

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15483

研究課題名(和文) アルツハイマー型認知症における次世代遺伝子治療・細胞内抗体治療法の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation gene therapy and intracellular immunotherapy for Alzheimer's disease

研究代表者

松原 悦朗 (Matsubara, Etsuro)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70219468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：A $\beta$ オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー型認知症(AD)における記憶障害発症の分子基盤となり、創薬の標的分子と考えられている。血液中から脳内神経細胞へと選択的にデリバリーされた後、生理的A $\beta$ モノマーを回避し、最初期病変である細胞内A $\beta$ オリゴマーのみを標的とする低分子化抗体を産生する改変型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの構築に向け、低分子化抗体作製を行った。哺乳細胞からの作製したプラスミドベクターからの抗体発現を試みるも、十分な産生量が得られず、様々な原因究明にもかかわらず、その取得には至らなかった。今後引き続き低分子抗体の取得法確立での、新たな治療概念の提唱・確立が求められる。

研究成果の概要(英文)：Synaptotoxic A $\beta$  Oligomers represent a molecular basis of memory impairment in Alzheimer's dementia (AD), which is considered as a therapeutic target. A modified Adeno associated virus (AAV) vector selectively reaching neurons after intravenous injection allow us to develop low-molecular weight antibodies selectively targeting the intracellular A $\beta$  Oligomers. In spite of our extensive efforts, we failed to obtain the enough amounts of antibodies, owing to unknown lower expression of antibodies from plasmid vector transfected into the mammalian cells. In the future, anyhow, it is necessary to make it work for their acquisition to propose and establish a new therapeutic concept.

研究分野：神経内科学、神経科学

キーワード：A $\beta$ オリゴマー 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

生理的に産生された amyloid (A) 分子の立体構造変化の結果形成される A オリゴマーが AD のシナプス障害・認知機能障害を引き起こす直接原因で治療標的であると考えられている。現在、申請者等の A オリゴマー特異的な発明抗体(特許第 5113853 号、USP 8378081)がヒト化され(KHK6640)、欧州と日本において、前駆期、軽度、中等度 AD を対象とした第 I 相臨床試験が展開されている。抗体は経済負担が重くかつ頻回投与が避けられない故に先制医療への使用は非現実的と考えられているが、その高い選択性と有効性を考慮すれば、予防を念頭に置いた抗体自体による根本的先制医療構築が必須である。

2. 研究の目的

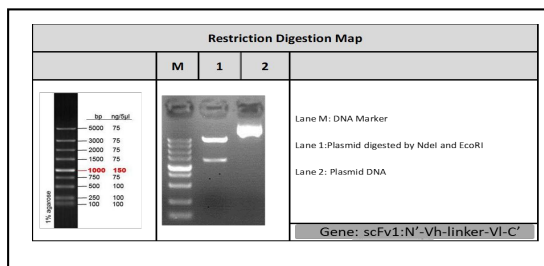
A オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー型認知症 (AD) における記憶障害発症の分子基盤となり、創薬の標的分子と考えられている。特に、神経細胞内に蓄積する A オリゴマーは AD 最初期病変と考えられるが、この分子を標的とした予防的創薬は依然未開発である。本研究では遺伝子治療による予防特化型細胞内抗体療法を開発することで、抗体医療自体のパラダイムシフトに挑戦する。AD における根本的な先制医療としての有用性を前臨床試験で実証し、抗体医療が preclinical AD のさらに pre-stage に対応した予防的根拠治療へと変貌しようとの、新たな治療概念の提唱・確立を目指す。

3. 研究の方法

2 種類の A オリゴマー特異的一本鎖抗体を設計し、哺乳類細胞で作成後(外注)、改変型 AAV ベクター(血中投与で神経細胞に特異的に移行が可能)への組み込みを、その発明者である自治医科大学の村松慎一教授(連携研究者)の協力を得て遂行し、アルツハイマー病モデルマウスで記憶障害発症予防効果を検証する。

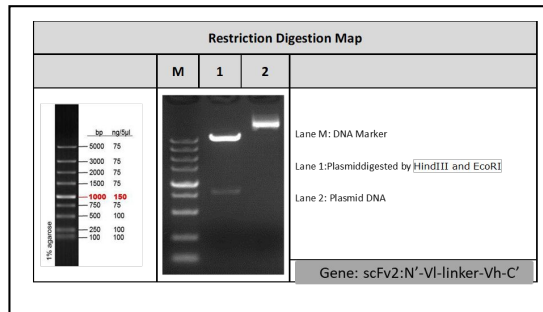
4. 研究成果

1) scFv 抗体遺伝子調整:



申請者らが発明したマウスモノクローナル抗体(Mol Neurodegener 2011, J Neurosci Res 2011, J Gerontol Geriat Res 2012)から行い、その遺伝子構造は 5' 側に V<sub>H</sub> 遺伝子

断片、3' 側に V<sub>L</sub> 遺伝子断片を配置したものをリンカーで連結(左図) もしくは 5' 側に V<sub>L</sub> 遺伝子断片、3' 側に V<sub>H</sub> 遺伝子断片を配置したものをリンカーで連結した 2 種類を作製した(下図)。

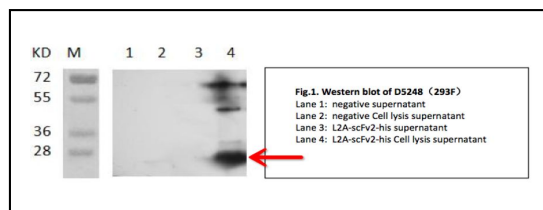


2) scFv 抗体の哺乳類細胞における発現:

CHO 及び HEK293 細胞での発言と回収確認を行った。両細胞にトランスフェクション後、培養、上清の回収、細胞ペレットの粉碎と抗 His タグ抗体によるウエスタンブロットを行った。

CHO 細胞では培養上清中に scFv が検出されず、細胞粉碎液中に scFv に由来するバンドが非常に薄く検出ができたが、発現量が少量すぎるため発現系としては不適と判断した。

HEK293 細胞(下図)でも、培養上清中には scFv が検出されなかった。同一構成のベクターの陽性コントロールでは上清中に検出が可能であり、ベクターの問題ではないと判断した。一方、細胞溶液中に scFv のバンド(30kDa 付近)を検出したが、より高分子側にも複数の濃いバンドを検出しており、アグリゲーションを起こしている可能性が考えられた。



scFv の安定性は発現効率とも相関があるため、配列の安定性に起因して発現効率及びアグリゲーションの問題が生じていると推測した。

HEK293 細胞破砕液中の scFv 精製も試みたが、Wash 以外のフラクションに scFv に由来すると思われるたんぱく質は検出されず、アグリゲーションを支持する所見と考えた。

以上は VL-VH 配向の結果であるが、VH-VL 配向は全く機能しなかった。今回の検討では CHO 細胞より HEK293 細胞が発現に適している

こと、scFv 分子間でアグリゲーションを起こしていることが原因と考えられ、scFv 取得に向けては今後以下のような対応が必要と考えられた(下図)。

対処法	利点	欠点
大腸菌を用いた発現・リフォールディング・精製を実施	・アグリゲーションによる問題か否か確認可能 ・量を確保できる可能性	・アグリゲーションが問題であれば、精製時や使用時に問題が発生する可能性
ドメイン間にS-S結合を導入	・配列の改変自体は比較的簡便	・モデリングによる十分な検討が必要 ・導入部位によってはアフィニティや特異性に影響あり
可変部位の類似フレームワークへの変更 合理的デザインによる改変	・ライブラリ作製より期間とコストが抑えられる ・ライブラリ作製より期間とコストが抑えられる	・アフィニティや特異性に影響を及ぼす可能性 ・立体構造や改変に関する知見が必要 ・アフィニティや特異性に影響
フージディスプレイサブライブラリを作製し、スクリーニング	・アフィニティや特異性を保ったまま安定性を向上させることが可能	・期間とコストが必要

### 3) 改変型 AAV ベクターへの組み込み

本研究で scFv を取得できなかったため、両者の検証には至らなかった。

### 4) 前臨床試験

本研究で scFv を取得できなかったため、両者の検証には至らなかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計4件)

Shimada H, Shoji M, Ikeuchi T, Suzuki K, Senda M, Ishii K, Matsuda H, Iwata A, Ihara R, Iwatsubo T, Mutoh K, Nakazawa E, Sekijima Y, Mori E, Ikeda M, Ikeda M, Kawakatsu S, Nakanishi A, Hashimoto M, Nunomura A, Matsubara E, Fukui M, Shirato T, Hirai K, Sakamoto M, Fujii H, Mori H. DIAN/DIAN-J/DIAN-TU, Brain Nerve. 査読無、69,701-709, 2017.  
DOI: 10.11477/mf.1416200811.

松原悦朗, 第8章 創薬・発症前治療への挑戦 2.オリゴマー抗体医療の現状と展望. 実験医学、査読無、35巻12号(増刊)、2017、229-232

Takemaru M, Kimura N, Abe Y, Goto M, Matsubara E. The evaluation of brain perfusion SPECT using an easy Z-score imaging system in the mild cognitive impairment subjects with brain amyloid- deposition. Clin Neurol Neurosurg. 査読有、160, 111-115, 2017.  
DOI: 10.1016/j.clineuro.2017.06.018.

Abe Y, Kimura N, Takahashi R, Gotou M, Mizukami K, Uchida H, Matsubara E. Relationship between cytokine levels in the cerebrospinal fluid and 11C-Pittsburgh compound B retention in

patients with mild cognitive impairment. Geriatr Gerontol Int. 17, 1907-1913, 2017.  
DOI: 10.1111/ggi.12991.

#### [学会発表](計5件)

認知症治療開発の最前線 自験例を中心に、口頭、松原悦朗, 第59回九州支部主催生涯教育講演会, 2017/5/20, 国内。

アルツハイマー型認知症の創薬最前線 自験例を中心に、口頭、松原悦朗, 第68回東海支部主催生涯教育講演会, 2017/6/11, 国内。

認知症治療と地域連携、口頭、松原悦朗, 第7回認知症予防学会, 2017/9/20, 国内。

シンポジウム5 認知症・治療の展望 A オリゴマーをターゲットとした治療法の開発、口頭、松原悦朗, 第35回日本神経治療学会総会, 2017/1/7, 国内。

認知症における「THERANOSTICS」の展望：治療と画像診断バイオマーカーの融合、口頭、松原悦朗, 第24回 New Horizon for Neurosciences, 2017/12/2, 国内。

#### [図書](計1件)

アルツハイマー病 認知症疾患 臨床医のための実践ガイド 原著第2版 (監訳者 小野賢二郎) 第15章 記憶障害と Alzheimer 病、認知症の治療目標、142-143, 2017, 朝倉書店

#### [産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### [その他]

国民との科学・技術対話社会に対する取り組み等

認知症予防の処方計画, 松原悦朗, 大分大学市民シンポジウム 目指せ!健康寿命日本ーおおいた, 2017/12/15, 国内.

国内初 IoT を駆使した患者位置情報・バイタルデータ等の遠隔モニタリングシステムを導入, 大分大学, プレスリリース, 2018/2/22, 国内.

徘徊時の居場所確認 大分大病院が患者を遠隔モニタリング リストバンド型端末着用 危険行動の予防にも活用, 大分大学, 大分合同新聞, 2018/3/12, 国内.

早期発見・早期治療介入が重要な『認知症』多様な発症原因や症状, 松原悦朗, 朝日新聞, 2018/3/29, 国内.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 悦朗 (MATSUBARA, Etsuro)  
大分大学・医学部医学科・教授  
研究者番号: 70219468

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

村松 慎一 (MURAMATSU, Shinichi)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10239543

### (4) 研究協力者

( )