

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年3月7日(07.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/045116 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 19/00 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/032729

(22) 国際出願日: 2018年9月4日(04.09.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-169312 2017年9月4日(04.09.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (**TOHOKU UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 照屋 健太(**TERUYA, Kenta**); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 西澤 桂子(**NISHIZAWA, Keiko**); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 堂浦 克美(**DOH-URA, Katsumi**); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 佐貫 伸一, 外(**SANUKI, Shinichi et al.**); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) **Title:** PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR CONFORMATIONAL DISEASES, AND SCREENING METHOD FOR CONFORMATIONAL DISEASE DRUGS

(54) 発明の名称: コンフォメーション病の予防又は治療剤、及びコンフォメーション病医薬のスクリーニング方法

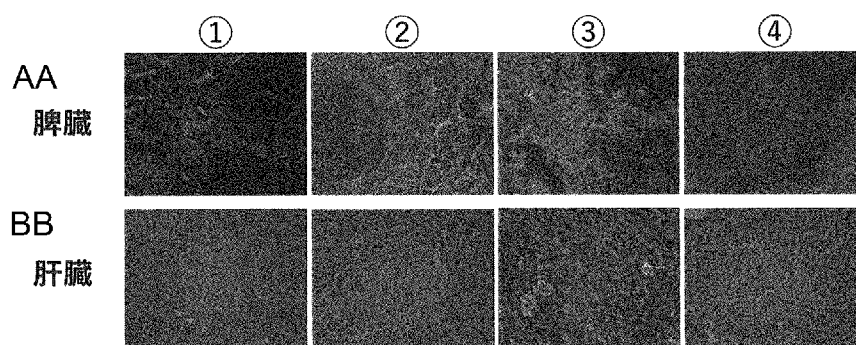


FIG. 33:
AA Spleen
BB Liver

(57) **Abstract:** The purpose of this invention is to provide a prophylactic or therapeutic agent for conformational diseases and a screening method for conformational disease drugs. Provided is a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of conformational diseases, said composition comprising: an inactivated oligomeric protein that enables the prevention or treatment of a conformational disease and is obtained by crosslinking a plurality of abnormal proteins which cause said conformational disease; and a pharmaceutically-acceptable carrier.

(57) 要約: コンフォメーション病の予防又は治療剤、及びコンフォメーション病医薬のスクリーニング方法を提供する。コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質が、クロスリンクされた不活化オリゴマータンパク質を用いることで、コンフォメーション病の予防又は治療が可能となり、該不活化オリゴマータンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、コンフォメーション病の予防又は治療のための医薬組成物が提供される。

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

コンフォメーション病の予防又は治療剤、及びコンフォメーション病医薬のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、コンフォメーション病の予防又は治療剤、及びコンフォメーション病医薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] コンフォメーション病あるいはタンパク質コンフォメーション病は、特定の宿主タンパク質についてその立体構造（コンフォメーション）が変化されて難溶性となって細胞や組織や臓器に蓄積し病的状態をもたらす疾患群であり、各種疾患例が報告されている（非特許文献1～3参照）。これには、アルツハイマー病、び慢性レビー小体病、プリオン病、ポリグルタミン病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症に代表される神経難病が含まれる。

コンフォメーション病では、特定のタンパク質が本来のコンフォメーションとは異なる β シート構造と呼ばれる構造成分に富むコンフォメーションをとって難分解性となる。コンフォメーション病のうちこのような異常なコンフォメーションをとったタンパク質が細胞外の組織に蓄積して難溶性物質（アミロイド）を形成する疾患群はアミロイドーシスと呼ばれる。

[0003] 一方、このような異常なコンフォメーションをとったタンパク質が細胞内に蓄積して「インクルージョンボディ（封入体）」と呼ばれる難溶性物質を形成する疾患群もある。前者には、家族性アミロイドポリニューロパチー、AAアミロイドーシス、ALアミロイドーシス、透析アミロイドーシス、老人性アミロイドーシス等の各種アミロイドーシスの疾患が含まれ、後者にはポリグルタミン病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症、び慢性レビー小体病、ハンチントン病、ピック病、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、前頭側頭型痴呆などが含まれる。また、どちらにも見られるものとしてはアルツ

ハイマー病やプリオン病などがある。

[0004] これらのコンフォメーション病の原因タンパク質は疾患によって異なり、タンパク質の一次構造上の共通点はないものの、コンフォメーションの異常化のメカニズムや異常化タンパク質の沈着を促進するメカニズムには共通点があると考えられており、コンフォメーション病全般あるいは複数のコンフォメーション病に共通した治療化合物の開発が可能である（非特許文献4～5参照）。実際に、これまでにアルツハイマー病、アミロイドーシス全般、プリオン病に共通する薬効を示すことが期待される薬物開発の報告が多数ある（例えば、非特許文献6～9参照）。しかし、これらコンフォメーション病については、原因及びその作用機構が徐々に解明されつつあるが、現在まで予防及び治療に決定的に有効な医薬品は見出されていない。

[0005] コンフォメーション病では、タンパク質の難溶凝集体化の阻害や難溶凝集体の排除が共通の創薬標的である。コンフォメーション病の中でも研究が進んでいるアルツハイマー病では凝集性アミロイド β や凝集性タウ蛋白に対する抗体を患者に投与する受動免疫療法の開発が盛んであり、一部では有望な結果が報告されている（非特許文献10～11参照）。しかし、それぞれのコンフォメーション病には、それぞれの凝集性タンパク質に最適化された抗体が選抜される必要があり、もともと難溶性である凝集体タンパク質は非自己として認識されないため、凝集体タンパク質だけを認識する特異抗体を作成することは極めて困難であり、ましてや様々な難溶凝集性タンパク質を対象にした汎用的な開発手段は開発されていない。

[0006] 一方、能動免疫療法では抗原となるタンパク質をどのように調製するのか、タンパク質のどの領域を認識させるのか等、安全で効果的な抗体産生を誘導させる工夫が課題となっている。これらの課題を克服するためにDNAワクチン、粘膜免疫などが開発されているが、かならずしも毒性凝集体の形成を特異的に阻害しているわけではない。すなわち、凝集体タンパク質だけを認識するわけではなく、本来は凝集体タンパク質も自己のタンパク質で構成されているため免疫寛容であるべき凝集体化していない正常なタンパク質も

認識する。また、多量体化凝集体の形成は阻害しても、毒性の強いオリゴマー凝集体の形成は阻害できないことも知られている（非特許文献 1 2 参照）。

[0007] さらに、難溶凝集体の化学構造については、様々なモデルが提唱されているものの、その難溶性という物性から正確な化学構造は解明されていない（例えば、非特許文献 1 3 参照）。そのため、化学構造に基づくインシリコでのドラッグデザインも不可能な状況である。

[0008] ここで、異常凝集タンパク質が起こす疾患の代表として知られているプリオン病についてより詳細に説明すると、プリオン病はプリオンにより中枢神経が侵される疾患であり、プリオンの本体は異常凝集したプリオン蛋白質であることが判明しており、異常凝集プリオン蛋白質は異常型プリオン蛋白質と呼ばれている。今日、他のコンフォメーション病で出現する難溶凝集性タンパク質も、プリオン病の異常型プリオン蛋白質と同様な挙動（すなわち、疾患伝播性）を示すことが証明されており、プリオンと同様なものと考えられている。アルツハイマー病の免疫療法について前記したが、プリオン病でもプリオン蛋白質に対する免疫療法において、若干の効果が複数の論文で報告されている（非特許文献 1 4）。しかし、いずれも正常型プリオン蛋白質を標的としており異常型プリオン蛋白質の阻害を標的としているものはない。したがって、前記したように難溶凝集性タンパク質を標的としたプリオン病の予防及び／又は治療薬の開発は、コンフォメーション病の予防及び／又は治療薬の開発にも通じている。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Robin W Carrell, David A Lomas, The Lancet, 1997年、350号、134-138頁
非特許文献2: 石原得博（監修）、池田修一（編集）、「アミロイドーシスの基礎と臨床」2005年3月金原出版（株）発行、第8頁～13頁
非特許文献3: 岩坪威、細胞工学、2001年、20巻11号、1474-1

477頁

非特許文献4: Jarrett JT, Lansbury PT Jr, Cell, 1993年、73巻、1055-1058頁

非特許文献5: Gervais F, Morissette C, Kong X, Curr. Med. Chem. - Immun., Endoc. & Metab. Agents, 2003年、3巻、361-370頁

非特許文献6: Watson JD, Lander DA, Selkoe JD, The Journal of Biological Chemistry, 1997年、50巻、31617-31624頁

非特許文献7: Kisilevsky R, Nature Medicine, 1995年、1巻、143-148頁

非特許文献8: Zhu H, Yu J, Kindy MS, Molecular Medicine, 2001年、7巻、517-522頁

非特許文献9: 堂浦克美、ファルマシア、2002年、7巻、635-639頁

非特許文献10: Wisniewski T, Goni F. Neuron, 2015年、85巻6号、1162-1176頁

非特許文献11: Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, et al. Nature, 2016年、537巻7618号、50-56頁

非特許文献12: Hara H, Ono F, Nakamura S, et al. Journal of Alzheimer's Disease. 2016年、54巻3号、1047-1059頁

非特許文献13: Shirai T, Saito M, Kobayashi A, et al. Structure, 2014年、22巻4号、560-571頁

非特許文献14: Goni F, Mathiason CK, Yim L, et al. Vaccine, 2015年、33巻5号、726-733頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明の目的は、上記のような背景に鑑み、コンフォメーション病の予防又は治療剤、及びコンフォメーション病医薬のスクリーニング方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく研究をすすめ、コンフォメーション病を引き起こす異常型のタンパク質は、凝集化する過程で、相互にクロスリンクされてオリゴマータンパク質となるとの知見を得た。そして、当該オリゴマータンパク質を不活化させて抗原として用いることで、能動免疫が可能となることを見出し、本発明を完成させた。

- [0012] 本発明の一形態は、コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質がクロスリンクされた不活化オリゴマータンパク質である。

また、本発明の別の形態は、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質を準備する準備ステップ、前記異常型タンパク質にクロスリンク処理を施し、オリゴマーを形成させるクロスリンクステップ、クロスリンクされたオリゴマータンパク質を回収する回収ステップ、及び回収されたオリゴマータンパク質を不活化処理する処理ステップ、を含む不活化オリゴマータンパク質の製造方法である。

また、本発明の別の形態は、上記不活化オリゴマータンパク質からなる、コンフォメーション病の予防又は治療剤であり、該治療剤と薬学的に許容される担体とを含む、コンフォメーション病の予防又は治療のための医薬組成物である。

また、本発明の別の形態は、コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質がクロスリンクされたオリゴマータンパク質に、候補化合物を接触させる接触ステップ、及び前記候補化合物を接触させたオリゴマータンパク質の活性及び／若しくは構造を測定する測定ステップ、を含む、コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法、又は、コンフォメーション病

を引き起こす異常型タンパク質に、候補化合物を接触させる接触ステップ、該異常型タンパク質にクロスリンク処理を施し、オリゴマーを形成させるクロスリンクステップ、及びクロスリンクさせたオリゴマータンパク質の活性及び／若しくは構造を測定する測定ステップ、を含む、コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法である。

発明の効果

[0013] 本発明により、コンフォメーション病の予防又は治療剤として使用できる不活化オリゴマータンパク質を提供することができ、当該不活化オリゴマータンパク質はコンフォメーション病の抗原として能動免疫に活用され得るとともに、コンフォメーション病の進行を改善することができる。

また、当該オリゴマータンパク質は、異常型タンパク質のインターフェースにてクロスリンクされており、当該インターフェースを特異的に認識する抗体を製造するために活用され得る。

更に、当該オリゴマータンパク質に、コンフォメーション病医薬の候補化合物を接触させ、オリゴマータンパク質の活性の変化を測定することで、あるいは、異常型タンパク質にコンフォメーション病医薬の候補化合物を接触させ、当該オリゴマータンパク質の形成活性の変化を測定することで、コンフォメーション病医薬のスクリーニングが可能となり得る。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]プリムリンの化学構造式を示す図である。

[図2]プリオン持続感染細胞の細胞溶解液にプリムリンを添加した場合におけるプリムリンによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の作用対象とプリオン株の違いについて試験した結果を示す電気泳動像のウェスタンブロットの図面代用写真である（実験例1）。

[図3]プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を用いてプリムリンによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の作用時間依存性について試験した結果を示す電気泳動像のウェスタンブロットの図面代用写真である（実験例2）。

[図4]実験例2において、プリムリン存在下で生成された異常型プリオン蛋白質

質クロスリンク反応物の量を縦軸、反応時間を横軸としてプロットしたグラフである。

[図5]プリムリン存在下で培養したプリオン持続感染細胞の細胞溶解液を用いた異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応のUV照射時間依存性について評価した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例3）。

[図6]プリオン非感染細胞の細胞溶解液を用いてプリムリン存在下UV照射による正常型プリオン蛋白質に対する効果を試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例4）。

[図7]プリオン非感染細胞の細胞溶解液を用いてプリムリン存在下UV照射による β アクチンに対する効果を試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例4）。

[図8]脳抽出溶液を用いたプリムリン存在下でのUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の試験結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例5）。

[図9]実験例5の試験結果において脳抽出溶液中の全タンパク質の電気泳動像の銀染色の図面代用写真である。

[図10]実験例6の試験に用いた化合物の化学構造式を示す図である。

[図11]各化合物混在下でのUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の試験結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例6）。

[図12]実験例7の試験に用いた化合物の化学構造式を示す図である。

[図13]各化合物混在下でのUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の試験結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例7）。

[図14]実験例7において発見されたメチレンブルーの効果について検証した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例8）。

[図15]過硫酸アンモニウムによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の試験結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例9）。

[図16]過硫酸アンモニウム及びN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の試験結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例9）。

[図17]抗プリオン活性を示すことが知られているコンパウンドB（comp B）、ドキシサイクリン（DOX）について、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応への効果を試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真、並びにウエスタンブロットにおけるクロスリンク反応物（二量体）に相当するシグナル強度を縦軸に、抗プリオン化合物の細胞溶解液への添加終濃度を横軸にプロットしたグラフである（実験例10）。

[図18]生成した異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物に対する尿素溶液の効果について試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例11）。

[図19]EDTAあるいは銅イオンを添加した際のUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応について試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例12）。

[図20]バリン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを共存させ、それらアミノ酸濃度を変化させた条件下における異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例13）。

[図21]プリムリン存在下UV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物を各種抗プリオン蛋白質抗体で検出した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例14）。

[図22]図21の結果について、異常型タンパク質の単量体シグナルに対するクロスリンク反応物（二量体）シグナルの強度比率を抗体別に示したグラフである。

[図23]実験例14で用いた抗プリオン蛋白質抗体のプリオン蛋白質上のエピトープの位置を示す図である。

[図24]一般的な二価架橋剤であるグルタルアルデヒドを用いてプリオン感染細胞溶解液でクロスリンクを行った時の、異常型タンパク質を検出した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例15）。

[図25]図24の場合と同様、PK処理なしの総プリオン蛋白質を検出した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例15）。

[図26]図24の場合と同様、 β アクチンを検出した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例15）。

[図27]異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物を、強力なタンパク質変性処理を行った後に精製したものの電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例16）。

[図28]実験例16で不活化した異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物のプリオン活性をマウスによるバイオアッセイで示したグラフである（実験例17）。

[図29]擬似異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物として遺伝子組換えタンパク質を検討した結果を示す電気泳動像のタンパク質染色の図面代用写真である（実験例18）。

[図30]不活化した擬似異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物をワクチン接種し、プリオンを腹腔感染させたマウスの脾臓中の異常型プリオン蛋白質を検出した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面代用写真である（実験例19）。

[図31]図30の異常型プリオン蛋白質シグナルを定量化したグラフである。

[図32]AAアミロイドーシスをおこす異常型タンパク質であるアミロイドAを含む組織溶解液を用いて、プリムリン存在下UV照射によるアミロイドAに対する効果を試験した結果を示す電気泳動像のウエスタンブロットの図面

代用写真である（実験例20）。

[図33]不活化したアミロイドAクロスリンク反応物をワクチン接種し、AAアミロイドーシスを誘導したマウスの脾臓と肝臓の組織中のアミロイドをコンゴーレッド染色し偏光顕微鏡下で検出した結果を示す組織の図面代用写真である（実験例20）。

[図34]図33の結果をまとめた表である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明について詳細に説明するが、本発明は説明に用いた具体的な形態のみに限定されるものではない。

[0016] 本発明の一実施形態は、コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質がクロスリンクされた、不活化オリゴマータンパク質である。

本発明者らは、コンフォメーション病に関して、プリオン病を例として異常タンパク質の凝集に着目し研究を進めたところ、特定の化合物などでプリオン病感染細胞を処理することで、異常型プリオン蛋白質がクロスリンクされた2量体、3量体、4量体などのオリゴマー形成が促進されることを見出した。一方で、正常型プリオン蛋白質では、クロスリンクの促進は生じなかった。また、当該現象は、プリオン感染細胞のみならず、セルライゼートや、個体におけるプリオン感染組織の抽出液でも生じた。

本発明者らは、当該クロスリンクの位置を特定すべく更に研究を進めたところ、異常型プリオン蛋白質構造モデル（非特許文献13）で示されるインターフェースと合致することに想到した。本発明はこのような知見に基づいてなされたものである。

なお、本明細書において「クロスリンク」とは、化学反応において官能基同士が反応して結びつく「架橋」とは概念が異なるものである。本明細書において「クロスリンク」とは、後述するクロスリンク剤により、コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質が多量体を形成するものである。

[0017] コンフォメーション病は、特定の宿主タンパク質についてその立体構造（

コンフォメーション)が変化されて難溶性となって細胞や組織や臓器に蓄積し病的状態をもたらす疾患である。典型的には、アルツハイマー病、び慢性レビー小体病、プリオン病、ポリグルタミン病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症に代表される神経難病や家族性アミロイドポリニューロパチー、AAアミロイドーシス、ALアミロイドーシス、透析アミロイドーシス、老人性アミロイドーシスなどのアミロイドーシスが含まれる。

[0018] 異常型タンパク質のクロスリンクは、例えば以下の化合物を添加することで生じる。

プリムリン、コンゴレッド、メチレンブルー、ルシフェリン、1, 3-bis (3, 4-dimethoxyphenyl) propane-1, 3-dione、チオフラビンT、コンパウンドBなどの色素系・発光系化合物、過硫酸アンモニウム、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンなどのラジカル発生剤、など。

更には紫外線の照射によっても、クロスリンクが生じる。

これらのものを1種又は2種以上組み合わせて使用することで、異常型タンパク質のクロスリンクを生じさせることができる。

[0019] クロスリンクを生じさせる化合物の添加量は、化合物の種類、コンフォメーション病の種類、用いる材料やその処理方法などにより適宜設定できる。一例をあげると、プリオン病の異常型タンパク質をクロスリンクするためにプリムリンを使用する場合、0.5 μ M~50 μ M添加することが好ましい。

[0020] 本実施形態のオリゴマータンパク質は、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質が、クロスリンクされて多量体を形成するものである。オリゴマーは典型的には2量体であり、3量体であってよく、4量体であってよく、5量体であってよく、6量体であってよいが、その多くは2量体あるいは3量体である。

[0021] 本実施形態のオリゴマータンパク質を形成する単量体の残基数は特に限定されないが、ハンドリングの容易性及び分子デザインの容易性から、クロス

リンク部位を含みかつクロスリンク部位以外のアミノ酸を多く含まないフラグメントであることが好ましい。そのため、後述する酵素処理により断片化されていてもよい。

単量体の残基数はクロスリンク部位を含むものであれば特段限定されないが、５以上であってよく、８以上であってよく、１０以上であってよい。また、２５以下であってよく、２０以下であってよく、１５以下であってよい。

[0022] 本実施形態のオリゴマータンパク質の分子量は特に限定されないが、１０００以上であってよく、１５００以上であってよく、２０００以上であってよく、また５０００以下であってよく、４０００以下であってよく、３０００以下であってよい。

[0023] 本実施形態のオリゴマータンパク質のクロスリンク部位は、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質のインターフェースで生じる。コンフォメーション病を引き起こす異常型蛋白質の構造は未だ不明確な部分もあるものの、例えば異常プリオンタンパク質の構造モデルが提唱されているなど、明らかになりつつある（非特許文献１３）。本発明者らの実験では、異常プリオン蛋白質のクロスリンク部位が、当該構造モデルにおけるインターフェース２又はインターフェース３に相当することが確認された。また、異常型プリオン蛋白質の場合には、アミノ酸残基１１０番近傍が関係している。ここでいう近傍は±５残基であり、±３残基であってよく、±２残基であってよく、±１残基であってよい。

[0024] コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質が、クロスリンクされたオリゴマータンパク質の製造方法を以下に示す。当該製造方法は本発明の別の実施形態である。

本実施形態に係る製造方法は、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質を準備する準備ステップ、前記異常型タンパク質にクロスリンク処理を施し、オリゴマーを形成させるクロスリンクステップ、及びクロスリンクされたオリゴマータンパク質を回収する回収ステップ、を含むオリゴマ

ータンパク質の製造方法である。

[0025] 準備ステップでは、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質を準備する。異常型タンパク質の由来は特に限定されず、ヒト由来であってよく、マウス、ラットなどの実験動物由来であってもよく、細胞由来であってもよく、試験管内で作製されたものでもよい。異常型プリオン蛋白質であれば、プリオン病の感染患者脳や感染動物脳や感染細胞などから得ることができる。

また、異常型タンパク質を保有する個体（例えばマウス、ラットなど）であってよく、異常型タンパク質を含むセルライセートであってよい。また、異常型タンパク質に似せた大腸菌組換えタンパク質であってもよく、異常型タンパク質に似せた合成ペプチドであってもよい。

[0026] オリゴマータンパク質を抗原（ワクチン）として用いる場合には、準備したタンパク質を不活化させる変性ステップを行ってもよい。本明細書において「不活化」とは、クロスリンクした異常型タンパク質の抗原性は保持しつつ、投与対象であり得るマウス、ラット等の実験動物やヒトに対して致死させない状態であることをいう。オリゴマータンパク質が不活化したか否かは、バイオアッセイ等で確認することができる。

不活化は常法に従い行われる。例えば、ソディウムドデシルサルフェート（SDS）、グアニジン塩酸、グアニジンチオシアン酸、尿素、ギ酸などのタンパク質変性剤で異常型タンパク質の変性が行われる。なお、変性ステップは、クロスリンクステップ後の異常型タンパク質に対して行ってもよい。

[0027] クロスリンクステップは、異常型タンパク質にクロスリンク処理を施すステップである。クロスリンクには、上記説明したクロスリンクを生じさせる化合物を添加させること、紫外線を照射するなどの方法により行われる。化合物の添加量、紫外線の照射量は、コンフォメーション病の種類、化合物の種類、用いる材料やその処理方法により適宜設定される。また、紫外線の波長も特段限定されないが、例えば365nmであってよい。

クロスリンクされたか否かは、例えばプロテイナーゼKなどでタンパク質

を酵素処理し、SDS-PAGEにより分子量を検出することで、判断することができる。クロスリンクすることでオリゴマーが形成され、単量体と比較してバンドが移動した、2量体、3量体等を表す高分子量バンドが観察される。

[0028] クロスリンクされたオリゴマータンパク質を回収するステップは、常法に従い行うことができる。この際、酵素処理等により、クロスリンク部分以外を除くよう、断片化してもよい。また、更にクロスリンク部分の単離生成を行ってもよい。

[0029] 上記方法により得られたオリゴマータンパク質は、コンフォメーション病の治療に対し、非常に有用なものとなる。オリゴマータンパク質を不活化処理して得られた、不活化オリゴマータンパク質は、コンフォメーション病の予防又は治療剤として用いることが可能であり、これに薬学的に許容される担体を加えることで、コンフォメーション病の予防又は治療のための医薬組成物として用いることが可能となる。医薬組成物の一例として、不活化オリゴマータンパク質を抗原としてワクチン注射することで、能動免疫療法が可能となり、またコンフォメーション病の進行を遅らせることが可能となり、症状が改善し得る。

[0030] なお、本実施形態において、不活化の対象である、「コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質がクロスリンクされたオリゴマータンパク質」は、当該タンパク質フルレングスでなくても、その活性中心を保持しつつ、その一部を置換、削除など改変したものであってよく、同様の活性を有するペプチドであってよく、同様の活性を有する組換えタンパク質であってよい。

[0031] また、クロスリンク部位のインターフェース構造を解明することで、インターフェースを特異的に認識する抗体や化合物をデザインすることが可能となり、クロスリンクを阻害する治療薬・予防薬を得ることができる。

[0032] また、本発明の別の形態は、上記オリゴマータンパク質、又上記製造方法で得られたオリゴマータンパク質に、候補化合物を接触させるステップ、及

び前記候補化合物を接触させたオリゴマータンパク質の活性及び／又は構造を測定するステップ、を含む、コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法、又は、コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質に、候補化合物を接触させる接触ステップ、該異常型タンパク質にクロスリンク処理を施し、オリゴマーを形成させるクロスリンクステップ、及びクロスリンクさせたオリゴマータンパク質の活性及び／又は構造を測定する測定ステップ、を含む、コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法である。

[0033] クロスリンクされた、コンフォメーション病を引き起こすオリゴマータンパク質は、クロスリンクにより、インターフェースの構造が保たれる。そのため、治療医薬としての候補化合物を当該オリゴマータンパク質に接触させ、オリゴマータンパク質の活性及び／又は構造を測定することで、直接的に候補化合物がコンフォメーション病に何らかの作用を与えるか否かを理解することができる。又は、異常型タンパク質に候補化合物を接触させた後にオリゴマータンパク質の形成活性を測定することで、直接的に候補化合物がコンフォメーション病に何らかの作用を与えるか否かを理解することができる。特に、候補化合物の接触により、オリゴマータンパクのクロスリンク部位が、緩む、撓む、構造が変化する、又はクロスリンク効率が低下する、などの現象が生じた場合、当該候補化合物は、コンフォメーション病の凝集が解消することに貢献する化合物であると判断できる。そのため、本実施形態のスクリーニング方法により、コンフォメーション病治療薬の候補化合物に対する直接的なアッセイを行うことが可能となる。

[0034] 以下、本発明に関連する実験について、異常凝集タンパク質の代表である異常型プリオン蛋白質およびアミロイドAを用いて説明する。

[0035] <実験例1>

プリオン感染細胞の細胞溶解液をもちいて、異なるプリオン株であってもプリムリンの異常型プリオン蛋白質クロスリンク作用が発揮されることを観察した。また正常型プリオン蛋白質除去処理とプリムリン処理によるクロスリンク反応の順序を入れ替えることによって、クロスリンク反応がプリオン

蛋白質の分子種の中で、異常型プリオン蛋白質に起こり、かつ異常型プリオン蛋白質では部分分解の有無にかかわらずに起こることが判明した。

[0036] [方法]

プリオン持続感染細胞としては、スクレイピープリオンであるRML株がマウス神経芽細胞腫細胞 (Neuro2a) に持続感染したScN2a細胞、あるいは22L株がNeuro2aに持続感染したN167細胞を用いた。細胞培養は、細胞培養フラスコ(底面積9.7cm²)にて培養し、細胞密度がコンフルエントとなった時点で培養上清を除き、リン酸バッファー生理食塩水[PBS、pH6.5]で細胞を洗浄した。洗浄液を十分に除き、リシス液[0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.5%NP-40(商品名、和光純薬工業(株)オクチルフェニルエーテル)、残部PBS]0.5mLを用いて細胞を溶解した。軽く遠心分離して高分子核酸を除いた上清を細胞溶解液とした。図1はプリムリンの化学構造式を表しており、化合物プリムリン(primuline、別名direct yellow-7、cas# 8064-60-6)はMPバイオサイエンス社より購入したものを精製せずに使用した。各々の細胞溶解液を12サンプルずつ準備し、6サンプルにプリムリンを添加した。終濃度は、0、10、2、0.4、0.08、0.016μMである。一方、残りの各々6サンプルについてタンパク質分解処理を行った。タンパク質分解処理は、20μL細胞溶解液にトリチラキウム アルBUM (Tritirachium album) 由来のプロテイナーゼK (PK: Proteinase K) を終濃度10μg/mLとなるように加えて37℃で30分反応(タンパク質分解)させた後、フェニルメタンスルホニルフロライド (phenylmethane sulfonyl fluoride: PMSF) を終濃度1mMとなるように加えてタンパク質分解反応をとめた。以下、このタンパク質分解・停止反応処理をPK処理と呼ぶこととする。30分間のプリムリン処理後にPK処理したサンプルと、PK処理後に30分間のプリムリン処理したサンプルを準備した。その後、タンパク質分解処理抵抗性である異常型プリオン蛋白質(以下PrPr

es と呼ぶ) を遠心処理 (9, 000 × g, 1 分間) で沈殿物として回収し、この沈殿全量に対し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用バッファー [1% SDS (ソディウムドデシルサルフェート)、0.05% ブロモフェノールブルー、4% グリセロール、1% βメルカプトエタノール、25 mM トリス塩酸 pH 6.8] 20 μL を加えて懸濁し、95℃、5 分間の熱変性処理を加えて試料を調製した。以下、この段階の試料を SDS-PAGE サンプルと呼ぶこととする。SDS-PAGE サンプルをイシカワ、ドウウラらの方法 [Journal of General Virology、2004 年、85 巻、1785-1790 頁] に準じ、15% トリス・グリシン SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、ウェスタンブロット法で PrPres を検出した。ウェスタンブロット法においては、電気泳動した蛋白質をナイロンメンブラン (ミリポア社製、PVDF メンブレイン) にブロッティングし、プリオン蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体 (SPI-BIO 社製、SAF83 (5000 倍希釈))、及び、アルカリフォスファターゼ・コンジュゲートヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (プロメガ社製 (20000 倍希釈))、化学発光検出試薬 (アマーシャム社製、CDP-Star detection reagent) を使用してプリオン蛋白質の検出を行った。

[0037] [結果]

図 2 に N167 および ScN2a の細胞溶解液をもちいてプリムリンのクロスリンク作用の作用対象とプリオン株の違いについて調べた結果を示す。レーン 1~6 は、PK 処理ののちプリムリンを作用させたもの、レーン 7~12 はプリムリンを作用させたのちに PK 処理したものであり、添加したプリムリンの濃度は、レーン 1 及び 7 が 0 μM、以下レーン 2 及び 8、レーン 3 及び 9、レーン 4 及び 10、レーン 5 及び 11、レーン 6 及び 12 がそれぞれ、10、2、0.4、0.08、0.016 μM である。上段のブロットは N167 の、下段のブロットは ScN2a の細胞溶解液を用いた結果を示している。プリオン株に関係なく、プリムリンの濃度に依存性に異常

型プリオン蛋白質クロスリンク反応物が観察された。プリムリン作用とPK処理の順番については、プリムリンを作用させたのちPK処理を行った方（レーン7～12）が、PK処理を行ったのちプリムリンを作用させた方（レーン1～6）よりも対応するプリムリン濃度において顕著にクロスリンク反応物の含量が増加している。PrPresは異常型プリオン蛋白質に対するPK処理によってN末端領域が切断されたタンパク質分解抵抗性の部分産物である。すなわちPrPresと異常型プリオン蛋白質とは分子サイズにおいて異なる。実施例1の結果はプリムリンの作用は切断を受けていない異常型プリオン蛋白質に作用し易く、PrPresには作用がやや弱いことを示している。従って本実験例は異常型プリオン蛋白質とPrPresの分子サイズ以外の生化学的差異をウエスタンブロット上で描出しているものといえる。

[0038] <実験例2>

プリムリンによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は作用時間依存的である。

[方法]

実験例1に準じてN167プリオン持続感染細胞を25cm²のスケールで培養し、細胞溶解液1mLを得た。終濃度、10μMになるようにプリムリンを添加し添加後0、60、120、180、240、360分に150μLのサンプルを採取した。サンプルは採取後冷凍し、全サンプル採取後PK処理を行い、PrPresを遠心処理によって回収し、SDS-PAGEサンプルを調製した。実験例1に準じてPrPresの検出を行った。比較のため、プリムリンを含まない細胞溶解液に対して同様の処理を行い、サンプルを得た。実験例1に準じてPrPresの検出を行った。得られた画像から生成したクロスリンク反応物の量をその画素密度から定量して、エクセル上にプロットするとともに、一次反応を想定した解析式へのフィッティングを行った。

[0039] [結果]

図3にN167細胞溶解液をもちいてプリムリンのクロスリンク作用の作用時間依存性について調べた結果を示す。レーン1～6は、プリムリン存在下、レーン7～12はプリムリン非存在下での結果である。作用時間は、レーン1、7が0分、以下レーン2、8、レーン3、9、レーン4、10、レーン5、11、レーン6、12がそれぞれ、60分、120分、180分、240分、360分である。プリムリン存在下で圧倒的にクロスリンク反応物形成が促進されていることがわかる。また、その作用は反応時間依存的である。図4は生成したクロスリンク反応物の相対的な量を縦軸、時間を横軸としてプロットしたもので、一次反応の時間に対する成長曲線を実線で示している。以上のことからプリムリンによる異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は時間依存的であるといえる。

[0040] <実験例3>

プリムリン処理細胞にUVを照射すると、異常型プリオン蛋白質のクロスリンク反応が促進される。すなわち、プリムリンは異常型プリオン蛋白質のタンパク質間クロスリンク光反応増感剤であり、プリムリンとUV照射の併用による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は、UV照射時間依存的である。同時に、プリムリン非存在下でも、UV照射によって異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が促進されることが判明した。

[0041] [方法]

プリムリンを含まずあるいは、終濃度2 μ Mでプリムリンを含む培養液を用いN167プリオン持続感染細胞を底面積25 cm²のスケールの細胞培養フラスコで培養し、リシス液で細胞を溶解して、細胞溶解液1 mLを得た。15 cmの距離においてUVランプ（フナコシ社、ハンディタイプ；主波長365 nm）の照射を行い、0、15、30、45、60分に195 μ Lのサンプル細胞溶解液を採取した。サンプルは採取後冷凍し、全サンプル採取後、PK処理を行いPrPresを遠心処理によって回収し、SDS-PAGEサンプルを調製した。クロスリンク反応物の分子量を見やすくするために、プリオン蛋白質の糖鎖を除く処理を行った。すなわち、SDS-PAGE

サンプルに対してフラボバクテリウム メニンゴセプトキウム (*Flavobacterium meningosepticum*) 由来 PNGase F を NEB 社の取扱説明書通りに添加して、SDS-PAGE サンプルに含まれる蛋白質上の糖鎖除去反応を行った。37℃、1 時間の反応時間を経たのち、5 倍濃縮 SDS-PAGE 用バッファーを加え、95℃、5 分間の熱変性処理を加えた。以下、この糖鎖除去・反応停止処理を脱糖鎖処理と呼ぶこととする。これらの処理を行った試料を実験例 1 と同様に電気泳動し、ウエスタンブロット法で PrPres を検出した。

[0042] [結果]

図 5 にプリムリン存在下、あるいは非存在下で培養した N167 細胞の溶解液をもちいた異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の UV 照射時間依存性について調べた結果を示す。レーン 1～5 は、プリムリン非存在下、レーン 6～10 はプリムリン存在下で培養した細胞の溶解液を用いている。UV 照射時間は、レーン 1、6 が 0 分、以下レーン 2、7、レーン 3、8、レーン 4、9、レーン 5、10 がそれぞれ、15 分、30 分、45 分、60 分である。

まず、これまでの図 2、図 3 において観測されていた異常型プリオン蛋白質のバンドはプリオン蛋白質一分子あたり、0 箇所、1 か所、2 か所に糖鎖修飾を受けた三種類の分子種を検出していたが、実験例 3 において糖鎖除去処理を施した結果では、レーン 1 に見られるようにバンドは糖鎖修飾が 0 箇所のバンドに収束している。この無糖鎖修飾の PrPres の分子量は 17 kDa (単量体サイズ) である。一方、UV 照射処理したレーンにおいては 34 kDa (二量体サイズ) と 51 kDa (三量体サイズ) に明瞭なバンドが検出される。これらのバンドは 17 kDa に対して整数倍であり、熱変性処理時には強力なタンパク質変性剤や還元剤を含んでいることから、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物であることに矛盾しない。糖鎖除去処理においてこれらのバンドは消失しないことから、クロスリンク反応は異常型プリオン蛋白質上の糖鎖部分で起こっているのではないことが明らかであ

る。

[0043] プリムリン存在、非存在によらず、UV照射依存的に異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が進行していることが確認できる。プリムリンの使用とUV照射の二つの手法により、レーン7、8では異常型プリオン蛋白質に由来する単量体がほとんど検出されず、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物である二量体や三量体が主たるPrPresの成分となっていることがわかる。しかしながらレーン9、10で見られるように促進反応が過剰になると全体的なPrPresの検出感度の低下が確認された。この光ブリーチ効果の要因は不明である。

以上のことから、UV照射は異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を誘起することを示している。異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応で観察されるような二量体のバンドは、PrPresの検出実験ではしばしば観測されていた事実であるが、発生条件を明記した報告はこれまでにない。市販のクロスリンカーを用いた実験は報告されているものの、それらは精製タンパク質を用いたごく一般的な方法であり、ここでの観察のように、不純物を含むような細胞溶解液でのクロスリンクの観察は独自のものである。さらにプリムリンの使用はUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を大幅に促進されることから、プリムリンは異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応において光増感剤として働くことが明らかとなった。

[0044] <実験例4>

これまでの実験例のようなプリムリンあるいはUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は正常型プリオン蛋白質には作用しない。また、細胞内で凝集・解離平衡状態にあることが知られている β アクチンもウエスタンブロット検出の条件下においてクロスリンク反応物は検出されない。

[0045] [方法]

実験例1に準じてプリオン非感染Neuro2a細胞を底面積25cm²のスケールの細胞培養フラスコで培養、リシス液で溶解し、細胞溶解液1mLを得た。150 μ Lずつ6本のチューブにとり、A、B、C、D、E、Fと

した。チューブC、Dは終濃度 $1\ \mu\text{M}$ になるように、E、Fは終濃度 $5\ \mu\text{M}$ になるようにプリムリンを添加した。チューブB、D、Fは $15\ \text{cm}$ の距離において30分間のUVの照射を行い、一方チューブA、C、Eは暗所に保存した。照射反応終了後、それぞれのチューブから $12.5\ \mu\text{L}$ の反応溶液をそれぞれ、正常型プリオン蛋白質検出用と β アクチン検出用の2本ずつ、計12本採取し、SDS-PAGEサンプルを調製した。正常型プリオン蛋白質検出用サンプルは実験例3に準じて脱糖鎖処理を行い、実験例1に準じて正常型プリオン蛋白質の検出を行った。 β アクチン用のサンプルは脱糖鎖処理を行わず、一次抗体として抗 β アクチン抗体を用いるほかは実験例1と同様に、目的蛋白質である β アクチンを検出した。

[0046] [結果]

異常型プリオン蛋白質のクロスリンク反応をもたらす条件での、正常型プリオン蛋白質と β アクチンに対する影響を調べた。図6は脱糖鎖処理をした、PK処理を行わない正常型プリオン蛋白質、図7は β アクチンを検出したものである。図6、7の各々のレーン1～6は、[方法]のチューブA～Fに対応している。すなわち、レーン1、2がプリムリン非存在下、以下レーン3、4、レーン5、6がそれぞれ、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ である。一番過酷な反応条件であるレーン6においては軽度の光ブリーチ効果が認められるものの、プリムリン存在、非存在によらず、UV照射によるクロスリンク反応は認められなかった。仮にクロスリンクにより二量体を形成すれば、正常型プリオン蛋白質、 β アクチンについて、それぞれ、 $46\ \text{kDa}$ 、 $80\ \text{kDa}$ にバンドが検出されることが期待される。従って、これまでの実施例においてプリムリン添加、UV照射、およびそれらの併用によるクロスリンク反応物の形成は、異常型プリオン蛋白質において特異的な反応であることが明らかとなった。

[0047] <実験例5>

プリオン感染マウスの脳から得た異常型プリオン蛋白質を含む粗精製画分の溶液に対してプリムリン存在下、UV照射処理において、異常型プリオン

蛋白質クロスリンク反応が観測されることを示した。

[0048] [方法]

マウスプリオン株（22^Lプリオン、1%（w/v）PBS懸濁液）をマウス（ICR）に脳内接種し、発病末期まで飼育した後に、脳を採取した。採取した脳（260mg）を破砕用チューブに入れ、-80℃で凍結させた。PBS（2340μL）を添加し、ステンレス製攪拌子で破砕することによって10%（w/v）の脳ホモジネートを作製し、密閉可能なチューブに200μLずつ分注した。そのうち2本のチューブに対して以下の操作を行った。それぞれのチューブにプロテナーゼE（10mg/mL水溶液）2μLを添加し、37℃、30分間反応させた。その後、EDTA（0.5M水溶液、pH8.0）4.1μLを添加し最終濃度10mMとした。4%サルコシルを含むPBSを206μL添加し攪拌後に、ベンゾネース0.83μLを添加し37℃、30分間反応させた。反応液に4%（w/v）リタングステン酸水溶液（pH7.4）を33.5μL、60%（w/v）ヨードオキサノール705.3μLを加え、さらに、4%（w/v）リタングステン酸水溶液（pH7.4）を57.2μL添加した。それぞれのチューブについて遠心分離（16100×g、90分間）を行い、回収した上清をまとめたのち、濾過膜（濾過径0.45μm）に通過させ濾液（2000μL）を得た。濾液を480μLずつ4本のチューブに分注した。そのうちの3本に最終濃度20μMになるようにプリムリンを添加し、10cmの距離を置いた30分間のUV照射を行った。残りの一本は無処理サンプルとした。反応後すべてのサンプルに0.3%PTA液〔2%（w/v）サルコシル、0.3%（w/v）リタングステン酸、PBS〕480μLを添加することによってヨードオキサノール含有量を17.5%（w/v）に調整したのち、遠心分離（16100×g、90分間）を行い、上清を廃棄した。各々の沈殿物に対して洗浄液〔17.5%（w/v）ヨードオキサノール、0.1%（w/v）サルコシルを含むPBS〕200μLを添加し、攪拌後、16.2μLの4%（w/v）リタングステン酸水溶液（pH7.4）を添

加し、遠心分離（ $16100\times g$ 、90分間）を行い、上清を廃棄し、沈殿物を得た。沈殿物に対して洗浄液 $200\mu L$ を添加し、PK処理（終濃度 $10\mu g/mL$ 、 $37^{\circ}C$ 、60分間）を行った。PMSFを最終濃度 $1mM$ になるように添加し、攪拌後、 $16.2\mu L$ の4%（ w/v ）リタングステン酸水溶液（ $pH7.4$ ）を添加し、遠心分離（ $16100\times g$ 、30分間）を行い、上清を廃棄し、沈殿物を得た。沈殿物に対して洗浄液 $200\mu L$ を添加し、攪拌後に $16.2\mu L$ の4%（ w/v ）リタングステン酸水溶液（ $pH7.4$ ）を添加し、遠心分離（ $16100\times g$ 、30分間）を行い、上清を廃棄し、沈殿物を得た。この洗浄工程をさらに2回繰り返したのち、実験例1に準じてSDS-PAGEサンプルを作製、さらに、実験例3に準じて脱糖鎖処理を行った。これらの処理を行った結果、無処理の試料1本とプリムリン存在下UV照射処理の試料3本が得られる。それらのうち、無処理の試料1本（ $10\mu L$ ）とプリムリン存在下UV照射処理の試料1本（ $10\mu L$ ）を用い、その $1/200$ に相当する量を実験例1と同様にSDS-PAGE電気泳動し、ウエスタンブロット法でPrPresを検出した。残り全量をSDS-PAGE電気泳動を行い、アクリルアミドゲルをタンパク質銀染色キット〔（銀染色IIキット ワコー）Wako社〕の説明書通りに銀染色した。

[0049] [結果]

図8にプリオン感染マウス脳サンプルに対してのプリムリン存在下UV処理によるクロスリンク反応の結果を示す。プリムリン存在下UV処理により、マウス感染脳サンプルにおいても異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物の形成が観察された。この結果は、生物材料の由来を問わず異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が起こりえることを示している。一方、図9で示されているように、銀染色では目立ったバンドの変動は観察されないことから粗精製画分中の混入タンパク質ではプリムリン存在下UV処理に対してむやみにクロスリンク反応物形成が生じていないことがわかる。

[0050] <実験例6>

プリムリンと同等、あるいは、類似した効果を持つ化合物の探索をおこない、コンゴーレッドが同様の異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の増感剤としての効力を持つことを示した。

[0051] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、125 μ Lずつ9本のチューブにとり、A、B、C、D、E、F、G、H、Iとした。チューブB～Iに終濃度50 μ Mになるように以下に示す化合物を添加した。チューブAには他のチューブと同量となるようにリシス液を添加した。添加した化合物は、チューブB、C、D、E、F、G、H、Iに対して、プリムリン、リボフラビン、インドシアニングリーン、エバンスブルー、メチルバイオレット、スーダンブラック、フルオロセイン、コンゴーレッドである。チューブA～Iに対して7cmの距離をおいて15分間のUV照射を行った。その後、実験例3に準じてPK処理、SDS-PAGEサンプル調製、脱糖鎖処理を行い、実験例1に準じてPrPresの検出を行った。

[0052] [結果]

図10に使用した化合物の化学構造式を、図11に様々な化合物混在下でのUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の実験結果を示す。ここでは汎用されている色素系化合物についての検討を行った。図11の各々のレーン1～9は、[方法]のチューブA～Iに対応している。ここまでの実験例と同様に、レーン1、2の比較においてプリムリンは異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の増感剤として作用している。レーン1とレーン3～8の比較において、特筆すべき効果を発揮するものは見つからなかった。レーン9のコンゴーレッドではプリムリンに比べてより容易にクロスリンク反応物（多量体）を形成することがわかった。しかしながらその反応の激しさのため、反応条件をコントロールすることが困難であると考えられた。

[0053] <実験例7>

実験例 6 と同様に、プリムリンと同等、あるいは、類似した効果を持つ他の化合物の探索をおこない、ルシフェリンが同様の異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の増感剤としての効力を持つことが明らかになった。一方、メチレンブルーの添加は異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を促進したが、UV 照射効果は見られなかった。

[0054] [方法]

実験例 2 に準じて N 1 6 7 プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、200 μ L ずつ 12 本のチューブにとり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 とした。チューブ 3 ~ 12 に終濃度 50 μ M になるように以下に示す化合物を添加した。チューブ 1、2 には他のチューブと同量となるようにリシス液を添加した。添加した化合物は、チューブ 3、4 にプリムリン、チューブ 5、6 にメチレンブルー、チューブ 7、8 にルミノール、チューブ 9、10 にルシフェリン、チューブ 11、12 に α けい皮酸である。チューブ 2、4、6、8、10、12 に対して 7 cm の距離をおいて 15 分間の UV 照射を行った。その後、実験例 3 に準じて PK 処理、SDS-PAGE サンプル調製、脱糖鎖処理を行い、実験例 1 に準じて PrP^{res} の検出を行った。

[0055] [結果]

図 1 2 に使用した化合物の化学構造式を、図 1 3 に化合物混在下での UV 照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の実験結果を示す。実験例 7 においては反応に光が関与する代表的な化合物を選択した。図 1 3 の各々のレーン 1 ~ 12 は、[方法] のチューブ 1 ~ 12 に対応している。ここまでの実験例と同様、レーン 1、2 の比較において UV 照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク作用が示されており、レーン 3、4 の比較においてプリムリンが異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の増感剤として作用していることが示されている。新規に調べた化合物で特徴的であったのはルシフェリンとメチレンブルーである。レーン 9、10 の比較において、ルシフェリンはプリムリンと同様に UV 照射による異常型プリオン蛋白質クロス

リンク反応の増感作用を発揮した。一方、レーン5、6の比較においては、多量体を示すバンドの強度は同等であった。このことは、メチレンブルーはUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を促進しないことを意味しているが、レーン1、5の比較において顕著な多量体を示すバンドのシグナル増強が見られる。すなわち、メチレンブルーはプリムリン、コンゴレッド、ルシフェリンとは異なる作用様式で異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を起こしている。

[0056] <実験例8>

実験例7において発見したメチレンブルーの効果について検証した結果、添加による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は、数 μM ~150 μM 程度までのメチレンブルー濃度が適していることが示された。

[0057] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、160 μL ずつ8本のチューブにとり、1、2、3、4、5、6、7、8とした。添加したメチレンブルーの濃度は、チューブ1が0 μM 、以下チューブ2、3、4、5、6、7、8がそれぞれ、300、150、75、38、19、9.5、4.8 μM である。その後、実験例1に準じてPK処理、SDS-PAGEサンプル調製を行い、PrPresの検出を行った。

[0058] [結果]

図14にメチレンブルーのN167細胞溶解液をもちいた異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の濃度依存性について調べた結果を示す。図14の各々のレーン1~12は、[方法]のチューブ1~12に対応している。二量体を示すバンドの強度はレーン5~8において最も強く、以下メチレンブルー濃度が大きくなるにつれて二量体のバンド強度は減少したが、代わりに三量体に相当するバンドがより明瞭にレーン3~5で認められた。しかし、メチレンブルー濃度が300 μM であるレーン2では単量体・多量体の全てのバンド強度が減少していた。

[0059] <実験例9>

一般的なラジカル反応剤も、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を起こすことを示した。

[0060] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、500 μ Lずつ8本のチューブに分注した。チューブ2と6、3と7、4と8には過硫酸アンモニウムをそれぞれ0.05 mg、0.5 mg、5 mgを添加し、チューブ6、7、8にはさらにN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンをそれぞれ0.01 μ L、0.1 μ L、1 μ Lを添加した。37℃で1時間反応させた後に、それぞれのチューブのサンプルをPK処理用と無処理用に半分ずつに分け、PK処理用は実験例3に準じてPK処理、SDS-PAGEサンプル調製、脱糖鎖処理を行った。無処理用はPK処理を実施せず、PK処理工程を除いて実験例3に準じてSDS-PAGEサンプル調製、脱糖鎖処理を行った。全てのサンプルについて実験例1に準じてPrPresの検出を行った。

[0061] [結果]

図15に過硫酸アンモニウムを添加した異常型プリオン蛋白質への効果を、PK処理の無し有りで示す。サンプル1～4は、[方法]のチューブ1～4に対応している。過硫酸アンモニウム0.5 mg添加サンプルであるレーン3では、顕著な異常プリオン蛋白のクロスリンクによる二量体サイズのシグナルが観察された。図16には、過硫酸アンモニウムとN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを添加した異常型プリオン蛋白質への効果を、PK処理の無し有りで示す。サンプル5～8は、[方法]のチューブ5～8に対応している。図15と同様に、過硫酸アンモニウム0.5 mgとN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン0.1 μ Lを添加したサンプルであるレーン7では、顕著な異常プリオン蛋白質のクロスリンクによる二量体サイズのシグナルが観察された。したがって、ラジカル反応剤も異常型プリオン蛋白質のクロスリンク反応を誘導することが示された。

[0062] <実験例10>

UV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を活用して抗プリオン化合物を分類することが可能であり、この指標を用いて化合物の作用機序を考察することができる。また、このことは逆に、UV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を抗プリオン化合物の探索に利用できることを示している。

[0063] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、180μLずつ10本のチューブにとり、A、B、C、D、E、F、G、H、I、Jとし、チューブB、C、D、Eに正常型プリオン蛋白質から異常型プリオン蛋白質への構造変換を阻害することが知られているコンパウンドB (comp B: 4-[(E) - {2 - [4 - (1, 3-oxazol-5-yl) phenyl] hydrazinylidene} methyl] pyridine)、チューブG、H、I、Jに異常型プリオン蛋白質の構造を弛緩させることが知られているドキシサイクリン (DOX) を添加した。各終濃度はチューブB、G、チューブC、H、チューブD、I、チューブE、Jがそれぞれ、0.5、2、10、20μMである。チューブA、Fには他のチューブと同量となるようにリシス液を添加した。添加後、チューブA～Jを10cmの距離をおいて30分間のUV照射を行った。反応終了後、実験例3に準じてPK処理を行い、SDS-PAGEのサンプル調製を行い、脱糖鎖処理後に、実験例1に準じてPrPresの検出を行った。

[0064] [結果]

コンパウンドB (comp B) およびドキシサイクリン (DOX) はこれまでの報告で抗プリオン活性を示すことが知られている化合物である。例えば、コンパウンドBは、[Kawagoe K, Motoki K, Odagiri T, et al. Hydrazone derivative. WIP O Publication No. WO/2004/087641, 2004年10月14日]で製造に関して、[Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C, et al. Journal of Virology,

2007年, 81巻, 12889-12898頁]で正常型プリオン蛋白質から異常型プリオン蛋白質への構造変換を阻害することで細胞や動物で抗プリオン活性を発揮することが示されている。また、ドキシサイクリンに関しては[Tagliavini F, Forloni G, Colombo L, et al. Journal of Molecular Biology, 2000年, 300巻5号, 1309-1322頁]において異常型プリオン蛋白質の構造を弛緩させる作用が報告されている。本実験例では、この二つの化合物の異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応への影響を試験した。図17上段のウエスタンブロットのレーン1~10はそれぞれ、[方法]のチューブA~Jに対応している。図17下段のグラフは上記ウエスタンブロットの二量体サイズに相当する各レーンのバンドの強度について、レーン2~5はレーン1、レーン7~10はレーン6の強度を基準とした比として、添加した化合物の濃度を横軸にして表している。グラフから明らかなように、コンパウンドBを添加したときには実験例1のプリムリンで観察されたように添加濃度依存的に二量体バンドのシグナル強度が増強した。一方、ドキシサイクリンを添加したときには添加濃度依存的に二量体バンドのシグナル強度が減弱した。このように二つの抗プリオン化合物はUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の結果に影響を与えることができ、また、コンパウンドBとドキシサイクリンではそれらの作用の違いが異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の結果に反映されることが示された。したがって、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応に与える影響の差異を指標に、抗プリオン化合物として知られる化合物を分類し作用機序を推測することが可能である。また、本実験例の結果は、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応系が抗プリオン候補化合物の簡便な試験管内選抜系として使えることを示している。

[0065] <実験例11>

プリムリン存在下UV照射によって生成した異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物は尿素溶液処理によって単量体に戻らない。

[0066] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、200 μ Lずつ5本のチューブにとり、A、B、C、D、Eとし、各チューブに終濃度50 μ Mになるようにプリムリンを添加後、7cmの距離をおいて15分間のUV照射を行った。その後、実験例1に準じてPK処理をおこない遠心によってPrPresの沈殿物を得た。沈殿物を8 μ Lの濃度の異なる尿素水溶液で溶解させた。尿素溶液の尿素濃度はチューブA、B、C、D、Eにおいて0、2、4、6、8Mである。室温で10分間放置したのち、5倍濃度のSDS-PAGEサンプルバッファーを各チューブに添加し、SDS-PAGEのサンプル調製を行い、実験例1に準じてPrPresの検出を行った。

[0067] [結果]

これまでの実験例で観察されてきた異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物の性質について調査を行った。図18に異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物への尿素溶液の効果について調べた結果を示す。図18の各々のレーン1～5は、[方法]のチューブA～Eに対応している。各レーンの全体のPrPresのバンドのシグナル強度は尿素の存在によって減弱傾向にあったが、減弱の程度は尿素の濃度に依存しなかった。単量体バンドと二量体バンドのシグナル強度の比については、レーン1～5にわたって一定している。すなわち、尿素溶液の添加によっても多量体の単量体への解離は観測されなかった。

SDS-PAGEでは蛋白質の種類によって稀に、多量体が検出されることがある。これまでの実験例では、サンプルバッファー中に0.5%の β メルカプトエタノールと1%のドデシル硫酸ナトリウムが、還元剤とタンパク質可溶化・変性剤としてすでに含まれていた。通常の蛋白質ではこのサンプルバッファーを添加し加熱すると完全に単量体として可溶化され、単量体として然るべき分子量を示す位置に検出される。これはごくごく広範に利用されている実験法である。しかしながら特殊な蛋白質、例えば、トランスサイ

レチンでは、これまでの実験例の条件によるSDS-PAGEにおいては、四量体に相当する分子量のバンドが検出される。しかし、サンプルバッファーに尿素を添加することで[Jenne DE, Denzel K, Blatzinger P, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A., 1996年、93巻、6302-6307頁]、尿素の濃度が2.5 M程度でトランスサイレチンは完全に単量体に相当する分子量のバンドで検出されることが知られている。この引用文献では、精製トランスサイレチンを使用した実験であり、多量体を形成する要因が分子間の強固な水素結合によるものであることを示している。本実験例の結果は、プリムリン存在下UV照射によって誘起される異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物は、分子間の強固な水素結合によるものではないことを示している。また、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が、プリオン持続感染細胞溶解液という夾雑系で、かつ、溶解液中に相当な界面活性剤が存在する下で起こる点は、引用文献にある実験条件とは大きく異なるところであり、異常凝集タンパク質の構造的特徴と反応の特異性を反映している。

[0068] <実験例12>

EDTAや銅イオンが、UV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応に与える影響を調べた結果、EDTAは影響を与えないが、銅イオンは異常型プリオン蛋白質に影響し異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の効率を下げた。

[0069] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、180 μ Lずつ16本のチューブにとり、プリムリンを終濃度10 μ Mになるように添加し、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、Pとし、チューブB、C、D、F、G、HにEDTA添加リシス溶液、チューブJ、K、L、N、O、Pに硫酸銅添加リシス溶液を加えた。各終濃度はチューブB、F、チューブC、G、チューブD、Hがそれぞれ、50

00、1000、200 μ M、チューブJ、N、チューブK、O、チューブL、Pがそれぞれ、1000、200、50 μ Mである。チューブA、E、I、Mには他のチューブと同量となるようにリシス溶液を添加した。添加後、チューブE、F、G、H、M、N、O、Pを7cmの距離において15分間のUV照射を行った。その間チューブA、B、C、D、I、J、K、Lは冷暗所に保存した。反応後に実験例1に準じてPK処理を行い、SDS-PAGEのサンプル調製を行い、PrPresの検出を行った。

[0070] [結果]

プリオン蛋白質の51-91番アミノ酸配列の領域は銅イオンとの結合が報告されている[Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. Biochemistry Biophysics Research Communication, 1995年, 214巻, 993-999頁]。この領域は、正常型プリオン蛋白質を分解し、異常型プリオン蛋白質をその痕跡を示すタンパク質分解酵素耐性コア(PrPresと同意)へとなすPK処理において切断される部分である。プリムリン、UV照射、その併用による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応では、実験例1で観察されたようにPrPresではクロスリンク反応効率が低下するため、クロスリンク反応にはこの51-91番アミノ酸配列の間接的な関与、すなわち、クロスリンクがかかるときには補助的に関わるが、直接クロスリンクを受ける領域ではない可能性が示唆されていた。そこでこの51-91番アミノ酸配列への構造的な摂動を目的として、キレート剤や銅イオンを添加し、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応を実施した。図19にEDTAや銅イオンを添加した際のUV照射による異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応について調べた結果を示す。図19の各々のレーン1-16は、[方法]のチューブA-Pに対応している。レーン1-4、レーン5-8における比較においてEDTAは反応に影響を与えなかった。一方、レーン9-12、レーン13-16における比較においては、銅イオンの添加によって異常型プリオン蛋白質の単量体バンドのシグナル強度の低下が見

られ、かつ、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は抑制された。したがって、51-91番アミノ酸配列が異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の効率に間接的に関与している可能性がある。生細胞を用いた通常の化合物選抜系においては、銅イオンやEDTAなどの試薬は細胞障害を招くため使用できないが、本実験例のように細胞溶解液を用いた実験系での評価は異常型プリオン蛋白質に作用する試薬を評価する上で有用である。

[0071] <実験例13>

異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応は、UVの波長領域に吸収特性があるアミノ酸の添加によっても阻害を受けない。

[0072] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、180 μ Lずつ16本のチューブにとり、プリムリンを終濃度10 μ Mになるように添加し、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、Pとし、チューブB、C、Dにバリリン、チューブF、G、Hにチロシン、チューブJ、K、Lにヒスチジン、チューブN、O、Pにトリプトファンを添加した。各終濃度はチューブB、F、J、N、チューブC、G、K、O、チューブD、H、L、Pがそれぞれ、100、20、5mMである。チューブA、E、I、Mには他のチューブと同量になるようにリシス液を添加した。添加後、チューブA～Pを7cmの距離において15分間のUV照射を行った。反応後に実験例1に準じてPK処理を行い、SDS-PAGEのサンプル調製を行い、PrPresの検出を行った。

[0073] [結果]

発明者の実験例とは使用する溶媒条件、反応条件等は異なるものの、光反応によるクロスリンクについて精製蛋白質と化合物フルオロセインを利用した報告がある[Webster A, Britton D, Apap-Bologna A, Kemp G. Analytical Biochemistry, 1989年, 179巻, 154-157頁]。その報告において反応様式は示されていないもののフィブリノーゲンの分子間のクロスリンクが還元

剤を含まない SDS-PAGE ゲルにおいて示されている。また、10 mM 程度で、UV の波長領域に吸収特性があるアミノ酸であるトリプトファンやチロシンによって、精製フィブリノーゲンの光誘起クロスリンクが阻害されることが示されている。そこで、本実験例では UV の波長領域に吸収を持つアミノ酸を共存させることにより、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が阻害されるか否かを試験した。

図 20 はバリン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを共存させ、それらアミノ酸濃度を変化させた条件下における異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応の結果を示している。どのアミノ酸に対しても異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応に対する阻害効果は見られなかった。このことは、異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応が夾雑系で特異的に起こっていることからすると、当然の結果であると言える。本実験例における結果から、異常型プリオン蛋白質におけるクロスリンクは基質である異常型プリオン蛋白質同士が時間的に安定かつ極近傍に位置する部分で形成されることが推察される。

[0074] <実験例 14>

異常型プリオン蛋白質におけるクロスリンク反応は、抗プリオン蛋白質抗体パネルを用いた解析から、アミノ酸残基 110 番近傍が関係していることが示唆された。この領域は、Shirai らの異常型プリオン蛋白質モデル (BH4 モデル) (Structure, 2014 年, 22 巻 4 号, 560-571 頁) では異常型プリオン蛋白質でプリオン蛋白質同士が相互作用するインターフェース 2 及び 3 に関与する位置にある。

[0075] [方法]

実験例 2 に準じて N167 プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、プリムリンを終濃度 20 μ M になるように添加し、15 分間の UV 照射を行った。反応後に実験例 3 に準じて PK 処理を行い、SDS-PAGE のサンプル調製を行い、脱糖鎖処理を施して最終的に 90 μ L の SDS-PAGE サンプルを得た。レーン 1~7 に 4.8 μ L ずつ添加し、実験例 1 に準じて S

D S - P A G E ゲル電気泳動並びにナイロンメンブレインへのブロッティングを行った。P r P r e s シグナルの検出を、レーン 1、2、3、4、5、6、7 に対して一次抗体として、それぞれ 1 E 4、3 C 1 0、6 D 1 1、6 H 4、S A F 7 0、S A F 8 3、M 2 0 を用い、その後は実験例 1 と同様に行った。これらの抗体うち、M 2 0 は二次抗体として a n t i - g o a t I g G、残りは a n t i - m o u s e I g G を利用した。

[0076] [結果]

ここまでの実験例では抗体として S A F 8 3 を使用して P r P r e s の単量体シグナルや多量体シグナルの検出を行ってきた。S A F 8 3 のプリオン蛋白質上でのエピトープの位置は 1 2 6 - 1 6 4 番アミノ酸配列にある。さて、クロスリンク反応が起こると、その部位を含めた近傍にあるエピトープと特異抗体による抗原抗体反応が影響を受ける可能性が高い。そこで多種類の抗体を利用することによってクロスリンク部位を探った。図 2 1 はさまざまな一次抗体を用いて P r P r e s を検出した結果を示している。1 E 4 と 3 C 1 0 を用いた検出では他の 5 種類の抗体を用いた場合よりも二量体シグナル検出率が顕著に低下していた。図 2 2 は、図 2 1 の結果について単量体シグナル強度に対する二量体シグナル強度の比率を求めたものであり、縦軸にその比率を示したグラフである。1 E 4 と 3 C 1 0 を用いた検出では他の 5 種類の抗体を用いた場合よりも二量体シグナル検出率が有意に低下していることが明瞭である。各抗体が認識するプリオン蛋白質上のエピトープの位置を図 2 3 に示した。1 E 4 と 3 C 1 0 はともにアミノ酸残基 1 1 0 番付近の極めて狭い領域にエピトープが位置しており、これらの結果から、異常型プリオン蛋白質におけるクロスリンク反応はアミノ酸残基 1 1 0 番近傍が関係していることが示された。この領域は S h i r a i らの異常型プリオン蛋白質モデル (B H 4 モデル) (S t r u c t u r e, 2 0 1 4 年, 2 2 巻 4 号, 5 6 0 - 5 7 1 頁) によると、異常型プリオン蛋白質同士が相互作用する反応性局面であるインターフェース 2 及び 3 に関与する領域であることが示されており、この領域で UV 照射によるクロスリンク反応が生じても全く

矛盾しない。

[0077] <実験例 1 5>

グルタルアルデヒドのような一般的な二価架橋剤による架橋では異常型プリオン蛋白質に特異的なクロスリンクは不可能であることを示した。

[0078] [方法]

実験例 2 に準じて N 1 6 7 プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、180 μ L ずつ 6 本のチューブにとり、A、B、C、D、E、F とし、チューブ C、D、E、F にグルタルアルデヒドを添加した。各終濃度はチューブ C、D、チューブ E、F がそれぞれ、0.1、0.02% である。チューブ A、B にはその他のチューブと同量となるようにリシス液を添加した。添加後、チューブ B、D、F を 15 cm の距離をおいて 30 分間の UV 照射を行った。反応終了後に、 β アクチン検出用に各チューブ 10 μ L、PK 処理前の総プリオン蛋白質検出用に 20 μ L のサンプルを採取した。残りを実験例 3 に準じて PK 処理を行い、SDS-PAGE のサンプル調製を行い、脱糖鎖処理後に、実験例 1 に準じて PrPres の検出を行った。 β アクチンおよび、PK 処理前の総プリオン蛋白質の検出は実験例 4 に準じた操作を行った。

[0079] [結果]

グルタルアルデヒドは組織の固定等に汎用される分子内に 2 個のアルデヒド基を有する化合物である。一般的な架橋剤を用いて細胞溶解液のような夾雑系でクロスリンクを行なった時、プリオン蛋白質や β アクチンの検出がどのような様態を示すか試験した。図 24、図 25、図 26 のレーン 1~6 はそれぞれ、[方法] のチューブ A~F に対応している。図 24、図 25、図 26 はそれぞれ PrPres、PK 処理無しの総プリオン蛋白質、 β アクチンを検出したものである。

[0080] 図 24 において 17 kDa のバンドとして示される PrPres、ならびに図 25 において 17 kDa のバンドとして示される断片化異常型プリオン蛋白質は、各図レーン 5、6 に示されているように、グルタルアルデヒド存

在下において、検出効率が著しく低下している。また、図25において23 kDaのバンドとして示される異常型・正常型の全長のプリオン蛋白質はレーン5、6において示されているように低濃度のグルタルアルデヒド存在下で検出感度が低下している。しかし、図24、図25のレーン3～6には異常型プリオン蛋白質の二量体や三量体に相当するようなバンドは検出されない。一方、 β アクチンは細胞内で重合・脱重合を行う蛋白質として知られているが、図26のレーン3～6において多量体バンドは検出されておらず、かつ、グルタルアルデヒド高濃度存在時には抗体による検出効率が低下している。レーン5、6において示されているように低濃度のグルタルアルデヒドであればレーン1、2に示されるグルタルアルデヒド無添加時と遜色のない程度に単量体のシグナルが検出されている。

したがって異常型プリオン蛋白質特異的にクロスリンクさせることは、一般的な二価反応性のクロスリンカーを用いた手法では不可能である。

[0081] <実験例16>

異常型プリオン蛋白質クロスリンク反応物から、治療用生物材料あるいは治療薬創製用生物材料を製造する過程として必要な、タンパク質変性剤処理としてソディウムドデシルサルフェート添加熱処理に加えてグアニジンチオシアン酸処理を行った場合でも、クロスリンク反応物は影響を受けないことを電気泳動パターンで示した。

[0082] [方法]

実験例2に準じてN167プリオン持続感染細胞の細胞溶解液を得て、1 mLずつ12本のチューブにとり、そのうち6本に対してプリムリンと同等なクロスリンク活性をもつ1,3-bis(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-dioneを終濃度20 μ Mになるように添加し、10 cmの距離において80分間のUV照射を行った。残りの6本は冷暗所に保存した。反応終了後、12本のチューブを実験例1に準じてPK処理を行い、SDS-PAGEサンプルを次のように調製した。細胞溶解液の遠心後の沈殿を15 μ LのSDS-PAGEサンプルバッファー

に溶解し、95℃、5分間の熱変性処理を加えた。UV照射を行ったサンプル6本分、冷暗所保存の6本分をそれぞれ1本ずつのチューブにまとめ、90μLずつの溶液とした。各々のサンプルに水60μLを添加、攪拌後した液に対して、クロロホルム150μL、メタノール600μL、水450μLをこの順番に加え、6000×gで10分間の遠心分離を行った。上部の水層を除去し、そこにメタノール450μLを加え同様に遠心分離を行った後に、上部の有機層を除き、タンパク質性の沈殿を得た。沈殿にメタノール450μLを添加し、同様に遠心分離を行い、上層を廃棄することによって沈殿物を洗浄した。以上のタンパク質水溶液からタンパク質沈殿を得る処理をクロロホルム-メタノール沈殿と呼ぶ。洗浄した沈殿物を風乾後、その残渣に20μLの8Mグアニジンチオシアン酸水溶液を添加し、60℃で1時間反応させた。反応後に80μLの水を加えた合計100μLのサンプルに対してクロロホルム-メタノール沈殿を行い、風乾後の残渣に15μLのSDS-PAGEサンプルバッファーを添加し、その一部をウエスタンブロット用サンプルとし、実験例1に準じてPrPresの検出を行った。

[0083] [結果]

SDS-PAGEサンプルバッファーは、強力な界面活性剤ソディウムドデシルサルフェートを含んでいる。また、グアニジンチオシアン酸はタンパク質の強力な変性剤であることが知られている。治療用生物材料あるいは治療薬創製用生物材料を製造することを目的とする場合、感染性を持つ異常型プリオン蛋白質は強力なタンパク質変性により十二分に感染性を除去する必要があると同時に、生体に使用する以上、上記の強力なタンパク質変性剤も十二分に除去した試験物を調製する必要がある。この実験例で示した一連の方法で、タンパク質の徹底した変性による感染性の除去と使用した変性剤の除去が可能である。図27のウエスタンブロットの結果では、レーン1はクロスリンク未処理のサンプル、レーン2は1, 3-bis (3, 4-dimethoxyphenyl) propane-1, 3-dione存在下UV照射によるクロスリンク処理のサンプルを示している。この結果から、一

連のタンパク質変性処理ならびに変性剤除去処理においても、異常型プリオン蛋白質のクロスリンク反応物は影響を受けないことが示された。

既知量の組換えプリオン蛋白質を標準として定量したところ、レーン 1 に相当するサンプルにおいては、 150 cm^2 の N167 プリオン持続感染細胞から $48\text{ }\mu\text{g}$ 相当の異常型プリオン蛋白質が、レーン 2 に相当するサンプルにおいては、同プリオン持続感染細胞から $52\text{ }\mu\text{g}$ 相当の異常型プリオン蛋白質が得られた。したがって、1, 3-bis (3, 4-dimethoxyphenyl) propane-1, 3-dione 存在下 UV 処理では、その反応により異常型プリオン蛋白質が損失を被ることはない。また、図の右には、レーン 2 のバンドシグナルのデンストメトリーを示しているが、このデータから本実験例の反応条件では単量体と二量体が濃度比 7 : 3 で生じることが示された。

[0084] <実験例 17>

クロスリンク体を開裂させることなく、マウスを死に至らしめるプリオン活性の不活化に関する実験例 16 において得られた試料をマウスに投与することによって、実際にそのプリオン活性の不活化が十分であるか検証する。

[0085] [方法]

実験例 16 において、クロスリンク反応後に変性処理・脱塩処理を行って得られた試料は、N167 プリオン持続感染細胞の 150 cm^2 に相当する。これを $500\text{ }\mu\text{L}$ の PBS で懸濁し、 $20\text{ }\mu\text{L}$ ずつ Tga20 マウスの脳内に投与した。対照として、N167 プリオン持続感染細胞 25 cm^2 に相当する細胞溶解液から得られたタンパク質を、 $500\text{ }\mu\text{L}$ の PBS に懸濁した試料を調製し、 $20\text{ }\mu\text{L}$ ずつ Tga20 マウスの脳内に投与した。その後、両群とも通常通りに飼育し、投与日からマウスの死亡までの生存期間をもってプリオン活性について評価した。

[0086] [結果]

図 28 は、縦軸に各群の生存率、横軸に各試料の投与後の日数である。実線は、クロスリンク反応後に不活化処理した試料を投与したマウスの群、点

線は対照とした不活化していないプリオンの試料を投与したマウスの群である。プリオンの試料を投与したマウスは投与後 93 日ほどで死亡するのにに対して、不活化処理後の試料を投与したマウスは、投与後 200 日以上経過しても死亡するマウスは見られなかった。以上のことから十分に不活化できていると判断し、投与後 206 日をもって飼育を打ち切った。

[0087] <実験例 18>

実験例 14 の結果より、アミノ酸残基 110 番近傍部を認識する抗体の産生は、異常型プリオン蛋白質の正常型プリオン蛋白質との接触によって伝播・進行するプリオン病の予防或いは進行阻止能を発揮する可能性がある。この可能性の検証にあたり、異常型タンパク質伝播をその特徴とするプリオン病特有の以下の問題点を解決する必要がある。すなわち、抗原となるプリオン蛋白質クロスリンク反応物の動物への投与は、プリオン病の発症原因となってしまう。また、多量のプリオン蛋白質クロスリンク反応物を必要とするため、実験例 5 に準じた抗原となるプリオン蛋白質クロスリンク反応物では、免疫を行うのに十分な量の試料を得ることが容易ではない。そこで、疑似タンパク質として大腸菌組換えプリオン蛋白質をその原料として実施例 1 と同様な方法によりクロスリンク反応物試料を製造する方法の開発をおこなう。

[0088] なお、通常、大腸菌組換えプリオン蛋白質の凝集体は、マウス個体の脳を侵し、死に至らしめる「プリオン」の活性をもたない。また、細胞に感染してタンパク質分解酵素部分抵抗性プリオン蛋白質の生産を誘起することもない。マウス等の個体や神経芽細胞腫細胞のような培養細胞においては、プリオン蛋白質は翻訳後に糖鎖とグライコシルリン酸イノシトールという脂質が付与されて、成熟体となる。一方、大腸菌組換え蛋白質では、このような化学的修飾を受けない。これらの相違点は、上述した予想されうる 2 つの問題を回避できる。

[0089] [方法]

通常知られている方法を用いて、マウスプリオン蛋白質の 89 番から 23

1 番のアミノ酸に対応するDNA配列をタンパク質発現プラスミドベクターに組み込んだ。プラスミドDNAを調製し、タンパク質発現用の大腸菌に形質転換によって導入し、その大腸菌を培養して発現誘導を行った。発現タンパク質は大腸菌内に封入体として得られた。回収した大腸菌を、[300 mM 塩化ナトリウム、20 mM トリス塩酸 pH 7.5] (以下、バッファーH) 中で破碎し、遠心分離により目的タンパク質を含む沈殿物を得た。沈殿物をPBSで懸濁、再び遠心分離することによって回収した。回収した沈殿物に対して、6 M 尿素を含むバッファーHを加え、沈殿タンパク質の抽出を行った後に、遠心分離によってタンパク質抽出液を得た。タンパク質抽出液を分子量分画8000の透析膜を用いて、バッファーHに対して透析を行った。透析の内側の液を回収したのち、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフによって、溶離液として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水から0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルへの直線濃度勾配での溶出によって精製を行った。得られた画分を凍結乾燥して、脱塩粉末状のマウスプリオン蛋白質(89-231)を得た。典型的には500 mLの培養液から5.0 mgの乾燥粉末が得られた。同様にして全長に相当するマウスプリオン蛋白質(23-231)の乾燥粉末も調製した。

[0090] 得られた乾燥粉末状のマウスプリオン蛋白質(89-231)を少量の6 M 尿素水溶液に溶かし、100倍容量のリシス液で希釈した。この条件下で、当該タンパク質は徐々に凝集・沈殿が始まり、肉眼で確認できる。この希釈液を反応原料とし、2日間室温にて放置した後に、実施例1と同様の、プリムリン存在下でのUV照射処理を行った試験物と、希釈と同時にプリムリン存在下でのUV照射処理を行った試験物を用意した。それぞれの試験物はその反応処理後に反応液の5倍容量のメチルアルコールを添加し、蛋白質沈殿を形成させ、大気圧下で乾燥させたのち、0.1%トリフルオロ酢酸を含む、水・アセトニトリル(1:1)に溶解させ凍結乾燥させることによってタンパク質粉末を得た。この一部をとり、SDS-PAGEとウェスタンブロットで分析した。マウスプリオン蛋白質(23-231)についても同様

な処理を行い、希釈後直ちに反応させた試料、反応そのものをさせなかった試料の比較を行った。

[0091] [結果]

図 29 に希釈から 2 日間の時間をおいて反応させた試料と希釈後直ちに反応させた試料の多量体形成反応効率について調べた結果を示す。A の 1 レーンは、希釈から 2 日間の時間をおいて反応させたマウスプリオン蛋白質（89-231）試料の SDS-PAGE 後のクマシーブリリアントブルー染色像である。B の 1 レーンは希釈後直ちに反応させたマウスプリオン蛋白質（89-231）試料の SDS-PAGE 後の銀染色像である。希釈後直ちに反応させた場合には明瞭な多量体が形成されることがわかる。C は大腸菌組換えマウスプリオン蛋白質（23-231）の反応処理を行っていない試料（1 レーン）と反応処理を行った試料（2 レーン）の SDS-PAGE 後の銀染色像である。A B C の m レーンは分子量マーカである。マウスプリオン蛋白質（89-231）と同一反応条件において、マウスプリオン蛋白質（23-231）では明瞭な多量体は検出されなかった。マウスプリオン蛋白質（89-231）はマウスプリオン蛋白質（23-231）に比べて、より凝集しやすいとされておりクロスリンク反応の効率が良かった。その一方で、マウスプリオン蛋白質（89-231）の凝集化が進行し、視認できるほど大きな沈殿となり、均一の水相からマウスプリオン蛋白質（89-231）が固相として、相分離するとクロスリンク反応が生じないと解釈できる。本項目の成果物として、抗原としてマウスに接種実験が可能な量のクロスリンク多量体を含むマウスプリオン蛋白質（89-231）の乾燥粉末を得た。

[0092] <実験例 19>

実験例 18 で得た試料が実際にプリオンに対するワクチンとして機能し、抗プリオン活性をマウス個体で誘起することが可能か検証した。クロスリンク多量体を含むマウスプリオン蛋白質（89-231）を変性処理後に投与することで、異常型プリオン蛋白質の蓄積を抑制できることが示された。

[0093] [方法]

5週令のB a l b／cマウスをA、B、Cに分け、通常の方法で飼育した。実験例18において調製した大腸菌組換えマウスプリオン蛋白質（89－231）クロスリンク反応物を含む凍結乾燥品0.2mgを完全フロイントアジュバント（製造元D i f c o L a b o r a t o r i e s）200μLで懸濁し、Bマウスに皮下注射した。この接種日を第1日とする。第21日に、大腸菌組換えマウスプリオン蛋白質（89－231）クロスリンク反応物を含む凍結乾燥品0.2mgを不完全フロイントアジュバント（製造元D i f c o L a b o r a t o r i e s）200μLで懸濁し、Bマウスに追加の皮下注射を行った。第35日に、BマウスとCマウスのそれぞれに、RMLプリオン（感染マウス脳1%（w／v）懸濁液）を腹腔内に100μL投与した。その後、第80日に各マウスを麻酔下で解剖を行い脾臓の一部を採取・秤量した。脾臓からの異常型プリオン蛋白質の検出にあたり、採取した脾臓は参考文献[Grathwohl KUD, Horiuchi M, Ishiguro N, et al. Archives of Virology、1996年、141巻、1863－1874頁]を元に抽出を行い、ウエスタンブロットにより異常型プリオン蛋白質の蓄積量を評価した。

[0094] [結果]

図30に異常型プリオン蛋白質のウエスタンブロットの結果を示す。Aはワクチン接種もプリオン感染もさせていないネガティブコントロールであり、Bはワクチン接種後にプリオン感染させたマウス、Cはワクチンを接種しないでプリオンを感染させたポジティブコントロールである。Cのポジティブコントロールでのみ異常型プリオン蛋白質の強いシグナルが観察された。なお、図中の米印で示すシグナルは非特異的な反応である。異常型プリオン蛋白質に相当するバンドのシグナル強度を図31に棒グラフで表した。図30と図31からわかるように、ワクチン接種したBはプリオン感染に対して抵抗性を獲得していた。

[0095] <実験例20>

アミロイドAは、AAアミロイドーシスにおいて全身臓器に沈着する異常型タンパク質である。アミロイドAを含む臓器から作製した不活化アミロイドAクロスリンク反応物を、抗原としてワクチン接種を行なったマウスでは、AAアミロイドーシスの発症を抑制できることが示された。

[0096] [方法]

実験的にAAアミロイドーシスを誘導したBalb/cマウスまたはIL-1raKOマウスから脾臓および肝臓を採取し、適当量の生理食塩水中で破碎し、10%臓器ホモジネートを得た。このホモジネートに最終濃度10 μ Mとなるようにプリムリンを添加し、30分間UV照射した。

このサンプルの一部を分取し、実験例1と同様にSDS-PAGE電気泳動し、ウエスタンブロット法を実施した。アミロイドAの検出には、マウス血清アミロイドA1に対するヤギポリクローナル抗体（R&D社製、2000倍希釈）及び、アルカリフォスファターゼ・コンジュゲートロバ抗ヤギ免疫グロブリン抗体（プロメガ社製、20000倍希釈）を使用した。

クロスリンク処理後のサンプルを遠心分離（40000 $\times$ g、20分間）して上清を廃棄し、沈殿物に対して生理食塩水を加えて懸濁した。これを遠心分離（40000 $\times$ g、20分間）して沈殿物を洗浄する作業を10回繰り返した後に、得られた沈殿物を水に懸濁し、遠心分離（30000 $\times$ g、60分間）後に上清を廃棄した。残った沈殿物を再び水に懸濁し、遠心分離（30000 $\times$ g、60分間）して洗浄する作業をさらに3回繰り返し、上清を回収した。3回分の上清をプールして遠心分離（100000 $\times$ g、60分間）し、得られた沈殿物を少量の水に懸濁したものをクロスリンク処理アミロイドA粗精製物とした。クロスリンク処理アミロイドA粗精製物に対し、最終濃度3Mとなるようにグアニジンチオシアン酸を添加し、25℃にて24時間処理した後に、透析によりグアニジンチオシアン酸を除去した。透析後のサンプルを不活化アミロイドAクロスリンク反応物とした。不活化アミロイドAクロスリンク反応物を抗原として、フロイント完全アジュバント（製造元Difco Laboratories）と混合してBalb/

cマウスの背部皮下に1匹あたりタンパク質として0.1mgを接種した。初回接種の21日後に同サンプルをフロイント不完全アジュバント（製造元 Difco Laboratories）と混合して背部皮下に1匹あたりタンパク質として0.1mgを追加接種した。この追加接種から4週間後に、10mLあたり600mgの乾燥ウシ型結核死菌（製造元 Difco Laboratories）を添加して乳化したフロイント完全アジュバントを、マウス背部皮下に1匹あたり0.3mL投与し、AAアミロイドーシスを誘導した。AAアミロイドーシス誘導の2週間後に脾臓および肝臓を採取し、臓器へのアミロイド沈着をコンゴレッド染色にて病理組織学的に評価した。

[0097] [結果]

図32に、アミロイドAを含むマウス臓器ホモジネートに対してのプリムリン存在下UV処理によるクロスリンク反応の結果を示す。プリムリン存在下UV処理により、アミロイドAクロスリンク反応物の形成が観察された。次に、ワクチン接種の効果を図33に示す。（1）無処置マウス、（2）不活化アミロイドAクロスリンク反応物を接種したが、アミロイドーシスを誘導しなかったマウス、（3）不活化アミロイドAクロスリンク反応物を接種せず、アミロイドーシスを誘導したマウス、（4）不活化アミロイドAクロスリンク反応物を接種し、アミロイドーシスを誘導したマウスにおいて、コンゴレッド染色した脾臓および肝臓の病理組織切片像を示す。ワクチン接種なしで、AAアミロイドーシスを誘導したマウスでは、コンゴレッド染色により偏光顕微鏡下で黄緑色の複屈折像を呈するアミロイドが脾臓や肝臓に相当量蓄積していることが観察された。一方、不活化アミロイドAクロスリンク反応物を接種したマウスでは、AAアミロイドーシスを誘導してもアミロイド蓄積が観察されなかった。すなわち、不活化アミロイドAクロスリンク反応物を抗原とするワクチン接種が、実験的AAアミロイドーシス誘導によって引き起こされる臓器へのアミロイド沈着を抑制した。白黒図では黄緑色の複屈折像がわかりにくいため、アミロイド蓄積を定性的に示した結果

を図 3 4 に表としてまとめた。

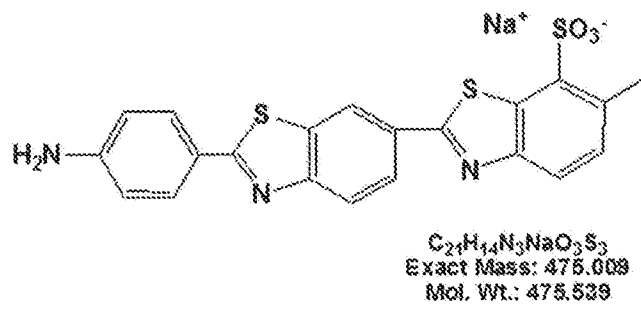
[0098] なお、本発明については、具体的な実施例を参照して詳細に説明されるが、本発明の趣旨及び範囲から離れることなく、種々の変更、改変を施すことができることは当業者には明らかである。

請求の範囲

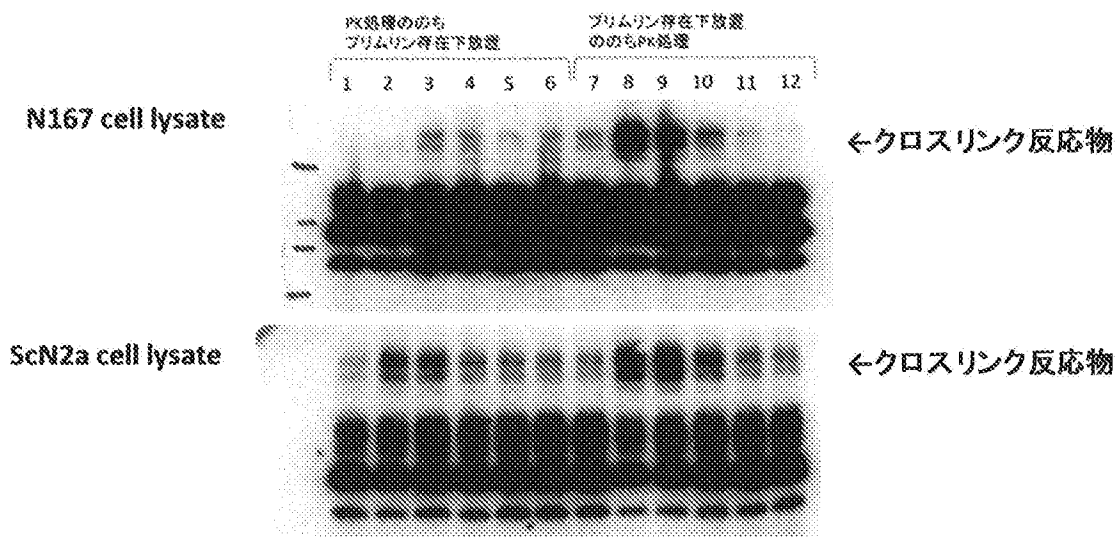
- [請求項1] コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質が、クロスリンクされた不活化オリゴマータンパク質。
- [請求項2] 前記異常型タンパク質が、タンパク質のフラグメントである、請求項1に記載の不活化オリゴマータンパク質。
- [請求項3] 前記クロスリンクは、前記異常型タンパクのインターフェースで生じる、請求項1又は2に記載の不活化オリゴマータンパク質。
- [請求項4] 抗原として用いられる、請求項1から3のいずれか1項に記載の不活化オリゴマータンパク質。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の不活化オリゴマータンパク質からなる、コンフォメーション病の予防又は治療剤。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の不活化オリゴマータンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、コンフォメーション病の予防又は治療のための医薬組成物。
- [請求項7] コンフォメーション病を予防する又は改善するためのワクチンである、請求項6に記載の医薬組成物。
- [請求項8] コンフォメーション病を引き起こす複数の異常型タンパク質が、クロスリンクされたオリゴマータンパク質に、候補化合物を接触させる接触ステップ、及び
 前記候補化合物を接触させたオリゴマータンパク質の活性及び／又は構造を測定する測定ステップ、を含む、
 コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法。
- [請求項9] コンフォメーション病を引き起こす異常型タンパク質を準備する準備ステップ、
 前記異常型タンパク質に、候補化合物を接触させる接触ステップ、
 前記候補化合物に接触させた異常型タンパク質にクロスリンク処理を施し、オリゴマーを形成させるクロスリンクステップ、及び
 前記候補化合物を接触させたオリゴマータンパク質の活性及び／又は

は構造を測定する測定ステップ、を含む、コンフォメーション病医薬のスクリーニング方法。

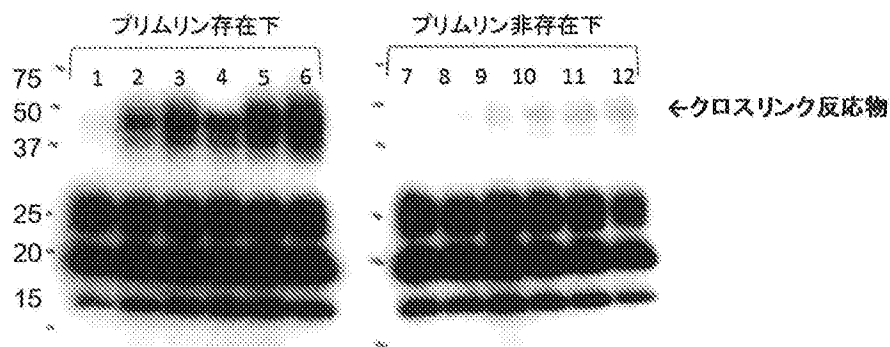
[図1]



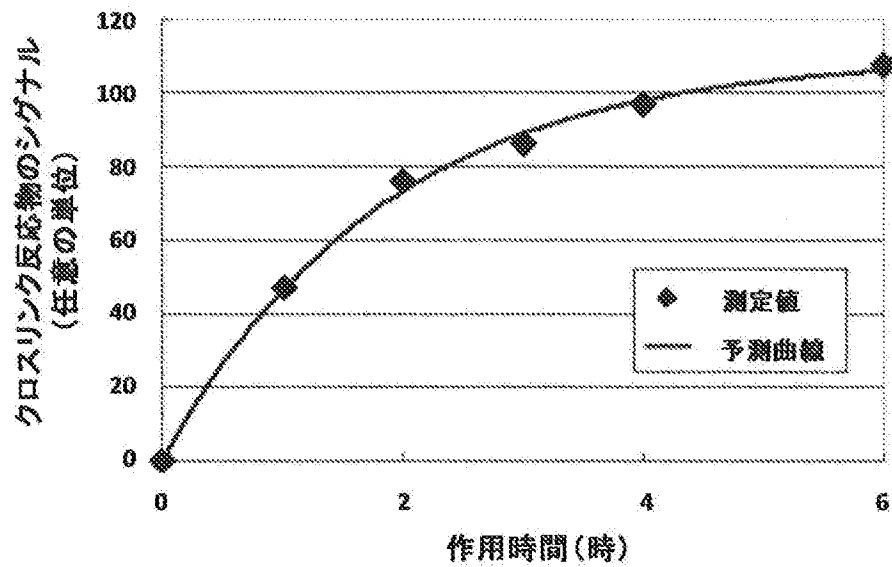
[図2]



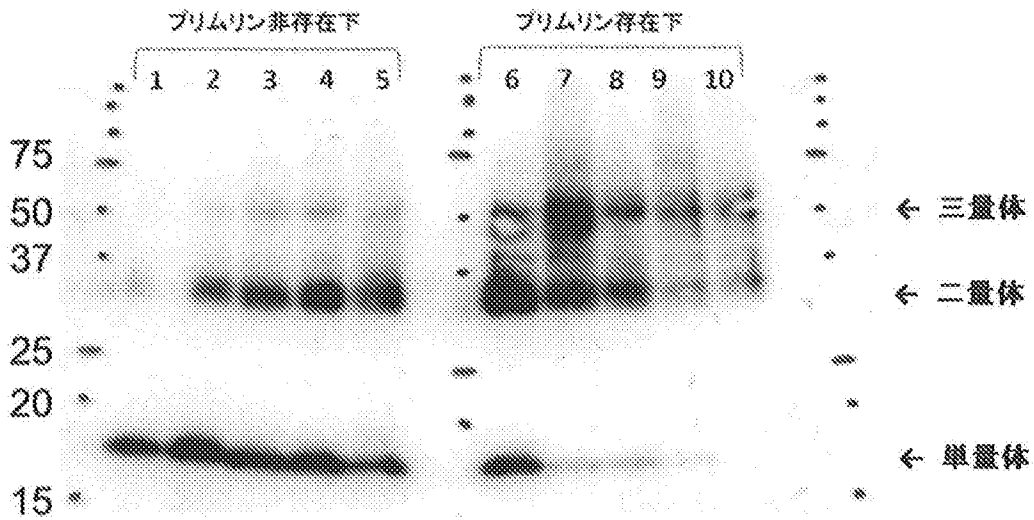
[図3]



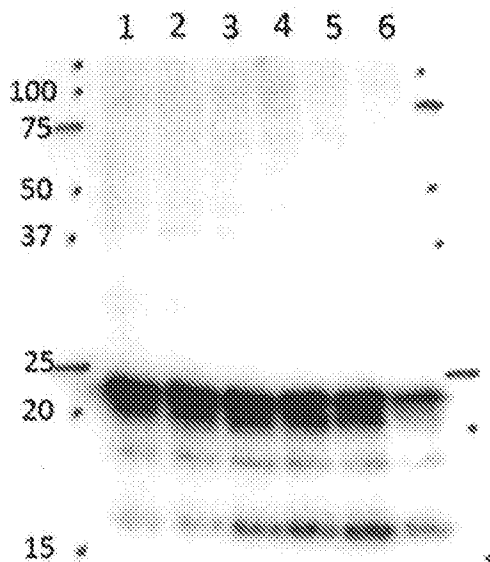
[図4]



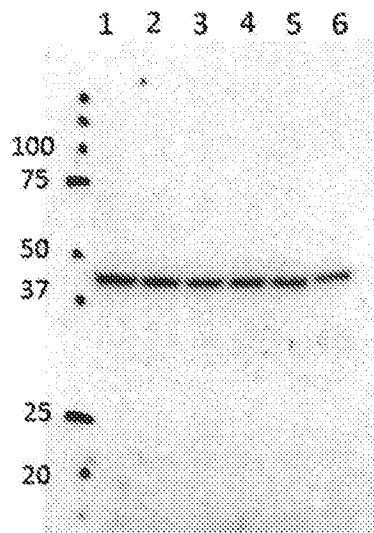
[図5]



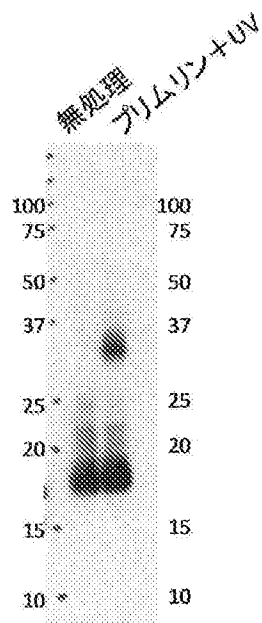
[図6]



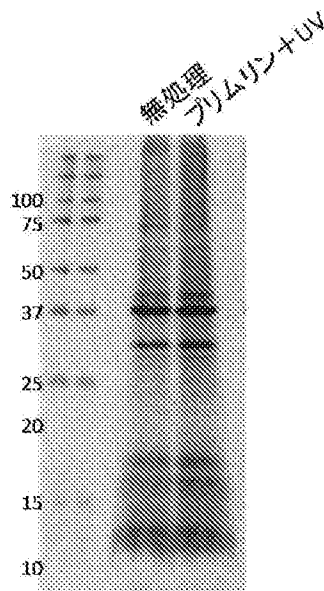
[図7]



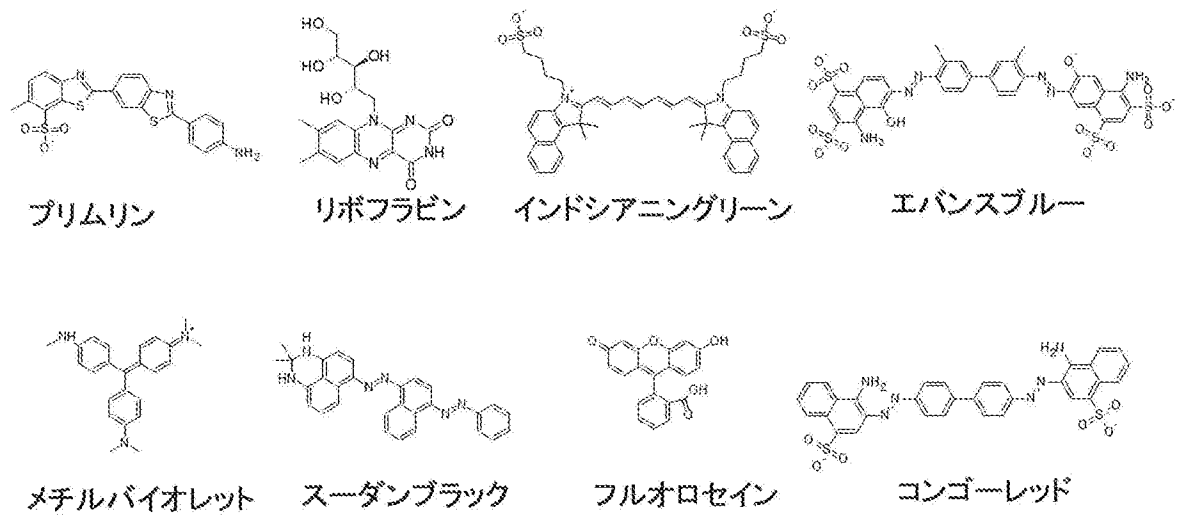
[図8]



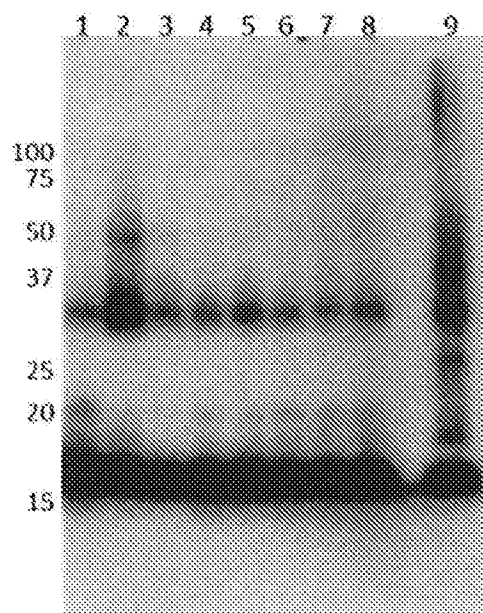
[図9]



[図10]

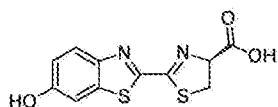


[図11]

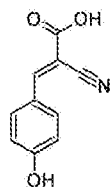


Nc1ccc(cc1)-c2nc3ccccc3s2-c4nc5cc(ccc5s4)S(=O)(=O)c6ccccc6Nc1ccccc1C(=O)NNC(=O)c2ccccc2

ルミール

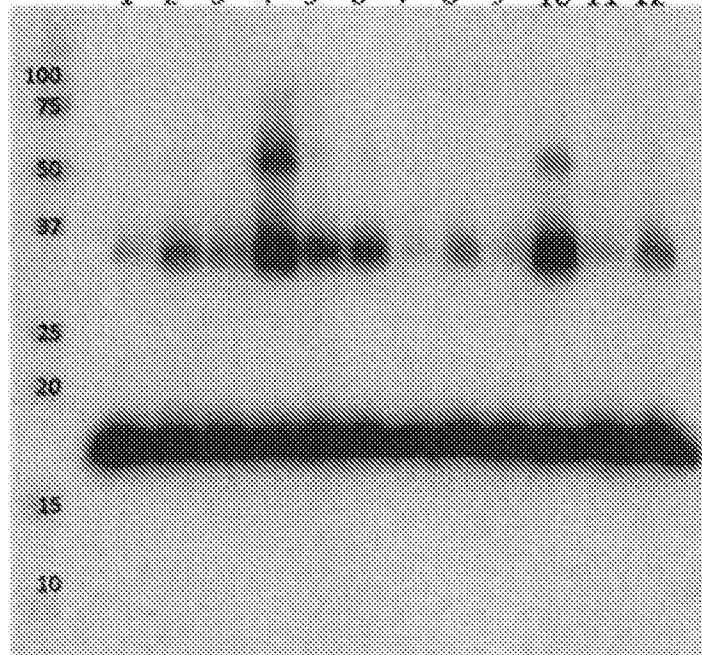


ルシフェリン

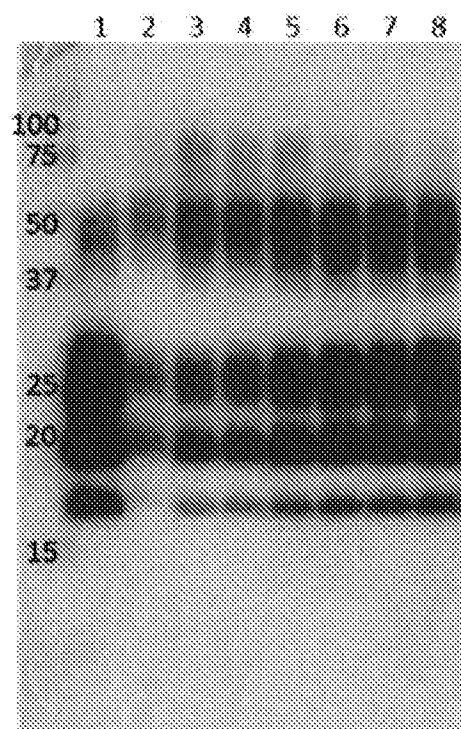


α/ナイ皮酸

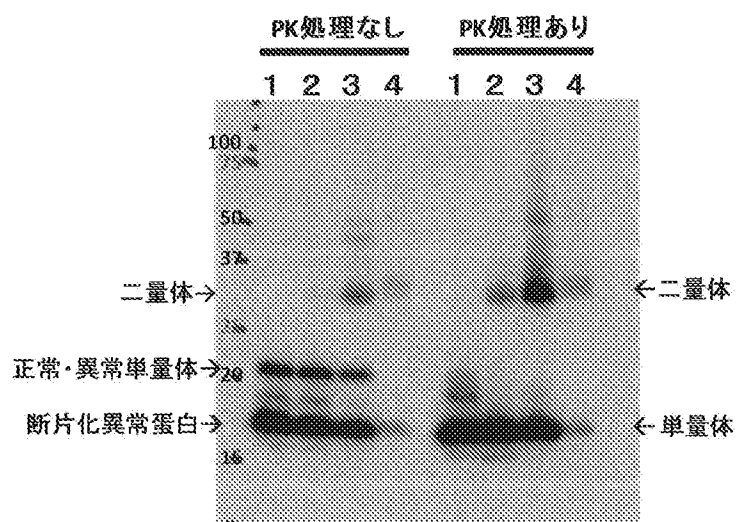
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----



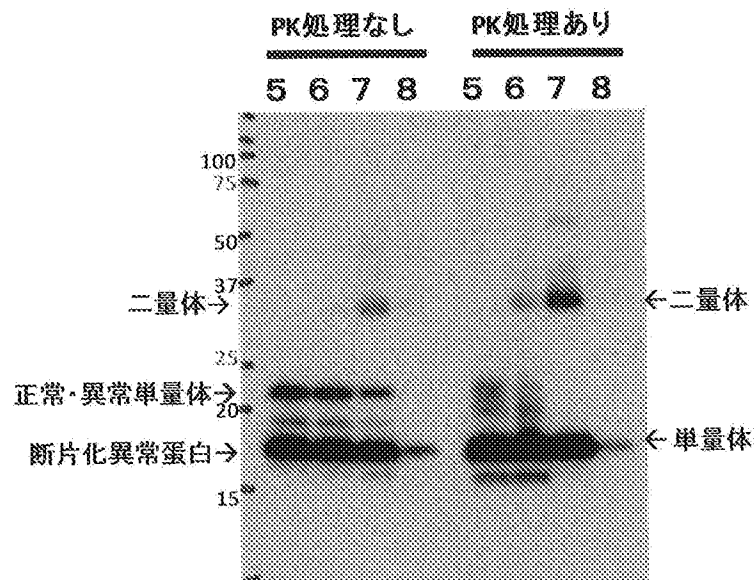
[図14]



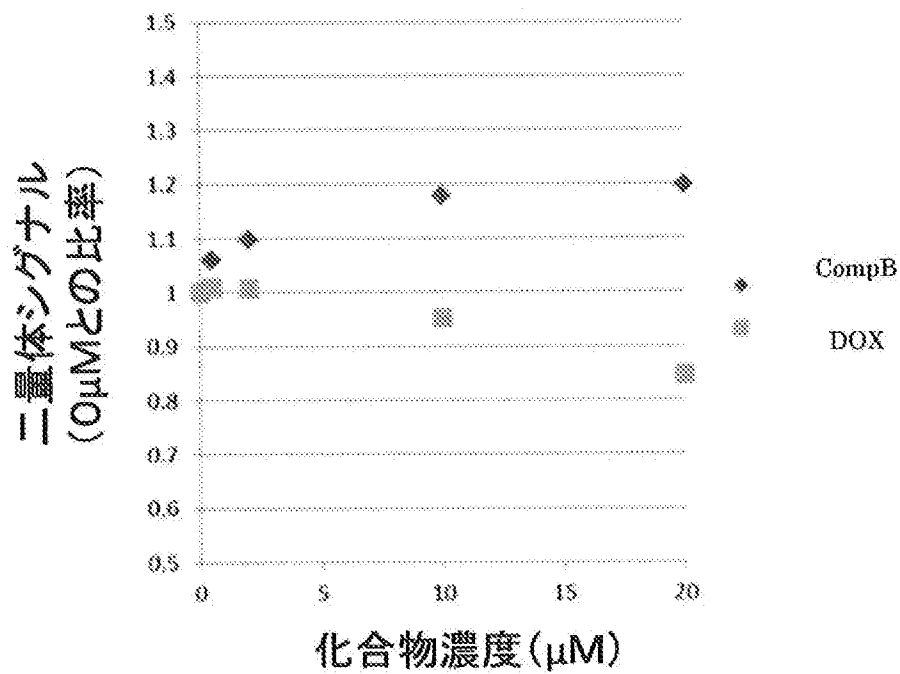
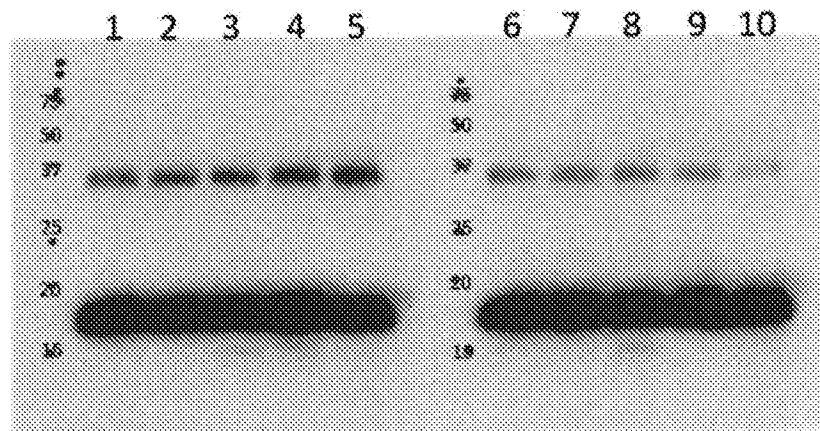
[図15]



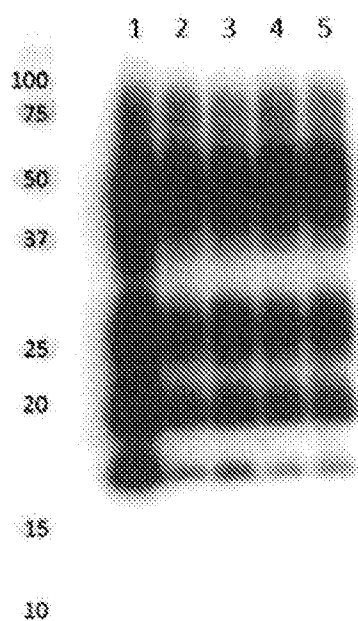
[図16]



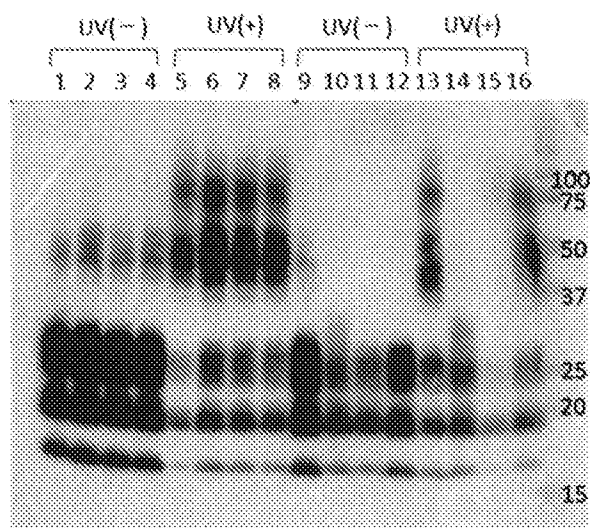
[図17]



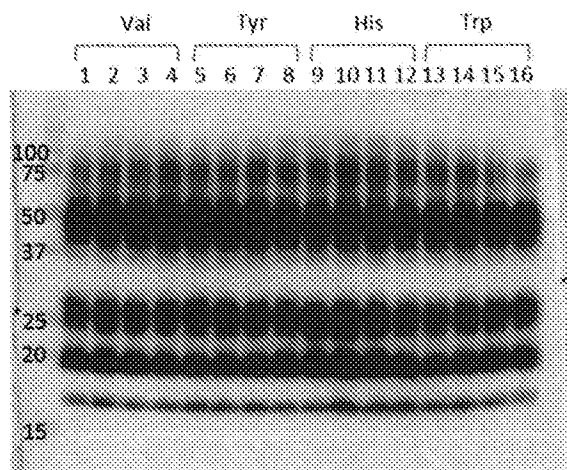
[図18]



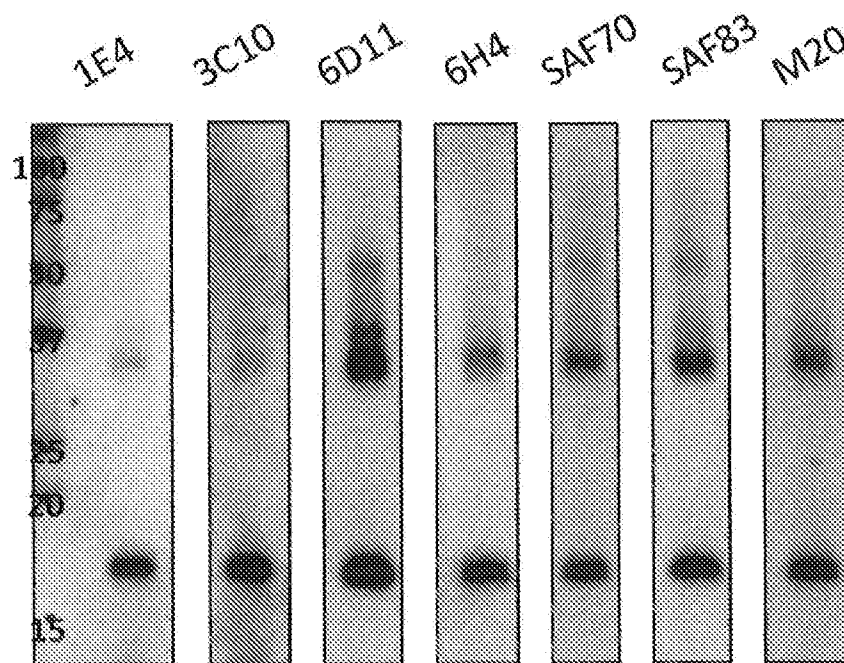
[図19]



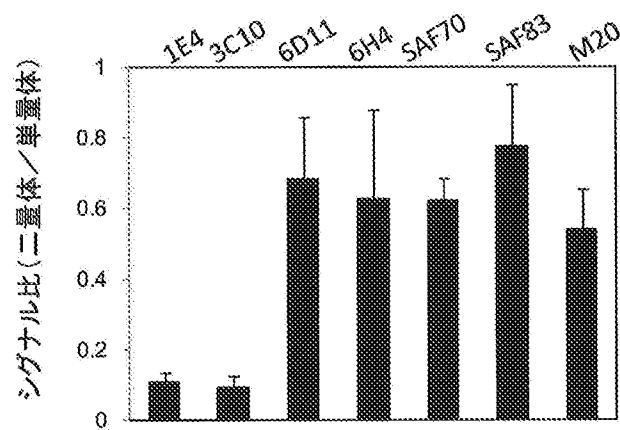
[図20]



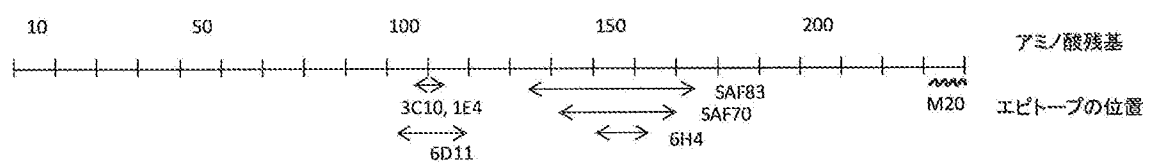
[図21]



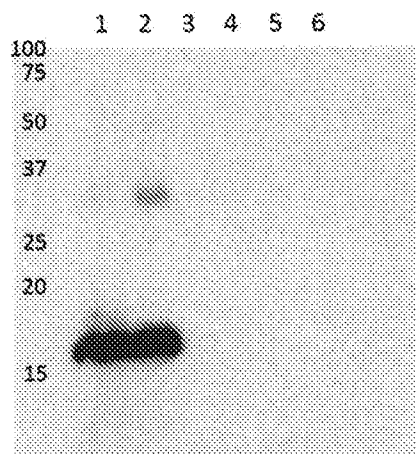
[図22]



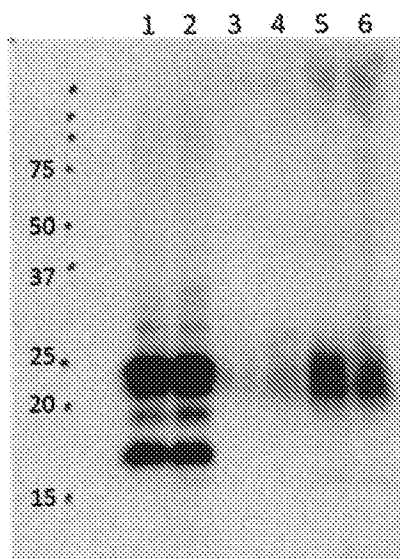
[図23]



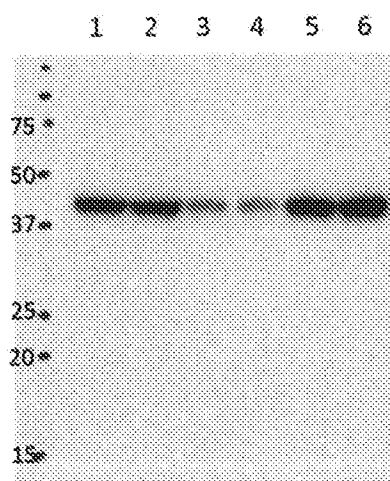
[図24]



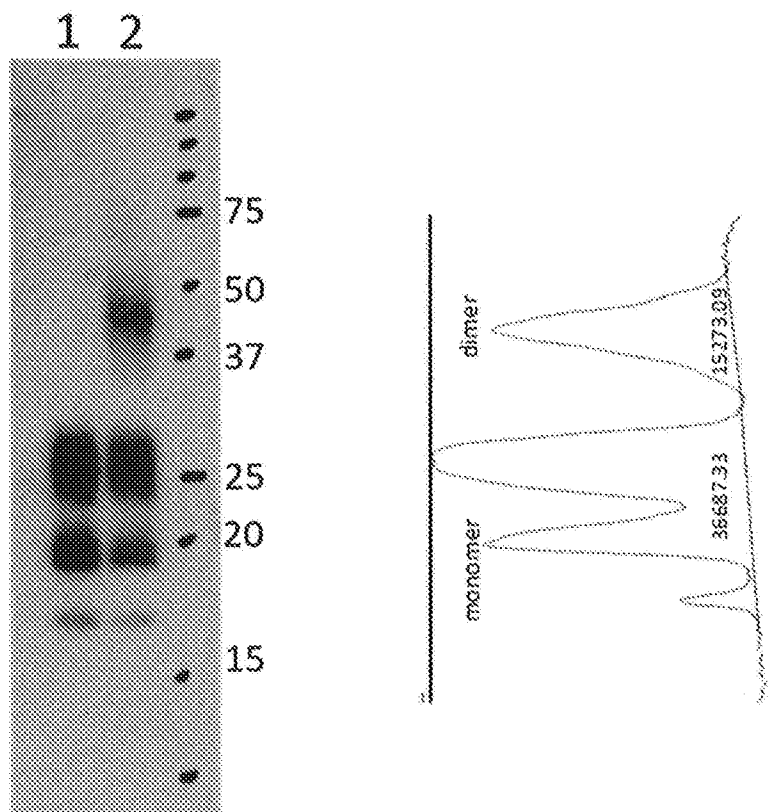
[図25]



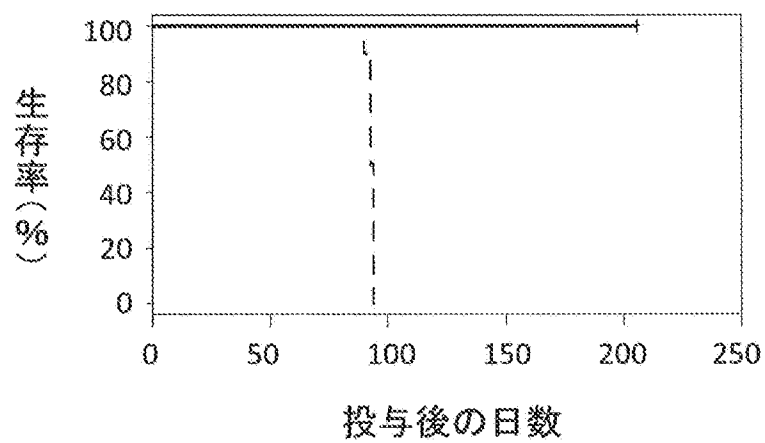
[図26]



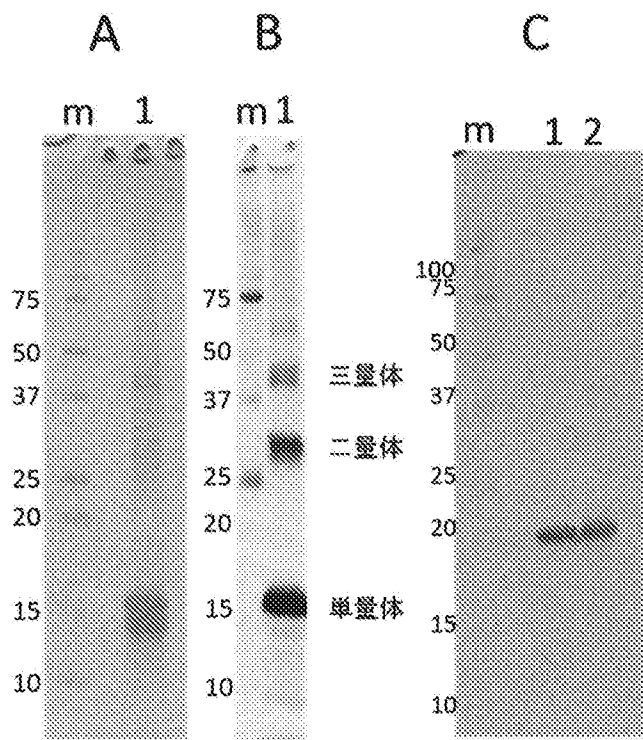
[図27]



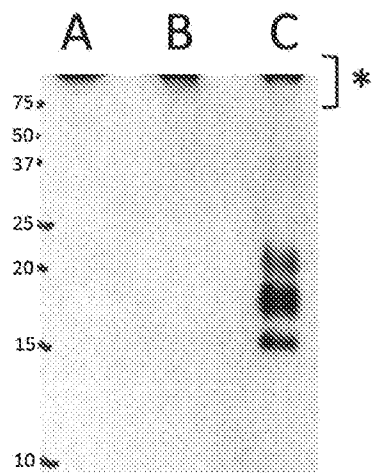
[図28]



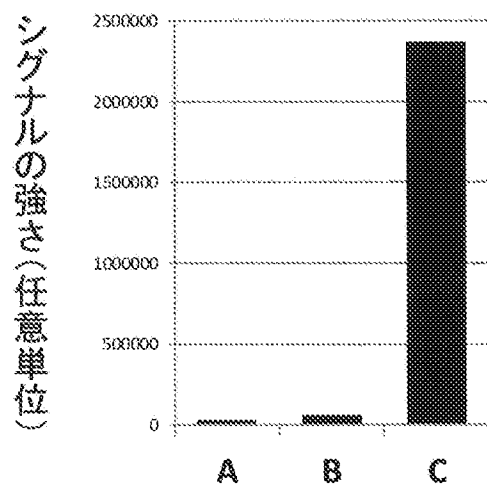
[図29]



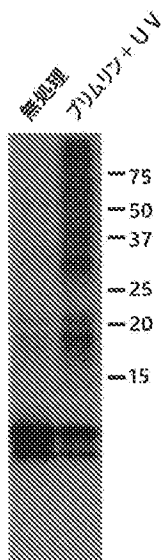
[図30]



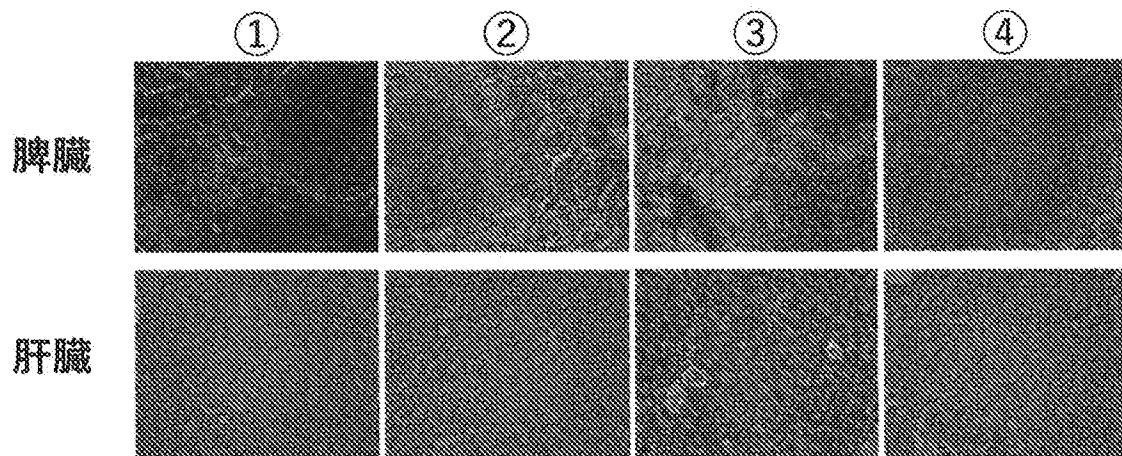
[図31]



[図32]



[図33]



[図34]

実験群	ワクチン	アミロイドーシス誘導	アミロイド蓄積 (脾臓・肝臓)
①無処置	×	×	—
②ワクチン接種あり →アミロイドーシス誘導なし	○	×	—
③ワクチン接種なし →アミロイドーシス誘導あり	×	○	+++
④ワクチン接種あり →アミロイドーシス誘導あり	○	○	—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P25/02(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C07K19/00, A61K39/00, A61P25/00, A61P25/02, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28,
G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/ JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	細胞上での蛋白質凝集体のモノマー間インターフェイスの解明, 2015 年度実施状況報告書, 06 January 2017, [retrieved on 26 October 2018], retrieved from the Internet: < https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-15K01804/15K018042015hokoku/ > p. 1, non-official translation (Clarification of interface between monomers of protein aggregate on cell, 2015 Implementation status Report)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 October 2018 (30.10.2018)

Date of mailing of the international search report
13 November 2018 (13.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032729

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-502120 A (CHIRON CORPORATION) 08 February 2007, claims 1, 2, 33 & US 2005/0118645 A1, claims 1, 2, 33 & WO 2005/016127 A2 & EP 1653844 A1	1-9
A	JP 2009-539959 A (UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF EDINBURGH et al.) 19 November 2009, claim 2 & US 2011/0052608 A1, claim 2 & WO 2007/144619 A2 & EP 2029628 A1	1-9
A	JP 2003-531570 A (ABGENIX, INC. et al.) 28 October 2003, claims 1, 2 & US 2005/0255113 A1, claims 1, 2 & WO 2001/006989 A2 & EP 1204674 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K19/00, A61K39/00, A61P25/00, A61P25/02, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 8 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	細胞上での蛋白質凝集体のモノマー間インターフェイスの解明, 2015 年度 実施状況報告書, 2017-01-06, [retrieved on 2018-10-26], Retrieved from the Internet: < https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-15K01804/15K018042015hokoku/ > 第 1 頁	1-9

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 0 . 1 0 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

1 3 . 1 1 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

福澤 洋光

4 B

3 9 6 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2007-502120 A (カイロン コーポレイション) 2007.02.08, 請求項 1、2、3 3 & US 2005/0118645 A1, 請求項 1、2、3 3 & WO 2005/016127 A2 & EP 1653844 A1	1-9
A	JP 2009-539959 A (ザ ユニヴァーシティ コート オブ ザ ユニヴァ ーシティ オブ エディンバラ, et al.) 2009.11.19, 請求項 2 & US 2011/0052608 A1, 請求項 2 & WO 2007/144619 A2 & EP 2029628 A1	1-9
A	JP 2003-531570 A (アブジェニックス インク., et al.) 2003.10.28, 請求項 1、2 & US 2005/0255113 A1, 請求項 1、2 & WO 2001/006989 A2 & EP 1204674 A1	1-9