

平成25年度 共同利用施設利用研究計画書 ( 新規・継続・変更 )

(枠にこだわらず詳細に記入してください。)

申請者氏名: 桑 田 一 夫

1. 研究分野の別	医科学研究	感染症研究 (BSL2)	<u>感染症研究 (BSL3)</u>
※いずれかに○をつけてください。			
2. 研究概要			
<p>BSE やクロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、致死性の神経変性疾患であるが、治療法は未だ確立していない。独立行政法人医薬基盤研究所・保健医療分野における基礎研究推進事業：プロジェクト ID: 06-4 : 「論理的創薬による蛋白質立体構造制御法の確立とプリオン病治療薬開発への応用」 (平成 18 年度～22 年度) において、我々は、正常プリオンタンパク質に結合し、異常型への変換を抑制する低分子シャペロン、P092 を開発してきた。P092 をプリオン感染マウスに末梢投与 (単回) すると、寿命が延長する。P092 をヒトプリオン病治療薬として実用化するため、現在、厚生労働省の難治性疾患等克服研究事業 (重点研究分野) (平成 24 年度～) において、First in Human に必要な非臨床安全性試験 (GLP) 、及び ADME 試験などをカニクイザルなどを用いて推進しているところである。しかし、プリオン病では、脳血液関門も一部破壊されるため、適切な臨床用量や投与時期を推定するためには、ヒトプリオン病に対応する症状を発現し、脳移行などもヒトに近い、プリオン病のカニクイザルを用いる必要がある。P3 施設においてプリオンに感染したカニクイザルを用いた共同治療実験が可能な施設は、霊長類医科学研究センターのみであるため、申請した。本研究においては、プリオンに感染したカニクイザルに対し、P092 を用いた治療実験を行う。特に、健康なカニクイザルの反復投与試験から推定された用量の P092 を、プリオンに感染したカニクイザルに、異なる病期から経口投与を開始することにより、症状の変化や投与時期によるその違いなどを詳細に観察する。この情報を、ヒトプリオン病に対する、臨床用量や投与時期の推定に役立てる。</p>			
3. 研究組織 (共同利用施設を <u>実際に利用する研究者についてのみ記入</u> してください。)			
研究者名 ※申請者を含む。	所属研究機関・職名	研究分担 (研究課題に対する分担事項を記入) ※ <u>研究者全員</u> について記入してください。	連絡先 (TEL・e-mail)
桑 田 一 夫 福岡 万佑子	岐阜大学・教授 岐阜大学・研究員	P092を用いたプリオン病カニクイザルの治療 異なる群における症状の比較及び解析	058-230-6143・kuwata@gifu-u.ac.jp 058-230-6145・mfukuoka@gifu-u.ac.jp

4. 研究及び実験の目的・方法等 ※変更の場合は、変更箇所にアンダーラインを付して記入してください。

## ①実験の目的

I. 安全な用量の P092 を、プリオンに感染したカニクイザルに経口投与することにより、症状の変化や投与時期による差などを観察し、ヒトのプリオン病に対する臨床用量や投与時期を推定するための根拠のひとつとすることを、主要な目的とする。

II. 現在、プリオンの生理機能は、わかっていない。少なくともマウスのレベルでは、プリオンをノックアウトしても正常である。P092 はプリオンに特異的に結合しその結合ポケットを塞ぐが、プリオンの立体構造にこのような摂動を与えた場合、霊長類の脳機能にどのような変化が生ずるかを、世界で初めて観測する。これにより、プリオンの生理機能の理解に迫る。

III. プリオン病の実態は、未だに謎に包まれている。P092 の投与により、異常プリオンの生成を抑えて、プリオン病のマウスの寿命を延長することはできる。しかし、それを実際にプリオンに感染した霊長類に投与した場合、その臨床症状 (精神症状、神経症状など) にどのような影響を与えるのかは、全くわかっていない。プリオンに感染したカニクイザルの治療実験は世界で初めてであり、これによりプリオン病の本態に迫る。

②実験の内容及び方法 ※動物実験の終了を何によって判断するのか(安楽殺を実施する際の判断点など)、動物実験の期間及び終了予定時期を明記してください。また、研究全体の計画と年次計画との関係、研究分担者の役割、研究実施場所や試料の確保等といった研究を進めるに当たっての状況も踏まえて、記入してください。

実験期間は、平成 25 年 4 月 1 日から、平成 27 年 3 月 31 日までとする。

カニクイザルに感染させるプリオン株は、霊長類医科学研究センターが保有している BSE 感染サル脳乳剤を用いる。6 頭のカニクイザルに塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で、無菌的に、皮膚を切開し、頭蓋骨に直径 2 mm の穿孔部を作製し、片側被殻に 10%BSE 発症サル脳乳剤 200 uL を接種する。接種後 3 日間抗生物質を投与する。

P092 は、岐阜大学の GMP 対応防爆クリーンルームで、決められた製法で製造された規格品を用いる。P092 は、水に懸濁し、経口投与する。現在、健康なカニクイザルに対して反復経口投与試験 (GLP) が実施されており、治療実験開始時には安全域が得られているが、これにより推定される用量を用いる。現在、9 mg/Kg/day (2 週間) でマウスの寿命延長が確認されているが、250 mg/Kg (単回投与) でカニクイザルに下痢症状が見られている。この間の量を、使用する予定である。

プリオンを接種した 6 頭のカニクイザルを 2 頭ずつの 3 群に分ける。

I 群 コントロール群

II 群 P092 早期投与群

III 群 P092 後期投与群

早期投与、及び後期投与の投与時期は、霊長類医科学研究センターでおこなわれた感染実験の症状発現に関する詳細なデータを考慮した上で、決定する。投与方法についても同様とする。

検査項目に関しては、投与・接種前及びその後経時的 (3 ヶ月に 1 回程度) に、塩酸ケタミン麻酔下において、血液、脳脊髄液を採取する。また、行動観察 (ビデオ撮影) などを行い、P092 の投与に伴う振戦、ミオクローヌス、麻痺、などの神経症状の出現時期やその変化などを観察する。最終的な脳組織病理標本検査、及び脳組織のウエストンブロット検査も行い、P092 の効果を検証する計画である。

#### 年次計画：

平成 25 年 カニクイザルに BSE 感染サル脳乳剤を脳内接種する。潜伏期は、1 年以上であるため、平成 25 年度は、主に症状観察し、この間に、GLP で進行中の非臨床安全性試験結果に基づき、P092 の投与量、投与時期などを検討する。

平成 26 年 症状が発現する前後で、P092 の投与を開始する。

平成 27 年 対照群が全麻痺状態になった時点で、全群をペントバルビタールの大量投与により安楽死させ、MRI 撮像、組織病理学的検査を行う。

③サル類を用いる動物実験の必要性 ※サル類はヒトに近縁な動物種といった理由以外のことを記入してください。

動物実験代替法の有・ (どちらかに○をつけ、その理由も以下に記入してください。)

クロイツフェルト・ヤコブ病では、第 1 期には、食欲不振、睡眠障害、体重減少などの精神症状、第 2 期には運動障害やミオクローヌスなどの神経症状が出現し、第 3 期では無動無言状態となる。このような症状は、カニクイザルのプリオン病モデルにおいて類似した経過を辿ることが示されているが、他のげっ歯類では観察できない。

また、非臨床安全性試験をカニクイザルで行っており、その結果に応じて、投与方法を決めることになる。脳血液関門の透過性なども同等である必要がある。従って、本研究には、サル類を用いる必要がある。

#### ④使用頭数の算定根拠

投与量は、別途行っている非臨床安全性試験で大体の目安は決まるが、投与時期について少なくとも 2 点取って、その違いを見る必要がある。クロイツフェルト・ヤコブ病で病院を受診される患者さんは、既に症状が進行している。これに対し、家族性のヤコブ病の家系の方は、未発症であっても発症する危険性があるため、安全性を確認した上で、症状が出る以前、或いはその直後に服用して戴けるように、事前登録しておくことが可能である。このような場合には、P092 の効果がさらに有効であることがマウスの実験から類推されるが、実際に各症状にどのくらい有効なのかを、カニクイザルで調べておく必要がある。従って、全体で III 群が必要であり、各群には、最低 2 頭が必要と考え、6 匹

と算定した。

⑤動物の苦痛を排除する手段

脳内投与など全ての外科的な処置に関しては、麻酔を併用し疼痛を除去する。麻酔薬による安楽死をおこなう。

外科処置時には、ケタラールとキシラジン混合の筋肉内投与、および術後3日間の抗生物質投与を行い、採血時などは、ケタラールの筋肉内投与（塩酸ケタミン 6 mg/kg）を行う。

⑥研究及び実験計画に対する倫理面の配慮並びに法令等の遵守への対応

動物実験は岐阜大学の動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を受けて行う（平成25年1月承認）。

動物愛護および感染伝播予防の観点から十分な配慮をおこなう。適切な麻酔により苦痛を排除した実験を遂行し、適切な外科手法によりサルへの外科的侵襲を最小限に抑える。実験に際しては、法律第105号「動物の愛護および管理に関する法律」、通知「文部科学省、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験の実施に関する基本指針」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」および霊長類医科学研究センター指針「サル類を用いた実験の詳細」等を遵守する。

⑦厚生行政又はヒトの健康の増進や科学的知識の進歩にどのように貢献するのか

クロイツフェルト・ヤコブ病は約100万人に1人の稀少疾患であるが、感染性疾患であり、国民のだれもが罹患する可能性がある。しかし有効な治療法は確立されておらず、発症した場合の致死率は100%である。同病の特効薬が開発されれば、国民の安心安全の確保、医療費の節減につながり、厚生労働行政にとってその意義は非常に大きい。我々が開発したP092は、プリオン病治療薬候補として非臨床試験（GLP）を進めており、本申請はそれを補完するうえで重要な役割を果たす。

また、タンパク質の立体構造異常が原因となる多くの神経変性疾患やアミロイドーシスがあるが、これらの根本原因を取り除くための治療法は確立していない。本開発の成功により、「低分子シャペロン」の論理的設計技術が確立されれば、民間においても同様の治療薬開発が進み、高齢化社会における医療費の抑制につながる。プリオン病の治療薬開発に対しては、製薬企業の協力も得にくく、医師主導治験を行って、実用化する以外に方法がない。しかしその実用化にこぎつければ、同様の難病に苦しむ患者に希望の灯をともしることができる。このような意味で、厚生労働行政の課題に大きく貢献できる。

貴所属機関における動物実験計画書及びその承認書の写しは必ず提出してください。申請時に提出できない場合は、その理由を以下に明記してください。

5. これまでの研究概要・結果及び継続・変更申請する理由 (継続・変更時のみ記入。新規の場合は記入不要。)

6-1. 年度ごとのサル類使用希望(予定)頭数 ※新規申請のみ記入

サルの種類	前年度からの保有頭数 a	平成25年度		平成26年度		平成27年度		全研究期間中に使用する総頭数 = a+b+c+d
		新規使用頭数 b	年度末の保有頭数	新規使用頭数 c	年度末の保有頭数	新規使用頭数 d	年度末の保有頭数	
カニクイザル	0	6	6	0	6	0	6	6
合計	0	6	6	0	6	0	6	6

6-2. 年度ごとのサル類使用希望(予定)頭数 ※変更・継続申請のみ記入

サルの種類	前年度までに		平成24年度末の実際の保有頭数 = a-b	平成25年度		平成26年度		全研究期間中に使用する総頭数 = a+c+d
	承認された総頭数 a	実験を終えた総頭数 b		新規使用頭数 c	年度末の保有頭数	新規使用頭数 d	年度末の保有頭数	
合計								

7. 当該年度のサル類使用希望頭数 6. 新規使用頭数と一致するよう、灰色の欄に頭数を記入してください。

サルの種類	性別	年齢	基盤研からの供給希望頭数	外部からの導入頭数	特記事項
					(個体条件・妊娠・胎仔・新生仔・疾患モデルサル等希望する個体条件を詳細に記入してください。)

カニクイザル	雄	2	6	0	疾患モデルサル(L-BSE感染)
合	計		6	0	

8. 外科的処置の詳細 [ ] ※外科的処置を行わない場合には[ ]内に×をつけ、9.非外科的処置の詳細に進んでください。

(1)外科的処置の目的 (全ての外科的処置は無菌的な手法を用いてください。同一の動物に2回以上外科的処置を施す場合は、その必要性についても詳細に記入してください。)

プリオンに感染させるために、脳内に接種する。

(2)外科的処置の種類	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
外科的処置後、実験が終了した時点で、動物を麻酔下で安楽殺させる。 (臓器採取のみを目的とした解剖は、この外科的処置には含まれない。)	0	0
外科的処置後、動物を生存させる。	6	6
同一の動物に対して2回以上外科的処置を繰り返す。	0	0

(3)手術の詳細 (臓器・組織・部位名、処置方法等について詳細に記入してください。)

脳内接種：塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で、無菌的に、皮膚を切開し、頭蓋骨に直径2 mmの穿孔部を作製し、片側被殻に10%BSE発症サル脳乳剤を200 uL注入する。接種後3日間抗生物質を投与する。

(4)苦痛の軽減、周辺への感染予防対策及び手術後の動物の管理において、必要な項目の[ ]内に○をつけてください。

頻回の観察[○] 補液[ ] 特別食の給餌[ ] 栄養剤の投与[ ] 鎮痛薬の投与[○]  
 抗生物質の投与[○]  
 その他[ ] (具体的内容については以下に記入してください。)

9. 非外科的処置の詳細		
(1) 処置に使用する薬剤	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
麻酔薬名: 塩酸ケタミン、キシラジン	6	6
鎮痛薬名:		
その他の薬物名:		
(2) 処置の種類 (次の項目に必要な事項を記入してください。)	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
採血方法及び採血量(ml/kg/月/頭) ケタラール麻酔下で採血量: 約 10 mL/頭/回 脳脊髄液採取量: 約 1 mL/頭/回 3ヶ月毎に1回	6	6
組織又は細胞の移植 (ヒト由来組織細胞を用いる場合には研究倫理審査委員会の承認が必要です。) 組織の種類: BSE感染発症したカニクイザルの脳組織(乳剤) 細胞の種類:	6	6
無麻酔で動物の拘束を5分以上する場合の理由・方法		
安楽殺した動物からの臓器摘出 (摘出臓器名)  脳、脊髄、末梢神経、脾臓	6	6

その他の処置		
--------	--	--

10. 実験終了後のサルの処置 ※該当する項目がある場合に必要な項目の[ ]内に○をつけてください。また、必要な事項を記入してください。

(1) 処分の方法 ※感染実験、組換えDNA実験又はカテゴリーCの実験に用いた個体は安楽殺を前提とします。

医薬基盤研究所への返却[ ] 安楽殺[  ]  
 その他[ ](具体的内容については以下に記入してください。)

(2) 不用臓器等の提供 ※希望する他の研究者に提供するため。感染実験及び組換えDNA実験に用いた個体の不要臓器等は提供できません。

提供する[ ] 提供しない[  ]  
 その他[ ](具体的内容については以下に記入してください。)

11. 生物学的安全性 ※該当する項目がある場合に必要な事項を記入してください。実験内容に応じて、別途、医薬基盤研究所の各種委員会の審査が必要となりますので、基盤研研究対応者に問い合わせてください。

	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
(1) 感染性微生物の使用		
微生物名BSEプリオン 微生物のバイオセーフティレベル: レベル2 ・ <u>レベル3</u> 感染経路:脳内接種 投与量:200 μl  (バイオセーフティ委員会承認番号: 申請中 )	6	6
(2) 組換えDNAの投与 (機関内承認実験・大臣確認実験)	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
投与する組換え体: 投与経路: 投与量:  (組換えDNA実験安全委員会承認番号: )		
(3) ヒト由来生物製剤の投与	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
製剤名: 投与経路:		

投与量:  (研究倫理審査委員会承認番号: )		
(4) その他の検体・異種動物由来材料等の使用 (具体的に記入してください。)	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
種類: 投与経路: 投与量:		
(5) 上記の使用に伴う安全取扱及び事故発生時の対応方法 (動物室内での同室の動物に対する対応、飼育担当者及び周囲の者並びに施設に対する注意並びに事故発生時の対応方法を具体的に記入してください。)		
<p>プリオン病は異常型プリオン蛋白により伝達するが、基本的には空気感染・飛沫感染・接触感染はしない。しかし、体液に含まれる可能性は否定できないため、嘔まれないように注意する。特に脳から流出した体液は、感染する可能性があるため注意する。万が一、手指に付着した場合は、1N NaOH を、局所的に塗布し、擦らずに流水で洗い流す。</p>		

12. 化学的安全性 ※該当する項目がある場合に必要な事項を記入してください。実験内容に応じて、別途、医薬基盤研究所の化学物質委員会の審査が必要となる場合がありますので、基盤研研究対応者に問い合わせてください。		
(1) 発がん物質、毒素又は他の危険物の投与	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
物質名: 投与経路: 投与量: (化学物質委員会承認番号: )		
(2) 性質不明の物質の投与 (具体的に記入してください。)	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
物質名: 投与経路: 投与量: 予想される効果:		
投与物質の安全取扱並びに事故発生時の対応方法 (動物室内での同室の動物に対する対応、飼育担当者及び周囲の者並びに施設に対する注意並びに事故発生時の対応方法を具体的に記入してください。)		



13. 申請者が現在までに行った本申請に関連した研究業績リスト(10件以内)

1. Yuji Kamatari, Yosuke Hayano, Kei-ichi Yamaguchi, Junji Hosokawa-Muto, \*Kazuo Kuwata: Characterization of anti-prion compounds according to the binding properties to the prion protein. Protein Science. (in press) (査読有)
2. Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Yuji O.Kamatari, \*Kazuo Kuwata: Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21, 1502-1507 (2011) (査読有)
3. Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Kenji Asami, Toshiaki Murai, \*Kazuo Kuwata: 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) (査読有)
4. Junji-Hosokawa Muto, Tsutomu Kimura, \*Kazuo Kuwata: Respiratory and cardiovascular toxicity studies of a novel anti-prion compound, GN8, in rats and dogs. Drug and Chemical Toxicology (in press) (査読有)
5. 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 GMI of Neuronal Membranes, Chemistry & biology 18 1422-31
6. Takeshi Ishikawa and \*Kazuo Kuwata: Interaction Analysis of the Native Structure of Prion Protein with Quantum Chemical Calculations. J. Chem. Theory Comput. 6, 538-547, 2010 (査読有)
7. Yamamoto N, \*Kuwata K. Regulating the Conformation of Prion Protein through Ligand Binding. Journal of Physical Chemistry B. 113, 12853-12856, 2009 (査読有)
8. Ishikawa T, Ishikura T, \*Kuwata K. Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method. Journal of Computational Chemistry. 30, 2594-2601, 2009 (査読有)
9. Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Nakamura HK, \*Kuwata K. A Variety of Anti-Prion Compounds Discovered through an in silico Screen Based on PrPc Structure:A Correlation Between Anti-Prion Activity and Binding Affinity Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53,765-771,2009 (査読有)
10. \*Kuwata, K., Nishida, N., Matsumoto, T., Kamatari, Y.O., Hosokawa-Muto, J., Kodama, K., Nakamura, H. K., Kimura, K., Kawasaki, M., Takakura, Y., Shirabe, S., Takata, J., Kataoka, Y., Katamine, S.: Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104: 11921 - 11926 (2007).

14. 苦痛及びストレスの程度

カテゴリー (計画された動物実験がいずれのカテゴリーに属するか、必ず該当する項目の[ ]内に○をつけ、以下の例を参考にして、その根拠を明確に記入してください。なお、いずれのカテゴリーに属するか判断しかねる場合は、基盤研研究対応者に問い合わせてください。)	当該年度 使用する頭数	全研究期間に 使用する頭数
カテゴリーA [ ](動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験処置)		
(例) ・実験を行うために、動物を掴んで保定すること ・あまり有害でない物質の投与又は少量採血等の簡単な処置 ・深麻酔により意識のない動物を用いた実験で、処置後に不快感を伴わないこと ・短時間(24時間以内)に飼料や水分を与えないこと ・適切な処置により動物を安楽殺処分すること ・重篤な症状を伴わない非致死的(感染)動物実験	/	/
カテゴリーB [ ○ ](動物に対して軽微なストレス又は短時間持続する痛みを伴う実験) 麻酔下による脳内接種、P3アイソレータ内での長期飼育、継時的採血、髄液採取、神経症状によるストレス等を総合してカテゴリーBと評価した。	6	6
(例) ・カテーテルを長時間挿入する	/	/

<ul style="list-style-type: none"> <li>・フロントのアジュバントを用いた免疫</li> <li>・麻酔状態における外科的処置で、処置後に軽度の不快感を伴うこと</li> <li>・重篤な症状を伴う非致死的(感染)動物実験</li> </ul>		
カテゴリーC [ ](避けることのできない重度のストレスや痛みを伴う実験)		
(例) <ul style="list-style-type: none"> <li>・行動学的実験において、故意にストレスを加えること</li> <li>・麻酔状態における外科的処置で、処置後に著しい不快感を伴うもの</li> <li>・苦痛を伴う解剖学的又は生理学的処置</li> <li>・苦痛を伴う刺激を与える実験で、動物がその刺激から逃れられない場合</li> <li>・無麻酔下で長時間(数時間以上)に渡って動物の体を保定すること</li> <li>・無麻酔下で痛みを与えること</li> <li>・動物が耐えることができる最大に近い痛みを与えること(動物が激しい苦痛の表情を示す場合)</li> <li>・重篤な症状を伴う致死的(感染)動物実験</li> </ul>		

15. 安楽殺法 ※該当する項目の[ ]内に○をつけてください。

[  ] 過剰量のバルビツール系麻酔薬の注射

[  ] 深麻酔下での放血

[  ] その他 (方法を以下に記入してください。)

16. 本申請に関連する研究費の応募・受入等の状況(予定を含む。)

資金制度・研究費名・研究期間 (配分機関等名)	研究課題名 (研究代表者氏名)	役割 (代表・ 分担の別)	平成24年度研究経費 (期間全体の研究費総額) (千円)
厚生労働省科学研究費補助 金・平成 24～26 年 (厚生労働 省)	プリオン病に対する低分子シャペロン治療薬 の開発	代表	198,806 千円 (990,419 千円)
			( )
			( )