

令和元年6月13日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09696

研究課題名(和文) 抗イディオタイプ抗体を用いたアルツハイマー型認知症のワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-idiotypic vaccine therapy for Alzheimer's disease

研究代表者

藪内 健一 (Yabuuchi, Kenichi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10763807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Aオリゴマーは、アルツハイマー型認知症発症にとって真の病態分子であり、根治療法の標的分子である。申請者らが独自に開発したAオリゴマー特異的抗体を基軸として、本研究ではこの発明抗体に対する抗イディオタイプ抗体の開発に取り組み、そこからアルツハイマー型認知症に対する能動的ワクチン療法の開発を企図した。その結果、in vitroでそれ自身に毒性がなく、発明抗体に対する中和活性をもつごく少数の抗イディオタイプ抗体をスクリーニングし得たが、in vivoでの活性を確認するには至らなかった。今後、この抗体の構造をさらに絞り込んで有効なワクチン開発につなげる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症の原因であるAオリゴマーに似せた分子を免疫学的手法で作り出し、1回投与でアルツハイマー型認知症を予防できるワクチンの開発を目指した。独自に開発したAオリゴマーの特異的抗体をマウスに免疫し、そのリンパ節の細胞を取り出して、抗体を作る能力を持つがん細胞(骨髄腫細胞)と融合させ、もとの抗体と結合する新しい抗体を選び出した(スクリーニング)。その結果、それ自身は毒性がなく、もとの抗体の機能を中和する、ごく少数の新規抗体が得られたが、安定して得ることは困難で、それが生体内で機能することは確認できなかった。今後はこの新規抗体の構造を検討し、生体内での有効性を確認する必要がある。

研究成果の概要(英文)：A oligomers have been recognized as the true pathogenic molecules and the therapeutic target for Alzheimer's disease. This study aimed to develop a novel anti-idiotypic vaccine therapy for Alzheimer's disease using the anti-A oligomer antibody that we have developed independently. Through the hybridoma technique, we obtained a few novel antibodies in vitro to neutralize the anti-A oligomer antibody without neurotoxicity themselves, but we couldn't prove the activities as vaccines in vivo. Further study to reveal these antibodies structure will be need to design analogues with vaccine-like action.

研究分野：アルツハイマー型認知症

キーワード：ワクチン アルツハイマー型認知症 アミロイドベータオリゴマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症(AD)の真の病態分子は、老人斑として蓄積したアミロイド (A) 線維ではなく、可溶性の A オリゴマーであるとする仮説(A オリゴマー仮説)が多くの先行研究によって広く支持されるようになり A オリゴマーを治療標的分子とした根治療法の開発競争が世界中で激化している。申請者等は AD モデルマウス脳内の神経細胞内外 A オリゴマー蓄積抑制とシナプス蛋白保護効果、記憶障害発症予防効果を有し先制医療にも応用可能なモノクローナル抗体(日本特願 2008-201058, USP 9085614, USP 9090680, Mol Neurodegener 2011, J Neurosci Res 2011, J Gerontol Geriatr Res 2012)と、いったん発症した記憶障害の回復と神経原線維変化形成阻止を可能とする根本的治療用抗体(日本特願 2008-201058, USP 9085614, USP 9090680, Life Sci 2012, Biomed Res Int 2013)の開発に成功した。しかしながら抗体療法は頻回投与が必要であり、医療経済の面から予防を旨とする AD の先制医療への使用は非現実的であり、AD 発症の予防を目的とする安全かつ有効なワクチン療法の開発が急がれる。

2. 研究の目的

本研究では、上記抗 A オリゴマー抗体をマウスに免疫し、この抗体の超可変部を認識する抗イデオタイプ抗体の作製を目的とする。得られた抗イデオタイプ抗体は、A オリゴマーの立体構造を模倣することが期待され、それ自身が A オリゴマーのような毒性を持たない、安全な能動的ワクチン療法となりうるかどうかを検証する。さらに抗イデオタイプ抗体が安定して得られた場合には、その CDR 領域をクローニングすることで DNA ワクチンあるいはペプチドワクチンを設計・作成し、その有効性の検証も同時に試みる。

3. 研究の方法

(1) 72D9 抗イデオタイプ抗体作製

IgG2b 型である抗 A オリゴマー特異的抗体 72D9 (日本特願 2008-201058, 米国特願 12/533,294 & 12/533,348) 1mg/ml PBS を完全フロイントアジュバントと 1:1 で混和し、Balb/c マウスに合計 0.2ml 皮下投与(100 µg/body)し免疫した。2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に尾静脈投与により計 5 回、同量を追加免疫した。免疫マウスより得られた鼠径リンパ節細胞(1×10^8 個)と、同数のマウスミエロマ細胞を、ポリエチレングリコール(PEG)法を用いて細胞融合させ、ハイブリドーマを作成・培養した。抗 A オリゴマー抗体 72D9 および対照として抗原特異性の異なるマウス IgG2b 抗体(HY123)を、それぞれ固相化したプレートを作成し、ハイブリドーマの培養上清を分注して抗イデオタイプ抗体をスクリーニングし、72D9/123HY のシグナル比 1.3 以上を陽性として、ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマからプロテイン A あるいは G にて抗イデオタイプ抗体を精製した。これら抗体のアイソタイプは Serotec(Oxford, UK) マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キットを用いて行った。同様の検討を、IgG2b (123HY)で免疫寛容を誘導した Balb/c マウスを用いて行った。

(2)得られたイデオタイプ抗体の毒性スクリーニング

SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞を用いて、得られたイデオタイプ抗体が細胞毒性を有するかどうかについて、LDH assay および Live/dead assay にて検証した。

(3) 72D9 抗体の A オリゴマー毒性抑制活性を指標としたイデオタイプ抗体の中和活性スクリーニング

SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞を用いて、A オリゴマーの細胞毒性に対する 72D9 抗体の抑制

効果を指標とし、得られたイディオタイプ抗体が 72D9 による細胞毒性抑制効果を中和できるか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 予備実験においてすでに 2 種類の親抗体への抗イディオタイプ抗体を得ていたが、今回の検討ではこの 2 種類以外に親抗体に強く結合する抗イディオタイプ抗体を得ることはできなかった。免疫寛容誘導マウスを用いても同様であった。

(2) 得られた抗イディオタイプ抗体は、免疫マウスの血液中には同定できなかった。

(3) この 2 種類の抗イディオタイプ抗体は A オリゴマーの構造を内在していると考えられるが、これらを SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞に添加しても毒性は認められなかった。

(4) A オリゴマーを SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞に添加すると、A オリゴマーの細胞毒性が LDH assay にて確認された。この系に 72D9 抗体を添加しておく、その毒性は完全に中和された。さらに上記 2 抗体を添加すると、72D9 抗体の毒性中和活性はキャンセルされ、A オリゴマーの細胞毒性が再現された。以上のことから、得られた 2 種類の抗イディオタイプ抗体はそれ自身で毒性を有さず、72D9 抗体の A オリゴマー毒性中和活性を阻害したことから、72D9 の超可変部の構造を認識し、結合して親抗体の中和活性を発現している可能性が示唆された。

(5) これら 2 種類の抗イディオタイプ抗体の安定した産生と精製を目指したが、収量が不安定で十分な量が得られず、その超可変部領域の塩基配列決定や、動物への投与が可能となる量を得ることができなかった。

(6) (2)の結果から、この抗イディオタイプ自体の投与ではワクチン活性を発現できる可能性は極めて低いと考えた。

総括と課題

独自開発した抗 A オリゴマー特異的抗体に対する中和活性をもち、それ自体は毒性を持たない有力な抗イディオタイプ抗体を少数ながら得ることができたが、それらを安定に産生できる系の確立には至らず、また既存の系においても収率を上げることができなかった。そのため、本研究で予定されていた能動ワクチン活性の検証や、同抗体の超可変部の塩基配列の決定による DNA ワクチン、あるいはペプチドワクチンの作成を行うことができなかった。今後はこれら抗体をさらに安定して産生できる系の確立を継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kimura N, Aso Y, Yabuuchi K, Ishibashi M, Hori D, Sasaki Y, Nakamichi A, Uesugi S, Fujioka H, Iwao S, Jikumaru M, Katayama T, Sumi K, Eguchi A, Nonaka S, Kakumu M, Matsubara E. “Modifiable lifestyle factors and cognitive function in older people: A cross-sectional observational study.” Front. Neurol. 2019. 査読有, In press.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Yabuuchi K, Kimura N, Miura Y, Matsubara E. “Characteristics of a patient population of dementia with Lewy bodies (DLB) and Parkinson’s disease with dementia (PDD) exhibiting frontal hypoperfusion in brain perfusion SPECT.” XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, 20th Sep, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松原 悦朗

ローマ字氏名：Matsubara Etsuro

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部神経内科学講座

職名：教授

研究者番号(8桁)：70219468

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：三浦 由真子

ローマ字氏名：Miura Yumako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。