

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 (試験物の特性解析)

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：照屋 健太 京都府立医科大学・准教授
業務主任者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

CED 試験物の品質管理に必要な特性評価手段を確立するために、本研究では幾つかの溶液物性値、具体的には示差走査熱量測定により CED 水溶液の熱的性質を、動的光散乱法により CED の水中での会合挙動の温度依存性を、ゼータ電位測定により水中での CED 会合体の表面電荷を測定した。

A. 研究目的

本研究では抗プリオン活性をもつ CED 試験物の品質管理に必要な特性評価手段を確立するため、CED の溶液物性を評価することが目的である。

0° C-90° C の温度範囲で昇温-降温サイクルを 3 回以上繰り返した。1 回目の昇温-降温サイクルは 10° C/min とし、熱履歴を消去した。

B. 研究方法

化合物

照屋が調製した化合物 14 種類 (化合物略号：あ A, あ B, あ C, い B, い C, い D, う A, う B, う C, う D, え A, え B, お B, お C) の 2 重量%水溶液を調製し、各実験へ供した。

動的光散乱 (DLS)

大塚電子社製 ELSZ-2 を用い、25, 37, 50, 60, 70, 80° C 時の流体力学的径 (nm) を Cumulant 法により求めた。

ゼータ電位測定

大塚電子社製 ELSZ-2、微量ディスポセルを用いて 37° C 時のゼータ電位 (mV) を測定した。

示差走査熱量測定 (DSC)

Mettler Toledo 社製 DSC823e、高感度センサー HSS7 を用い、昇温速度 3.5° C/min, 降温速度 3.5° C/min にて

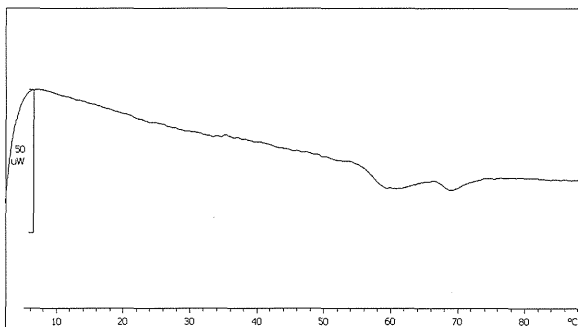
(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

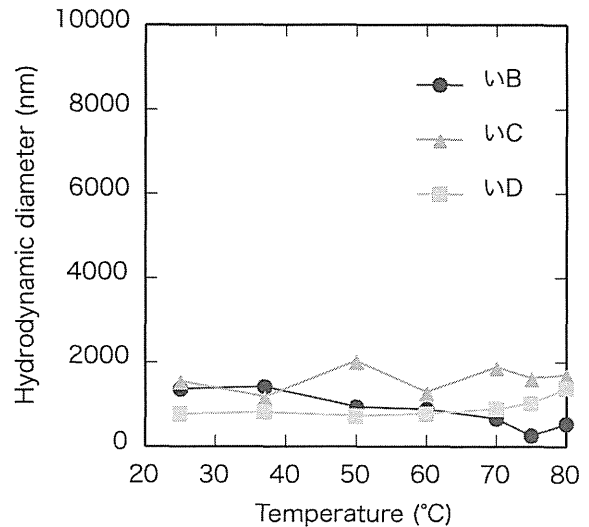
DSC 測定

カチオン性誘導体である、あA, あB, あC, いB, いC, いD, うA, うB, うC, えA, えB, おB, おCの水溶液は、行った実験条件では顕著な熱的性質を示さなかった。中性誘導体であるうDのみ、昇温過程で55°Cから70°C付近に吸熱ピークが観察された。この吸熱ピークはCED分子鎖近傍からの脱水和に由来すると考えられる。

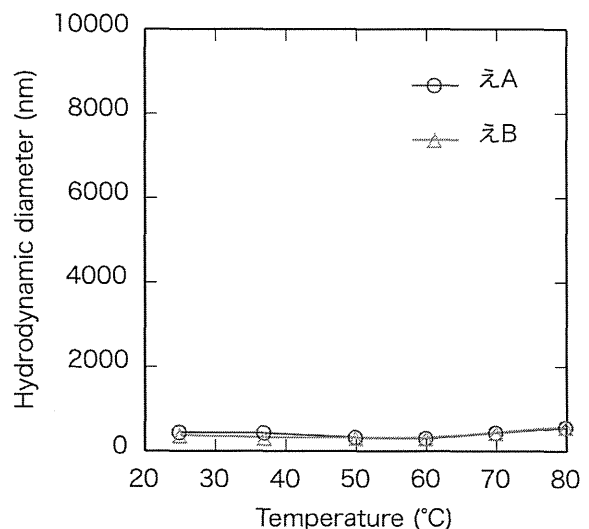
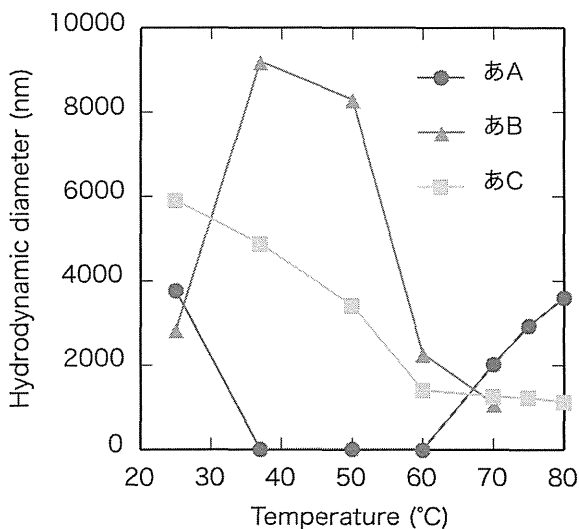
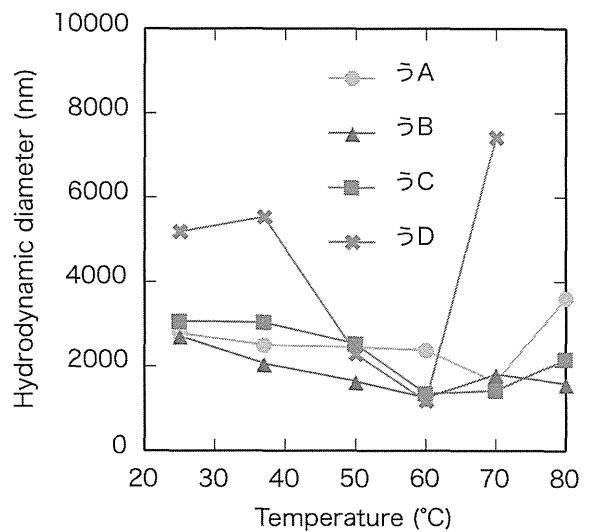


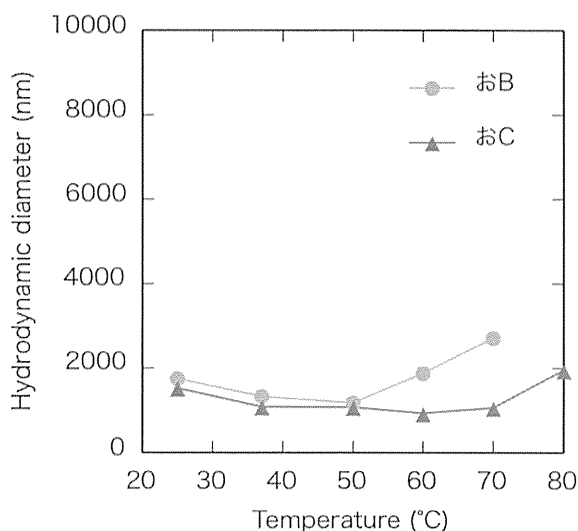
DLS 測定

うDは後述するDSCデータの吸熱温度付近(60 から 70°C)で会合体サイズの急激な上昇が観察された。また、シリーズ毎に会合体のサイズにある程度の違いが認められた。シリーズ「お」の場合、昇温過程において会合体サイズの上昇する傾



向が見られる。





ゼータ電位測定

中性のうDの会合体は水中では若干負に帯電しているが、それ以外の化合物は正に帯電している事が判った。

D. 考察

DLS, DSC のデータを合わせて考えるならば、カチオン性誘導体の分子鎖近傍の水和構造は変化し難いと考えられる。その要因の一つとして、水中での会合体が正に帯電し、分子鎖同士の接近とそれに続く大きな会合構造の形成を妨げていることが挙げられる。これまでに、CED の溶液物性と抗プリオン活性との相関に関する知見は蓄積されていない。今後、CED の作用機序を詳細に考察する上で、CED の溶液物性の評価データが役立つ可能性がある。

E. 結論

本研究において CED の溶液物性について実験データを蓄積することが出来た。溶液中での化合物の会合挙動、熱応答性は、誘導体化により顕著に影響を受けていることが判った。したがって、試験物の品質管理手段として、本研究で示した溶液

サンプル名	Zeta potential (mV)
あA	7.68
あB	8.63
あC	10.30
いB	9.88
いC	12.43
いD	15.29
うA	10.64
うB	7.95
うC	9.33
うD	-0.02
えA	7.55
えB	8.14
おB	7.19
おC	6.24

物性解析が極めて有用であると考えられる。

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]

Kamitakahara, H., Baba, A., Yoshinaga, A., Suhara, R., Takano, T., Synthesis and crystallization-induced microphase separation of cellulose triacetate-*block*-poly(\cdot -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

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

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

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

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

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

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

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

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, March 2015.

Hiroshi Kamitakahara, Synthetic strategies for cellulosic diblock copolymers, 249th ACS National Meeting, Denver, March 2015.

Hiroshi Kamitakahara, Atsushi Nakagawa, and Toshiyuki Takano, Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on diblock methylcellulose derivatives, 249th ACS National Meeting, Denver, March 2015.

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

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, 2014 年 7 月

水上 貴仁, 宮川 泰幸, 飛松 裕基, 上高原 浩, 高野 俊幸. α -ケト/ β -O-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

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

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

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

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

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：
各種試験物のスクリーニング

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：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
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

広域で高活性な予防薬候補物を選抜するため、評価系プリオン感染細胞を用いて、新たに作製された試験物をスクリーニングした。また、発想を転換して CED の物性修飾について種々の検討を行い、CED のバイオアベイラビリティや毒性を改善できないか検討した。その結果、ある種の CED の物性修飾が有効であることが判明した。

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、ハイリスク患者への予防薬の開発が欠かせない。CED は優れた予防薬候補化合物であるが、実用化にはバイオアベイラビリティや毒性の改善が必要である。本研究では、CED の最適化に向けて新たに作製された CED 誘導体のスクリーニングが目的である。また、化学構造の改変以外の手段で CED のバイオアベイラビリティや毒性の改善が達成できないかどうかを検討することも目的である。

B. 研究方法

化合物

新たに調製された CED 試験物を検討した。

スクリーニング

CED 効果評価用プリオン感染細胞を用いて、培養液中に化合物を加え、異常型プリオン蛋白の形成量をウェスタンブロット法で評価した。

化合物の物性修飾

様々な文献や資料を参考に、種々の CED 物性修飾を行った。修飾体の評価は、上記の CED 効果評価用プリオン感染細胞を用いた。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

新たな CED 試験物のスクリーニング

CED の最適化に向けて新たに調製された CED 誘導体では、既存の高活性な CED 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。

物性修飾 CED 試験物のスクリーニング

種々の CED 物性修飾の中で、ある種の修飾体が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。

D. 考察

新たに調製された CED 誘導体の中には、既存のものよりも優れたものがあつたが、優れた広域活性も兼ね備えたものは見つからなかった。CED の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本研究で明らかとなった。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。

E. 結論

CED の化学構造の改変に加えて、ある種の物性修飾手段が CED の最適化に極めて有効である。

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

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

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：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
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

プリオン分解促進治療薬候補物をスクリーニングするために開発した増殖飽和型プリオン感染細胞を用いて、新たに作製された試験物に加えて保有の CED や CED 関連化合物を検討した。標準試験物の効果を凌ぐ化合物は見つからなかったが、スクリーニングの結果から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。

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場合、病気の進行を阻止できない。プリオン病発病者への実効的な介入には、効率的なプリオン分解促進薬の開発が欠かせない。本研究は、飽和状態のプリオンを激減させるプリオン分解促進効果に優れた CED 誘導体の開発を目的としている。

B. 研究方法

化合物

新たに調製された CED 試験物に加えて、既に教室で保有の CED や CED 関連化合物を検討した。

スクリーニング

新たに開発した増殖飽和型プリオン感染

細胞を用いて、培養液中に化合物を加え、異常型プリオン蛋白の減少率をウェスタンブロット法で評価した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

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。

D. 考察

本研究結果では、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

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、今後検討する必要がある。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である可能性があり、種々の物性修飾体のスクリーニングも今後検討する必要がある。

E. 結論

増殖飽和型プリオン感染細胞を用いて、CED や CED 関連化合物をスクリーニングし、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を得た。

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

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

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)

実用化支援・薬事指導

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

研究要旨

CED 化合物の実用化に必要な種々の支援ならびに研究開発業務の進捗管理を行った。

A. 研究目的

プリオン病の予防治療薬開発促進研究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うことが目的である。

な支援ならびに研究開発業務の進捗管理ができていると考えられる。

B. 研究方法

対面方式およびメール方式による進捗聴取ならびに実用化に向けてのアドバイスを実施した。

E. 結論

CED 化合物の実用化研究を支援し、同研究の進捗管理を行った。

(倫理面への配慮)

特になし

F. 健康危険情報

特になし

C. 研究結果

本開発研究事業の開始時ならびに年度終盤に、3回にわたり対面方式による開発研究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。さらに、メール方式による開発研究相談を随時受けつけ、実用化に向けたアドバイスをを行った。

G. 研究発表

(2014/4/1～2015/3/31 発表)

1. 論文発表

[雑誌]

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

D. 考察

対面方式およびメール方式での進捗聴取ならびに実用化に向けてのアドバイスにより、CED 化合物の実用化に向けて有効

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

学 会 等 発 表 実 績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「プリオン病の予防治療薬開発促進研究」

機関名 東北大学、京都府立医科大学、京都大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
[口頭]				
Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems.	Kobayashi A, Matsuura Y, <u>Mohri S</u> , Kitamoto T	Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea	July 6-7, 2014	国外
Synthesis and properties of end-functionalized methyl cellulose derivatives; bridging the gap between oligo- and polysaccharides.	<u>Hiroshi Kamitakahara</u> , Atsushi Nakagawa, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Toshiyuki Takano	249th ACS National Meeting, Denver	Mar23-25, 2015	国外
Synthetic strategies for cellulosic diblock copolymers.	<u>Hiroshi Kamitakahara</u>	249th ACS National Meeting, Denver	Mar23-25, 2015	国外
Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on diblock methylcellulose derivatives.	<u>Hiroshi Kamitakahara</u> , Atsushi Nakagawa, and Toshiyuki Takano	249th ACS National Meeting, Denver	Mar23-25, 2015	国外
孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病MV2の新分類	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	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	国内
TSEプリオンとプリオノイドの違い	<u>堂浦 克美</u>	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	国内
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	齋藤 靖子、 <u>上高原 浩</u> 、高野 俊幸	セルロース学会第21回年次大会・鹿児島	2014年7月1日	国内

発表した成果（発表題目、 口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
[口頭]				
2次元 NMR による天然試料の フェニルクリコシト型 LCC の化 学構造解析	宮川 泰幸、 飛松 裕基、 水上 貴仁、 John Ralph、 上高原 浩、 高野 俊幸	第59回リグニン討論会・ 福井	2014年9月11日	国内
生体直交型反応を活用した リグニンのメタホリックラ ベルと蛍光標識	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	第59回リグニン討論会・ 福井	2014年9月11日	国内
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	古田 早紀、 粟原 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	第64回日本薬学会近畿 支部総会・大会・京都	2014年10月11日	国内
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	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	第51回ペプチド討論 会・徳島市	2014年10月23日	国内
抗プリオン化合物の作用機 序に関する考察	堂浦 克美	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	国内
Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on end-functionalized methylcellulose derivatives.	Hiroshi Kamitakahara, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Yoshimasa Tanaka and Toshiyuki Takano	International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo	2015年3月16日	国内

発表した成果（発表題目、 口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
[口頭]				
NMR Studies of Phenyl Glycoside-Type Lignin-Carbohydrate Complexes (LCCs) in Wood Cell Walls.	Yasuyuki Miyagawa, Yuki Tobimatsu, Takahito Mizukami, John Ralph, <u>Hiroshi Kamitakahara</u> and Toshiyuki Takano	International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo	2015年3月16日	国内
Visualization of cell wall lignins by metabolic labeling and bioorthogonal click chemistry.	Yuki Tobimatsu, Satoshi Aruga, Dorien Van de Wouwer, Allen Eric, Robert Kumpf, <u>Hiroshi Kamitakahara</u> , Toshiyuki Takano, Bartel Vanholme, Boerjan Wout and John Ralph	International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), Tokyo	2015年3月16日	国内
Photosensitizer-bound cellulose derivatives for photocurrent generation.	Yasuko Saito, <u>Hiroshi Kamitakahara</u> and Toshiyuki Takano	International Symposium on Wood Science and Technology 2015, Tokyo	2015年3月16日	国内
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	横畑 里美、 成田 和央、 飛松 裕基、 三波 由実、 <u>上高原 浩</u> 、 高野 俊幸	第65回木材学会・東京	2015年3月18日	国内
脱メチル化リグニンの調製および機能性評価	澤村 かおり、 飛松 裕基、 <u>上高原 浩</u> 、 高野 俊幸	第65回日本木材学会大会・東京	2015年3月18日	国内

発表した成果（発表題目、 口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
[ポスター]				
A platinum compound enhances the protease sensitivity of PrPres in cell lysates.	Sakasegawa Y, Doh-ura K.	Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea	July6-7, 2014	国外
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	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	セルロース学会第21回 年次大会・鹿児島	2014年7月1日	国内
脱メチル化リグニンの構造 分析および性質評価	澤村 かおり、 飛松 裕基、 上高原 浩、 高野 俊幸	第59回リグニン討論 会・福井	2014年9月11日	国内
α -ケト β -O-4 型構造を有する phenyl glycoside 型 LCC モテ ル化合物の合成	水上 貴仁、 宮川 泰幸、 飛松 裕基、 上高原 浩、 高野 俊幸	第59回リグニン討論 会・福井	2014年9月11日	国内
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	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	第51回ペプチド討論 会・徳島市	2014年10月22日	国内
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 の開発と SARS 3CLプロテ アーゼ阻害剤への応用	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、 眞壁 秀文、 小林 数也、 赤路 健一	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	国内
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	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	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	国内
バイオマス由来の熱応答性 超分子ヒドロゲルの開発	上高原 浩	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	国内

発表した成果（発表題目、 口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
[ポスター]				
リグニンの生体標識を指向したモノリグノールプロープ群の合成	有賀 哲、 飛松 裕基、 Eric Allen、 John Ralph、 上高原 浩、 高野 俊幸	第65回木材学会・東京	2015年3月18日	国内
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	岡西 諒子、 飛松 裕基、 上高原 浩、 高野 俊幸	第65回木材学会・東京	2015年3月18日	国内
カラマツ鋸屑からの両親媒性ナノ粒子の調製	三木 健太郎、 飛松 裕基、 上高原 浩、 高野 俊幸	第65回木材学会・東京	2015年3月18日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
[雑誌]				
Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein.	Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K.	<i>Journal of Virology</i> , 88, 4083-4099	2014	国外
Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems.	Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T.	<i>Acta Neuropathol Commun</i> , 2:32	2014	国外
Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP.	Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T.	<i>Structure</i> , 22, 560-571	2014	国外
Synthesis and crystallization-induced microphase separation of cellulose triacetate- <i>block</i> -poly(γ -benzyl-L-glutamate).	Kamitakahara, H. Baba, A., Yoshinaga, A., Suhara, R., Takano, T.	<i>Cellulose</i> , 21 (5) 3323-3338	2014	国外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
[雑誌]				
Facile synthesis of acyl chitosan isothiocyanates and their application to porphyrin-appended chitosan derivative.	Shibano M, Nishida S, Saito Y, <u>Kamitakahara H</u> , Takano T.	<i>Carbohydr Polym</i> 113:279-285	2014	国外
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).	Miyagawa, Y., Mizukami, T., <u>Kamitakahara H</u> , Takano, T.	<i>Holzforschung</i> , 68(7)747-760	2014	国外
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.	Saito, Y., <u>Kamitakahara H</u> , Takano, T.	<i>Cellulose</i> , 21 (3) 1885-1896	2014	国外
Preparation and evaluation of the oxidation ability of hematin-appended 6-amino-6-deoxycellulose.	Ozawa, M., Fukutome, A., Sannami, Y., <u>Kamitakahara H</u> , Takano, T.	<i>J. Wood Chem. Tech.</i> , 34(4) 262-272	2014	国外
Patient access to medical devices-what about Japan, the second largest medical device market?	Ikeno F, <u>Ikeda K</u> , Uchida T.	<i>Cardiovasc Interv Ther</i> , 29(1)1-3	2014	国外
Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors.	Shimamoto Y, Hattori Y, Kobayashi K, <u>Teruya K</u> , Sanjho A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K.	<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 23, 876-890	2015	国外
Synthesis of a pyrrolidine analog of a tetrahydrofuran containing acetogenin, cis-solamin.	Ohnishi K, Sakurai H, Katsuyama M, Kobayashi K, Makabe H, <u>Teruya K</u> , Akaji K, Hattori Y.	<i>HETEROCYCLES</i> , in press	2015	国外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
[雑誌]				
Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology?	Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, <u>Mohri S</u> , Kitamoto T.	<i>J Virol</i> , in press	2015	国外
Detection of Proteinase K-resistant prion protein(PrPres) in mouse neuroblastoma cells.	Kurahashi H, <u>Sakasegawa Y</u> , <u>Doh-ura K</u> .	<i>PSSJ Arch</i> 7 :e074	2014	国内
セルロース誘導体の置換位置制御と機能化	<u>上高原 浩</u>	木材学会誌60 (3) 144-168	2014	国内
プリオン（異常プリオン蛋白）の伝播	<u>倉橋 洋史</u> 、 <u>堂浦 克美</u>	<i>Clinical Neuroscience</i> , 33 (3) 260-264	2015	国内

研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷

Efficacy and Mechanism of a Glycoside Compound Inhibiting Abnormal Prion Protein Formation in Prion-Infected Cells: Implications of Interferon and Phosphodiesterase 4D-Interacting Protein

Keiko Nishizawa, Ayumi Oguma, Maki Kawata, Yuji Sakasegawa, Kenta Teruya,* Katsumi Doh-ura

Department of Neurochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

ABSTRACT

A new type of antiprion compound, Gly-9, was found to inhibit abnormal prion protein formation in prion-infected neuroblastoma cells, in a prion strain-independent manner, when the cells were treated for more than 1 day. It reduced the intracellular prion protein level and significantly modified mRNA expression levels of genes of two types: interferon-stimulated genes were downregulated after more than 2 days of treatment, and the phosphodiesterase 4D-interacting protein gene, a gene involved in microtubule growth, was upregulated after more than 1 day of treatment. A supplement of interferon given to the cells partly restored the abnormal prion protein level but did not alter the normal prion protein level. This interferon action was independent of the Janus activated kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway. Therefore, the changes in interferon-stimulated genes might be a secondary effect of Gly-9 treatment. However, gene knockdown of phosphodiesterase 4D-interacting protein restored or increased both the abnormal prion protein level and the normal prion protein level, without transcriptional alteration of the prion protein gene. It also altered the localization of abnormal prion protein accumulation in the cells, indicating that phosphodiesterase 4D-interacting protein might affect prion protein levels by altering the trafficking of prion protein-containing structures. Interferon and phosphodiesterase 4D-interacting protein had no direct mutual link, demonstrating that they regulate abnormal prion protein levels independently. Although the *in vivo* efficacy of Gly-9 was limited, the findings for Gly-9 provide insights into the regulation of abnormal prion protein in cells and suggest new targets for antiprion compounds.

IMPORTANCE

This report describes our study of the efficacy and potential mechanism underlying the antiprion action of a new antiprion compound with a glycoside structure in prion-infected cells, as well as the efficacy of the compound in prion-infected animals. The study revealed involvements of two factors in the compound's mechanism of action: interferon and a microtubule nucleation activator, phosphodiesterase 4D-interacting protein. In particular, phosphodiesterase 4D-interacting protein was suggested to be important in regulating the trafficking or fusion of prion protein-containing vesicles or structures in cells. The findings of the study are expected to be useful not only for the elucidation of cellular regulatory mechanisms of prion protein but also for the implication of new targets for therapeutic development.

Prion diseases, synonymously referred to as transmissible spongiform encephalopathies, are fatal neurodegenerative disorders that include Creutzfeldt-Jakob disease, fatal familial insomnia, and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome in humans, as well as scrapie, bovine spongiform encephalopathy, and chronic wasting disease in animals. All of these diseases are characterized by the deposition of an abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}), which is a main component of the "prion" pathogen and is converted from the protease-sensitive normal cellular isoform of prion protein (PrP^C) in the central nervous system and lymphoreticular system (1). Both partial protease resistance and detergent-insoluble polymer formation are biochemical characteristics of PrP^{Sc}. A protease resistant core of PrP^{Sc} (PrP^{Res}) is detected by immunoblotting using anti-PrP antibody after treatment of PrP^{Sc} with proteinase K (1). The biosynthesis and metabolism of PrP^C and PrP^{Sc} have been investigated intensively in prion-infected cells (2) but have not been elucidated fully. Particularly enigmatic are the endogenous factors regulating the formation of PrP^{Sc} or the conformational change from PrP^C into PrP^{Sc}.

The increasing incidence of human prion diseases, which is attributable to increasing life expectancy, as well as outbreaks of

acquired forms of prion diseases, such as variant diseases and iatrogenic diseases, have aroused great concern in many countries and have accelerated the development of antiprion remedies and prophylactics. Various antiprion compounds or biological materials reportedly inhibit PrP^{Sc}/res formation *in vitro* or in prion-infected cells (3–5). Some compounds and biological materials reportedly extend the incubation periods in prion-infected animals. Nevertheless, no compound or biological material has halted disease progression in prion-infected animals, except for

Received 20 December 2013 Accepted 17 January 2014

Published ahead of print 22 January 2014

Editor: B. W. Caughey

Address correspondence to Katsumi Doh-ura, doh-ura@med.tohoku.ac.jp.

* Present address: Kenta Teruya, Department of Medicinal Chemistry, Graduate School of Medicinal Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kita-ku, Kyoto, Japan.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.03775-13