

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07277

研究課題名（和文）次世代ヒトプリオン増幅法の構築とヒトプリオン病創薬スクリーニングへの応用

研究課題名（英文）Construction of a next-generation human prion amplification method and its application to drug screening for human prion diseases

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：2つの試験管内プリオン増幅法を用いて、プリオン病治療薬のスクリーニングを試みた。結果、遺伝性ヒトプリオン病GSS馴化株であるFukuoka-1株を抑制する化合物を見出した。しかし、この化合物は薬剤耐性プリオンが出現することが示唆された。Fukuoka-1株プリオン感染マウスへの治療効果を調べたところ、投与したマウスの生存期間は非投与群と有意差はなかった。一方、感染90日後から投与したマウスの生存期間は延長した。動物試験を行う前に薬剤耐性化を見抜くことは治療薬開発の効率化の鍵となる。今後、試験管内プリオン増幅法が薬剤耐性プリオンの出現を予測するツールに成り得るか検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は致死性神経変性疾患であり治療法はない。これまでに治療薬として期待された化合物にはプリオン感染細胞で抑制効果が示されたものの、感染マウスにおける耐性プリオンの出現により有効性が制限された事例もある。長期に及ぶ動物試験を行う前に薬剤耐性プリオンの出現を見抜くことは治療薬開発の効率化の鍵となる。本研究で見出された治療薬候補化合物は動物試験において薬剤耐性プリオンが出現したことが示唆され、試験管内プリオン増幅法においても耐性プリオンが出現することが確認された。今後、試験管内プリオン増幅法が薬剤耐性プリオンの出現を予測するツールに成り得るか検討する。

研究成果の概要（英文）：Two in vitro prion amplification methods were used to screening for prion disease therapeutics. As a result, we found a compound that inhibited the Fukuoka-1 strain. However, this compound was suggested to produce drug-resistant prions by in vitro prion amplification. When the therapeutic effect of this compound on mice infected with the Fukuoka-1 prion strain was examined, survival of the treated mice was not significantly different from that of the non-treated group. On the other hand, survival of mice treated with the compound from 90 days after infection was prolonged. Detecting drug resistance before conducting animal studies is a key to improving the efficiency of therapeutic drug development. In the future, we will examine whether in vitro prion amplification can be a tool to predict the emergence of drug-resistant prions.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：プリオン病 試験管内プリオン増幅法

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^C) が構造変換し、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) 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感染性の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、発症年齢、症状・徴候および臨床経過が異なる他、プリオンタンパク質の生化学的特性も異なっている。現在プリオン病の予防・治療法はなく、治療薬の開発が急がれている。クロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるヒトプリオン病の治療薬開発には以下の3つの課題がある：①ヒトプリオン治療薬開発のためのスクリーニング方法がないこと、②治療薬の抑制効果の評価方法がプロテアーゼ耐性 PrP (PrP-res) の検出であること、および③単剤療法における副作用の問題である。とくに課題①のため、これまでの創薬の初期段階で重要となる一次スクリーニングではヒツジのプリオン病であるスクレイピーのマウス馴化株を用いることがほとんどである。しかし、プリオン株によって薬剤効果は異なっているため、ヒトプリオンへの抑制効果を正しく検証することが不可能であった。

プリオン株によって種間伝播および細胞や実験動物体内での増幅効率は異なっており、スクレイピー由来株は培養細胞およびマウスに易感染し増幅する。しかしヒトプリオン病の約8割を占める孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) のプリオンは細胞やマウスへの感染が容易ではない。これまでに孤発性 CJD プリオン持続感染細胞の作製が試みられてきたが未だ樹立できず、さらにヒトプリオンタンパク質発現 (TgHuPrP) マウスにおいても発症までに約200日かかることからヒトプリオン病創薬は困難を極めている。試験管内でプリオン増幅させる方法として PMCA 法 (Protein misfolding amplification assay) がある。PMCA 法は健常動物由来脳乳剤 (PrP^C) 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^{Sc} を試験管内で爆発的に複製することを可能とし、この方法は脳内で起こる PrP^{Sc} の増幅を模倣していると考えられている。しかしヒトプリオンを効率的に増幅させる PMCA 法は確立されていない。本研究ではヒトプリオン増幅に必要な補因子を特定し、効率的な増幅を可能とする基質を作製することでヒトプリオン病創薬のスクリーニング系を確立する。

2. 研究の目的

本研究では学術背景に述べた3つの課題を念頭に置き、ヒトプリオン試験管内増幅系の構築とプリオン活性を指標とした抗プリオン薬の評価を行うことで真に有効な治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒトプリオン病治療薬の開発に向けて以下の目標を達成する。

- I) ヒトプリオン株の試験管内増幅系の構築とスクリーニングへの応用
- II) 分子動力学計算による PrP-化合物の結合予測
- III) RT-QuIC 法を用いたプリオン活性抑制効果の検証
- IV) ヒトプリオン感染マウスへの治療効果の検証

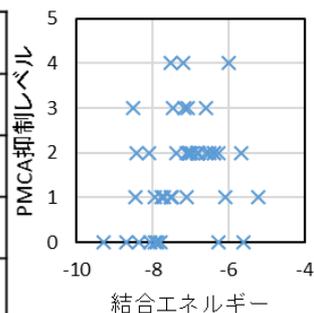
4. 研究成果

本研究では試験管内プリオン増幅法を用いて、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) に結合することで異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) への構造変換を抑制するプリオン病治療薬のスクリーニングを試みた。表面プラズモン共鳴イメージングによって PrP^C に結合することが判明した化合物および、これまでにプリオン抑制効果が認められている化合物の計58種類の候補化合物を PMCA 反応系およびプリオン感染細胞に添加し、抑制効果を検証した。

I) ヒトプリオン株の試験管内増幅系の構築とスクリーニングへの応用および、II) 分子動力学計算による PrP-化合物の結合位置の予測

バキュロウイルス-昆虫細胞発現系にて発現させた PrP^C を基質とした試験管内プリオン増幅法 (PMCA) により、ヒトプリオン (クロイツフェルト・ヤコブ病: CJD) 増幅系の構築を試みたが、現時点ではスクリーニングへの応用可能レベルには到達できていない。そこで遺伝性ヒトプリオン病 GSS 馴化株である Fukuoka-1 株をターゲットとしてスクリーニングを行った結果、Fukuoka-1 株の増幅を抑える4つの化合物を見出した。候補化合物の PMCA 抑制レベルとドッキング

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



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。(上図) 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。

III) RT-QuIC 法を用いたプリオン活性抑制効果の検証

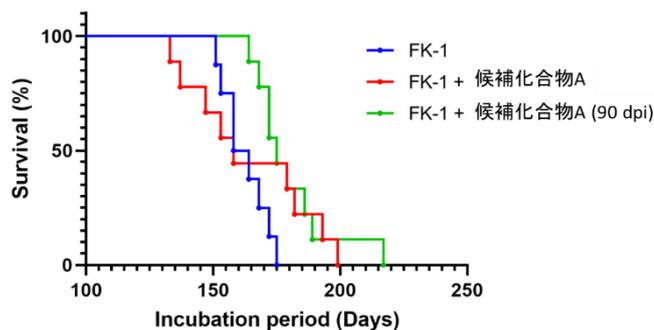
これまでのスクリーニングではプロテアーゼ耐性の異常型プリオンタンパク質 (PrP-res) を指標としていたため、プロテアーゼで消化される PrP 10~20 分子の高いプリオン感染性や神経毒性をもつオリゴマーを見落としていた。本研究では当研究室が開発した RT-QuIC 法を用いて感染性オリゴマーを検出することで有効性の評価を行った。

候補化合物をプリオン持続感染細胞の培地に添加し、抑制効果を RT-QuIC 法を用いてプリオン活性を評価したところ、プリオン株ごとに阻害剤の抑制効果が異なることが示された。また、一部のプリオン株感染細胞では潜伏感染が誘導されていることが明らかとなった。

IV) プリオン感染マウスへの治療効果の検証

実験 I-III) で見出した候補化合物 A の予防・治療効果をプリオン感染マウスにて評価した。感染早期 (感染直後) と感染後期 (感染後 90 日) 開始の 2 群で行い予防・治療効果を検証した。

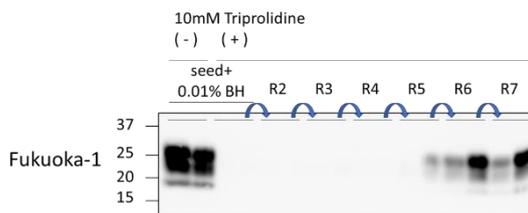
候補化合物 A を投与した Fukuoka-1 株プリオン感染マウスの生存期間 (164.6 ± 24.4 日) は、無投与群 (162.4 ± 8.8 日) と有意差はなかった。一方、感染 90 日後から候補化合物 A を投与したマウスの生存期間は延長した (180.2 ± 16.0 日)。



(考察)

候補化合物 A はプリオン感染細胞の PrP-res (プロテアーゼ耐性 PrP) を消失させたが、化合物存在下で継代培養を繰り返しても RT-QuIC 法で検出されるプリオン活性は低いながらも残存した。また、候補化合物 A は PMCA におけるプリオンの増幅を抑制するが、PMCA による増幅を連続して行くと耐性プリオンが出現することが明らかとなった。(右図) 以上の結果と IV) の動物試験の結果を考慮すると薬剤耐性プリオンが出現した可能性が考えられた。

これまでに国内外の研究において様々な治療薬候補化合物が見出されてきたが、in vitro で効果があっても動物試験で効果が出ない研究報告も多い。米国の S. B プルシナーたちのグループは、2-アミノチアゾール (IND24) はスクレイピー由来 RML 株感染マウスの潜伏期間を延長させたが、薬剤耐性プリオンが出現することを報告している。(D. B. Berry, PNAS (2013)) 動物試験を行う前に迅速に耐性化を見出すことは治療薬開発の効率化の鍵となる。今後、試験管内プリオン増幅法 (PMCA 法、RT-QuIC 法) が耐性プリオンの出現を予測するツールに成り得るか検討する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanae Takatsuki, Morikazu Imamura, Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pentosan polysulfate induces low-level persistent prion infection keeping measurable seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12049-z	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高月英恵
2. 発表標題 試験管内プリオン増幅法を用いた抗プリオン薬の再評価と薬剤耐性プリオンの分子機構の解明
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takatsuki Hanae
2. 発表標題 Pentosan polysulfate induces latent prion infection in cell cultures infected with Fukuoka-1 strain
3. 学会等名 APPS 2021 Online（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hanae Takatsuki, Morikazu Imamura, Takehiro Nakagaki, Miho Kaneko, Tsuyoshi Mori, Noriyuki Nishida, Ryuichiro Atarashi
2. 発表標題 Investigation of the effect of the emergence of drug-resistant prion in mice
3. 学会等名 APPS 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	中垣 岳大 (Nakagaki Takehiro) (80722917)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

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
---------	---------