

Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

4) Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

5) 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. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.

6) 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, July 29-30, 2012.

7) Kurahashi H, Doh-ura K. Applicational research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnq1 Δ 100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

8) 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, July 29-30, 2012.

9) Sakai E, Doh-ura K. Glycerol enhances the protease-resistance prion protein production in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

10) Doh-ura K. Drug discovery for prion diseases: dream and reality. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

11) Sakai E, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Glycerol enhances the PrPres production via a PI3K signaling pathway in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

12) Kurahashi H, Oishi K, Arai C, Ishiwata M, Chan-Gi Pack, Sako Y, Doh-ura K, Nakamura Y. Mechanisms of anti-prion factors in yeast. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

13) 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, 10.23, 2011.

14) 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, 11.4-5, 2011.

15) 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, 5.25, 2012.

16) 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, 12.2, 2012.

17) 逆瀬川裕二, 西澤桂子, 堂浦克美. プリオン複製に関わる宿主因子の細胞生物学的および生化学的な探索アプローチ. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9.11-13, 2013.

G. 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

酵母プリオンの感染・伝播に関する研究

研究分担者：鈴木元治郎 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター
研究分担者：大橋祐美子 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター
研究協力者：田中元雅 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター

研究要旨 プリオン病およびタンパク質凝集関連疾患においてその感染性・伝播や毒性を決める要素として、病因となるタンパク質凝集体の性質と感染されるホストの性質の二点が考えられる。そこで、本研究では酵母プリオンの系を利用してタンパク質凝集体形成の分子メカニズムの解明と、タンパク質凝集体の細胞間の伝播に関わるホスト細胞の因子の二点に着目した。まず、酵母プリオン Sup35 をモデルタンパク質として利用して S17R 一塩基置換変異体が誘導する凝集体多形形成メカニズムの解明を目指した。凝集体形成前のモノマーやオリゴマーの状態での揺らぎや部分構造に着目した核磁気共鳴法解析を行ったところ、凝集体のコアとなりうる領域内に特殊な揺らぎをもち、凝集体形成の開始点となりうる領域が二点あることを発見した。さらに常磁性緩和促進法を用い、Sup35 の部分構造を調べたところ、N 末領域の一部に、二次構造を持たないが比較的コンパクトな領域があることを発見した。また、Sup35 が凝集することによって引き起こされる酵母プリオン [PSI⁺] の系を利用して、プリオンタンパク質の凝集体を母細胞に引き留めることによって、娘細胞を新鮮に保つと共に、母細胞において凝集体をすみやかに除去する機構が存在することを明らかにしつつある。このように、プリオン病などの原因となるタンパク質凝集体の構造がどのような過程で決定されるかと、感染したタンパク質凝集体がどのようにして細胞間を伝播するかという二つの方向からプリオンという現象の謎に迫ることで、プリオン病の予防や治療の基盤となる知見が得られることを目指した。

A. 研究目的

プリオン病および他のタンパク質凝集関連疾患において、凝集体の構造はその感染性や病態を決める重要なファクターである。本研究では、一つのタンパク質から構造の異なる凝集体が形成されるメカニズムを解明する。一方、細胞にはタンパク質の凝集体が形成されることを防ぐ機構や、形成された凝集体から細胞を守る機構が存在すると考えられ、そのような機構を明らかにすることは疾患の予防や治療に有用である。そこで細胞で形成された凝集体を細胞が適切に除去するか、どのようにして細胞間を伝播することを細胞が防いでいるか、を明らかにすることによってタンパク質凝集体に対するホスト細胞の機構を明らかにする。以上のように異なる方向からのアプローチによってタンパク質凝集体による疾病の病因、感染、伝播に関する基本的な知見を得ることを目的と

する。

B. 研究方法

本研究では出芽酵母のプリオンである [PSI⁺] とその原因タンパク質である Sup35 タンパク質を主に使用する。凝集体の構造多形解析では様々な条件下で形成した Sup35 のアミロイド凝集体の構造をプロテアーゼ処理および質量分析などによって解析する。また、それぞれの条件下における Sup35 のモノマーやオリゴマーの構造を核磁気共鳴装置の様々な手法で解析する。また、出芽酵母において酵母プリオンの凝集体と結合するタンパク質を網羅的に調べ、凝集体と結合するタンパク質として Mlp タンパク質を同定した。Mlp タンパク質がプリオンタンパク質などの凝集体と結合するか、また Mlp タンパク質の機能を失った変異株を作成し、その表現型を解析することによって、ホスト細胞に

おける Mlp タンパク質がプリオン凝集体の細胞間の伝播に果たす役割を明らかにし、プリオンの伝播・感染機構の解明を目指した。

(倫理面への配慮)

酵母もしくは酵母由来の精製タンパク質を用いた研究であり、倫理面の問題はない。遺伝子組み換え実験等は理化学研究所の指示に従い適切に行った。

C. 研究結果

野生型およびS17R一塩基置換変異体Sup35を用いてアミロイド凝集体を形成し、その凝集体をプロテアーゼによって消化し、プロテアーゼによって消化されなかった残基を質量分析によって同定し、凝集体のコア領域を同定したところ、野生型と変異型では異なるコア領域を持つことが明らかになった。CLEANEX-PM測定によってアミド水素の交換速度を測定したところ、特殊な揺らぎを持つ領域をこれらのコア領域となりうる領域に発見した。飽和移動差-NMR測定によってこれらの領域では分子間相互作用が存在することを確認した。これらの領域にに変異を導入することで凝集体のコア領域が変化することが確認され、これらの領域が凝集体の開始点であることが示唆された。NMR常磁性緩和促進法を用いて部分構造を解析したところ、Sup35のN末端領域の一部に二次構造を持たないが比較的コンパクトな領域があることを発見した。

また、出芽酵母において酵母プリオンであるSup35、Rnq1、New1の凝集体と結合するタンパク質を網羅的に調べたところ、核膜孔複合体を構成するMlp1とMlp2が同定された。出芽酵母においてタンパク質凝集体は、核の近傍に局在することが知られており、またそのような凝集体は出芽酵母における不均等細胞分裂の際に、主に母細胞に留まることが知られている。そこで、Mlpタンパク質がプリオンタンパク質などのタンパク質凝集体の分配に必要であるかを調べたところ、野生型酵母ではタンパク質凝集体は主に母細胞に局在するが、mlp1mlp2二重変異株においては母細胞への局在が失われることを見出した。また、Mlpタンパク質とタンパク質凝集体のマーカーとなるHsp104が共局在

することもわかった。次に酵母プリオンである[PSI+]の系を利用して、プリオン化の原因となるSup35タンパク質凝集体の娘細胞への流れ込みを解析したところ、mlp1mlp2二重変異株ではSup35凝集体の流れ込みが起りやすくなっていることがわかった。さらにmlp1mlp2二重変異株の細胞寿命を調べたところ、野生型と比べて寿命が低下していること、またHsp104の過剰発現によって、その寿命の低下が回復することがわかった。

D. 考察

一つのタンパク質分子内に凝集体の形成開始点が二つ以上存在し、どの開始点を選択するかによって凝集体の構造が決定されると考えられる。これは病因となるアミロイド凝集体がどのようにして毒性の強い構造をとるようになるかを理解するうえで重要なモデルとなる可能性がある。凝集体の形成の際にどの開始点を選択されるかは分子の状態、周辺的环境に依存して一番有利な開始点を選択されると考えられる。

また、核膜孔複合体の構成因子であるMlpタンパク質がタンパク質凝集体と結合している可能性が示されたが、Mlpタンパク質はNuclear Basketと呼ばれ、核膜孔の核側に存在している。このことから、凝集体などのダメージを受けたタンパク質が核内へと輸送されている可能性が考えられる。酵母では核内でプロテアソームの活性が高いことがわかっており、プリオン凝集体などがユビキチン化された後、核内へと輸送されプロテアソームによって分解されている可能性が高いと考えられる。mlp1mlp2二重変異株の解析から、mlp1mlp2二重変異株ではプリオンタンパク質などのタンパク質凝集体を母細胞に留めることができず娘細胞へ流れ込みやすくなり、その結果、細胞寿命が低下すると考えられる。以上より、Mlpタンパク質はタンパク質凝集体を母細胞の核膜孔内部に保持するためのアンカーとなっていると考えられる。核膜孔複合体は非常に安定なタンパク質であり、母細胞と娘細胞に不均等に分配すると考えられている。そのため、プリオンタンパク質凝集体がMlpタンパク質によって母細胞の核内部に集積されることによって、プリオンタンパ

ク質などの凝集したタンパク質の娘細胞への流入を阻害していると考えられる。

E. 結論

本研究では、凝集体形成の際に構造多形をもたらすタンパク質分子の揺らぎ、分子間相互作用、凝集開始点の配列特性、部分構造を明らかにした。アミロイド凝集体形成は共通した機構をもつことが多くあり、本研究で明らかになったこれらの機構は病因となるタンパク質の凝集体形成への応用が期待される。凝集体形成開始点が周辺環境などによって変化し、その結果形成される凝集体の構造が変化することが明らかになったことから、低分子化合物などの投与により、凝集体開始点を変化させることによって人為的に毒性の少ない凝集構造を誘導することも可能になると期待できる。

また本研究において、酵母プリオンタンパク質凝集体がどのように不均等に分配されるかについても興味深い知見が得られた。さらに詳細な解析を行うことにより、酵母プリオンタンパク質の伝播機構について明らかにすることで、宿主細胞内でタンパク質凝集体がどのようにして無毒化されるかについての知見が得られると考えられる。また、哺乳類においても、プリオンタンパク質などのタンパク質凝集体の伝播や分解機構にMlpタンパク質が関わっているか検討することで、タンパク質凝集体の細胞間伝播のメカニズムが明らかになる可能性がある。

以上のように、タンパク質凝集体の構造多形の形成メカニズムと細胞によるタンパク質凝集体の伝播阻害のメカニズムが明らかになりつつある。これらの結果はプリオン病などの深刻な疾病の予防や治療に将来役に立つものと考えている

[参考文献]

1) Ohhashi Y, Ito K, Toyama BH, Weissman JS, Tanaka M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat Chem Biol* 3:225-230, 2010.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Foo CK, Ohhashi Y, Kelly MJ, Tanaka M, Weissman JS. Radically different amyloid conformations dictate the seeding specificity of a chimeric Sup35 Prion. *J Mol Biol* 408:1-8, 2011.
- 2) Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science* 336:355-359, 2012.
- 3) Suzuki G, Tanaka M. Active prion conversion as a molecular switch for cellular adaptation to environmental stress. *Bioessays* 35:12-16, 2013.
- 4) Suzuki G, Tanaka M. Expanding the yeast prion world: Active prion conversion of non-glutamine/asparagine-rich Mod5 for cell survival. *Prion* 7:109-113, 2013.
- 5) 鈴木元治郎, 田中元雅. 新規な酵母プリオンタンパク質 Mod5 の凝集が生存に有利に働くことを発見. *化学と生物* 51: 228-233, 2013

2. 学会発表

- 1) Ohhashi Y, Tanaka M. Structural basis of the diversity of protein strain conformations. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 2) Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. Conformational switch of a novel non-Gln/Asn rich yeast prion protein, Mod5, controls the resistance of anti-fungal agents through regulation of ergosterol biosynthesis. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 3) Ohhashi Y, Tanaka M. Role of protein fluctuation in determination of amyloid conformation. The International symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, Yokohama, November 15-18, 2011.
- 4) Ohhashi Y. Protein fluctuation in monomer determines prion strain conformations. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 5) Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30,

2012.

6) Suzuki G, Tanaka M. The mechanism of asymmetric distribution of prion protein in the yeast cell. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July21-22, 2013.

7) 大橋祐美子、田中元雅. アミロイド構造の決定におけるタンパク質揺らぎの役割の解析. 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋, 9.22-24, 2012.

8) 鈴木元治郎, 田中元雅. 酵母における老化タンパク質凝集体の不均等分配のメカニズム. 日本細胞生物学会年会, 名古屋, 6.19-21, 2013.

9) 大橋祐美子, 山口芳樹, 鎌足雄司, 花島慎弥, 桑田一夫, 田中元雅. 酵母プリオン Sup35 を用

いたアミロイド構造多形形成メカニズムの解明. 第13回日本蛋白質科学会年会, 鳥取, 6.12-14, 2013.

G. 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

プリオン立体構造変換原理の解明とその制御

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
研究協力者：鎌足雄司 岐阜大学生命科学総合研究支援センター機器分析分野
研究協力者：山口圭一 岐阜大学岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
研究協力者：福岡万佑子 岐阜大学岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨 プリオン蛋白質における線維状凝集体形成反応においては、溶媒環境や超音波照射パワーにより、様々の構造が生成された。また、これら複数の異なる線維構造間では、構造障壁の異なる構造間で、種々の転移が起きることが、実験的に証明された。抗プリオン薬の実用化にあたっては、異常型プリオン立体構造の詳細に依存しない性質のものが推奨される。メディカルシャペロンは、正常型プリオン蛋白質に結合し、正常型を安定化するため、株に関係なく有効である。今後、抗プリオン物質の開発は、メディカルシャペロンを中心に展開することになる、と考えられる。

A. 研究目的

プリオンにおける鋳型依存性複製過程を様々な手法で観測し、その情報に基づいて、これを制御するための新規メディカルシャペロンを設計するとともに、その作用機序を解明する。

B. 研究方法

プリオンの鋳型依存性複製過程が、超音波存在下で加速されることが分かっているが、超音波パワーを定量的に測定できていないため、これを可能にする。また、プリオン凝集体構造の超音波照射を含む溶媒環境依存性を解析するため、新たに凝集体専用のストップト・フロー装置を開発する。同時にNMR、FT-IR及びCDを用いて、これらの構造変化を解析する。さらに、我々が既に見出している、抗プリオン物質であるメディカルシャペロンの作用機序を解明する。

（倫理面への配慮）

本研究は、プリオン蛋白質を用いた物理化学実験であるため、特に倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

照射する超音波のパワーを定量的に決定す

ることが可能となった。また、鋳型生成のラグタイムが、超音波のパワーに対してほぼ直線的に縮小することが分かった。生成された線維状凝集体は、照射強度により様々な形状のものが形成されたが、異常型プリオンの増幅に最適なパワーを定量的に設定することが可能となった。

また、種々の異なる形状を有する線維状凝集体間の構造転移を調べるため、プリオン蛋白質のH2ペプチドのアミロイド線維を用いてpHジャンプ実験を行った。その結果、CDとFT-IRスペクトル測定によりpH 2.9で作製した線維(pH 2.9 fibrils)をpH 7.5にジャンプさせると、分子間のβシートとターン構造が大きく変化すること(pH 7.5-like fibrils)が分かった。しかし、pH 7.5-like fibrilsはpH 7.5で作製した線維(pH 7.5 fibrils)とは構造が異なっていた。よって、pHジャンプ後も線維構造は部分的に保持されていると考えられる。次に、pHを7.5→2.9に戻すと、pH 7.5-like fibrilsは再びpH 2.9 fibrilsに戻った。このようにH2線維構造は分子間の水素結合による制限によって、ほぼ可逆的に変化すると考えられる。しかしながらpH 7.5で作成した線維に完全に変換することは、観測時間の範囲内ではなかった(不可逆)。従って、pH 7.5-like fibrilsとpH 7.5 fibrilsとの間には、大きな障壁があると考えられる。

さらに、これまでに公開されている抗プリオン物質と我々が開発したメディカルシャペロンにおける働きの違いを明らかにした。これまでに公開された抗プリオン物質は、いずれも作用機序が曖昧であり、特定のプリオンには効果があったが、調べた限りでは、福岡1株にはいずれも無効であった。異常型プリオンには、形状の異なる様々な株が存在するため、一種類の薬剤で全てに対応することは困難である、と考えられる。一方、我々が見出したメディカルシャペロンは、正常型プリオン蛋白質に結合し、正常型を安定化するため、株に関係なく有効である。今後、抗プリオン物質の開発は、メディカルシャペロンを中心に展開することになる、と考えられる。

D. 考察

鋳型依存性複製過程により形成された線維性凝集体の形態は、超音波のパワーや pH などの溶媒環境に大きく依存する。プリオンが形成する凝集体の立体構造は、このように溶媒環境に大きく依存するため、これが異常型 (PrP^{Sc}) の多様性 (株) の原因となる、と考えられる。このようにプリオン感染において、株は保存されるが、これは鋳型依存性複製過程において、株に特異的な凝集体構造間に、上に述べたような大きな遷移障壁が形成されるためであろうと考えられる。一方、遷移障壁の低い構造間では容易に構造変化が可能である。これらは、継代に伴う同種株内部での性状変化に相当する、と考えられる。異常型 (PrP^{Sc}) の多様性 (株) を考えると、一種類の異常型 (株) に特異的に結合する低分子化合物は、他の株に変化すれば、効果がなくなる恐れもあり、治療薬開発に当たっては、メディカルシャペロンのような、PrP^C の安定化などのメカニズムを考慮する必要がある。

E. 結論

プリオンにおける線維状凝集体は、溶媒環境や超音波照射パワーにより、様々な構造が生成され、複数の異なる線維構造間で、構造転移を起こすことが分かった。抗プリオン薬の実用化にあたっては、異常型プリオン立体構造の詳細に依存しない性質のものが推奨される。メディカルシャペロンは、正常型プリオン蛋白質に結

合し、正常型を安定化するため、株に関係なく有効である。今後、抗プリオン物質の開発は、メディカルシャペロンを中心に展開することになる、と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura T, Hosokawa-Muto J, Asami K, Murai T, Kuwata K. Synthesis of 9-substituted 2,3,4,9- tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *Eur J Med Chem* 46:5675-5679, 2011.
- 2) Sanghera N, Correia BE, Correia JR, Ludwig C, Agarwal S, Nakamura HK, Kuwata K, Samain E, Gill AC, Bonev BB, Pinheiro TJ. Deciphering the Molecular Details for the Binding of the Prion Protein to Main Ganglioside GM1 of Neuronal Membranes. *Chem Biol* 18:1422-31, 2011.
- 3) Yamaguchi K, Matsumoto T, Kuwata K. Proper calibration of ultrasonic power enabled the quantitative analysis of the ultrasonication-induced amyloid formation process. *Protein Sci* 21:38-49, 2012.
- 4) Hosokawa-Muto J, Kimura T, Kuwata K. Respiratory and cardiovascular toxicity studies of a novel anti-prion compound, GN8, in rats and dogs. *Drug Chem Toxicol* 35:264-71, 2012.
- 5) Ishikawa T, Kuwata K. RI-MP2 gradient calculation of large molecules using the fragment molecular orbital method. *J Phys Chem Lett* 3:375-379, 2012.
- 6) Mashima T, Nishikawa F, Kamatari Y, Fujiwara H, Saimura M, Nagata T, Kodaki T, Nishiwaka S, Kuwata K, Katahira M. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Research* 41:1355-62, 2013.
- 7) Okamoto T, Ishikawa T, Koyano Y, Yamamoto N, Kuwata K, Nagaoka M. A minimal implementation of the AMBER-PAICS interface for Ab initio FMO-QM/MM-MD simulation. *Bull Chemi Soc Jpn* 86:210-222, 2013.
- 8) Kamatari Y, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterizing antiprion compounds based on their binding

properties to prion proteins: Implications as medical chaperones. *Protein Science* 22:22-34, 2013.

9) Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. *Autophagy* 9:1386-94, 2013.

10) Kimura T, Sako T, Siqin, Hosokawa-Muto J, Cui YL, Wada Y, Kataoka Y, Doi H, Sakaguchi S, Suzuki M, Watanabe Y, Kuwata K. Synthesis of an ¹¹C-Labeled Antiprion GN8 Derivative and Evaluation of Its Brain Uptake by Positron Emission Tomography. *Chem Med Chem* 8:1035-1039, 2013.

11) Endo S, Dawei HU, Suyama M, Matsunaga T, Sugimoto K, Matsuya Y, El-Kabbani O, Kuwata K, Hara A, Kitade Y, Toyooka N. Synthesis and structure-activity relationship of 2-phenyliminochromene derivatives as inhibitors for AKR1B10. *Bioorg Med Chem* 21:6378-6384, 2013.

12) Yamaguchi K, Kamatari YO, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly Reversible Conformational Change of Amyloid Fibrils as Revealed by pH-Jump Experiments. *Biochemistry* 52: 6797-6806, 2013.

13) Kazuo K. Logical Design of Medical Chaperone for Prion Diseases. *Current topics in medicinal chemistry* 13: 2432-40, 2013.

14) 石川岳志, 石倉孝一, 桑田一夫. フラグメント分子軌道法プログラム「PAICS」と統合創薬プログラム「NAGARA」. *Mol Sci* 5:NP0015, 2011.

15) 桑田一夫. 量子ロボット. *生物物理* 51:205, 2011.

16) 桑田一夫. 量子創薬—論理的形態制御学の原理—(Non-commutative Geometrical Drug Discovery—The Principle of Geometrical Regulation—). *Yakugaku Zasshi* 132:873-879, 2012.

2. 学会発表

1) Kuwata K. Regulating the prion conformation

by logical drug design. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

2) 山口圭一, 松本友治, 桑田一夫. マウスプリオン蛋白質のアミロイド線維形成を促進する超音波パワーの定量. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

3) Motoyoshi S, Ishikawa T, Yamagishi K, Kuwata K, Tokiwa H. All-electronic calculations(AEC)-docking procedure based on the FMO-ONIOM method. Ninth Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists 2011, Santiago de Compostela, July 17-22, 2011.

4) Kamatari YO, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterization of anti-prion compounds according to the binding properties to the prion protein. The 26th Annual Symposium, San Diego, August 5-8, 2012.

5) Kuwata K. Medical chaperone - A novel strategy for the logical drug design. Drug Discovery & Therapy World Congress 2013, Boston, June 2-8, 2013.

6) Fukuoka M. Structure-based drug discovery of anti-influenza virus compounds among medicines. Drug Discovery & Therapy World Congress 2013, Boston, June 2-8, 2013.

7) Kuwata K. Logical design of a medical chaperone for prion diseases. 韓国蛋白質学会, Daejeon, June 17-19, 2013.

8) Kuwata K. Medical chaperone- a novel strategy for the logical drug design for prion diseases. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

9) Yamaguchi K, Kamatari YO, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly reversible conformational change of H2 amyloid fibrils as revealed by pH-jump experiments. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 7.21-22, 2013.

10) 桑田一夫. バイオ分子間相互作用形態の階層的桑田一夫. プリオン分子内におけるポリ A とポリ T の稀な出会い. 新学術領域「天然変性蛋白質」第2回領域会議, 宮崎, 6.29-7.1, 2011.

11) 桑田一夫. モデリングに関する総合討論. バイオ分子間相互作用形態の階層的モデリン

グの研究打ち合わせ, 東京, 7.27, 2011.

12) 桑田一夫. 立体構造進化と論理的創薬を担う岐阜大 NMR 拠点. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端的 NMR 拠点から生まれる新たな潮流: 最新成果, 役割, 利用」, 大阪, 7.28-29, 2011.

13) 桑田一夫. Prion dynamics and logical drug design. Israel-Japan Joint Symposium on Biophysics “Protein Dynamics: From single molecules to whole cell”, 兵庫, 9.16, 2011.

14) 岡本拓也, 小谷野哲之, 石川岳志, 桑田一夫, 長岡正隆. FMO-QM/MM 分子動力学シミュレーションに向けた AMBER-PAICS インターフェイスの開発. 第 5 回分子科学討論会, 札幌, 9.20-23, 2011.

15) 桑田一夫. プリオン蛋白質のコンホメーションスイッチ. 第 4 回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会, 熊取, 11.10, 2011.

16) 桑田一夫. X線回折・NMR 融合アミロイド線維イメージング. X-FEL 第 1 回会合, 佐用, 9.18-19, 2012.

17) 山口圭一, 鎌足雄司, 福岡万佑子, 宮地礼司, 桑田一夫. ダブル pH ジャンプによるアミロイド線維のほぼ可逆的な構造変化の解析. 日本生物物理学会, 名古屋, 9.22-24, 2012.

18) 桑田一夫. Relaxation Matrix and Prion. 蛋白質研セミナー International Workshop on Pharmaceutical NMR-Nucleic Acids and Prion Protein, 大阪, 10.30, 2012.

19) 山口圭一, 桑田一夫. Estimation of ultrasonic power to induce the amyloid fibril formation of prion protein. 蛋白質研セミナー「『蛋白質と過飽和』~Impacts of Supersaturation on Protein Science~」, 大阪, 6.18-19, 2012.

20) 山口圭一, 桑田一夫. プリオン蛋白質のアミロイド線維形成を促進する超音波パワーの評価. 第 5 回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会, 京都, 11.1, 2012.

21) 山口圭一, 鎌足雄司, 福岡万佑子, 宮地礼司, 桑田一夫. ダブル pH ジャンプによる H2 アミロイド線維のほぼ可逆的な構造変化. 第 13 回蛋白質科学会年会, 鳥取, 6.12-14, 2013.

22) 桑田一夫. Application アミロイド 2. X-FEL 第 2 回会合, 和光, 8.8-9, 2013.

G. 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

プリオン病診断における H-FABP 検出の有用性について

研究分担者：松田治男 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学
研究分担者：堀内浩幸 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学
研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子解析学
研究分担者：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子解析学

研究要旨 プリオン病の髄液検査において、14-3-3 やタウタンパク質の測定は標準化されている。一方、心臓型脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)は、データの蓄積に伴ってその重要性が明らかになりつつある。本研究グループでは、市販品の H-FABP 検出キットをはるかに超える高感度 H-FABP 検出系を構築し、この検出系を用いることで 14-3-3 やタウタンパク質に加えて、プリオン病の髄液検査に H-FABP の検出を行い、14-3-3 やタウタンパク質陰性の CJD 患者でも H-FABP 陽性となることを見いだした。さらにこれらの患者は、全て Val150Ile(V180I)の遺伝子変異をもつことがわかった。髄液中の H-FABP 濃度と CJD 病状経過との関係では、H-FABP 濃度の変動がタウタンパク質の濃度変動と近似であり、いずれも無道無言の前に高値を示す傾向が認められた。CJD 患者における血清 H-FABP 濃度の変動を調査する目的で各種認知症疾患の血清 H-FABP 濃度を測定し比較したところ、健常人に比べ CJD 患者は約 3 倍の高値を示したが、レビー小体型認知症(DLB)と認知症を伴うパーキンソン病(PDD)では約 6 倍の異常高値を検出した。またこの測定値は、¹²³I-MIBG 心筋シンチ検査結果と良く相関していることがわかった。

A. 研究目的

H-FABP の高感度検出系を構築し、プリオン病診断における H-FABP 検出の有用性を明らかにすることを目的に研究を行い、14-3-3 やタウタンパク質の測定系と同様、プリオン病診断における H-FABP 測定の標準化を目指す。

B. 研究方法

1. H-FABP 検出系

H-FABP の検出系には、本研究で構築した H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体(3E9)をキャプチャー抗体に、HRP 標識ニワトリモノクローナル抗体(HUFa26)を検出抗体としたサンドイッチ ELISA を用いた。さらに検出系の高度化を目的に、HRP の発色系を OPD 系と TMB 系で比較検討した。

2. 髄液バイオマーカーの測定

CJD 患者髄液 46 検体について、1 で構築した高感度 H-FABP 検出系で髄液中の H-FABP 濃度を検出し、14-3-3 とタウタンパク質の測定値(標

準化法)と比較検討した。また CJD の症状経過に伴う髄液 H-FABP 濃度を測定し、タウタンパク質濃度変動と比較検討した。

3. 各種脳疾患患者における血清 H-FABP

各種認知症疾患における血清 H-FABP 濃度の検出では、sCJD 9 例と健常人 6 例を含む PDD(認知症を伴うパーキンソン病)/DLB 8 例、LCCA(脊髄小脳変性症)2 例、AD(アルツハイマー病)4 例、CBD(大脳皮質基底核変性症)の患者 2 例の計 33 例について血清 H-FABP 濃度を測定した。

4. PDD/DLB における ¹²³I-MIBG 心筋シンチと血清 H-FABP 濃度の比較

PDD/DLB において実施された ¹²³I-MIBG 心筋シンチのデータと測定した血清 H-FABP 濃度を Yahr 分類、発症から期間、¹²³I-MIBG の初期像と後期像で相関比較を行なった。

(倫理面への配慮)

ヒトプリオン病他の脳脊髄液並びに血清を用いたバイオマーカー測定は、研究協力が所属する長崎大学で実施し、実験に当たっては、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

C. 研究結果

1. 高感度 H-FABP 検出系の構築

H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体 (3E9) をキャプチャー抗体とし、3 種の組換えニワトリモノクローナル抗体を用いて、検出系の比較検討を行い最も検出感度が高く、また安定生産が可能な HuFa26 抗体を選抜した。また、発色系を OPD の系から TMB の系へ変更することで、より高感度で相関係数も高く、かつ検出時間を短縮することが可能となった(図 1)。

2. 髄液バイオマーカーとの比較検討

46 例の CJD 患者の髄液におけるタウ、14-3-3 タンパク質並びに H-FABP 濃度を検出したところ、26 例が全て陽性、5 例が 14-3-3 と H-FABP 陽性、9 例が H-FABP のみ陽性、2 例が 14-3-3 のみ陽性、4 例が全て陰性であり、CJD 患者の髄液検査における H-FABP 検出の有用性が明らかとなった(図 2)。また、H-FABP のみ陽性の 9 例はいずれも V180I の遺伝子変異を持つという興味深い結果を得た。髄液中の H-FABP 濃度と CJD 病状経過との関係では、H-FABP 濃度の変動がタウタンパク質の濃度変動と近似であり、いずれも無道無言の前に高値を示す傾向が認められた。

3. 各種脳疾患患者における血清 H-FABP

各種認知症疾患における血清 H-FABP 濃度を測定し、その平均値で比較した(図 3)。その結果、sCJD 患者の平均 H-FABP 濃度は、健常人の平均値の約 3 倍の高値を示した。一方 PDD/DLB では、約 6 倍という極めて高い値を示した。

4. PDD/DLB における ¹²³I-MIBG 心筋シンチと

血清 H-FABP 濃度の比較

¹²³I-MIBG の結果と血清 H-FABP 濃度の比較では、¹²³I-MIBG の初期像と後期像の値と血清 H-FABP 濃度間で高い相関が認められた(図 4)。

D. 考察

本研究において、プリオン病における H-FABP の髄液検査における有用性が示されたが、なぜプリオン病になると髄液中に H-FABP が高濃度に検出されるのかは明らかになっていない。また、今後 H-FABP をプリオン病診断に活用していくには、CJD のタイプ別の H-FABP 濃度動態の特徴、検出感度と特異度を明らかにする必要があるものと考えられる。

PDD/DLB と血清 H-FABP 濃度の関係は、非常に興味深いですが、今後の展開は別途考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究で構築した高感度 H-FABP 検出系は、髄液を用いたプリオン病診断において有用であることがわかった。

[参考文献]

- 1) Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23:372-381, 2007.
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewczuk P, Poser S, Kretzschmar HA, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neuro- degenerative diseases. *Neurosci Lett* 370: 36-39, 2004.
- 3) Wada-Isobe K, Imamura K, Kitamaya M, Kowa H, Nakashima K. Serum heart-fatty acid binding protein levels inpatients with Lewy body disease. *J Neurol Sci* 266: 20-24, 2008.
- 4) Mollenhauer B, Steinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, Locascio JJ, Wiltfang J, Kretzschmar H A, Poser S, Trenkwalder C, Otto M. Serum heart-type fatty acid-binding protein and cerebrospinal fluid tau: marker candidates for dementia with Lewy bodies. *Neurodegenerative Dis* 4: 366-375, 2007.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

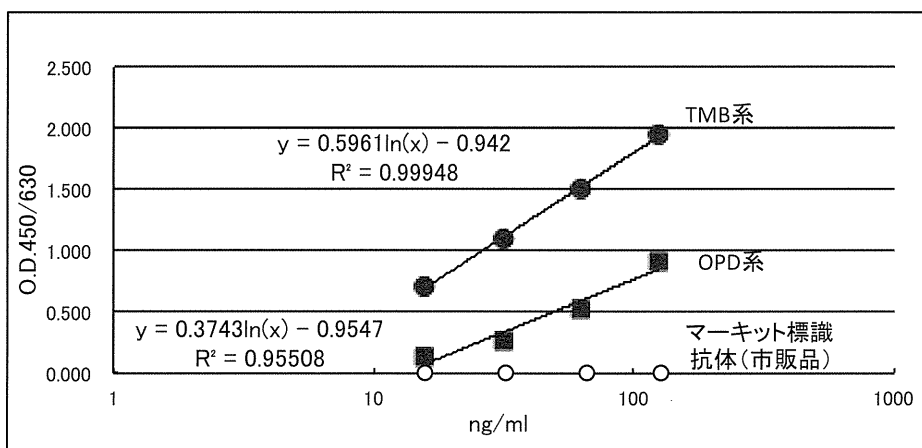


図1 H-FABP検出における発色系の比較

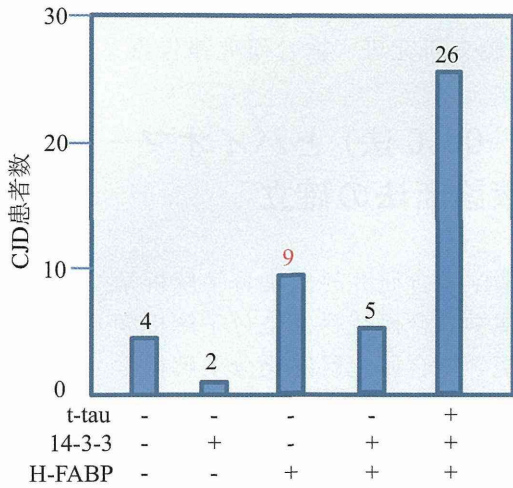


図2. CJD患者髄液46検体の3種マーカー検出と特徴

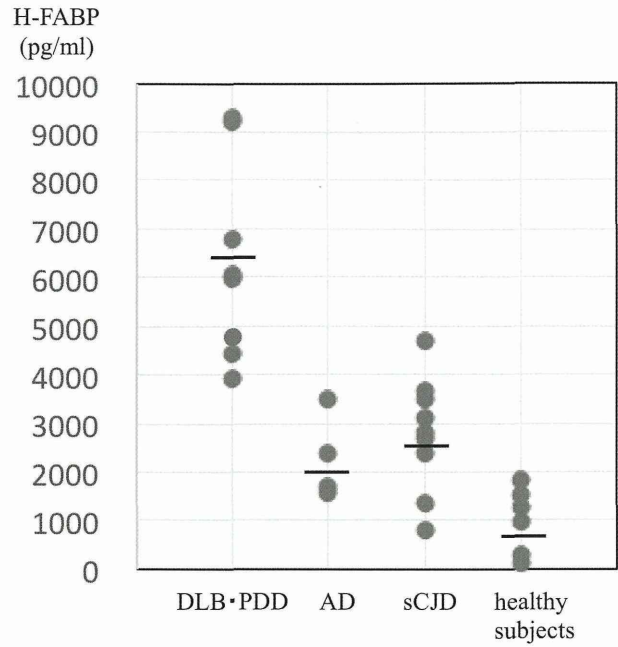


図3 各認知症患者の血清中のH-FABP濃度

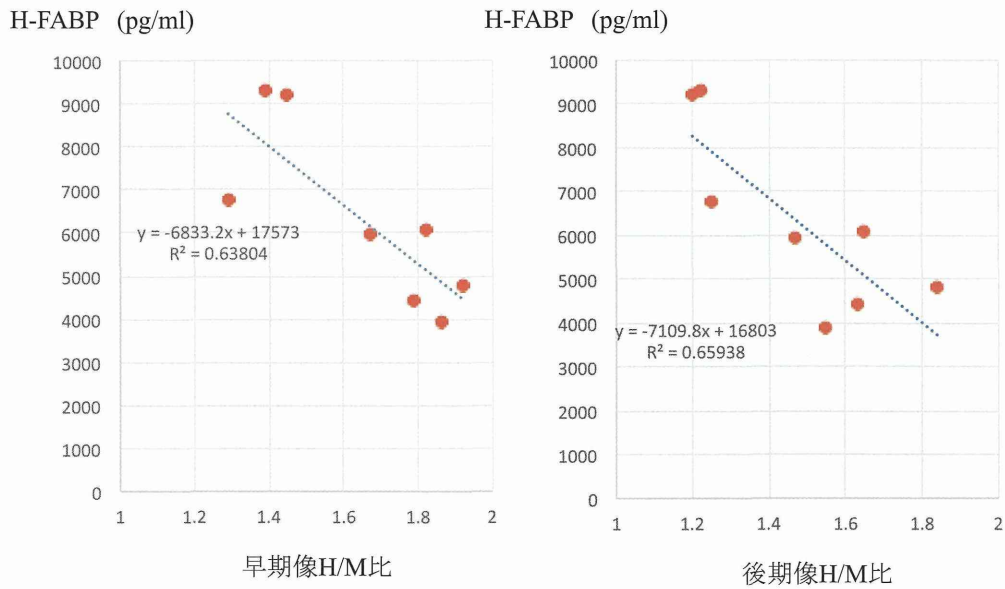


図3 H-FABPと¹²³I-MIBGとの関係

異常型プリオンタンパク試験管内増幅法（RT-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：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学
研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学
研究協力者：新竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学

研究要旨 近年正常 PrP を反応基質として、試験管内で微量の異常型 PrP を検出が容易なレベルまで増幅することが可能なことが報告され、それを用いた新たな診断法の開発が検討されてきた。我々は QUIC 法という、ヒトプリオン病患者に対して非常に感度の高い異常型 PrP 増幅法を、開発することに成功した。また平成 23 年我々は、異常型 PrP 高感度増幅法 (Real-time QUIC 法と命名) を開発し、ヒトプリオン病患者由来脳脊髄液中の異常型 PrP を検出することに成功した。しかしながら多数例の確定例におけるヒト孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討と、RT-QUIC 法による解析は報告されていない。孤発性プリオン病における様々な病型ごとの検討、検査時期による検出率の比較検討など多くの検討課題が残されている。また確定例の孤発性プリオン病における検出感度は、明らかにされていない。今回我々は、新規症例を加えた 109 症例の確定例について、髄液を解析した。14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QUIC 法の感度は、それぞれ 88.9%、85.3%、78.9% であった。

A. 研究目的

近年正常 PrP を反応基質として、試験管内で微量の異常型 PrP の検出が、容易なレベルまで増幅することが可能なことが報告され、それを用いた新たな診断法の開発が検討されてきた。我々は QUIC 法という、ヒトプリオン病患者に対して非常に感度の高い、異常型 PrP 増幅法を開発することに成功した。

我々は新規異常プリオン蛋白検出法 RT-QUIC 法を確立し、ヒトプリオン病の髄液診断への応用を行う。さらに多くの検討課題を明らかにし、髄液検査を確立することが本研究の課題である。

B. 研究方法

①新規異常プリオン蛋白検出法 RT-QUIC 法にて、安定して検出する方法について検討する。

②2006 年-2013 年の 7 年間で日本におけるサーベイランス委員会に登録された症例中、確実例で髄液サンプルがあった症例は 45 症例、一方海外からの検査依頼はドイツ 8 症例、オーストラリア 16 例、韓国 4 例、スペイン 36 症例で

あった。これら 109 症例について、髄液中の 14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QUIC 法による解析を行った。さらに孤発性プリオン病における、様々な病型ごとの検討による解析を行った。

（倫理面への配慮）

研究環境・生命倫理・安全対策に関わる全般を所掌する部門があり、人に関わる研究・動物実験を伴う研究・遺伝子組換え実験を伴う研究のすべてが、機関長への申請の手続きを必要とする。機関長から付託された全学的メンバーで構成される各種実験審査委員会（倫理審査委員会、動物実験委員会、組換え DNA 実験委員会）において、研究内容が審査され、研究環境・生命倫理・安全対策に問題がなく法律規則を順守していることが確認されたのちに、機関長から許可される体制が取られている。研究開始後は、人に関わる研究では毎年、動物実験を伴う研究及び遺伝子組換え実験を伴う研究では各機関が定める時期毎に、研究状況を機関長に報告することになっている。

検査および実験については、医学部共同生物

災害防止実験施設内の BSL2, BSL3 実験室を利用し、病原体の拡散防止には万全を期している。

C. 研究結果

1. RT-QUIC 法は現在、使用するリコンビナント蛋白の品質(クオリティー)により、精度が左右される。そこでリコンビナントのクオリティーコントロールを維持するために、RT-QUIC 法で利用できるリコンビナントの条件を我々独自で作成した。
2. 確実例は 109 症例に達した。
3. 14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QUIC 法の感度は、それぞれ 88.9%、85.3%、78.9%であった(表 1)。
4. MM2-視床型ではバイオマーカーと RT-QUIC 法いずれも陰性であり、髄液診断は困難であると考えられた(表 2)。
5. 2 種類のバイオマーカー・RT-QUIC 法ともに陽性であったのは 72.5%、一方いずれも陰性だったのは 6.4%であった(表 3)。
6. 脳血管障害・橋本脳症を基礎疾患とした症候性けいれん 4 症例が、偽陽性を示した(表 4)。

D. 考察

ヒト孤発性プリオン病に診断において、髄液中のバイオマーカーと異常プリオン蛋白試験管内増幅法(RT-QUIC 法)の測定は、診断上極めて有用である。しかしながら、高齢者の症候性けいれんでは髄液検査のみで判断しないように、注意を喚起しなければいけない。

E. 結論

髄液中のバイオマーカーと異常プリオン蛋白試験管内増幅法(RT-QUIC 法)は、診断において有用であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine* 29:9321-9328, 2011.
- 2) Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, Shirabe S,

Atarashi R, Mutsukura K, Satoh A, Kataoka Y, Nishida N. High sensitivity of an ELISA kit for detection of the gamma-isoform of 14-3-3 proteins: usefulness in laboratory diagnosis of human prion disease. *BMC Neurol* 11:120, 2011.

- 3) Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 5:150-153, 2011.

- 4) Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, Sakaguchi S, Nishida N, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* 179:1301-1309, 2011.

- 5) Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. *Prion* 6:443-446, 2012.

- 6) Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol* 189:1540-1544, 2012.

- 7) Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. *J Virol* 86:4947-4955, 2012.

- 8) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with human IgG1 antibody specific for β -form prion protein. *J Biol Chem* 287:14023-14039, 2012.

- 9) Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal

degradation and prolongs survival in prion-infected mice. *Autophagy* 9:1386-1394, 2013.

10) Kawakatsu M, Urata Y, Imai R, Goto S, Ono Y, Nishida N, Li TS. Nicaraven attenuates radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *PLoS One* 8:e60023, 2013.

11) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 44:720-726, 2013.

12) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. *PLoS One* 8:e54915, 2013.

13) 中根明夫, 光山正雄, 佐藤成大, 江崎孝行, 森田公一, 山田作夫, 西田教行, 外 43 名. プリオンと遅発性ウイルス感染症. 中込 治, 神谷茂・編 標準微生物学 第 11 版, 医学書院, 東京, pp541-544, 2012.

14) 神谷 茂, 山口博之, 平山壽哉, 小熊恵造, 光山正雄, 西園 晃, 西田教行, 外 29 名. 中枢神経系の感染症. 神谷 茂, 河野 茂・編 微生物学 基礎から臨床へのアプローチ, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, pp501-517, 2012.

15) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. プリオン病における脳脊髄液の QUIC 診断. *Clin Neurosci* 30:1202-1204, 2012.

16) 新竜一郎, 西田教行. プリオン病診断法の開発. *最新医学* 67:32-36, 2012.

17) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. 髄液14-3-3 蛋白とタウ蛋白増加の鑑別診断. *Clin Neurosci* 31:850-851, 2013.

18) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. プリオン病の髄液診断の可能性. *最新医学* 68:1950-1957, 2013.

19) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. 髄液検査のポイントと鑑別診断青木 滋. *Clin Neurosci* 31:1080-1082, 2013.

20) 西田教行, 佐藤克也. 急速進行性認知症の

鑑別診断. *長崎市医師会報* 47:17-20, 2013.

21) 佐藤克也, 西田教行. ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:792-797, 2013.

22) 六倉和生, 佐藤克也, 西田教行. 致死性家族性不眠症. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:798-801, 2013.

2. 学会発表

1) Nishida N. Sensitivity and specificity of RT-QuIC. JPND research, Hannover, August 23-25, 2012.

2) Nishida N. Application of the vitro prion amplification method RT-QUIC to the early diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Association of Aging Research, Seoul, November 8-9, 2013.

G. 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

表 1. 14-3-3 蛋白, t-tau 蛋白, RT-QUIC 法の感度・特異度

	14-3-3 蛋白	t-tau 蛋白	RT-QUIC 法
感 度	88.9%	85.3%	78.9%
特異度	80.9%	86.2%	98.7%

表 2. タイプ別のバイオマーカーと RT-QUIC 法による感度の検討

	症例数	14-3-3 蛋白	t-tau 蛋白 (>1,300 pg/ml)	RT-QUIC 法
MM1	57	85.1%	85.1%	75.9%
MV1	2	100%	100%	100%
VV1	2	50%	0%	0%
MM2-cortical form	27	88.9%	88.9%	85.2%
MM2-thalamic form	2	0%	0%	0%
MV2	8	100%	87.5%	75%
VV2	11	100%	100%	100%

表 4. 偽陽性を示した症例

性別	発症年齢	蛋白量 (mg/dl)	14-3-3 蛋白	t-tau 蛋白 (pg/ml)	diagnosis
男性	41	60	-	<40	neurosyphilis
男性	67	34	-	700	epilepsy due to CVA
男性	72	53	+	2,872	epilepsy due to CVA
女性	83	42	+	1,594	epilepsy due to Hashimoto's encephalopathy

表 3. プリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (確実例: 109 症例)

14-3-3 蛋白	t-tau 蛋白	RT-QUIC 法	総数	%
+	+	+	79	72.5
+	-	+	4	3.7
-	+	+	0	0
+	+	-	12	11.0
-	+	-	2	1.8
+	-	-	2	1.8
-	-	+	3	2.8
-	-	-	7	6.4

間葉系幹細胞のプリオン病治療への応用と抗プリオン活性を有する薬剤の新規ハイスループレットスクリーニング系の構築

研究分担者：長谷部理絵 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究分担者：堀内基広 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究協力者：山崎剛士 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究協力者：単 智夫 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究要旨 プリオン病の治療法の確立に資することを目的として、平成 23 および 24 年度は、間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた細胞治療がプリオン病の治療に応用可能かを検討した。マウスの骨髄 (BM)、緻密骨 (CB) および脂肪組織 (AT) より分離した MSCs を、プリオン感染マウスの臨床期初期に脳内に移植した場合、BM 由来 MSCs 移植群では、生存期間が 161.8 ± 9.9 日となり、非移植群と比較して (152.3 ± 6.2 日)、生存期間が有意に延長した。プリオン増殖抑制活性を有する抗 PrP 抗体 mAb44B1 を発現するヒト不死化 MSCs (hMSCs)、あるいは神経保護作用を有する脳由来神経栄養因子 (BDNF) を発現する hMSCs を作製したが、mAb44B1 および BDNF の発現量が低く、治療効果の発揮には発現量の改善が必要と考えられた。平成 25 年度は、抗プリオン活性を有する薬剤の新規スクリーニング系として、プリオン持続感染細胞からタンパク分解酵素処理をせずに異常型プリオンタンパク質を検出可能な Cell ELISA を構築した。

A. 研究目的

プリオン病の治療モデルとして、間葉系幹細胞 (MSCs) の使用を検討する。また、プリオン増殖抑制活性を有する抗プリオンタンパク抗体を発現する MSCs、あるいは神経保護作用を有する脳由来神経栄養因子 (BDNF) を発現する MSCs を作製して、相加効果が発揮されるかを検討する。

プリオン持続感染細胞は、プリオン病治療薬候補のスクリーニングに使用されてきたが、これまで使用されてきた方法はタンパク分解酵素により正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) を除去する必要がある (1, 2)。しかし、この方法では異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) のうち、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} が除去されてしまう。PrP^{Sc} はタンパク分解酵素感受性と抵抗性の画分が存在し、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} に、より高い感染性および PrP^C を構造転換させる活性が付随している。そこで、プリオン持続感染細胞からタンパク分解酵素処理を行わずに、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} をも検出可能な Cell ELISA を構築して、抗プリオ

ン活性を有する薬剤のスクリーニング系として応用する。

B. 研究方法

1. マウス MSCs の分離。

骨髄 (BM) 由来マウス MSCs は大腿骨および下腿骨骨髄から回収した。緻密骨 (CB) 由来マウス MSCs は骨髄を除去した緻密骨の骨片を培養し、細胞を遊離させた。脂肪組織 (AT) 由来マウス MSCs は皮下脂肪組織をコラーゲナーゼ処理し、細胞を回収した。回収した細胞は低酸素条件下 (5%) で培養した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理により剥離し、磁気細胞分離法により、CD11b および CD45 陰性の細胞を回収した。

2. 44B1scFv-hMSCs および BDNF-hMSCs の作製。

抗 PrP 抗体 mAb44B1 の 1 本鎖抗体 (44B1scFv) あるいは BDNF を発現するためのレンチウイルスベクターを 100 MOI でヒト不死化 hMSCs に感染させた。44B1scFv の産生は ELISA により確認した。また BDNF の産生はウエスタンブロットにより確認した。

3. Cell ELISA 系の構築。

プリオン持続感染細胞 (ScN2a3-22L) および悲感染細胞 (N2a3) を 96 ウェルプレートに 1×10^4 /well で播種した。72-96 時間培養後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。細胞を 0.1M glycine-0.1% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間処理した後、5M GdnSCN で 10 分間処理した。続いて細胞を 5% 牛胎児血清を含む PBS でブロッキングした後、一次抗体として mAb132、二次抗体として HRP 標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を用いて抗体反応を行った。TMB を加えて発色反応を行い、硫酸を加えて発色反応を停止した後、プレートリーダーにて吸光度 (OD450 nm) を測定した。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験は、北海道大学動物実験委員会で承認された実験計画書に基づいて実施した (承認番号 09-104, 09-105)。

C. 研究結果

1. マウス MSCs 移植によるプリオン感染マウスの延命効果 (図 1)。

非移植群 (n=7) の生存期間は 152.3 ± 6.2 (平均 \pm 標準偏差) 日、BM 由来 MSCs 移植群 (n=9) では 161.8 ± 9.9 日であり、生存期間が有意に延長した ($p < 0.05$, Logrank 検定)。CB 由来 MSC 移植群 (n=4) の生存期間は 156.5 ± 8.4 日、AT 由来 MSCs 移植群 (n=4) は 154.3 ± 6.4 日であり、非移植群と比較して有意な差は認められなかった。

2. Cell ELISA の構築。

当教室で作製した抗 PrP モノクローナル抗体 mAb132 は、細胞や組織切片を GdnSCN などのカオトロピック試薬により前処理する必要があるが、タンパク分解酵素の処理なしに、PrP^{Sc} を検出可能である (3, 4)。そこで、mAb132 を用いて、プリオン持続感染細胞から、タンパク分解酵素処理を必要としない PrP^{Sc} 検出系の構築を試みた。予想通り mAb132 を用いた場合、GdnSCN の前処理を行ったプリオン持続感染細胞 ScN2a3-22L から PrP^{Sc} の検出が可能であった。

抗プリオン活性を有する薬剤の一次スクリーニングを考えた場合、PrP^{Sc} 検出の際に、同じ

細胞で細胞毒性を評価できることが望ましい。そこで、PrP^{Sc} 検出のために細胞をパラホルムアルデヒドで固定する前に、WST 試験により、細胞の活性を評価するステップを加えることを検討した。WST 試験の結果から、U18666A は $2.5 \mu\text{M}$ 以上の濃度で細胞毒性を示すことが判明したが、WST 試験を実施した場合と実施しなかった場合ともに、 $2.5 \mu\text{M}$ 未満の濃度で、PrP^{Sc} の減少が確認できた (図 2)。従って、PrP^{Sc} 検出工程の前に WST 試験を実施することで、PrP^{Sc} の検出に影響せずに、細胞毒性を評価できることが確認できた。

D. 考察

マウス BM 由来 MSCs は脳内移植により、プリオン感染マウスの生存期間が有意に延長した。フローサイトメトリー解析により、複数の表面抗原が二峰性の発現パターンを示すことから (結果は示さず)、マウス組織より分離した MSCs には複数の細胞集団が存在し、治療効果が希釈されている可能性が考えられた。表面抗原による選択を行い、均一な細胞集団を得ることで治療効果が向上するかもしれない。

Cell ELISA は、タンパク分解酵素処理を必要としないことから、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} も検出可能な点で、従来のスクリーニング系とは異なる。また、細胞を 96 ウェルプレートに播種後、ウェルの移し変えをすることなく、細胞毒性の評価と PrP^{Sc} 量の変化を測定できることから、抗プリオン活性を有する薬剤の簡便なハイスループットスクリーニング系として有用と思われる。

E. 結論

マウス骨髄由来 MSCs をプリオン感染マウスの発病初期に脳内移植した場合、生存期間が延長したことから、骨髄由来 MSCs はプリオン病の細胞治療に応用可能であると考えられた。

タンパク分解酵素処理を用いずに、プリオン持続感染細胞から PrP^{Sc} を検出する、抗プリオン活性を有する薬剤のハイスループット一次スクリーニング系である Cell ELISA を構築した。

[参考文献]

- 1) Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B. New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2,000 drugs and natural products. *J Virol* 77:10288-10294, 2003.
- 2) Ghaemmaghami S, May BCH, Adam R, Renslo AR, Prusiner SB. Discovery of 2-aminothiazoles as potent antiprion compounds. *J Virol* 84:3408-3412, 2010.
- 3) Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol* 93:668-680, 2012.
- 4) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.
- 5) Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol* 189:1540-1544, 2012.
- 6) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.
- 7) Ohsawa N, Song CH, Suzuki A, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol Immunol* 57: 288-297, 2013.
- 8) Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc} during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology* 450-451: 324-335, 2014.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song CH, Honmou O, Furuoka H, Horiuchi M. Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions. *J Virol* 86:11069-11078, 2011.
- 2) Hasebe R, Raymond GJ, Horiuchi M, Caughey B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology* 423:205-213, 2012.
- 3) Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP^{Sc} in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol* 83:3852-3860, 2012.
- 4) Yoshikawa Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Kadohira M, Kai S, Mizusawa H, Nagata C, Onodera T, Sata T, Tsutsui T, Yamada M, Yamamoto S. Alternative BSE risk assessment methodology for beef and beef offal imported into Japan. *J Vet Med Sci* 74:959-968, 2012.
2. 学会発表
- 1) Yamasaki T, Horiuchi M. Chlorpromazine prevents PrP^{Sc} formation by transporting PrP^{Sc} into late endosome/lysosome. Prion 2011. Montreal, May 17-19, 2011.
- 2) Takahashi Y, Song CH, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Immunohistochemical analysis of PrP^{Sc} accumulation and activation of astrocytes and microglia in early stage of prion-infection. Asian Pacific Prion Symposium. Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 3) Hasebe R, Sakai K, Song CH, Horiuchi M. Involvement of CD14 in the early neuropathogenesis of prion disease. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 15, 2011.
- 4) Yamasaki T, Baron GS, Horiuchi M. Detection of newly generated PrP^{Sc} in Neuro2a cells inoculated with fluorescent-dye labeled purified PrP^{Sc}. Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 15, 2011.
- 5) Sassa Y, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. A decreased expression of