

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K07998

研究課題名(和文) 抗A オリゴマー最小フラグメント抗体を用いた次世代抗体医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of a novel antibody therapy for Alzheimer's disease using anti-Abeta oligomeric minimal fragment antibodies

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症(AD)の根治療法の開発を目指し、我々は独自にADの原因分子(Aオリゴマー;A_{Os})を認識する最小フラグメント抗体を創製した。本研究では、ADモデル動物を用いて、この抗体の脳内での立ち振る舞いと、記憶障害に対する効果を検証した。その結果、この抗体は末梢からの投与で容易に脳内に移行し、海馬や大脳皮質に分布することを見出した。また、モデル動物の記憶障害を、正常マウスと同程度まで改善させた。今後はより詳細な作用機序や臨床応用に向けた製剤開発に向けて研究を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が新規開発した最小フラグメント抗体は、優れた脳内移行性を持ち、抗Aオリゴマーフルボディ抗体に匹敵する記憶障害予防効果を持つだけでなく、従来の抗Aオリゴマー抗体と異なり神経細胞内にも作用点を持つ可能性を見出した。以上より、本抗体が細胞内Aオリゴマーの挙動の理解や制御を通してADの病態解明に大きく貢献することが期待できる。社会的には、急速な高齢社会の大きな問題であるADに対して、安価で効果的な根治療法の開発に道を開き、以って医療介護における人的経済的負担の軽減に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Aiming to develop a curative therapy for Alzheimer's disease (AD), we have independently developed "minimal fragment antibodies" that recognize the molecules responsible for AD (A oligomers). In this study, we examined the pharmacokinetics of these antibodies in the brain and their effects on memory impairment using an animal model of AD. We found that the antibodies were easily transferred into the brain by peripheral administration and distributed in the hippocampus and cerebral cortex. The antibodies also improved memory impairment in model mice to the same level as in normal mice. Since these antibodies have been found to be inexpensive and highly effective, we will continue our research to elucidate the action mechanism in detail and to develop a formulation for clinical application in human.

研究分野：神経内科学，認知症，行動薬理学

キーワード：Aオリゴマー アルツハイマー型認知症 Aオリゴマー抗体 CDRペプチド マイクロダイアリシス

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 β)線維ではなく、可溶性のA β オリゴマーであるとする仮説(A β 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 β オリゴマーを治療標的分子としたADの根治療法の開発が喫緊の課題となっている。申請者等はいち早くA β オリゴマーの重要性を、認識し、すでにそれらを特異的に認識するモノクローナル抗体の開発に独自に成功している(日本特願 2008-201058, USP 9085614, USP 9090680, Mol Neurodegener 2011, J Neurosci Res 2011, J Gerontol Geriatr Res 2012 および日本特願 2008-201058, USP 9085614, USP 9090680, Life Sci 2012, Biomed Res Int 2013)。現在までこの発明抗体(特許第 5113853 号, USP 8378081)はヒト化され(KHK6640)、欧州と日本において、前駆期~中等度ADを対象とした第I相臨床試験を終えるなど治験が進行中である。しかしながら抗体療法は医療経済への負担の大きさと抗体の中枢神経移行率の低さを本質的な弱点として有し、発症予防を一義とすべきAD予防・先制医療への使用は非現実的であり、より安価で優れた中枢神経移行性を持つ次世代標的分子医療の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

我々のグループは、AD根治における抗体療法が本質的に抱える上記弱点を克服した新しい抗体医薬品の開発を期して、前述の発明抗体を起点とする機能的CDRペプチドからなる最小フラグメント抗体を作成した(特願 2016-016407)。本研究の目的は、この新規抗体のADモデル動物における脳内動態を、高分子マイクロダイアリシス法により解明し、新規抗体の投与経路、投与量を最適化することである。さらにこの新規抗体の薬効の有無を、行動学習試験を含めて薬理学的に評価し、併せてADの疾患標的分子であるA β オリゴマーの挙動に、この新規抗体がいかなる影響を与えるかを調査する。

3. 研究の方法

序：最小フラグメント抗体の作成

我々のグループが独自に開発したA β オリゴマーに対する特異的抗体を産生するハイブリドーマの全RNAから逆転写にてcDNAライブラリーを作成し、その中から可変領域を含む配列を5'-RACE PCR法により増幅した。得られたPCR産物をベクターに挿入してクローニングしてこれらのアミノ酸配列を決定して複数のCDRペプチドを得た。これらから、A β オリゴマーの神経毒性に対する保護効果を持つものを選択し、最終的に2種類のCDRペプチド(最小フラグメント抗体A, B)を得た。

(1) 急性投与した最小フラグメント抗体の血中動態

10-14週齢のC57B6マウスを麻酔し、蛍光標識した最小フラグメント抗体をPBSに溶解し、尾静脈内皮下および経鼻にて投与した。各個体は、抗体投与前、投与後15分から24時間までのタイムポイントで尾静脈から採血を行った。得られた血清の蛍光強度を求め、同時に作成した検量線からフラグメント抗体の濃度を算出した。

(2) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳室内および海馬内濃度

若齢の野生型マウスC57B6および高齢のADモデルマウス(APP-NL-G-F-KIマウス)の雄性マウスを用いた。動物は投与実験約1週間前に脳室あるいは海馬にガイドカニューレ埋め込み手術を行なった。実験当日は動物を麻酔し、マイクロダイアリシス回路に接続し自由行動下で透析液を回収した。回収したサンプルの蛍光強度を測定し、同時に作成した検量線からそれぞれのサンプル内のフラグメント抗体の濃度を算出した。

(3) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳内A β オリゴマーへの効果

上記(2)と同様に最小フラグメント抗体を急性投与した後に24時間に渡り回収した透析液内のA β オリゴマーの、ELISA法による検出し、その経時的変化の解明を試みた。

(4) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳内分布

高齢の野生型C57B6マウスおよびADモデル動物に対して、Alexa488で標識した最小フラグメント抗体あるいはPBSを皮下投与ならびに経鼻投与し、投与後に時間を振って灌流固定・抜脳した。脳は4%パラホルムアルデヒドで保存した後にスライスし、免疫組織化学的にフラグメント化抗体の脳内分布を検討した。

(5) 長期反復投与した最小フラグメント抗体の記憶障害予防に対する効果

記憶障害発症前のADモデル動物(APP-NL-G-F-KIマウス)を3群に分け、それぞれ最小フラグメント抗体A, BあるいはPBSのみを経鼻的に長期反復投与し、記憶障害が発症するとされる月齢

まで継続した。コントロールとして、同月齢の野生型マウスに PBS を同じ投与スケジュールで投与したものを用いた。投与終了からモリス水迷路試験により学習記憶機能を評価した。

(6) 長期反復投与した最小フラグメント抗体の作用機序についての免疫化学的検討

上記(6)で用いた動物は、実験終了後に灌流固定・抜脳して、生化学的あるいは免疫組織化学的検討に用いた。

4. 研究成果

(1) 急性投与した最小フラグメント抗体の血中動態

最小フラグメント抗体 A, B とも、ほぼ変わらない血中半減期を得た。皮下投与および経鼻投与でのバイオアベイラビリティは抗体 A においてやや良好な結果であった。

(2) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳室内および海馬内濃度

高分子マイクロダイアリシス法を用いた検討を行なった。3つの用量で検討し、安定して濃度時間曲線が得られる濃度を決定した。結果、野生型若年マウスでは最小フラグメント抗体 A, B は両者とも皮下投与で血液脳関門を通過し、脳室内、海馬内ともほぼ同様の濃度時間曲線を示した。最高濃度は抗体 B でやや高値となった。経鼻投与では、両者とも皮下投与に比べて長い脳内滞留時間と高い脳内最高濃度を示した。高齢 AD モデルマウスでの検討では、野生型と比較してやや体内貯留時間が長い傾向があったものの、脳内濃度自体には大きな変化がなかった。

(3) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳内 A オリゴマーへの効果

上記(2)の実験同様に *in vivo* マイクロダイアリシスによってサンプリングした透析液中の A オリゴマーの、フラグメント抗体投与からの濃度変化を ELISA 法で検出しようと試みた。結果、有意な時間曲線を得られず、これは A オリゴマー濃度が透析液中では極めて低かったため検出限界であったためと考えた。

(4) 急性投与した最小フラグメント抗体の脳内分布

最小フラグメント抗体投与後に、時間をふって灌流固定、抜脳したサンプルを用いて、免疫組織学的検討を行なった。結果、抗体 A, B とも大脳皮質、海馬など脳全体にびまん性に分布することがわかった。高倍率の観察では、フラグメント抗体が細胞外のみならず、細胞内に認められ、A オリゴマーと共同在していることがわかった。さらに、マイクロダイアリシス法にて脳内からウォッシュアウトされていると判断される時点を超えて、神経細胞内に抗体が観察された。

(5) 長期反復投与した最小フラグメント抗体の記憶障害予防に対する効果

上記実験より得られた結果を元に、最適化した投与ルート、用量、投与間隔を用いて、学習記憶障害に対する最小フラグメント抗体の効果を検討した。正常コントロールである野生型マウスと比較して、PBS のみ反復投与した AD モデルマウス群では、有意な学習獲得の障害が見られた一方で、フラグメント抗体 A および抗体 B の反復経鼻投与群は、両者とも有意に AD モデルマウスの学習記憶障害を改善し、野生型と同水準の成績を示した。この実験により、この2種の最小フラグメント抗体はいずれも、フルボディ型抗体に匹敵する学習記憶障害の改善効果を持つことが明らかとなった。

(6) 長期反復投与した最小フラグメント抗体の作用機序についての免疫化学的検討

上記(5)で得られた学習記憶に対する著明な改善効果の機序を探るべく、反復投与実験後の動物は全て灌流固定・抜脳し生化学的・免疫組織化学的な検討を行なった。その結果、神経細胞毒性につながるいくつかの細胞内キナーゼの活性低下が確認された。これらの結果は、本抗体が細胞内で A オリゴマーの細胞障害性に対して保護的に作用している可能性を裏付けるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kimura Noriyuki, Aso Yasuhiro, Yabuuchi Kenichi, Matsubara Etsuro	4. 巻 15
2. 論文標題 Association between objectively measured walking steps and sleep in community-dwelling older adults: A prospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Noriyuki, Aso Yasuhiro, Yabuuchi Kenichi, Ishibashi Masato, Hori Daiji, Sasaki Yuuki, Nakamichi Atsuhito, Uesugi Souhei, Jikumaru Mika, Sumi Kaori, Eguchi Atsuko, Obara Hitoshi, Kakuma Tatsuyuki, Matsubara Etsuro	4. 巻 3
2. 論文標題 Association of Modifiable Lifestyle Factors With Cortical Amyloid Burden and Cerebral Glucose Metabolism in Older Adults With Mild Cognitive Impairment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JAMA Network Open	6. 最初と最後の頁 e205719 ~ e205719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1001/jamanetworkopen.2020.5719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Eguchi A, Kimura N, Aso Y, Yabuuchi K, Ishibashi M, Hori D, Sasaki Y, Nakamichi A, Uesugi S, Jikumaru M, Sumi K, Shimomura T, Matsubara E.	4. 巻 16(9)
2. 論文標題 Relationship Between the Japanese Version of the Montreal Cognitive Assessment and PET Imaging in Subjects with Mild Cognitive Impairment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Alzheimer Res.	6. 最初と最後の頁 852-860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1567205016666190805155230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 -
2. 論文標題 Modifiable Lifestyle Factors and Cognitive Function in Older People: A Cross-Sectional Observational Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.00401. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Yuuki、Kimura Noriyuki、Aso Yasuhiro、Yabuuchi Kenichi、Aikawa Miki、Matsubara Etsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship between Cerebrospinal Fluid Matrix Metalloproteinases Levels and Brain Amyloid Deposition in Mild Cognitive Impairment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1496 ~ 1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11101496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 悦朗 (Matsubara Etsuro) (70219468)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------