

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16126

研究課題名(和文) 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病に対する集学的治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a multidisciplinary treatment for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

研究代表者

中垣 岳大 (NAKAGAKI, Takehiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80722917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトプリオンタンパク発現マウス(KiChMマウス)に孤発性クロイツフェルトヤコブ病由来のプリオン株を頭蓋内接種して、有効な投与条件を検討した。感染マウスの発症前(感染80日後)と発症後(感染110日後)にヒト不死化骨髄間葉細胞(MSC)を投与した。その結果、発症後投与群でも対照群と比較して15日間生存期間が延長した。さらに、投与細胞数を検討したところ、1,000,000個投与群は対照群と比較して有意な生存期間の延長が認められたが、2,000,000個投与群では生存期間が延長しなかった。以上より、hMSCはマウスの発症後から1,000,000個投与すればよいことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

sCJDは急速に認知症が進行し、無動無言を経て死に至る。今のところ有効な治療法が確立されていないため、治療法の開発は急務である。我々は免疫抑制剤FK506(タクロリムス)を中心に治療薬の探索を行ってきた。本研究では、新規化合物や骨髄間葉系細胞とFK506という作用機序の異なる治療法を組み合わせることで、sCJDの克服を目指すものである。本研究成果を発展させることで、sCJDをはじめとするプリオン病の克服だけでなくアルツハイマー病やレビー小体型認知症など、他の神経変性疾患の治療法の確立にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human prion protein-expressing mice (KiChM mice) were intracerebrally inoculated with brain homogenate derived from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. At first, we compared the timing of administration of immortalized human mesenchymal stromal cells (hMSC). The mice were divided into three groups (PBS, before onset-treatment and after onset-treatment group). When we compared survival periods, there were no significant differences between each group whereas after onset-treatment group survived 15 days longer than PBS group. Next, we compared the number of cells for the administration between million cells and two million cells. The mice administered with million cells showed a significant prolongation of survival compared to the control group whereas the two million cells group did not. These results suggested that million hMSC is enough for the treatment of diseased mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：クロイツフェルトヤコブ病 骨髄間葉系細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病の病原体である「プリオン」の本体は、正常型プリオンタンパク(PrP^C)が構造変換した異常型プリオンタンパク(PrP^{Sc})とされている。PrP^{Sc}はPrP^Cを構造変換することで脳内に沈着し、グリア細胞の増生も加わって神経細胞が脱落する。これまでは主にPrP^{Sc}の産生を抑制する薬剤が開発されてきたが、今のところ有効な治療法は確立されていない。その理由として、発症時には既に患者さんの脳内ではPrP^{Sc}の蓄積や神経細胞の脱落が起こっていることから、治療薬を単独で使用しても効果が得られにくいということ、多くの実験で用いられているプリオンは、ヒトやヒツジなどプリオン病罹患動物由来のプリオンをマウスに接種して順化させたマウスプリオン株であり、ヒトプリオン病のプリオン(ヒトプリオン)とは特性が異なるということが考えられる。以上の理由からプリオン病の治療法確立のためには、ヒトプリオン感染モデルを用いて作用機序の異なる治療薬の組み合わせを評価することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

我々は、孤発性クロイツフェルトヤコブ病(sCJD)患者由来の脳乳剤をヒト化プリオンノックインマウス(KiChMマウス)に接種し、その発症後から免疫抑制剤FK506(タクロリムス)を投与したところ、グリア細胞の活性化を抑制し、マウスの生存期間が約20日間延長した。(Nakagaki et al., *Neurotherapeutics* in press)これは今のところ、ヒトプリオン感染モデルで治療効果が確認された唯一の報告である。また、マウスプリオン株感染マウスにヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)を投与すると、神経細胞へ分化して、マウスの生存期間が延長することが報告されている。(Song et al., *J Virol.* 2009)そこで我々はFK506とhMSC、構造変換阻害剤を組み合わせた治療法の確立を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究ではsCJD患者由来のプリオン株を頭蓋内接種したKiChMマウス(sCJDプリオン感染マウス)に不死化hMSCの投与時期、細胞数の検討を行った。

不死化hMSCの培養方法および投与前処理

不死化hMSC(UE7T13細胞)はヒトMSCにHPVのE7とhTERTを導入して不死化した細胞である。(Mori T et al., *Mol Cell Biol.* 2005) 培地条件の検討の結果、10% FBS含有MEM alphaで問題なく継代できることを確認した。

投与当日に細胞をトリプシンで回収、PBSで洗浄後、PBSで細胞を懸濁した。細胞懸濁液は100 μ Lずつ尾静脈から投与した。対照群にはPBSを同様に投与している。なお、各マウスへの投与は一回のみである。

実験1 投与時期の検討

sCJDプリオン感染マウスの発症前(感染80日後)もしくは発症後(感染110日後)にhMSCを尾静脈より投与した。細胞の投与量は1匹あたり 1×10^6 個である。発症前投与群は2匹、発症後投与群は3匹、対照群は4匹であった。

実験2 投与量の検討

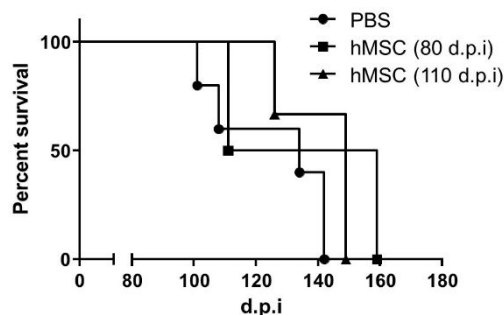
sCJDプリオン感染マウスをPBS投与群(n=3)、細胞数 1×10^6 個投与群(n=5)、細胞数 2×10^6 個投与群(n=6)の3群に分け、感染110日後に尾静脈より投与した。

4. 研究成果

実験1 投与時期の検討

PBS投与群では平均生存期間が 125.4 ± 19.5 日であった。発症前投与群は 135 ± 33 日、発症後投与群は 141.3 ± 13.3 日であった。発症前、発症後投与群に生存期間の差はほとんど認められなかった。またマウスの匹数が少ないため有意な差は認められないものの、発症後投与群は対照群と比較しておよそ15日間の生存期間の延長が認められた。(図1)

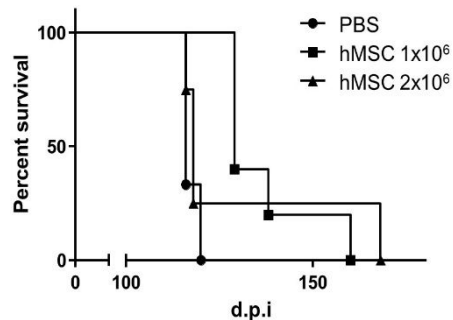
図1: 投与時期による治療効果の比較



実験2 投与量の検討

PBS投与群の平均生存期間が 117.3 ± 2.3 日(中央値116日)であった。 1×10^6 個投与群では平均生存期間が 137 ± 13.4 日(中央値129日)となり、PBS投与群と比較して有意に生存期間が延長した。(p<0.01)
 2×10^6 個投与群では未だ生存しているマウスが2匹いるが、残り4匹のマウスは生存期間120日未満であり、PBS投与群と比較しても生存期間は延長しなかった。(図2)

図2: 投与細胞数による治療効果の比較



この結果から、投与細胞数が多い場合、治療効果は非常に優れているが、何らかの副作用によって死亡する危険性もあると考えられる。

以上の結果より、hMSCの投与条件として、発症後に 1×10^6 個投与で治療効果が得られることが分かった。その一方で投与するMSCの数は多ければ多いほど良いというわけではないと考えられる。今後、それぞれのマウスの病理学的変化を検討して、 2×10^6 個投与群で生存期間が延長しなかった原因を探るとともに、FK506やPrPの構造変換阻害剤との併用療法を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagaki Takehiro, Ishibashi Daisuke, Mori Tsuyoshi, Miyazaki Yukiko, Takatsuki Hanae, Tange Hiroya, Taguchi Yuzuru, Satoh Katsuya, Atarashi Ryuichiro, Nishida Noriyuki	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Administration of FK506 from Late Stage of Disease Prolongs Survival of Human Prion-Inoculated Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-020-00870-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Adachi Toshiyuki, Adachi Tomohiko, Nakagaki Takehiro, Ono Shinichiro, Hidaka Masaaki, Ito Shinichiro, Kanetaka Kengo, Takatsuki Mitsuhsa, Nishida Noriyuki, Eguchi Susumu	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Difference in driver gene expression patterns between perihilar and peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma in an experimental mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Takehiro, Satoh Katsuya, Homma Takujiro, Nakagaki Takehiro, Yamaguchi Naohiro, Atarashi Ryuichiro, Sudo Yuka, Uezono Yasuhito, Ishibashi Daisuke, Nishida Noriyuki	4. 巻 525
2. 論文標題 Prion protein interacts with the metabotropic glutamate receptor 1 and regulates the organization of Ca ²⁺ signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 447 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Satoh Katsuya, Fuse Takayuki, Nonaka Toshiaki, Dong Trong, Takao Masaki, Nakagaki Takehiro, Ishibashi Daisuke, Taguchi Yuzuru, Mihara Ban, Iwasaki Yasushi, Yoshida Mari, Nishida Noriyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Postmortem Quantitative Analysis of Prion Seeding Activity in the Digestive System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4601 ~ 4601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24244601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fuchigami Takeshi, Kawasaki Masao, Koyama Ryusuke, Nakaie Mari, Nakagaki Takehiro, Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Ono Masahiro, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of Radioiodinated Benzofuran Derivatives for in Vivo Imaging of Prion Deposits in the Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2003 ~ 2013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.8b00184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Daisuke, Homma Takujiro, Nakagaki Takehiro, Fuse Takayuki, Sano Kazunori, Satoh Katsuya, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro, Nishida Noriyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awz016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Yukiko, Ishikawa Takeshi, Kamatari Yuji O., Nakagaki Takehiro, Takatsuki Hanae, Ishibashi Daisuke, Kuwata Kazuo, Nishida Noriyuki, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 367 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1088-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Satoh Katsuya, Ishibashi Daisuke, Nakagaki Takehiro, Iwasaki Yasushi, Yoshida Mari, Murayama Shigeo, Mishima Kenichi, Nishida Noriyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 3916-3930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-017-0624-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Ken, Ishikawa Takeshi, Otaki Hiroki, Mizuta Satoshi, Hamada Tsuyoshi, Nakagaki Takehiro, Ishibashi Daisuke, Urata Shuzo, Yasuda Jiro, Tanaka Yoshimasa, Nishida Noriyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Structure-based drug discovery for combating influenza virus by targeting the PA-PB1 interaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10021-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Satoh Katsuya, Ishibashi Daisuke, Nakagaki Takehiro, Iwasaki Yasushi, Yoshida Mari, Murayama Shigeo, Mishima Kenichi, Nishida Noriyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 3916-3930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-017-0624-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Yukiko, Ishikawa Takeshi, Kamatari Yuji O., Nakagaki Takehiro, Takatsuki Hanae, Ishibashi Daisuke, Kuwata Kazuo, Nishida Noriyuki, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1088-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中垣岳大、的場苑子、石橋大輔、西田教行
2. 発表標題 炭酸水素カルシウムメゾ構造体によるプリオン不活化能の検討
3. 学会等名 第55回ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiro Nakagaki
2. 発表標題 Administration of FK506 prolongs survival of mice with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease agent
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----