

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390172

研究課題名（和文）プリオン病の発病抑制に関わる宿主の新規防御機構の実証と新規治療標的因子群の発見

研究課題名（英文）Investigation on host defense mechanism and search for new therapeutic targets against prion diseases

研究代表者

堂浦 克美（DOH-URA KATSUMI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00263012

研究成果の概要（和文）：

プリオン病に対して長期間にわたる優れた発病抑制効果を発揮する化合物の作用機構を解明することで、プリオン病に対する生体防御機構解明の糸口を得ようとした。化合物投与により誘導される宿主因子群の解析から、特異的に変動する一群のサイトカイン・ケモカインに関連する遺伝子群を絞り込み、細胞レベルならびにヒボレベルでの評価作業から、治療標的分子を選択した。一方、マウス系統差の解析から、胸腺細胞の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the host defense mechanism against prion diseases, host factors induced by the administration of a long-acting prophylactic compound were analyzed, using the technology of genomics and proteomics. Consequently, several specifically induced cytokines or chemokines were identified. Following the evaluation of their therapeutic or prophylactic effects in prion-infected cells or animals, new therapeutic targets related to such immunological factors were selected. Besides, by the analysis of animal strain difference in the compound activity, involvement of thymus cells in the prophylactic effects was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学

1. 研究開始当初の背景

ヒトプリオン病の約80%は、原因や感染経路が特定できない孤発性(特発性)クロイツフ

エルト・ヤコブ病(CJD)であり、初老期～老年期で稀に発生する。一方、変異型CJD、医原性プリオン病、kuruなどの後天性プリオン

病では、感染源に同程度に暴露されたにもかかわらず、予想よりはるかに少人数(1/100~1/1000)で発病が観察されている。また、英国において大きな問題となっているのが変異型 CJD の未発症キャリアーの存在である。未発症キャリアーのリンパ網内系組織ではプリオンが増殖し、血液中にもプリオンが存在するためである。このような事実は、プリオン病は特定のヒトで発病が起こることを示唆している。また、遺伝性プリオン病においては、同一の遺伝子変異でも、発症時期や発症率にはバリエーションがあり、この現象は遺伝子変異が疾患を起こす力と疾患が起こるのを防ぐ宿主要因や外的要因の力の駆引き具合(浸透率)で説明される。

一方、最近ではプリオンが protein misfolding cyclic amplification (PMCA) と呼ばれる方法で試験管内増幅できることが盛んに報告されるようになった。そんな中で、現在最もホットなトピックは、プリオンの存在がなくても健常な個体の脳組織から PMCA でプリオンが試験管内で *de novo* に産生されることを示す報告である (Proc Natl Acad Sci USA. 104(23):9741-9746, 2007; PLoS Pathog 5:e1000421, 2009)。このことは、病原因子プリオンがユビキタスに存在し、健常な個体でもプリオンが絶えず少量は産生されていることを示唆している。

さらに、プリオン病は感染から発病までの潜伏期間が数年から数十年にわたる遅発性疾患であり、そのメカニズムはまったく不明であるが、長期間の潜伏期間中はプリオンの増殖が抑制されている。動物実験では腹腔内に感染材料を接種すると、接種直後の脾臓では高い感染力価が観察されるが、日数の経過とともに脾臓中の感染力価は測定感度以下にまで一旦低下する。さらにしばらく日数が経過すると脾臓中の感染力価は再度上昇して

くることがわかっている。

以上のことから、私たちの体内にはプリオンの増殖を抑え発症を防ぐ疾患感受性に関わる防御機構が備わっており、その防御機構は何らかの外的要因等の影響を受けて発病を修飾していると予想される。

2. 研究の目的

最近、研究申請者はセルロース誘導体化合物 (CE) をプリオン感染動物の皮下、腹腔内あるいは静脈内に単回投与、または経口で連日投与すると、劇的な発症遅延効果が見られることを発見した。CE は生体不活性物質として知られ、薬剤の賦形剤や食品添加物などとして私たちの日常生活の極めて多様な分野で使われている化合物であり、日常少なからず経口摂取しており、一部は腸管から吸収されている。特に、感染早期に CE を皮下に単回投与すれば、ほぼ生涯にわたり発症が抑えられる。また、驚くべき事に CE を皮下に単回投与した 1 年後に、プリオンを脳内感染させた場合であっても、発症は劇的に遅延する。本研究は、CE のプリオン病発症抑制に関わる宿主の実行因子を探索し、未知の宿主防御機構の存在を解明する糸口を見つけ出すことが目的である。また、実行因子候補の下流因子や実行因子の発現調節因子群からプリオン病に対する新たな創薬標的分子群の候補となるものがないかどうかを調べることも目的である。

3. 研究の方法

研究は、(1) CE 感受性動物と CE 非感受性動物を用いて、CE 投与により末梢や脳内で誘導される因子群の探索と同定、(2) プリオン感染細胞やプリオン感染動物を用いて、プリオン抑制作用をもつ CE 誘導因子群の評価と同定、(3) *in vitro* 実験系における CE

代替化合物の探索よりなる。

(1) C E誘導因子群の探索: 分子発現解析、組織学的解析、免疫細胞学的解析よりなる。分子発現解析では、経時的にC E投与マウスより脾臓や脳を取り出し、DNA マイクロアレイ解析や SELDI 蛋白質解析、TOF-MS/MS 蛋白質解析を行い、リアルタイム RT-PCR やウエスタンブロット等にてC E投与により mRNA や蛋白質の発現が特異的に変動する宿主因子を探索した。C E感受性動物とC E非感受性動物で比較を行い、各動物で変動する宿主因子を抽出した。

組織学的解析では、C E投与マウスの脾臓と脳の免疫細胞の浸潤の有無と脳内のグリア細胞の活性化を免疫組織学的に解析した。また、免疫関連因子(サイトカイン/ケモカイン・接着分子・主要組織適合抗原)の発現を経時的に免疫組織学的に観察し、変動する因子を探索した。

C Eはマクロファージ系細胞とT細胞の相互作用を介してプリオン抑制活性を発揮していることが推察されたため、免疫細胞学的解析では、C E感受性動物とC E非感受性動物において、C E投与群と対照群からそれぞれ脾臓マクロファージ・末梢血由来樹状細胞・Tリンパ球を分離し、LPS やレクチン刺激下で産生するケモカインを単培養と共培養で比較定量し、C E投与群で変動する因子を調べた。

(2) プリオン抑制因子群の探索

上記の解析で抽出できたC E投与により発現変動する宿主因子について、プリオン感染細胞を用いてプリオン増殖抑制作用の有無を評価した。具体的には、各因子に対して siRNA による遺伝子ノックダウンや遺伝子導入による一過性高発現実験、組換え蛋白質・特異抗体・選択的阻害剤の培養上清中への添加実験により、感染細胞中のプリオン増殖が

影響を受けるかどうかを解析した。さらに、これらの因子の遺伝子について入手可能な遺伝子改変動物については、in vivo で発病抑制効果を確認した。

(3) C E代替化合物の探索

C E投与により誘導される効果因子の下流因子、またはその因子の発現調節機構に作用する低分子化合物のスクリーニングを行い、C E効果を代替できるより効果的な薬物の開発を検討した。

4. 研究成果

C E投与により免疫系組織あるいは脳内で誘導される宿主因子群を探索するため、DNAアレイ解析・蛋白質解析による組織全体レベルでの分子発現解析、in situ の免疫組織学的解析、そして試験管内での免疫細胞学的解析を行った。その結果、C E投与により変動する一群のサイトカイン・ケモカインに関連する遺伝子群を絞り込むことができた。絞り込んだ遺伝子のうち、ランダムに選んだものについてプリオン感染細胞において過発現あるいはノックダウンによる遺伝子発現変動を行い、プリオン抑制効果の評価を実施したが、検討した全ての因子において有意な効果を示すものはなかった。

また、C E投与が免疫系細胞機能に与える影響とそのマウス系統差の解析を行った。その結果、免疫細胞学的解析ではC E投与群と非投与群のマクロファージ系細胞に由来する因子群について検討したが、プリオン感染細胞で評価した限りでは抗プリオン作用を発揮するものは観察されなかった。

一方、マウス系統差と免疫系細胞機能との解析では、新生時期胸腺摘出術を施行した動物で顕著にC E効果が修飾されるという結果が得られた。すなわち、特定の胸腺細胞がC E効果に大きく影響を与えていると考えら

れた。また、CE投与により誘導される特定のサイトカインのうち、上記のランダム解析で漏れていた因子群を網羅的にプリオン感染細胞やビボで再検討したところ、ビボで有意な延命効果を示し抗プリオン活性を発揮するサイトカインを発見した。さらに、このサイトカインに関連する治療標的分子を探索し、その標的分子に対する低分子化合物をビボで投与して評価を行い、効果は極めて弱いもののCE効果の一部を代替することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- 1) Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology*. 査読有 2012 ; 32:124-132. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01245.x.
- 2) Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and selectivity of the marine toxin neodysiherbaine A and its synthetic analogues to GluK1 and GluK2 kainate receptors. *J Mol Biol*. 査読有 2011 ; 413(3) : 667-683. doi: 10.1016/j.jmb.2011.08.043.
- 3) Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem*. 査読有 2011 ;46(7):2917-2929. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.04.016.
- 4) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Ohmoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2011 ;405(2):285-290. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.030.
- 5) Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K. Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells. *Protein J*. 査読有 2010 ;29(7):493-500. doi: 10.1007/s10930-010-9278-9.
- 6) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 査読有 2010 ; 37(5):934-941. doi: 10.1007/s00259-009-1314-7.
- 7) 逆瀬川 裕二, 堂浦 克美.【認知症学 下-その解明と治療の最新知見-】臨床編 プリオン病の診断と治療 孤発性プリオン病 Creutzfeldt-Jakob病と治療薬開発. *日本臨床* 査読無 2011;69:411-414.
- 8) 逆瀬川 裕二, 木村 朋寛, 堂浦 克美. プリオン病の疫学から治療まで プリオン病の分子標的治療薬の開発. *NEUROINFECTION* 査読無 2011;16:79-86.

[学会発表] (計19件)

- 1) 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
- 2) Kurahashi H, Doh-ura K. Applicational research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnql Δ 100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 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. Prion2012, Amsterdam (Netherlands), May 09-12, 2012
 - 6) Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011
 - 7) Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011
 - 8) Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. Acidic CC Chemokines are upregulated in RML-Prion-Infected Neuroblastoma N2a Cells. Prion2011, Montreal (Canada), May 16-19, 2011
 - 9) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T, Doh-ura K. Ando T, Ohmoto A. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. Prion2011, Montreal (Canada), May 16-19, 2011
 - 10) Sakasegawa Y, Nakabayashi S, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. CC chemokines are upregulated in prion-infected neuroblastoma cells. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
 - 11) Kimura T, Nishizawa K, Doh-ura K. Search for endogenous factors involved in the abnormal PrP formation in prion-infected cells. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
 - 12) Teruya K, Doh-ura K. A thioflavin derivative facilitates cross-linking of abnormal PrP but not normal PrP. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
 - 13) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Oguma A, Nishizawa K, Doh-ura K. Anti-prion activities of PSK in vitro and in vivo -further evaluation of its function-. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, July 24-25, 2010
 - 14) 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，東京，2012年12月2日
- 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，東京，2012年5月25日
- 16) 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，東京，2011年11月5日
- 17) 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，2011年10月23日
- 18) 逆瀬川 裕二、堂浦 克美。熱ショック蛋白質Hsp90のリコンビナントプリオン蛋白質に対する部分変性活性は低濃度Cu (II) イオンによって可逆的に制御される。第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010年12月7日-10日
- 19) 堂浦 克美。ヤコブ病の克服研究。第4回プリオン病の市民講座 食と医療の安全ーBSE・ヤコブ病・鳥インフルエンザ・口蹄疫ー，東京，2010年11月23日

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

- 1) 名称：コンフォメーション病医薬組成物
 発明者：堂浦 克美
 権利者：東北大学、伊藤ハム株式会社
 種類：国内特許
 出願番号 (出願日)：特願2008-512153 (2007年4月20日)
 特許番号 (登録日)：特許第4981036号
 取得年月日：2012年4月27日
 国内外の別：国内
- 2) 名称：異常型プリオン蛋白質の濃縮方法、および除去方法
 発明者：堂浦 克美、照屋 健太、竹中 繁織、大塚 圭一

権利者：東北大学、九州工業大学

種類：国内特許

出願番号 (出願日)：特願2006-071881 (2006年3月15日)

特許番号：特許第4769925号

取得年月日：2011年7月1日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.prion.med.tohoku.ac.jp/prion.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂浦 克美 (DOH-URA KATSUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00263012

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：