

厚生労働科学研究委託事業 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））  
 委託業務成果報告（総括）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学（神経内科学） 教授

**研究要旨** プリオン病、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)、進行性多巣性白質脳症(PML)の克服を目標に、分子病態解明、それに基づく治療・予防法開発を目的に研究を実施し以下の成果を得た：(1) プリオン病：プリオン病の神経変性に関与する標的分子を阻害する2つの新規化合物の同定、プリオン蛋白発現低下技術の確立、プリオン分解に関与する宿主因子の同定、スクレイパー発症同一個体内における複数のプリオンの混在の解明、CJD-V180I 変異マウスの作成、治療薬開発のためのポストミトテイクな感染細胞モデルの確立、iPS細胞を神経細胞に分化させる新規化合物の発見、異種間プリオン感染能の異なる酵母プリオン凝集体の同定、プリオンへのIRF3を介した免疫応答におけるOct-1発現関与の解明、プリオン感染におけるケモカインCXCL10遺伝子発現上昇、ヒトニューロブラストーマPRNP欠損細胞の樹立、硬膜移植CJD例における脳血管Aβ沈着促進など、プリオン病の分子病態解明、治療法開発に成果を得た。これらには医薬品開発のシーズとなる5つの特許出願予定を含む。一方、患者登録によるプリオン病コンソーシアム(JACOP)の構築に基づき、臨床試験の問題点の検討、設計が進捗した。(2) SSPE：麻疹ウイルスの神経細胞への感染における変異F蛋白質による膜融合能の亢進を明らかにし、ウイルス受容体同定のための研究が進んだ。リバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験が進行し薬物動態の解明が進んだ。(3) PML：脳病変におけるJCウイルス(JCV)の解析、oligodendroglioma細胞株におけるJCV持続感染系の開発、LAMP法によるJCVゲノムDNAの検出法の開発等で成果を得た。PMLに対するメフロキン臨床試験を推進し、メフロキンが有効な患者の特徴についての情報を蓄積した。

<b>研究分担者</b>	桑田一夫	岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻 教授
水澤英洋	国立精神・神経医療センター病院 院長	石橋大輔
八谷如美	東京医科大学病態生理学分野 教授	堀内基広
作道章一	琉球大学医学部保健学科生体代謝学 准教授	桶本優子
坂口末廣	徳島大学疾患酵素学研究センター 神経変性疾患研究部門 教授	濱口 毅
宮澤光太郎	動物衛生研究所インフルエンザ・ プリオン病研究センター 主任研究員	細矢光亮
毛利資郎	東北大学大学院医学系研究科 病態神経学講座 客員教授	堀田 博
堂浦克美	東北大学大学院医学系研究科 神経化学分野 教授	柳 雄介
田中元雅	独立行政法人理化学研究所脳科学総 合研究センター チームリーダー	澤 洋文
		北海道大学大学院獣医学研究科獣医 衛生学教室 教授
		国立感染症研究所細胞化学部 主任研究官
		金沢大学附属病院神経内科 助教
		福島県立医科大学医学部小児科学講 座 教授
		神戸大学大学院医学研究科微生物学 分野 教授
		九州大学大学院医学研究院ウイルス 学 教授
		北海道大学人獣共通感染症リサーチ センター分子病態・診断部門 教授

西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部  
部長  
 宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室  
講師

長嶋和郎 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病  
理学分野 名誉教授  
 奴久妻聡一 神戸市環境保健研究所感染症部  
副部長

## A. 研究目的

プリオン病、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)、進行性多巣性白質脳症(PML)の分子病態を解明し、それに基づき治療法、感染及び発症予防法を確立することを目的とする。

対象の3疾患は共に進行性で致死的な感染症であり、感染や発症のメカニズムの解明は極めて不十分であり治療法が確立していない。本研究により、これらの致死性感染症の感染や発症機序の解明を進展させ、早期診断法、治療法や発症・感染予防法の開発・確立に貢献する。

プリオン病は人獣共通感染症であり、牛海綿状脳症からの感染である変異型Creutzfeldt-Jakob病(vCJD)や医原性の硬膜移植後CJD(dCJD)等が社会的問題になっている。有効な治療法や感染・発症予防法はなく、平均18ヶ月で死亡する。わが国では、2005年に初めてvCJDが同定され(Yamada *et al.* Lancet 2006)、また、dCJDの症例数が全世界の約2/3を占め現在も発症が続いている(Nozaki, Yamada *et al.* Brain 2010)。1980年代に硬膜移植を受けリスクが高い約20万人にも及ぶ患者が潜在する。一方、一般人口の虫垂切除標本においてBSEプリオンが高率にみられることが英国から報告され(Gill *et al.* BMJ 2013)、食品ばかりでなく、血液(製剤)や手術器具を介した2次感染のリスクが世界的にクローズアップされている。感染及び発症メカニズムを解明し、発症前及び早期診断法、治療法、感染・発症予防法を開発することが急務である。本研究により感染及び発症メカニズムを解明し、発症前及び早期診断法、治療法、感染・発症予防法を開発・確立することによって、感染リスク評価法や予防策の改善、国民の不安の軽減にも貢献する。

SSPEは欧米では発症がほとんどなく治療薬開発研究は行われていない。わが国は先進国中で唯一の麻疹流行国でありSSPEの発症が持続している。欧米ではSSPE発症がほとんどないため、治療研究は行われていない。神経細胞における麻疹ウイルスの持続感染機序は未だ不

明であり、分子病態解明に基づく新たな治療法の開発、リバビリン(Rib)脳室内持続投与療法等の治療法の臨床試験の実施により本症患者の予後改善を図る。

PMLはHIV感染者の漸増、血液疾患、自己免疫疾患、それらに対する免疫治療薬、特に生物学的製剤の使用に伴い増加している。原因となるJCウイルス(JCV)の脳への感染・増殖機構を解明することによって、早期診断法、最適な治療を確立・普及させることが必要である。

## B. 研究方法

本領域のエキスパートの医学研究者、獣医学者等を結集した融合的研究組織を構築し、対象となる3疾患ごとに分科会を設置し、研究者間の緊密な連携をとりながら研究を推進した。対象3疾患の疫学研究、臨床病態の検討に基づく診断基準や診療ガイドライン等の作成にあたる厚生労働省・難治性疾患政策研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究」班(研究代表者：山田正仁)、「プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究」指定研究班(研究代表者：水澤英洋)と密接に連携しながら研究を推進した。

### 1) プリオン病

① 分子病態解明と治療法開発：プリオン病における神経変性関連分子として同定した14-3-3 $\eta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ , Tom70, Miro1を標的とした阻害薬開発のため、マウス神経芽細胞腫由来neuro2a(N2a)細胞において正常型プリオン蛋白(PrP)(PrP<sup>C</sup>)を過剰発現させ、上述の細胞死経路を再構成し、14-3-3タンパク質作用薬を添加することで、14-3-3/PrP<sup>C</sup>複合体の形成阻害効果および細胞死遅延あるいは阻害効果を持つものを探索した(八谷)。

PrPを減少させることによりプリオン病の治療が可能と考えられるが、その際、PrP<sup>C</sup>の機能が低下することによる副作用が出現する可能性がある。PrP欠損時の性状変化を細胞レベルで解析するために、PrP遺伝子欠損細胞株を用

いて、プリオン関連蛋白質である Shadoo 蛋白質 (Sho) の発現に対する PrP の影響を解析し、さらに、感染型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) 感染細胞の PrP 減少方法の開発のため、shRNA を用いた PrP 発現抑制法を検討した(作道)。

ビボの感染した神経細胞の状態を反映する細胞として、ポストミトティックなプリオン感染細胞の方が治療薬探索には適している。そこで、プリオン持続感染細胞に細胞増殖を抑制する処置や分化誘導する処置を行い、ポストミトティックなプリオン感染細胞の作製、これらの細胞における既報告のプリオン形成阻害剤の有効性を検討した(堂浦)。

病原体に対する自然免疫機構の 1 つ IRF3 がプリオン感染に対して保護的に働くことから、IRF3 の転写に着目し、この IRF3 抑制のメカニズムについて検討した(石橋)。

プリオンへの感受性および感染持続性にすぐれた培養細胞株による新規プリオン解析系を確立するために、プリオンへの感受性を有すると考えられるヒトニューロblastoma 細胞株に由来する PrP 欠損細胞株の樹立し、さらに多型や変異を有する *PRNP* を再導入した安定発現細胞株を樹立し、さらにこれらの新規樹立細胞株に対してプリオン感染実験を行った(桶本)。

新規プリオン結合因子として同定した Sortilin の PrP 細胞内輸送における役割について、マウス神経芽腫由来 N2a 細胞に PrP 遺伝子を導入した N2aC24 細胞、22L プリオン持続感染 N2aC24L1-3 細胞、siRNA による Sortilin ノックアウト細胞を用い検討した(坂口)。

Sox2, Nanog, Lin28 を標的としてこれを制御し、iPS の誘導及び神経細胞への分化を促し、プリオン病において神経細胞の再生を促進する低分子化合物を創製するために、これら 3 種類の蛋白質を標的として、オリジナルソフト ‘NAGARA’ を用い、論理的創薬計算を行った(桑田)。

酵母プリオン蛋白質 Sup35NM の実験系を用いて、異種間でプリオン感染能を有する Sup35NM アミロイドを同定し、その構造を生物物理的手法などから明らかにすること、さらに、異種間でプリオン感染が生じる時の Sup35NM 蛋白質の動的構造変化の解明を目指して、これ

らの実験を行うための様々な実験系の構築を行った(田中)。

ヒツジ体内(脳および末梢組織)に分布するプリオンの特徴を明らかにすることは、同じく複数の CJD プリオンの混在が考えられるヒトでの治療や薬剤の選択にとって重要な知見を提供する。本研究では、動物モデルを用いてスクレイピープリオンの多様性を明らかにするために、定型スクレイピーの野外発症例の脳、坐骨神経および下顎リンパ節の 10% 乳剤を TgOvPrP59 マウスに脳内接種し、伝達率や潜伏期間などの生物学的性状と蓄積する PrP<sup>Sc</sup> の生化学的性状を検討した(宮澤)。

プリオン病治療薬開発のためにはモデル動物が必要である。ヒト遺伝性プリオン病のうち、わが国で最も頻度の高いコドン 180 に valine から isoleucine の変異を有する CJD (CJD-V180I) の感染モデルはないため、ヒト型プリオン蛋白質を発現するノックインマウスに伝達するための感染実験を行った(毛利)。

プリオン感染脳では著しいアストロサイトの増生が認められるが、アストロサイトのプリオン病病態への関与は解明されていない。そこでプリオン病でのアストロサイトの活性化状態を解析した(堀内)。

わが国では dCJD が多発している。近年、多くの動物実験で PrP<sup>Sc</sup> 以外のミスフォールド蛋白質も個体間を伝播することが報告されている。ヒト屍体由来の硬膜の移植により PrP<sup>Sc</sup> 以外の蛋白質も伝播している可能性を検討するため、dCJD16 例の脳において、アミロイドβ蛋白質 (Aβ)、リン酸化タウ蛋白質、リン酸化 α シヌクレイン、リン酸化 TDP-43 の沈着を、年齢をマッチさせた孤発性 CJD 21 例を対照として検討した(浜口、山田)。

② 臨床試験体制の構築：将来の臨床試験のため、オールジャパン体制での臨床研究のための Japanese Consortium of Prion Disease (JACOP) を構築し、さらに遺伝性プリオン病に対する介入試験のためのユニットの構築について検討した(水澤ほか)。

## 2) SSPE

① 分子病態解明と治療法開発：麻疹ウイルスの神経細胞感染機構を解明することにより SSPE

の治療法を開発することを目的に、野生型あるいは融合能が亢進した F 蛋白質を発現する組換え麻疹ウイルスのヒト SLAM 発現遺伝子改変マウスへの脳内および腹腔内接種実験、神経細胞受容体の同定のための実験を行った(柳)。

SSPE ウイルス Kobe-1 株の細胞融合能を担う F タンパク質の個々のアミノ酸変異が F タンパク質の性状に及ぼす影響を解析するとともに、神経細胞への感染に必要な変異の同定を試みた(堀田)。

②リバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験：SSPE に対し抗ウイルス効果のある Rib による治療が試みられている。Ommaya reservoir を用いた Rib 脳室内単回投与療法では、髄液中 Rib 有効濃度の維持が困難であり、Ommaya reservoir への頻回の穿刺により、細菌性髄膜炎を合併することが報告されている。安全かつ効果的な投与のために、標準化が必要である。皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法を試み、脳脊髄液中 Rib 濃度を検討した(細矢)。

### 3) PML

①分子病態解明と治療法開発：PML の分子病態解明を推進するため、原因ウイルスである JCV の Tokyo-1 株の VP1 の BC, HI ループ構造及び agnoprotein (Agnoc) C 末端配列に対するモノクローナル抗体を作成した(宍戸-原)。

PML の免疫組織学的診断に適した抗体を評価することを目的として、JCV の後期タンパク質である Agno、VP2/3、及び VP1 に対する特異抗体を用いて、PML 症例の病変部における各タンパク質の発現様式を詳細に解析し、病態解明につながる知見を得ると共に、PML 症例の脳組織切片における JCV タンパク質の発現様式を免疫組織化学的に解析し、更に PML 検体切片から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて JCV ゲノムを定量し、ウイルスゲノム量とタンパク質発現様式の関連について検討した(澤)。

PML は JCV が oligodendroglia に感染し、髄鞘保持機能を障害するために生ずる脱髄性疾患であるが、oligodendroglia 系細胞において JCV 増幅を伴う維持型持続感染は未だ報告されていない。そこで、oligodendrogloma の細胞株お

よび astrocytoma 系の細胞株を用いて JCV 感染実験を行った(長嶋)。

SV40 の T 抗原を発現する COS-7 細胞、293T 細胞および SVG 細胞を用いて JCV を増殖させる系は、T 抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングには不適である。SV40 の T 抗原を発現しておらず、かつ培養が容易な種々のヒト由来細胞を用いて、real-time RT-PCR により JCV large T の発現量を定量し、JCV 複製を DNA replication assay で、ウイルス増殖は HA および Dpn I 処理と real-time PCR を組み合わせたアッセイで検討した(奴久妻)。

脳脊髄液中の JCV の検出および定量は、PML の診断および治療の重要な指標である。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用して、迅速・簡便で、かつ高い感度と特異度を有する JCV 遺伝子検査法を開発し、その有用性を検討した。JCV 検査のため全国の医療機関から国立感染症研究所ウイルス第一部に送付された脳脊髄液検体のうち、153 検体を用いた(西條)。

②メフロキンによる臨床試験：これまで *in vitro* の実験系で JCV の増殖を抑制することで知られている塩酸メフロキンの PML 患者に対する臨床的有用性を明らかにするために、臨床試験としてメフロキンを投与した PML 17 例について retrospective に解析した(三浦、山田)。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。患者を対象とする臨床研究については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。

## C. 研究結果

### 1) プリオン病

① プリオン病の分子病態解明と治療法開発：PrP<sup>C</sup> を過剰発現させたマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞に 14-3-3 阻害効果を有する Fusicoccum 添加したところ、細胞死遅延効果が観察された。一方、1BV02 にはこの活性が見られなかった。さらに、プリオン持続感染型培養細胞 ScN2 細胞においてアミノ酸キラル異性体

D-ロイシンはプロテアーゼ抵抗性 PrP を減少させる活性を有することを見いだした。

空ベクター導入 HpL3-4 細胞 (HpL3-4-EM) および PrP 遺伝子を再導入した HpL3-4 細胞 (HpL3-4-PrP) を検討した結果、GAPDH 遺伝子、Sho 遺伝子の発現量は両細胞で差が見られなかった。3 種類の PrP に対する shRNA を検討した結果、N2a 細胞に対しては、3 種類とも PrP 発現の抑制効果が確認された。

神経細胞を再現するポストミトテイクなプリオン感染細胞の作成のため、プリオン感染 N2a 細胞を、血清濃度の調整とブチル酸・ヘキサノ酸・レチノイン酸・ジブチリル cAMP・グリセロール等の添加を組み合わせることで、特に[低血清濃度+ブチル酸]、[通常血清濃度+グリセロール]は細胞増殖抑制効果が高く、かつ PrP<sup>res</sup> レベルも高い状態が観察された。ステーションナリーに近い状態のプリオン感染細胞で、pentosan polysulfate、compound B や polysaccharide-K 等の効果を検討したが、いずれも PrP<sup>res</sup> を十分に低減させることはできなかった。

プリオン感染に対して保護的に働く IRF3 の転写に着目し、IRF3 抑制のメカニズムについて検討したところ、IRF3 の転写開始上流-119/-1 がプロモーター活性のコア領域であること、プリオン持続感染細胞では非感染細胞に比べ、プロモーター活性が 1/4 程度であり抗プリオン効果を示す薬剤 (Congo-Red、Pentosan polysulfate) 処理により 3 倍上昇すること、Oct-1 は IRF3 プロモーター活性を有意に増加させること、ChIP により-119/-1 の領域と Oct-1 とが結合すること、細胞およびマウスにおいてプリオン感染により Oct-1 が減少することを認めた。

新規プリオン解析系の確立のために、遺伝子改変 (ゲノム編集) 技術による PrP 欠損細胞株の樹立を行った。PRNP コーディング領域の欠損が生じたクローンを確定し、これらの細胞株における PrP 産生がないことを、間接蛍光抗体法やウエスタンブロッティング法においても確認した。

新規プリオン結合因子 Sortilin の PrP 細胞内輸送における役割の検討では、N2aC24 細胞および N2aC24L1-3 細胞において、プリオン感染により Sortilin 発現量は低下した。さらに、Sortilin ノック

ダウンによる Sortilin の機能抑制により、感染細胞及び非感染細胞ともに PrP の蓄積が生じた。また、Sortilin の機能が抑制された細胞はプリオン感染に対して高感受性を示した。

Sox2、Nanog、Lin28 を標的としたオリジナルソフト 'NAGARA' を用いた論理的創薬計算の結果、化合物 S04 により iPS コロニー形状が変形し、ALP 活性が著明に低下した。S04 の投与により Sox2 の発現が選択的に抑制された。

異種間でプリオン感染能を有する Sup35NM アミロイドに関する研究では、構造多形がプリオンドメインのアミノ末端領域とは異なる部分にコア領域にあること、*K. lactis* の Sup35NM アミロイドのコアを形成するアミノ酸領域は、Sup35NM モノマーの状態、より揺らぎの顕著な領域であること、*K. lactis* の、特異な構造をもつ Sup35NM アミロイドが異種間プリオン感染能を示すことが明らかになった。

同一個体内におけるスクレイピープリオンの多様性を検討では、定型スクレイピー野外発症ヒツジの脳を接種した TgOvPrP59 マウスのうち、潜伏期間の短い個体は CH1641 様スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積し、長い個体は定型スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した。定型スクレイピー野外発症ヒツジの坐骨神経を TgOvPrP59 マウスに接種した場合は、発症個体は全て定型スクレイピーの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した。一方、下顎リンパ節を接種したマウスでは伝達率が低く、発症した個体は CH1641 様スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を蓄積した。

CJD-V180I の感染モデルの樹立のための感染実験では、CJD-V180I の 10% 脳乳剤の脳内接種の後、最大 812 日間の観察を続けた結果、接種された 3 系統のノックインマウスには、免疫組織検査とウエスタンブロッティングで、プロテアーゼ耐性の異常な PrP の蓄積は認められなかった。そこで、新たに V180I のヒト PrP 遺伝子変異導入マウスを作製した。このマウスは自然発症もしくは異常 PrP 蓄積を示さなかった。

プリオン病脳におけるアストロサイトの活性化状態を解析では、サイトカイン、ケモカイン、および神経栄養因子とそれらの受容体、計 11 の遺伝子の発現を TaqMan Assay により調べたところ、CXCL10 の発現がプリオン接種後 90 日および 120 日で有意に上昇し、病末期には非感染

マウス脳由来アストロサイトと同程度まで減少した。*CXCL10*欠損マウスにスクレイパー帯広株を接種した場合、野生型マウスと比較して潜伏期が短くなった。

dCJD脳におけるAβ沈着の検討では、Aβ沈着面積率では孤発性CJDと差はなかったが、髄膜の脳アミロイドアンギオパチー(CAA)や軟膜下Aβ沈着が有意に多く、その程度は年齢やCJD罹病期間に相関を認めず、硬膜移植から死亡までの期間と有意な正の相関を示した。リン酸化タウ蛋白、リン酸化αシヌクレイン、リン酸化TDP-43の蛋白の沈着は若年者では認めず、加齢の影響が考えられた。

②臨床試験体制の構築：平成11年4月1日から平成26年9月26日までのわが国のプリオン病の合計2394例の解析では、孤発性CJDが1836例であり、全体の77%を占めていた。これらの大部分は急速進行性の認知症を呈し、約4カ月で無動性無言に至り、約16カ月で死に至るといふ、極めて急激な経過をとる。したがって、孤発性CJD発症後に薬物効果を判定するのは容易ではなく、発症超早期あるいは発症前の治療開始が必要である。そのため、JACOPにおいて、遺伝性プリオン病を対象に、発症前遺伝子検査、バイオマーカー、臨床所見の前向き調査を行うこと、先行するアルツハイマー病研究(DIAN, A4, API)を参考に、臨床コア、バイオマーカーコア、遺伝学コア、統計コア、病理学コアなどを作り、経時的変化を明らかにしつつ、発症年齢を想定してその数年前もしくは超早期に介入を行なうことが必要と考えられた。

## 2) SSPE

①分子病態解明と治療法開発：野生型F蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスの脳内接種ではウイルスは全く脳内で広がらなかったが、変異F蛋白質を持つウイルスは脳内で広がった。一方、腹腔内接種した場合は、変異ウイルスは、野生型ウイルスに比べてSLAM陽性細胞が多数存在する脾臓での増殖は著しく低下した。神経細胞に発現している受容体の同定のため、神経芽腫細胞株IMR-32のcDNAライブラリーを作製し非感受性細胞に導入後GFP発現麻疹ウイルスを感染させる発現クローニング、IMR-32の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体の

ウイルス感染阻止能を調べるスクリーニングが進行した。

SSPEウイルスKobe-1株の細胞融合能を担うFタンパク質のアミノ酸変異については、Y398H変異はFタンパク質の細胞内発現量及びフリプロテアーゼ感受性を亢進させ、細胞融合活性を増強させること、G301W変異はFタンパク質の安定性を低下させ、細胞融合活性を増強させること、一方、G401E変異はFタンパク質の細胞内発現量及びフリプロテアーゼによる開裂感受性を低下させ、細胞融合活性を著しく低下させること、Fタンパク質のY398H変異をMV野生株に復帰させた組換えウイルス(H398Y)は感染能を全く欠失すること、G301W変異を復帰させたウイルス(W301G)はVero/SLAM細胞での細胞融合能が強く抑制され増殖できないこと、G401E変異を復帰させたウイルス(E401G)は細胞融合能が亢進しSH-SY5Y細胞で著明な感染拡大を示すことが明らかになった。

②リバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験：新規SSPE患者3例を対象とし、皮下埋込み型持続輸注ポンプ埋込み術を施行し、Rib + IFNαの持続輸注療法を開始した。投与サイクルは10日間薬剤投与+10~20日間休薬を1サイクルとして、脳脊髄液中Rib目標濃度を50~200μg/mLに設定し治療した。3症例とも、脳脊髄液中Rib濃度は投与量に応じて高まり、概ね治療域濃度で維持することができた。治療中、重篤な副反応は認められず、薬剤濃度を調節することにより、脳脊髄液中Rib有効濃度の維持が可能であった。臨床的には、実施症例において病状進行の停止、および改善には至らなかったが、病状の進行は緩徐となった。脳脊髄液中濃度の安定化後はRib治療中であっても自宅で過ごすことが可能で、患者・家族のQOLの改善につながった。

## 3) PML

①分子病態解明と治療法開発：JCVVP1のBC、HIループ構造に相当する合成ペプチドに対するモノクローナル抗体、agnoprotein (Agno)C末端配列に対するモノクローナル抗体を新たに作成した。

JCV Agno、VP2/3、及びVP1に対する特異抗

体を用いた免疫組織化学的検討では、病変中心部、辺縁部において、Agno、VP2/3、及び VP1 各抗体で異なる染色結果が得られた。Agno と VP1 は細胞外の間質に、VP2/3 は明核に陽性所見を認めた。JCV ゲノム量と VP2/3 の免疫染色陽性所見は相関性が高かった。一方 Agno は JCV ゲノム量との相関は低かったが、低ゲノム量の検体においても免疫染色陽性所見が認められた。

oligodendroglioma の細胞株および astrocytoma 系の細胞株を用いた JCV 感染実験では、oligodendroglioma の細胞株である U87 細胞株にのみ持続感染が認められ、同じ oligodendroglioma 系の細胞株である A172 および astrocytoma 系である KMG4、U251 細胞株には感染しなかった。U87 細胞株への JCV 感染細胞数は JCV 接種後 2 週間で最大になり、1 か月後には消失した。JCV 接種により培養上清中に浮遊細胞集塊が増え、これを収集し培養すると陽性細胞数が約 5 倍に増加した。

ヒト由来細胞を用いた JCV 増殖の解析では、種々のヒト由来細胞に JCV DNA をトランスフェクトして、JCV の large T の発現量を real-time RT-PCR により定量したところ、IMR-32 馴化株をトランスフェクトしたアストロサイトと 293 細胞で large T に有意な発現の増加がみられた。さらに、ウイルス DNA の複製およびウイルス増殖を調べたところ、アストロサイトと 293 細胞で IMR-32 馴化株の複製、増殖がみられた。

PML 診断のための JCV 検出 LAMP 法の開発研究では、LAMP 法に用いたプライマーセットはアジア・アフリカ・ヨーロッパなどに分布する JCV の 12 サブタイプのゲノムシーケンスのアライメントより T 遺伝子領域を増幅するように設計した。脳脊髄液から精製された JCV DNA をテンプレートとして、63°C、60 分反応させた。増幅された JCV ゲノムは、反応液の濁度を測定することにより、陽性対照 DNA を用いた標準曲線を作成して、定量的に検出した (qLAMP 法)。qLAMP 法により得られた結果を TaqMan プロブを用いた qPCR 法による結果と比較検討した結果、臨床検体では 1 反応あたり 20 DNA コピー/reaction の JCV ゲノムを 100% 検出した。qLAMP 法の感度および特異度は、qPCR 法と比較して、それぞれ 78%、97% であ

った。陽性的中率および陰性的中率は、それぞれ 93%、90% であった。qLAMP 法で決定された JCV ゲノム量は qPCR 法によるそれと高い相関 ( $r = 0.882$ 、 $P < 0.0001$ ) を示した。

② メフロキンによる臨床試験：メフロキン投与 17 例の検討では、塩酸メフロキン投与 6 か月後の結果では、7 例で臨床症状の改善があったが、うち 2 例では合併症で死亡した。8 例では臨床症状の改善なく、うち 7 例は死亡、2 例で投与中止となった。有効例 7 例での基礎疾患は HIV2 例、血液疾患 2 例、膠原病 3 例であったのに対し、無効例 8 例は HIV 3 例、血液疾患 2 例、膠原病 2 例であった。

## D. 考察

### 1) プリオン病

① 分子病態解明と治療法開発：14-3-3 作用薬 Fusicoccum は、培養細胞において PrP<sup>C</sup> とミトコンドリアが介する神経細胞死を抑制する活性を有すること、D-ロイシンはプリオン持続感染型培養細胞においてプリオン化を阻害する活性を有することを見いだした。Fusicoccum は Fusicoccum amygdali (植物に感染するカビの一種) が産生する毒素であり、14-3-3 タンパク質に modeIII で結合する基質に対し、結合阻害活性を呈するが、modeI あるいは II 結合基質にはその活性を示さない。これらの分子群は、プリオン病以外の神経変性疾患における神経変性に対しても有効である可能性がある。

PrP 遺伝子再導入細胞を用いた実験で、PrP 遺伝子発現は Sho 遺伝子発現に影響を与えないことが示唆された。PrP 遺伝子発現によるアポトーシス抑制には Sho 遺伝子の発現制御は関与しないものと考えられた。PrP 欠損下での Sho とアポトーシスの関連について、さらに解析を進める必要がある。また、shRNA を発現するレトロウイルスベクターにより PrP 発現が抑制できる可能性が示された。今後、より効率的に PrP 発現を抑制できる shRNA を探索するとともに、プリオン感染細胞へ shRNA を適用し、PrP 発現抑制により PrP<sup>Sc</sup> 蓄積が抑制できるのか、検討を進めていく。

通常プリオン感染増殖細胞を用いたスクリーニングで見つかったプリオン形成阻害剤の効果は、細胞増殖による希釈バイアスに

より過大に評価されてきた可能性がある。よりビボに近い状態（細胞増殖がステーションナリー状態でプリオンが飽和状態）の細胞モデルで治療薬を探索することで、優れた治療効果を持つシーズを発見できる可能性がある。本年度の検討した中では、[低血清濃度+ブチル酸]あるいは[通常血清濃度+グリセロール]による処理細胞は有望であったので、今後はこれらの処理細胞でPrPres量を激減させる化合物等を探索していくとともに、一層最適な細胞モデルの探索を継続していく。

プリオン感染に対して保護的に働く IRF3 の転写に着目し、IRF3 抑制のメカニズムについて検討したところ、Oct-1 は IRF3 の主要な転写因子であり、プリオン感染後の IRF3 発現低下は、Oct-1 の発現減少に伴った結果と示唆された。これらの分子はプリオン病の新たな治療標的となる可能性がある

プリオンへの感受性および感染持続性にすぐれた培養細胞株による新規プリオン解析系を確立するための研究では、プリオンに感受性を有するヒト由来の細胞株を用いた PrP 欠損細胞株の樹立に成功した。PrP 欠損細胞株においてはプリオン感受性を示さないが、PRNP の再導入により、プリオン感受性は回復するものと期待される。今後、多型や変異を有する PrP の再導入および安定発現細胞クローンの樹立を行う。

新規プリオン結合因子 Sortilin の PrP 細胞内輸送における役割の検討では、プリオン感染は、Sortilin 発現量低下を引き起こしその機能を抑制し、Sortilin の機能抑制は、PrP<sup>C</sup> および PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、プリオン感染による Sortilin の減少が、PrP 分解を抑制し PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を引き起こしていること、Sortilin 機能抑制はプリオン感染に対して高感受性を示すことが示され、プリオン感染に対する細胞の防御機構として Sortilin は重要な機能を果たしていると考えられた。

Sox2, Nanog, Lin28を標的としたオリジナルソフト‘NAGARA’を用いた論理的創薬では、Sox2に選択的に結合する分子により、iPS細胞の分化を促進し、分化の方向を制御できる可能性があることが分かった。低分子化合物によるiPS

の誘導と分化を制御できるようになれば、神経細胞の再生が可能となり、プリオン病の根本的治療法開発に貢献する。

異種間でプリオン感染能を有するSup35NMアミロイドに関する研究では、*K. lactis* のSup35NMには少なくとも2つのアミノ酸領域がアミロイドのコアになり得るポテンシャルを有すること、Sup35NMモノマー内の局所的な揺らぎが最終的に生じるアミロイドのコア領域を決定する要因であること、異種間におけるプリオン感染には2つの酵母種においてSup35NMアミロイドのコアを形成するアミノ酸組成の一致度が重要な因子であることが示唆された。

同一個体内におけるスクレイピープリオンの多様性を検討では、定型スクレイピーを発症したヒツジの脳、末梢神経組織およびリンパ組織には定型スクレイピープリオンとCH1641様スクレイピープリオンが混在し、CH1641様スクレイピープリオンは末梢神経よりもリンパ組織でより増幅しやすいことが示唆された。これらはプリオン病の診断・治療法開発の基礎となる知見である。

CJD-V180I の感染モデルの樹立では、ヒトの多型を有するヒト化マウス3系統の脳内接種による長期観察の結果でも感染は成立しなかった。CJD-V180I の PrP 遺伝子に相同の V180I 変異を有する KiHu180V マウスは、長期観察後も PK 抵抗性の異常な PrP の蓄積は認められなかったため、このマウスでは接種後に異常 PrP が検出された場合、自発性ではなく感染によるものであるものであり、このマウスは感染モデルマウスの候補となり得ると考えられた。

プリオン病感染脳におけるアストロサイトの活性化状態を解析では、ケモカイン CXCL10 の遺伝子が、感染中期から後期にかけて発現が上昇し、その後低下するという特徴的な発現変動を示し、CXCL10 欠損マウスに帯広株を接種した場合、野生型マウスと比較して潜伏期が短縮することから、CXCL10 は病態進行に抑制的に作用することが示唆された。炎症性のケモカインとして知られる CXCL10 の神経組織内での機能や役割は不明であるが、プリオン病の分子病態解明、治療法開発のために CXCL10 はキーとなる分子の一つであると考えられた。

dCJD 脳における Aβ 沈着の検討では、dCJD



の剖検脳への A $\beta$ 沈着面積率は、孤発性 CJD と比較して有意差はなかったが、髄膜 CAA や軟膜下 A $\beta$ 沈着が dCJD でより多く認められた。このことは、dCJD では、脳の表面に近い部位の A $\beta$ 沈着が、孤発性 CJD と比較して促進されていることを示唆している。硬膜移植によって、脳の表面に近い部位の脳 $\beta$ アミロイドーシスが促進されたと考えれば、硬膜移植によって脳 $\beta$ アミロイドーシスが伝播した可能性や脳外科手術が脳 $\beta$ アミロイドーシスを促進した可能性がある。

上記の研究成果の中には医薬品開発のためのシーズとなる 5 つの特許出願予定が含まれている。

②臨床試験体制の構築：前臨床段階において、プリオン病の治療薬候補は次々と見出されつつある。一方で、プリオン病典型例は急速進行性で発症 3-4 ヶ月以内に無動無言になってしまうため、治験薬の開始が遅れ治療効果の検証が難しい。それを克服するために、全プリオン病を対象とする自然歴研究(JACOP)が始まっており、また、多くのバイオマーカーが実用化されていることから、遺伝性プリオン病等の適切な対象群及び治験方法を設定することにより、有効な介入試験が可能になるものと考えられた。

## 2) SSPE

①分子病態解明と治療法開発：神経細胞に発現している受容体の同定のための研究が進行した。神経細胞受容体の同定により、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構の理解が深まるだけでなく、ウイルスの細胞侵入を標的にした治療法の開発が期待できる。

SSPE ウイルス Kobe-1 株の細胞融合能を担う F タンパク質のアミノ酸変異の検討から、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質の 398 位のアミノ酸は、立体構造上フリンプロテアーゼによる開裂部位近傍に位置するため、その開裂に影響しており、SSPE-Kobe-1 株の感染拡大には Y398H 変異が決定的に重要であること、G301W 変異も SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質の細胞融合活性を増強させ、神経細胞への感染に大きく寄与していることが明らかとなった。一方、G401E 変異はウイルス感染能を抑制し、持続感染の成立に

関与する可能性が考えられた。

②リバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験：皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法により、脳脊髄液中 Rib 目標濃度を持続的に維持することができた。治療中、重篤な副反応は認められなかった。安全かつ効果的に実施するため、さらなる症例の集積および検討が必要である。

## 3) PML

①分子病態解明と治療法開発：JCV VP1 の BC、HI ループ構造に対するモノクローナル抗体、Agno C 末端配列に対するモノクローナル抗体を新たに作製できた。ウイルス結晶構造解析からも予測されるように、VP1 蛋白のループ構造がウイルス抗原性を担っていると考えられ、これに対するモノクローナル抗体も比較的力価の高いものが得られやすい。また、Agno の C 末端配列は JC ウイルス特異的で、BK ウイルスや SV40 とは交叉がない。これまでに作製したポリクローナル抗体 (VP1, VP2/VP3, Agno) と合わせて、今後、脱髄脳症の発症機序解明の研究や、病理診断に応用可能である。

JCV Agno、VP2/3、及び VP1 に対する特異抗体を用いた免疫組織化学的検討では、病変領域によって各抗体の染色像に差異があり、PML の免疫染色においては抗 VP2/3 抗体を含む複数の抗体を用いて免疫組織化学解析を行うべきことが明らかになった。VP2/3 抗体と Agno 抗体を組み合わせることにより、病理組織上でウイルス量を推定できると考えられた。

oligodendroglioma の細胞株を用いた JCV 感染実験において、U87 細胞株に持続的な感染が成立したことは、新たな JCV 感染における許容細胞の樹立という観点では重要な知見である。しかし、長期の感染維持は不可能であった。oligodendroglia の JCV 感染における特異的因子を検索する上で感染維持が不可欠であり、感染細胞数を増加させることが今後の課題である。この特異的因子の同定は PML の新たな治療法開発に直結している。

ヒト由来細胞を用いた JCV 増殖の解析の結果から、アストロサイトと 293 細胞では IMR-32 馴化株が複製できることが明らかになり、T 抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニン

グに有用であると考えられた。

PML 診断のための JCV 検出 LAMP 法の開発研究では、JCV Large-T 遺伝子を標的とするプライマーセットが JCV に対する特異性が高く、さらに定量性を有することを見出した。その検出感度は  $2.0 \times 10^1$  DNA コピー/reaction であり、qPCR の感度  $2.0 \times 10^0$  DNA コピー/reaction の約 1/10 であることが示された。また qLAMP 法と qPCR 法を比較した感度は 78% であった。さらに qLAMP 法と qPCR 法による定量結果には強い相関関係が認められた。qLAMP 法は qPCR 法の補完的な方法としても適用可能であることが示唆された。

② メフロキシンによる臨床試験：PML 患者に対する塩酸メフロキシンの有効性に関してはさまざまな報告があり、欧米では HIV-PML に関しては有効性が乏しいと考えられている。本邦の PML 症例は非 HIV-PML が多いことが特徴であり、その基礎疾患や免疫学的状態、発症誘発薬剤なども多岐にわたっている。今回の 17 例の検討においても、塩酸メフロキシン投与にて症状、転帰の改善を認めた症例群が存在した。今後、有効例の特徴を明らかにする必要がある。

## E. 結論

1) **プリオン病**：14-3-3 タンパク質作用薬 Fusicoccum は PrP<sup>C</sup> とミトコンドリアが介する神経細胞死を抑制する活性を有すること、D-ロイシンはプリオン持続感染型培養細胞においてプリオン化を阻害する活性を有することを見いだした。PrP に対する shRNA を発現するレトロウイルスベクターを用いて PrP の発現抑制ができることを示した。治療薬探索に適したプリオン感染細胞モデルとして、グリセロールやブチル酸で処理したプリオン感染細胞は有望であることを発見した。プリオン感染に対して保護的に働く IRF3 の主要な転写因子は Oct-1 であり、プリオン感染後の IRF3 発現低下は、Oct-1 の発現減少に伴うことを見出した。プリオンに感受性を有するヒト由来の細胞株を用いた PrP 欠損細胞株の樹立に成功した。プリオン感染は新規プリオン結合因子 Sortilin の発現量低下を引き起こすことで PrP<sup>Sc</sup> 分解を抑制し PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を促進することを示した。iPS 細胞の神経細胞への分化制御化合物の論理的創薬で

は、低分子化合物による選択的な分化制御が可能であることを示した。酵母プリオンの系を用いた異種間プリオン感染の分子機構の研究はアミロイドのコアを形成する領域のアミノ酸組成の一致度が異種間プリオン感染能を決定する要因であることを示した。同一個体の複数の臓器に複数の性状の異なるスクレイピープリオンが共存することを明らかにした。CJD-V180I の感染モデルとなりうるヒト化マウス KiHu180I を初めて作成した。プリオン感染マウス脳のアストロサイトにおけるケモカイン CXCL10 がプリオン病の病態進行に抑制的に働くことを示した。dCJD 脳では CAA や軟膜下 Aβ 沈着が促進されており、硬膜移植によって脳 β アミロイドーシスが伝播した可能性等が考えられた。臨床研究コンソーシアム (JACOP) によるプリオン病自然歴調査が進捗し、遺伝性プリオン病の未発症例・超早期症例を対象とした介入試験等のプリオン病臨床試験の構想が提案された。

2) **SSPE**：SSPE の病態解明と治療法開発に不可欠な麻疹ウイルスの神経細胞受容体の同定のための研究が進展した。SSPE-Kobe-1 株の細胞融合能は、F タンパク質の Y398H 変異及び G301W 変異によりもたらされている可能性が示唆された。SSPE 患者に対する皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法により、脳脊髄液中 Rib 目標濃度を持続的に維持することができた。

3) **PML**：JCV VP1, Agno に対するモノクローナル抗体を作成した。PML の免疫組織学的検索において、異なったウイルスタンパク質に対する抗体を用いることが有用であった。JCV 維持型持続感染を示す oligodendroglioma 株、T 抗原を標的とする治療薬開発に有用な 2 つの細胞株を見出した。脳脊髄液中の JCV ゲノムを迅速・簡便に検出・定量する qLAMP 法開発に成功した。メフロキシンによる臨床試験において改善を示した患者群についての情報を蓄積した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は

分担研究報告を参照のこと)

- 1) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep* 4:6006, 2014.
- 2) Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol* 88:11791-11801, 2014.
- 3) 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. *J Virol* 88:4083-4099, 2014.
- 4) Watanabe S, Ohno S, Shirogane Y, Suzuki SO, Koga R, Yanagi Y. Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *J Virol*, in press.
- 5) Honda RP, Yamaguchi KI, Kuwata K. Acid-induced molten globule state of a prion protein: crucial role of strand 1-Helix 1-Strand 2 segment. *J Biol Chem* 289:30355-30363, 2014.
- 6) Shishido-Hara Y, Yazawa T, Nagane M, Higuchi K, Abe-Suzuki S, Kurata M, Kitagawa M, Kamma H, Uchihara T. JC virus inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-Like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:442-53, 2014.
- 7) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, Pentosan polysulfate, chlorpromazine and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One* 9:e106516, 2014.
- 8) Imamura M, Muramatsu N, Das NR, Chida J, Hara H, Sakaguchi S. Mouse-hamster chimeric prion protein (PrP) devoid of N-terminal residues 23-88 restores susceptibility to 22L prions, but not to RML prions in PrP-knockout mice. *PLoS One* 9:e109737, 2014.
- 9) Sugiyama S, Tanaka M. Self-propagating amyloid as a critical regulator for diverse cellular functions. *J Biochem* 155:345-351, 2014.
- 10) Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol* 25:8-14, 2015.
- 11) Eisele YS, Fritschi SK, Hamaguchi T, Obermüller U, Föger P, Skodras A, Schäfer C, Odenthal J, Heikenwalder M, Staufenbiel M, Jucker M. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral  $\beta$ -amyloidosis. *J Neurosci* 34:10264-10273, 2014.
- 12) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, Saijo M. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 159:1687-1696, 2014.
- 13) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun* 454:125-130, 2014.
- 14) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirotani M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, Saijo M, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of  $^{11}\text{C}$ -methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol* 261:2314-2318, 2014.
- 15) Ohara H, Kataoka H, Nakamichi K, Saijo M, Ueno S. Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review. *J Neurol Sci* 341:144-146, 2014.

16) Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open* 4:e004968, 2014.

17) Miyazawa K, Okada H, Iwamaru Y, Masujin K, Yokoyama T. Susceptibility of GT1-7 cells to mouse-passaged field scrapie isolates with a long incubation. *Prion* 8:306-313, 2014.

18) Komatsu J, Sakai K, Hamaguchi T, Sugiyama Y, Iwasa K, Yamada M. Creutzfeldt-Jakob disease associated with a V203I homozygous mutation in the prion protein gene. *Prion* 8:336-338, 2014.

19) Nukuzuma S, Sugiura S, Nakamichi K, Kameoka M, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells. *Microbiol Immunol*, in press.

20) Nakamichi K, Lim CK, Saijo M. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn J Infect Dis* 67:307-310, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし