁系脳炎 6 cases
  - 精神疾患 7 cases
  - 症候性けいれん 10 cases
  - 神経梅毒 3 cases
  - other diseases
- 大脳皮質基底核変性症  
進行性多巣性白質脳症

### 3. 異常プリオン蛋白試験管内増幅法(Real-time QUIC法)とバイオマーカーを用いたヒトプリオン病の髄液の陽性率 (全definite cases 96 症例)

14-3-3 $\gamma$	t-tau	RT-QUIC	総数
+	+	+	71
+	-	+	4
-	+	+	0
+	+	-	10
-	+	-	2
+	-	-	2
-	-	+	3
-	-	-	4

### 4. 異常プリオン蛋白試験管内増幅法(Real-time QUIC法)とバイオマーカーを用いたヒトプリオン病の髄液の感度・特異度 (96 definite sCJD症例+ 非プリオン病240 症例)

	14-3-3 $\gamma$	t-tau	RT-QUIC
感度	91.7%	88.5%	82.3%
特異度	81.2%	86.8%	98.7%

## 解説

1. 確実例96症例と非プリオン病240症例におけるRT-QUIC法とバイオマーカーの感度・特異度について検討を行った。
2. 確実例96症例の検討ではRT-QUIC法の感度は82.3%、バイオマーカーである総タウ蛋白は88.5%、14-3-3蛋白は91.7%であった。
3. 非プリオン病240症例中RT-QUIC法にて偽陽性4症例を経験した。いずれもけいれんを呈している症例であった。非プリオン病でけいれんを呈する症例ではRT-QUIC法偽陽性に注意する必要性がある。

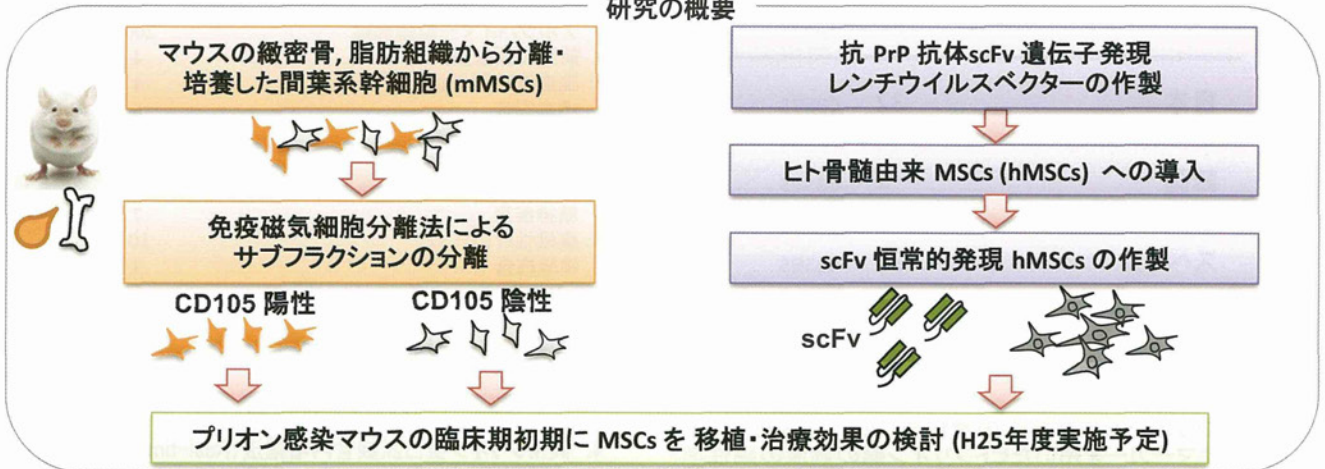
# 平成 24 年度プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班研究成果

## 間葉系幹細胞を用いたプリオン病治療モデルに関する研究

研究分担者: 北海道大学 大学院獣医学研究科 長谷部 理絵

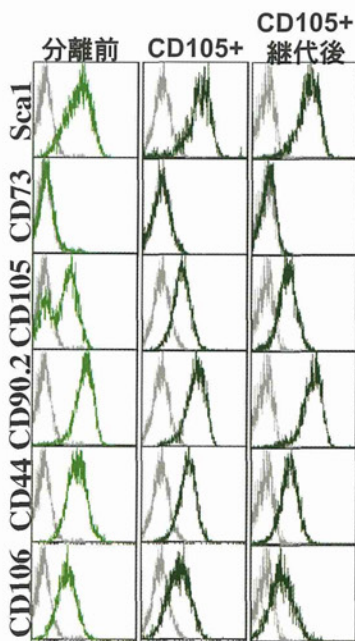
現在のところ、プリオン病に対する有効な治療法はない。本研究は間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた再生医療のプリオン病治療への応用を検討するために実験動物レベルでの基礎的知見を収集することを目的としている。昨年度はマウス組織より分離した MSCs をプリオン感染マウスの脳内に移植したところ、生存期間が延長する傾向が認められた。表面抗原の解析から、これらの MSCs には複数の細胞集団が存在し、それにより治療効果が希釈されている可能性が考えられたため、幹細胞の増殖マーカーである CD105 発現によるサブフラクション分離により均一な細胞集団を得ることを試みた。また、治療効果を高めるために抗 PrP 抗体 scFv を恒常的に発現する MSCs の作製を行った。

### 研究の概要



### 結果 1. CD105 陽性サブフラクション分離

(a) 分離前後および継代後の表面抗原の発現

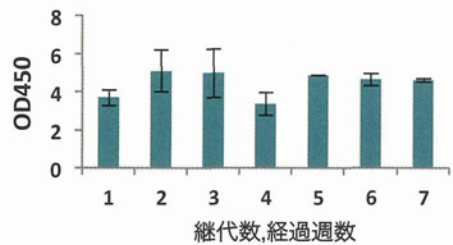


(b) 分化能の評価

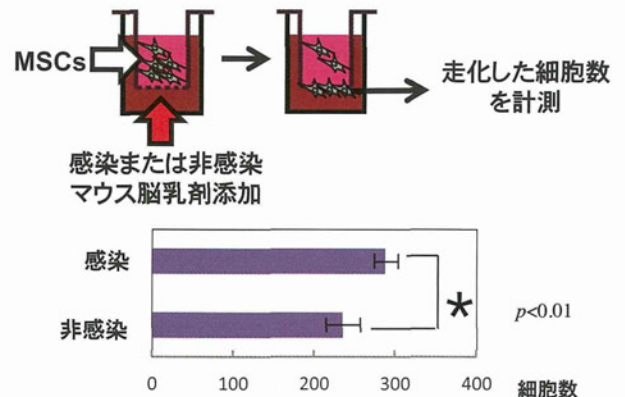


### 結果 2. scFv 恒常的発現 hMSCs の作製

(a) 培養上清中の rPrP 結合性 scFv の検出



(b) scFv 発現 hMSCs の走化能の評価



- 免疫磁気細胞分離法により得られた CD105 陽性 mMSCs は継代後も表面抗原を維持しており、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を有していた。
- scFv を恒常的に発現する hMSCs は 7 代継代後も scFv を産生していた。また、プリオン感染マウス脳乳剤に対して走化性を有していた。
- 今後はこれらの MSCs を臨床期初期のプリオン感染マウスに移植し、治療効果を検討していく。