

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16920

研究課題名(和文) ヒトプリオン病に対する構造ベースに基づくコンビネーションセラピーの確立

研究課題名(英文) Establishment of Structure-Based Combination Therapy for Human Prion Disease

研究代表者

高月 英恵 (Takatsuki, Hanae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80773978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病は異常型プリオンタンパク質が中枢神経系に蓄積することで発症する神経変性疾患である。本研究では、試験管内プリオン増幅法(PMCA法)を用いて薬剤の異常プリオン増幅抑制効果を検証した。

58種類の化合物を治療薬候補化合物としてPMCA反応に添加し、抑制効果を検証したところ、遺伝性ヒトプリオン病馴化株であるFukuoka-1株の増幅を抑える3つの化合物を見出した。そして、スクレイピー馴化株である22L株も同様に実験したところ、興味深いことに10種類の化合物はFukuoka-1株と異なる結果を示し、プリオン株によって薬剤の抗プリオン効果に違いがあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病は異常型プリオンタンパク質が中枢神経系に蓄積することで発症する神経変性疾患である。本研究の成果は2つあり、1つはプリオン株ごとに阻害剤の抑制効果が異なることを明確に示したこと。もう一つはプリオン潜伏感染という現象を初めて発見したことである。今後このメカニズムを解明することで、予防薬の開発のための知見が得られるだけでなく、発症要因が不明であった孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の発症機構の解明につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Prion disease is a neurodegenerative disorder caused by the accumulation of abnormal prion protein in the central nervous system. In this study, we examined the inhibitory effect of drugs on abnormal prion amplification using the in vitro prion amplification assay (PMCA assay).

Fifty-eight compounds were added to the PMCA reaction as candidate compounds for therapeutic agents, and their inhibitory effects were examined. Three compounds were found to suppress the amplification of the Fukuoka-1 strain, an acclimated strain of hereditary human prion disease. However, the scrapie acclimation strain, 22-L, showed different results from those of Fukuoka-1, indicating that the anti-prion effects of drugs differed among prion strains.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プリオン病 試験管内プリオン増幅法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は正常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) が構造変換し、異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) となり、中枢神経系に蓄積することで認知症や様々な運動障害を呈する致死性神経変性疾患である。プリオン病はウイルスと同様に株が存在することが特異な点であり、症状・徴候および臨床経過が異なる。プリオン病の予防・治療法はなく、治療薬の開発が急がれている。ヒトプリオン病の 80% を占める孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の発症要因は明らかではなく、遺伝子変異やプリオン感染源との暴露歴がなくとも、年間およそ百万人に 1~2 人の確率で発症する。これまでに抗マalaria薬であるキナクリン、鎮静剤であるフルピリチン、間質性膀胱炎や関節炎の治療薬であるペントサンポリサルフェート (PPS) は臨床研究が行われたが、効果は一過性であり、副作用が問題となった。

### 2. 研究の目的

PrP<sup>Sc</sup> は構造変換(シート構造の増加)によってプロテナーゼ K で消化されにくくなるため、これまで in vitro における抗プリオン薬のスクリーニングはプロテナーゼ K 耐性 PrP (PrP-res) の検出によって行われてきた。しかし、プロテナーゼで消化されてしまう、PrP 10~20 分子程度のオリゴマーは感染性が高いことが報告されており、PrP-res の検出だけでは感染性の指標として十分とは言えない。そこで本研究では PrP-res レベルだけでなく高感度検出法である RT-QuIC 法を応用することにより培養細胞中の感染性オリゴマーの検出を行うことで、真に有効な治療薬の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

プリオン病の治療薬開発には以下の 3 つの課題がある。創薬に応用可能なプリオンのハイスループット・スクリーニング法がないこと、現スクリーニング法では PK 感受性 PrP<sup>Sc</sup> の見落としを懸念していること、治療効果及び副作用の問題である。以上の課題を念頭に置いて本研究ではアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済みの 1200 の薬剤の内、表面プラズモン共鳴イメージング (SPRi) によってヒト PrP<sup>C</sup> に結合することが示された 26 の薬剤および、これまでにマウスプリオン感染細胞において PrP<sup>Sc</sup> 減少効果があると報告された 32 の化合物を治療薬候補化合物として以下の研究を行った。

#### (1) PMCA (Protein misfolding cyclic amplification) 法による化合物のプリオン増幅抑制効果の検証

PMCA 法は健常動物由来脳乳剤 (PrP<sup>C</sup>) を基質としてインキュベーションと超音波処理を繰り返すことで極微量の PrP<sup>Sc</sup> を試験管内で爆発的に複製させる方法である。この方法は脳内で起こる PrP<sup>Sc</sup> の増幅を模倣していると考えられている。PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換を抑制することを目的とした場合、培養細胞系よりも直接的に構造変換抑制効果を評価できる PMCA 法をスクリーニングに用いることが適切であると考えた。ヒトの遺伝性プリオン病 (ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群: GSS) のマウス馴化株である Fukuoka-1 株とヒツジのプリオン病であるスクレイピーの馴化株である 22L 株を PMCA 反応の種 (シード) として用いた PMCA に候補化合物を添加し、プリオン増幅抑制効果を検証した。

#### (2) RT-QuIC 法によるプリオン持続感染細胞中のプリオン活性の検出

プリオン感染細胞内のプリオン活性レベルを評価するため RT-QuIC 法を行う。RT-QuIC 法は PrP<sup>Sc</sup> のオリゴマー ~ アミロイドフィブリルまでを高感度に検出可能なアッセイである。プリオン感染細胞 (Fukuoka-1 株、22L 株感染マウス神経芽細胞種) に候補化合物を添加し、細胞内プリオン活性への影響を調べる。本研究では実験 1) でプリオン株特異的効果が顕著に示されたペントサンポリサルフェートを中心に検証した。

#### (3) ヒトプリオン試験管内増幅系 Hu-iPMCA の構築

ヒトプリオン病の 8 割は孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) である。そこで、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現させたプリオンタンパク質 (Bac-HuPrP) を基質とした sCJD プリオン試験管内増幅系 Hu-iPMCA 法の構築を試みた。

#### (4) 多剤併用療法のための構造ベースドッキング計算によるプリオンタンパク質 化合物相互作用解析

PubChem に 3 次元構造が登録されていない化合物を除き、計 47 種の候補化合物のドッキング計算を行い結合エネルギーおよび結合部位に関してシミュレートし、実験 1) で行った各化合物の PMCA 抑制レベルとの相関性を検証した。

### 4. 研究成果

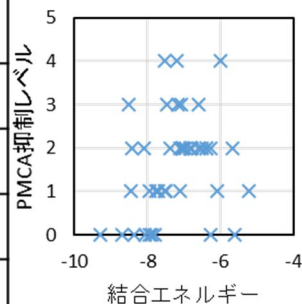
#### (1) PMCA 法による化合物のプリオン増幅抑制効果の検証と (4) 結合エネルギーとの相関性

58 種の化合物のプリオン増幅抑制効果を PMCA 法にて検証した。Fukuoka-1 株に対する強力なプリオン増幅抑制効果を持つ化合物が 3 つ見出された。各化合物の PMCA 抑制レベルとドッキン

グ計算によって示された結合エネルギーには相関がなかった。(右図1)抑制効果が見込まれる2つの薬剤を併用しPMCA抑制効果を検証したところ、相加効果は得られたが、相乗効果は得られなかった。

また、22L株を用いて同様に実験を行い、Fukuoka-1株の結果と比較した。48種の化合物は抑制の程度に差はあるもののFukuoka-1株と同様の結果を示した。しかし残り10種類の化合物の内、4種類はFukuoka-1株では抑制効果が得られたが、22L株では効果が全く得られず、6種類は22L株では抑制効果が得られたが、Fukuoka-1株では効果が全く得られなかった。これらのことからプリオン株によって薬剤の抑制効果が異なることが示唆された。

PMCA産物のWBのバンド強度	PMCA抑制レベル
1-10mMの濃度で50%以上抑制	1
1-10mMの濃度で完全に抑制	2
1mM以下の濃度で50%以上抑制	3
1mM以下の濃度で完全に抑制	4



ペントサンポリサルフェート(PPS)を用いた実験ではこのプリオン株特異的な抑制効果がより明確に示された。スクレイピー馴化株である22L株、Chandler株およびME7株ではPPSによる異常型プリオンタンパク質増幅抑制効果が示されたが、Fukuoka-1株およびmBSE株においてはスクレイピー由来株ほどの抑制効果は得られなかった。(右図2)これまでにPPSはスクレイピー株感染細胞及び感染マウスにおいてプリオン阻害効果が認められ、臨床試験が日本とイギリスで行われた。しかし孤発性CJD、BSE由来の変異型CJDおよび遺伝性プリオン病(GSS)の患者において治療効果は得られなかった。本研究で明示されたPPSのプリオン株特異的なPMCA抑制効果は、in vivoにおけるPPSのプリオン阻害・治療効果を裏付ける結果となった。

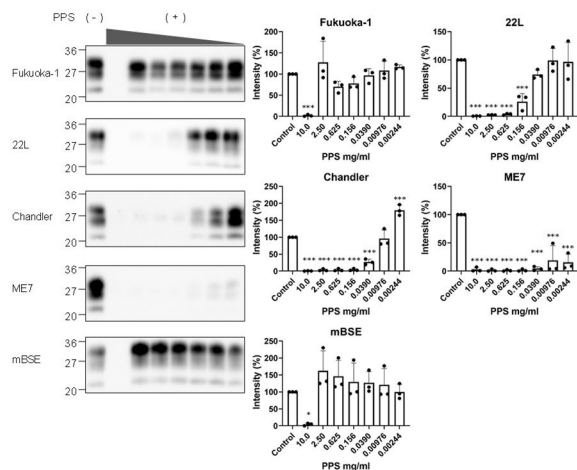


図2. PPSによる異常型プリオンタンパク質増幅抑制効果。Fukuoka-1株およびmBSE株では10mg/ml、22L株では156 $\mu$ g/ml以上、Chandler株では39 $\mu$ g/ml以上の濃度で抑制効果を示した。ME7では2.44 $\mu$ g/mlの低濃度でも抑制効果があった。

### (2) RT-QuIC法によるプリオン活性の検出

これまでのスクリーニングではプロテアーゼ耐性の異常型プリオンタンパク質(PrP-res)を指標としていたため、プロテアーゼで消化されるPrP 10~20分子の高いプリオン感染性や神経毒性をもつオリゴマーを見落としていた。本研究ではパイロットスタディとしてPPS処理したマウスプリオン持続感染細胞のプリオン活性をRT-QuICを用いて測定した。22L株においてはPrP-resおよびプリオン活性が検出されなくなった後に培地からPPSを除き、25回継代培養を行ってもPrP-resおよびプリオン活性が戻ることはなかった。しかし、Fukuoka-1株においてはPrP-res消失後もプリオン活性は低いながらも残存し、そしてPPSを培地から除くとプリオン活性およびPrP-resは元のレベルまで回復した。つまりPPSによってFukuoka-1株感染細胞はプリオン潜伏感染が誘導されることが明らかとなった。

### (3) ヒトプリオン試験管内増幅系Hu-iPMCAの構築

実験1) 2)の結果はヒトのプリオン病治療薬の開発にはヒトプリオン(CJD)のスクリーニング系の確立が必須であること示している。しかし実験1)のPMCA法ではCJDプリオンを増幅することはできない。我々はPMCA bufferの組成および補助因子の添加によりCJDプリオンの増幅を試みたが、反応に48時間以上かかるうえスクリーニングに応用できるほどの増幅効率が得られなかった。そこで、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現させたプリオンタンパク質(Bac-HuPrP)を基質としたHu-iPMCAの構築を試みた。Bac-HuPrPwtと、遺伝子多型である129番目のメチオニンをバリンに変更したBac-HuPrP129Vを作成し条件検討を行った。現時点では反応に必要な補助因子候補が見出されており16時間でプリオン増幅が可能となったが、増幅効率が安定していない点が課題である。

本研究の成果は2つある。1つはプリオン株ごとに阻害剤の抑制効果が異なることを明確に示したことである。もう一つは培養細胞におけるプリオン潜伏感染という現象を初めて発見したことである。PPSによって細胞内のプリオン活性が1000-10000分の1に減少しているにもかかわらず、細胞内分解機構から逃れ活性を維持し続けている。このメカニズムを解明することで、予防薬の開発のための知見が得られるだけでなく、発症要因が不明であった孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の発症機構の解明につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hanae Takatsuki, Tsuyoshi Mori, Morikazu Imamura and Ryuichiro Atarashi
2. 発表標題 Pentosan polysulfate induces latent prion infection in Fukuoka-1 strain-infected cells
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------