

201442017A

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

プリオン病の予防治療薬開発促進研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 堂浦 克美

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人東北大学が実施した平成26年度「プリオン病の予防治療薬開発促進研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

ページ

I. 委託業務成果報告（総括）	
プリオン病の予防治療薬開発促進研究	・・・ 1
堂浦 克美 （東北大学大学院医学系研究科）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
CED作用機序解明に基づく疾患感受性因子究明：CED評価系細胞を用いた解析	・・・ 9
堂浦 克美 （東北大学大学院医学系研究科）	
CED作用機序解明に基づく疾患感受性因子究明：CED反応性が異なるコンジェ ニック動物の作出と解析	・・・ 11
毛利 資郎 （東北大学大学院医学系研究科）	
CED等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製、並びにCED等を リードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製：試験物の作製	・・・ 13
照屋 健太 （京都府立医科大学）	
CED等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製、並びにCED等を リードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製：試験物の作製（試験物の特性解析）	・・・ 16
上高原 浩 （京都大学大学院農学研究科）	
CED等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製：各種試験物の スクリーニング	・・・ 21
堂浦 克美 （東北大学大学院医学系研究科）	
CED等をリードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製：各種試験物の スクリーニング	・・・ 23
逆瀬川 裕二 （東北大学大学院医学系研究科）	
実用化支援・薬事指導	・・・ 25
池田 浩治 （東北大学病院臨床研究推進センター）	
III. 学会等発表実績	・・・ 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・・・ 35

委 託 業 務 成 果 報 告

( 総 括 )

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))  
委託業務成果報告 (総括)

プリオン病の予防治療薬開発促進研究

業務主任者：堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科・教授
担当責任者：毛利 資郎	東北大学大学院医学系研究科・客員教授
担当責任者：照屋 健太	京都府立医科大学・准教授
担当責任者：上高原 浩	京都大学大学院農学研究科・准教授
担当責任者：逆瀬川 裕二	東北大学大学院医学系研究科・助教
担当責任者：池田 浩治	東北大学病院臨床研究推進センター・特任教授
業務協力者：西澤 桂子	東北大学大学院医学系研究科
業務協力者：小熊 歩	東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

プリオン病に対する実効的な介入に必要な、糖誘導体 (CED) の実用化に関する3つの課題に取り組んだ。①CED 評価系細胞ならびに CED 反応性が異なる動物を用いて CED の作用機序解明から疾患感受性因子の究明を行うことについては、CED 作用機序解明に結びつく可能性がある複数の宿主因子群を同定することができた。②CED 評価系細胞を用いて CED 誘導体や類縁化合物をリードとした広域で高活性な予防薬候補物を創製することについては、新たに調製した CED 誘導体群の中に有望な試験物を確認した。また、CED のバイオアベイラビリティや毒性を改善する手段として、極めて有効な CED の物性修飾方法を見出した。一方、試験物の品質管理に必要な特性評価手段として、複数の溶液物性評価方法の組み合わせが有用であることを確認した。③増殖飽和型プリオン感染細胞を用いて CED 誘導体や類縁化合物をリードとした治療薬候補物を創製することについては、プリオン分解促進治療薬に必要な化学構造特性に関してヒントが得られた。以上の実用化開発研究業務は適切に管理されて行われた。

A. 研究目的

亜急性に進行する致死性神経難病であるプリオン病は、大半は散発性に発生し、患者数は年々増加している。発病早期の診断が困難で、プリオンは通常の滅菌処理に耐性であるため、医療行為による二次感染も発生している。発病後の介入では脳内プリオン量が飽和状態に近い場合、病気の進行

を阻止できない。実効的な介入には、疾患感受性因子の解明、感受性保因者やリスク保因者に対する予防薬の開発、飽和状態の脳内プリオン量を激減させるプリオン分解促進治療薬の開発が必要である。

業務主任者らは、糖誘導体 (CED) が、プリオン病の発病を抑制することを発見した。体内への単回投与でほぼ寿命一杯にわたり

発病を抑制する。本研究では、これまでの成果をさらに実用化に近付けるため、プリオン病に対する実効的な介入に必要な、① CED 評価系細胞ならびに CED 反応性が異なる動物を用いて CED の作用機序解明から疾患感受性因子の究明を行うこと、② CED 評価系細胞を用いて CED 誘導体や類縁化合物をリードとした広域で高活性な予防薬候補物を創製すること、③ 増殖飽和型プリオン感染細胞を用いて CED 誘導体や類縁化合物をリードとした治療薬候補物を創製することを目的としている。

## B. 研究方法

### ①. CED の作用機序解明に基づく疾患感受性因子の究明

#### a. CED 評価系細胞を用いた解析

タグ標識 CED 等を利用して、評価系プリオン感染細胞で CED と相互作用する宿主因子の分離・同定を行った。並行して、経時的に mRNA と miRNA を回収してマイクロアレイ解析を行い、CED 処理でのみ特異的に変動する因子群についてデータマイニングを行い、候補因子を絞った。

#### b. CED 反応性が異なるコンジェニック動物の作出と解析

トランスジーンと CED 高反応性遺伝子をもつ C57BL/6 背景のコンジェニックマウスの作出をめざして、CED 高反応性の Tg7 マウスを C57BL/6 PrPnull マウスと掛け合わせを続けた。

### ②. CED 等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製

#### a. 試験物の作製

基材となる CED の官能基変換や修飾反応を行い、各種の化学構造改変修飾体や関連化合物を合成した。合成物の溶液の

物性特性は dynamic light scattering、ゼータ電位、Wilhelmy 法、示差走査熱量等の分析で評価した。

#### b. 各種試験物のスクリーニング

CED 評価系プリオン感染細胞と CED 低反応性プリオン感染細胞を用いて、各種試験物のプリオン阻害活性を解析し、両者で高活性を発揮する化合物を選抜した。選抜化合物について毒性評価細胞パネルで評価した。これらの結果を合成担当にフィードバックし、試験物の修飾展開⇔活性・毒性評価を繰り返した。

### ③. CED 等をリードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製

#### a. 試験物の作製

上記② a と同様。増殖飽和型プリオン感染細胞の評価結果をもとに合成を展開した。

#### b. 各種試験物のスクリーニング

上記② a の合成化合物に加えて保有の CED 関連化合物ライブラリーから、増殖飽和型プリオン感染細胞でプリオン分解促進活性を評価して高活性物を選抜した。選抜物の毒性評価は② b と同様で、これらの結果を合成担当にフィードバックし、試験物の修飾展開⇔活性・毒性評価を繰り返した。

### ④. 実用化支援・薬事指導

上記①②③に関連した実用化支援、事業化支援、ならびに薬事指導を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、所属機関の倫理審査委員会の審査を受けて承認を得た上で、動物愛護の精神に十分に配慮して実施した。

## C. 研究結果

### ①. CED の作用機序解明に基づく疾患感受性因子の究明

評価系プリオン感染細胞溶解液中で CED

と相互作用する因子群は検出できなかつた。一方、CED 投与により発現パターンが経時的に変化する遺伝子群や miRNA 群を同定することができた。

CE 高反応性遺伝子を解析するためのコンジェニック動物作出実験は、メイティング等で難渋したため、現時点は F2 マウスで CED 反応性を見るためプリオン感染後経過観察中である。

#### ②. CED 等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製

高活性 CED あるいは広域活性 CED をもとに、A 系統誘導体 6 種類、B 系統誘導体 12 種類、C 系統誘導体 17 種類を調製した。C 系統誘導体について溶液物性特性を分析したが、試験物の品質管理手段として、各種の溶液物性解析が極めて有用であることが示された。

新たに調製した CED 試験物の中には、既存の高活性を持つものよりも優れたものがあり、10分の1の量でも効果が観察された。一方で、広域活性においては、既存のものよりも明らかに優れたものは観察されなかった。一方、物性修飾による CED 効果への影響を調べたところ、ある種の物性修飾により優れた活性を示すことがわかった。物性修飾無しのものよりも、100分の1の量でも効果が観察され、広域活性についても同等な低量で効果が観察された。

#### ③. CED 等をリードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製

検討した全ての化合物で、標準試験物の効果を凌ぐものは見当たらなかった。しかし、標準試験物と同等な効果を持つものと、そうでないものでは化学構造上で異なる特徴が観察された。

#### ④. 実用化支援・薬事指導

対面方式やメール方式による研究開発の進捗聴取を実施し、実用化や特許化に向けて具体的なアドバイスを行い、進捗報告書等の提出や進捗発表を支援した。

#### D. 考察

##### ①. CED の作用機序解明に基づく疾患感受性因子の究明

CED 投与群で特異的に変動する因子群については、CED 作用機序のどのステップに関与しているのか、CED の副次的な反応でないのか、プリオン蛋白代謝への影響があるのか、などを明らかにしていく必要がある。一方、CED 高反応性遺伝子を特定する研究はコンジェニックマウス作出に大変時間を要するため、F2 マウスで得られる結果を十分に考慮し、今後の実験計画を立てる必要がある。

##### ②. CED 等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製

試験物によってはその物性や化学構造等の理由からデザイン通りに調製ができていないかどうかの評価が困難なものもあったが、通常的手段に加えて各種の溶液物性分析も取り入れて、試験物の品質評価を行っていく必要がある。また、CED の作用機序を考察する上で、CED の溶液物性分析データが役立つ可能性もある。

新たに調製した CED 誘導体の中には、既存のものよりも優れたものがあり、化学構造においてさらにファインチューニングが必要である。一方、化学構造の改変以外の手段（物性修飾）で CED のバイオアベイラビリティや毒性を改善できることが明らかとなった。今後は、両者の検討（化学構造の最適化と物性修飾の最適化）によりさらに優れたものを開発できる可能性がある。

### ③. CED 等をリードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製

標準試験物の効果を凌ぐものは見当たらなかったが、プリオン分解促進治療薬に必要な化学構造特性に関して共通点が見られた。プリオン分解促進治療薬に必須のファーマコフォアであるかどうかを、検討していく必要がある。一方、予防薬開発で有効であった CED の物性修飾が、プリオン分解促進にも有効な可能性があり、種々の物性修飾体を検討する必要がある。

### ④. 実用化支援・薬事指導

対面方式およびメール方式での指導により、CED 化合物の実用化に向けて有効な支援ならびに業務の進捗管理ができていく。

## E. 結論

プリオン病に対する実効的な介入に必要な、CED の実用化への開発促進研究を実施した。いずれの研究開発項目においても、予定の 7 割以上を達成できた。特に、「CED 等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製」において、CED の最適化（バイオアベイラビリティと毒性の改善）の手段として、化学構造の改変以外の手段を発見したことは、CED 実用化への弾みとなる成果である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

(2014/4/1～2015/3/31 発表)

### 1. 論文発表

[雑誌]

Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K.

Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *Journal of Virology*, 88, 4083-4099, 2014

Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun*, 2 :32, 2014

Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, Kitamoto T. Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? *J Virol*, in press, 2015

Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP. *Structure*, 22, 560-571, 2014

Shimamoto Y, Hattori Y, Kobayashi K, Teruya K, Sanjho A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K. Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 876- 890, 2014

Ohnishi K, Sakurai H, Katsuyama M, Kobayashi K, Makabe H, Teruya K, Akaji K, Hattori Y. Synthesis of a pyrrolidine analog of a tetrahydrofuran containing acetogenin, cis-solamin. *HETEROCYCLES*, in press, 2015

Kamitakahara, H., Baba, A., Yoshinaga, A., Suhara, R., Takano, T. Synthesis and crystallization-induced microphase separation of cellulose



- triacetate-*block*-poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate). *Cellulose*, 21 (5) 3323-3338, 2014
- Shibano M, Nishida S, Saito Y, Kamitakahara H, Takano T. Facile synthesis of acyl chitosan isothiocyanates and their application to porphyrin-appended chitosan derivative. *Carbohydr Polym*, 113:279-285 2014
- Miyagawa, Y., Mizukami, T., Kamitakahara, H., Takano, T. Synthesis and fundamental HSQC NMR data of monolignol beta-glycosides, dihydromonolignol beta-glycosides and p-hydroxybenzaldehyde derivative beta-glycosides for the analysis of phenyl glycoside type lignin-carbohydrate complexes (LCCs). *Holzforschung*, 68(7)747-760, 2014
- Saito, Y., Kamitakahara, H., Takano, T. Preparation of Langmuir-Blodgett monolayer films of (zinc(II) phthalocyanine)-containing cellulose derivative; the use of 2,3-di-*O*-myristyl cellulose as a scaffold. *Cellulose*, 21 (3) 1885-1896, 2014
- Ozawa, M., Fukutome, A., Sannami, Y., Kamitakahara, H., Takano, T. Preparation and evaluation of the oxidation ability of hematin-appended 6-amino-6-deoxycellulose. *J. Wood Chem. Tech.*, 34(4) 262-272, 2014
- Ikeno F, Ikeda K, Uchida T. Patient access to medical devices—what about Japan, the second largest medical device market? *Cardiovasc Interv Ther*, 29(1)1-3, 2014
- Kurahashi H, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Detection of Proteinase K-resistant prion protein(PrPres) in mouse neuroblastoma cells. *PSSJ Arch*7:e074, 2014
- 倉橋 洋史、堂浦 克美. プリオン (異常プリオン蛋白) の伝播, *Clinical Neuroscience*, vol.33 no.3, 260-264, 2015
- 上高原 浩. セルロース誘導体の置換位置制御と機能化. *木材学会誌* 60 (3) 144-168, 2014
- ## 2. 学会発表
- Sakasegawa Y, Doh-ura K. A platinum compound enhances the protease sensitivity of PrPres in cell lysates. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea, July6-7, 2014
- 堂浦 克美. TSE プリオンとプリオノイドの違い、第 55 回日本神経病理学会総会 学術研究会・東京、2014 年 6 月 7 日
- 堂浦 克美. 抗プリオン化合物の作用機序に関する考察、徳島大学疾患酵素学研究センタープリオンセミナー・徳島、2015 年 2 月 27 日
- Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea, July 6-7, 2014
- 小林 篤史、岩崎 靖、大塚 浩之、山田 正仁、吉田 眞理、松浦 裕一、毛利 資郎、北本 哲之. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 MV2 の新分類、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会・東京、2014 年 6 月 6 日
- 古田 早紀、栗原 千如、辰巳 正、新城 源、今野 博行、野坂 和人、小林 数也、服

- 部 恭尚、照屋 健太、赤路 健一. レトロインベルソ型 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の合成と構造活性相関研究、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会・京都、2014 年 10 月 11 日
- 服部 恭尚、嶋本 康広、小林 数也、照屋 健太、中川 敦史、山下 栄樹、三城 明、赤路 健一. ペプチド性阻害剤に基づく新規低分子阻害剤の合成と阻害活性評価、第 51 回ペプチド討論会・徳島市、2014 年 10 月 23 日
- 照屋 健太、嶋本 康広、服部 恭尚、小林 数也、三城 明、山下 栄樹、中川 敦史、赤路 健一. SARS 3CL プロテアーゼとアザデカリン骨格を有する阻害剤の複合体の立体構造解析、第 51 回ペプチド討論会・徳島市、2014 年 10 月 22 日
- 服部 恭尚、嶋本 康広、大西 康司、葛山 昌伴、櫻井 春華、古田 善宏、照屋 健太、真壁 秀文、小林 数也、赤路 健一. パラジウム触媒を用いたジアステレオ選択的開環反応によるピペリジン環構築法の開発と SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤への応用、第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム・仙台、2014 年 11 月 11 日
- 嶋本 康広、服部 恭尚、小林 数也、照屋 健太、三城 明、中川 敦史、山下 栄樹、赤路 健一. アザ-デカリン骨格を有する新規 SARS-3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と評価、第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム・神戸、2014 年 11 月 27 日
- Hiroshi Kamitakahara, Atsushi Nakagawa, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Toshiyuki Takano. Synthesis and properties of end-functionalized methyl cellulose derivatives; bridging the gap between oligo- and polysaccharides. 249th ACS National Meeting, Denver, Mar23-25, 2015
- Hiroshi Kamitakahara. Synthetic strategies for cellulosic diblock copolymers. 249th ACS National Meeting, Denver, Mar23-25, 2015
- Hiroshi Kamitakahara, Atsushi Nakagawa, and Toshiyuki Takano. Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on diblock methylcellulose derivatives. 249th ACS National Meeting, Denver, Mar23-25, 2015
- Hiroshi Kamitakahara, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Yoshimasa Tanaka and Toshiyuki Takano. Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on end-functionalized methylcellulose derivatives. International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo, Mar16, 2015
- Yasuyuki Miyagawa, Yuki Tobimatsu, Takahito Mizukami, John Ralph, Hiroshi Kamitakahara and Toshiyuki Takano. NMR Studies of Phenyl Glycoside-Type Lignin-Carbohydrate Complexes (LCCs) in Wood Cell Walls. International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo, Mar16, 2015
- Yuki Tobimatsu, Satoshi Aruga, Dorien Van de Wouwer, Allen Eric, Robert Kumpf, Hiroshi Kamitakahara, Toshiyuki Takano, Bartel Vanholme,

Boerjan Wout and John Ralph. Visualization of cell wall lignins by metabolic labeling and bioorthogonal click chemistry. International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo, Mar16, 2015

Yasuko Saito, Hiroshi Kamitakahara and Toshiyuki Takano. Photosensitizer-bound cellulose derivatives for photocurrent generation. International Symposium on Wood Science and Technology 2015, Tokyo, Mar16, 2015

齋藤 靖子、上高原 浩、高野 俊幸. 光増感色素導入セルロース誘導体の合成とその光電変換能評価 (3) 混合 LB 法による光電変換薄膜の構築. セルロース学会第 21 回年次大会・鹿児島、2014 年 7 月 1 日

上高原 浩、須原 遼、山上 真緒、川野 陽子、吉永 新、田中 義正、高野 俊幸. 両親媒性末端機能化セルロース誘導体: ゲル化を誘導する構造因子と超分子ヒドロゲルの性能評価. セルロース学会第 21 回年次大会・鹿児島、2014 年 7 月 1 日

宮川 泰幸、飛松 裕基、水上 貴仁、John Ralph、上高原 浩、高野 俊幸. 2 次元 NMR による天然試料のフェニルグリコシド型 LCC の化学構造解析. 第 59 回リグニン討論会・福井、2014 年 9 月 11 日

飛松 裕基、有賀 哲、Eric Allen、Robert Kumpf、Bartel Vanholme、上高原 浩、高野 俊幸、Wout Boerjan、John Ralph. 生体直交型反応を活用したリグニンのメタボリックラベルと蛍光標識. 第 59

回リグニン討論会・福井、2014 年 9 月 11 日

澤村 かおり、飛松 裕基、上高原 浩、高野 俊幸. 脱メチル化リグニンの構造分析および性質評価. 第 59 回リグニン討論会・福井、2014 年 9 月 11 日

水上 貴仁、宮川 泰幸、飛松 裕基、上高原 浩、高野 俊幸.  $\alpha$ -ケト/ $\beta$ -0-4 型構造を有する phenyl glycoside 型 LCC モデル化合物の合成. 第 59 回リグニン討論会・福井、2014 年 9 月 11 日

上高原 浩. バイオマス由来の熱応答性超分子ヒドロゲルの開発. 第 3 回ネイチャーインダストリーアワード、2014 年 12 月 12 日

横畑 里美、成田 和央、飛松 裕基、三波由実、上高原 浩、高野 俊幸. 遷移金属錯体を用いたリグニンモデル化合物の電解酸化. 第 65 回木材学会・東京、2015 年 3 月 18 日

澤村 かおり、飛松 裕基、上高原 浩、高野 俊幸. 脱メチル化リグニンの調製および機能性評価. 第 65 回木材学会・東京、2015 年 3 月 18 日

有賀 哲、飛松 裕基、Eric Allen、John Ralph、上高原 浩、高野 俊幸. リグニンの生体標識を指向したモノリグノールプローブ群の合成. 第 65 回木材学会・東京、2015 年 3 月 18 日

岡西 諒子、飛松 裕基、上高原 浩、高野 俊幸. 親水部としてグルコース・マンノースを有する分子末端機能化メチルセルロースの合成とその性質. 第 65 回木材学会・東京、2015 年 3 月 18 日

三木 健太郎、飛松 裕基、上高原 浩、高野 俊幸. カラマツ鋸屑からの両親媒性ナノ粒子の調製. 第 65 回木材学会・東京、2015 年 3 月 18 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

委 託 業 務 成 果 報 告

(業 務 項 目)

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))  
プリオン病の予防治療薬開発促進研究 委託業務成果報告 (業務項目)

CED 作用機序解明に基づく疾患感受性因子究明：  
CED 評価系細胞を用いた解析

業務主任者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授  
業務協力者：西澤 桂子 東北大学大学院医学系研究科

## 研究要旨

評価系プリオン感染細胞で CED と相互作用する宿主因子の分離を試みたが、特定の因子を分離することができなかった。一方、経時的に mRNA と miRNA を回収し、マイクロアレイ解析を実施し、CED 投与でのみ特異的に変動する宿主因子群について解析を行った。その結果、CED 作用機序解明に結びつく可能性がある複数の因子群を同定することができた。

### A. 研究目的

プリオン病は、発病後の介入では脳内プリオン量が飽和状態に近い状態のため、病気の進行を阻止できない。プリオン病への実効的な介入には、予防薬の開発や効率的なプリオン分解促進薬の開発が欠かせないが、同時に、感受性保因者を発病前に同定するためには疾患感受性関連因子の究明が欠かせない。これまでの研究で、CED 反応性は発病を左右する疾患感受性因子の一つと考えられることより、CED 反応性に関わる作用機序を明らかにすることが本研究の目的である。

### B. 研究方法

#### 相互作用因子の解析

固相化 CED やタグ標識 CED を作製し、評価系プリオン感染細胞を用いて CED と相互作用する因子群の分離を行った。

#### マイクロアレイ解析

CED 投与群と対照群で経時的に mRNA と miRNA を回収し、マイクロアレイ解析を実施した。得られたデータを統計学的処理やパスウェイ解析を行い、有意なデータを抽出した。

(倫理面への配慮)  
特になし

### C. 研究結果

#### 相互作用因子の解析

固相化 CED やタグ標識 CED を用いて、評価系プリオン感染細胞中の相互作用因子群を探索した。様々な条件を検討したが、プリオン蛋白を始め細胞溶解液の可溶性成分のなかには、CED と相互作用するものは検出できなかった。

## マイクロアレイ解析

対照群と比較して、CED 投与群で発現パターンが経時的に変化する遺伝子群や miRNA 群を同定することができた。

### D. 考察

CED 投与群で特異的に発現パターンが経時的に変動する因子群について、CED 作用機序のどのステップに関与しているのか、CED の副次的な反応であるのか、プリオン蛋白代謝への影響があるのか、などを今後は明らかにしていく必要がある。

### E. 結論

CED 作用機序解明に結びつく可能性がある複数の因子群を同定することができた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

(2014/4/1~2015/3/31 発表)

#### 1. 論文発表

[雑誌]

Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K. Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *Journal of Virology*, 88, 4083-4099, 2014

Kurahashi H, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Detection of Proteinase K-resistant prion protein(PrPres) in mouse neuroblastoma cells. *PSSJ Arch*7:e074, 2014

倉橋 洋史、堂浦 克美. プリオン (異常プリオン蛋白) の伝播, *Clinical*

*Neuroscience*, vol.33 no.3, 260-264, 2015

#### 2. 学会発表

Sakasegawa Y, Doh-ura K. A platinum compound enhances the protease sensitivity of PrPres in cell lysates. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea, July6-7, 2014

堂浦 克美. TSE プリオンとプリオノイドの違い、第 55 回日本神経病理学会総会 学術研究会・東京、2014 年 6 月 7 日

堂浦 克美. 抗プリオン化合物の作用機序に関する考察、徳島大学疾患酵素学研究センタープリオンセミナー・徳島、2015 年 2 月 27 日

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

特になし

#### 2. 実用新案登録

特になし

#### 3. その他

特になし

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))  
プリオン病の予防治療薬開発促進研究 委託業務成果報告 (業務項目)

CED 作用機序解明に基づく疾患感受性因子究明：  
CED 反応性が異なるコンジェニック動物の作出と解析

担当責任者：毛利 資郎 東北大学大学院医学系研究科・客員教授  
業務協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科

## 研究要旨

CED に対する反応性が異なる 2 系統のマウスを掛け合わせ、CED 反応性に乏しい C57BL/6 背景で CED 高反応性遺伝子をもつコンジェニックマウスの作出を目指して、繁殖実験ならびに感染・CED 投与実験を実施した。

### A. 研究目的

これまでの研究で、CED に対する反応性は発病を左右する疾患感受性因子の一つと考えられることより、CED 反応性に関わる作用機序を明らかにするため、マウスの CED 高反応性遺伝子を同定する。そのために、まずは同遺伝子をもつコンジェニックマウスの作出が本研究の目的である。

### B. 研究方法

#### 動物の掛け合わせ

CED 反応性に優れている Tg7 マウスを、CED 反応性に乏しい C57BL/6 系 PrP null マウスと掛け合わせを行い、F1 マウスを得た。この F1 マウスを C57BL/6 系 PrP null マウスと掛け合わせを行い、プリオン感染・CED 投与実験で CED 反応性を評価できる十分な数の F2 マウス (オスのみ) を得た。F2 マウス全頭の精子を凍結保存した後に、以下の CED 反応性解析実験を実施した。

#### CED 反応性の解析

263K プリオンを脳内感染させ、その後に CED を腹腔内に単回投与して、プリオン病を発病するまでの経過を観察した。プリオン病の発病は脳組織の免疫組織化学やヒストプロット法で評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、所属機関の動物実験に関する倫理審査委員会の審査を受け、承認を受けた上で、動物愛護の精神に十分に配慮して実施した。

### C. 研究結果

予定では、F2 マウスにおける CED 反応性の解析を終了し、選抜したマウス精子を用いて顕微授精で F3 以降の作出まで到達することとなっていたが、Tg7 マウスと C57BL/6 系 PrP null マウスの相性が悪く、両者のメイティングのコツがわかるまでに時間を要した。また、十分な数の



F2 マウス (オスのみ) を得るまでも時間がかかったため、現時点は F2 マウスで CED 反応性を見るため経過を観察中である。

#### D. 考察

CED 高反応性とはプリオン病の発病を最も効果的に遅延させる形質であり、本研究は1つの世代を選抜するにも大変時間を要する研究である。F2 マウスで得られる結果を十分に考慮した上で、今後の実験計画を立てる必要がある。

#### E. 結論

CED 反応性に乏しい C57BL/6 背景で CED 高反応性遺伝子をもつコンジェニックマウスの作出を目指して、繁殖実験ならびにプリオン感染・CED 投与実験を実施した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

(2014/4/1~2015/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

[雑誌]

Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun*, 2:32, 2014

Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, Kitamoto T. Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? *J Virol*, in press, 2015

##### 2. 学会発表

Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea, July 6-7, 2014

小林 篤史、岩崎 靖、大塚 浩之、山田 正仁、吉田 眞理、松浦 裕一、毛利 資郎、北本 哲之. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 MV2 の新分類、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会・東京、2014 年 6 月 6 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))  
プリオン病の予防治療薬開発促進研究 委託業務成果報告 (業務項目)

CED 等をリードとした広域で高活性な予防薬候補物の創製、並びに CED 等を  
リードとしたプリオン分解促進治療薬候補物の創製：  
試験物の作製

担当責任者：照屋 健太 京都府立医科大学・准教授

## 研究要旨

CED の最適化 (バイオアベイラビリティならびに安全性の改善) のため、高活性な CED や広域で有効な CED の基本化学構造をもとに CED 誘導体として A 系統 6 種類、B 系統 1 2 種類、C 系統 1 7 種類を作製した。

### A. 研究目的

現状の CED では最大の効果を期待するには高用量の投与が必要であり、そのために毒性の出現が問題となっている。そこで、バイオアベイラビリティならびに安全性の改善に向けて、最適化の方向を明らかにするため、現状で広域活性や高活性を有する CED の基本化学構造をもとに各種の誘導体を作製する。

### B. 研究方法

#### A 系統誘導体

CED の水酸基を反応基として、2 種類の化学構造や物性が異なる修飾基を導入した。

#### B 系統誘導体

2 種類の CED を用いて、それぞれの水酸基へのエーテル結合反応を利用して、置換度が異なるように疎水性修飾基を導入した。

#### C 系統誘導体 (あ～お系統誘導体)

広域で有効な CED の官能基に、物性や化学構造が異なる修飾基を導入した。

(倫理面への配慮)

特になし

### C. 研究結果

#### A 系統誘導体

高活性 CED の誘導体として物性が異なる 6 種類を作製した。

#### B 系統誘導体

2 種類の高活性な CED を用いて、それぞれ 8 種類、4 種類の疎水性修飾をもつ誘導体を作製した。

#### C 系統誘導体 (あ～お系統誘導体)

広域で有効な CED をもとに、高活性化に関係する修飾基等を導入した誘導体として 1 7 種類を作製した。

## D. 考察

今回の試験物の作製研究では、これまでにわかっている高活性・広域活性にかかわるファーマコフォアを満足させる試験物の作製をめざしたが、化合物によってはその物性や化学構造等の理由からデザイン通りに修飾合成ができていないかどうかの評価が困難なものもあった。今後は、上高原による各種の溶液物性分析の結果も加味して、試験物の品質評価を行っていく。

## E. 結論

CED の最適化研究に必要な試験物の作製を担当した。高活性・広域活性な CED の基本化学構造をもとに合計 35 種類の CED 誘導体を作製した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

(2014/4/1~2015/3/31 発表)

### 1. 論文発表

[雑誌]

Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T. Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP. *Structure*, 22, 560-571, 2014

Shimamoto Y, Hattori Y, Kobayashi K, Teruya K, Sanjho A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K. Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 876- 890, 2014

Ohnishi K, Sakurai H, Katsuyama M, Kobayashi K, Makabe H, Teruya K, Akaji K, Hattori Y. Synthesis of a pyrrolidine analog of a tetrahydrofuran containing acetogenin, cis-solamin. *HETEROCYCLES*, in press, 2015

### 2. 学会発表

古田 早紀、栗原 千如、辰巳 正、新城 源、今野 博行、野坂 和人、小林 数也、服部 恭尚、照屋 健太、赤路 健一. レトロインベルソ型 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の合成と構造活性相関研究、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会・京都、2014 年 10 月 11 日

服部 恭尚、嶋本 康広、小林 数也、照屋 健太、中川 敦史、山下 栄樹、三城 明、赤路 健一. ペプチド性阻害剤に基づく新規低分子阻害剤の合成と阻害活性評価、第 51 回ペプチド討論会・徳島市、2014 年 10 月 23 日

照屋 健太、嶋本 康広、服部 恭尚、小林 数也、三城 明、山下 栄樹、中川 敦史、赤路 健一. SARS 3CL プロテアーゼとアザデカリン骨格を有する阻害剤の複合体の立体構造解析、第 51 回ペプチド討論会・徳島市、2014 年 10 月 22 日

服部 恭尚、嶋本 康広、大西 康司、葛山 昌伴、櫻井 春華、古田 善宏、照屋 健太、真壁 秀文、小林 数也、赤路 健一. パラジウム触媒を用いたジアステレオ選択的開環反応によるピペリジン環構築法の開発と SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤への応用、第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム・仙台、2014 年 11 月 11 日

嶋本 康広、服部 恭尚、小林 数也、照屋 健太、三城 明、中川 敦史、山下 栄樹、赤路 健一. アザ-デカリン骨格を有する新規 SARS-3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と評価、第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム・神戸、2014 年 11 月 27 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし