

平成22年3月31日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17025056
 研究課題名(和文) アルツハイマー病の免疫機序の解析と新しい治療法の開発
 研究課題名(英文) Analysis of immune mechanisms of Alzheimer's disease and development of a novel treatment

研究代表者
 田平 武 (TABIRA TAKESHI)
 順天堂大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：80112332

研究成果の概要(和文)：漢方薬十全大補湯は骨髄由来マクロファージ/ミクログリアを活性化し、老人斑除去効果を示すことを明らかにした。新規に樹立したモノクローナル抗体 3.4A10 は A β 42 の立体構造を認識し、老人斑の除去効果、A β オリゴマーの除去効果、学習機能改善効果を示し、脳出血の有意な増強は示さなかった。本抗体は病気を修飾する治療抗体になり得ると期待される。

研究成果の概要(英文)：An herbal medicine Juzentaihoto activated bone marrow-derived macrophage/microglia and enhanced clearance of senile plaque amyloid. We established a new monoclonal antibody 3.4A10, which recognized a conformational structure of A β 42, reduced senile plaque amyloid as well as A β oligomers, and improved cognitive functions without enhancing cerebral micro-hemorrhages. This is expected to be used as a disease modifying antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	13,100,000	0	13,100,000
2006年度	13,600,000	0	13,600,000
2007年度	13,600,000	0	13,600,000
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
総計	58,300,000	0	58,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイド、ワクチン、漢方薬、ミクログリア、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の免疫療法の可能性が示され (Schenk D et al. Nature 1999) ヒトでの治験が行われた。ワクチン接種した患

者の剖検脳はワクチン接種によりヒトでも老人斑が消失しうること (Nicoll JA et al. Nature Med. 2003)、老人斑アミロイドに対する抗体が上昇した患者ではその後の進行

が緩徐になることが示された(Hock C et al. Neuron 2003)。本研究者らはアデノ随伴ウイルスベクターにアミロイドベータ蛋白 ($A\beta$) cDNA を組換えた経口ワクチンを開発し動物での有効性、安全性を示した(Hara H et al. J Alzheimer Dis 2004; Mouri A et al. FASEB J 2006)。しかし、高齢者では免疫機能が低下しており、反応が十分でない可能性がある。また、経口ワクチンはより安全であると考えられるが、副作用が皆無とは断定できない。そこで、より安全かつ効率のよい免疫療法を開発することをめざし、本研究を行った。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の安全かつ効率のよい免疫療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために以下の3つの研究を行った。

1. 抗体に代わる人工オプソニンの開発

ワクチンのメカニズムとしてアミロイド抗体がオプソニンとして作用し、食細胞によるアミロイドの貪食を促進することが提唱されている。そこで抗体に代わる新規オプソニンを作製することにした。 $A\beta$ はネプリライシン等による分解、細胞外液中のトランスポーターを介する脳外搬出のほか、アルファ2-マクログロブリン ($\alpha 2-M$) に結合し、LDL 受容体関連タンパク質 (LRP) を介して細胞に取り込まれ処理される。そこで $A\beta$ 結合部位と LRP 結合部位が近接して存在する $\alpha 2-M$ の約50アミノ酸がオプソニンとして利用できないかしらべることとし、それをコードする遺伝子を構築し発現蛋白を精製、オプソニンとしての有効性を調べることにした。

2. 末梢由来アミロイド貪食細胞を活性化させる薬の開発

Simard ら(2006) は遺伝的背景を合わせた green fluorescent protein (GFP) トラン

スジェニック (tg)マウスの骨髄細胞を致死放射線照射したアミロイド前駆体蛋白 (APP) tg マウスに移植し経時的に脳を観察した。その結果、若年マウスでは老人斑に集積しアミロイドを貪食する細胞は骨髄由来であるが、高齢になると骨髄由来ミクログリアが減少しアミロイドが蓄積することを示した。従って、末梢由来食細胞をいかに脳に送り込むかが重要となる。そこで免疫増強活性が知られる既知薬物の中から漢方薬の一つ十全大補湯に注目し、その効果を APP tg マウスを用いて調べることにした。

3. TAPIR 抗体の開発

Hoch ら(2003) はベータアミロイド・ワクチン接種を受けた患者で tissue amyloid plaque immuno-reactive (TAPIR) 抗体が上昇した患者では上昇しなかった患者に比し認知機能の低下が有意に軽くなること、ELISA 抗体は相関しないことを示した。TAPIR 抗体とは患者血清で AD 患者脳切片を免疫染色し、老人斑に結合する抗体をいう。そこで、ファージ抗体ライブラリー又は細胞融合法により、TAPIR 抗体と思われるものを選択することにした。

4. 研究成果

1. 人工オプソニンの開発

$A\beta$ 結合部位と LRP 結合部位を含む $\alpha 2-M$ 遺伝子を発現ベクターに組み込み、Glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白を得て分離精製を試みた。しかし予想に反し水に対し極めて難溶性であり、オプソニンとして使えないことが分かった。

2. 末梢由来アミロイド貪食細胞活性化薬の開発

12 ヶ月齢の APP tg マウス (tg2576) に十全大補湯又は小柴胡湯を 0.1 mg/ml の飲水として1 ヶ月投与し、脳の病理組織及び生

化学的変化を生食水群と比較した。その結果、十全大補湯投与マウスでは老人斑が有意に減少し ($p=0.0001$)、脳のギ酸画分の $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ が有意に減少し、とくに $A\beta 40$ は 50% の減少が見られた。CD11b 強陽性で Iba-1 陽性のミクログリアの脳内浸潤が多数観察された。これら CD11b 強陽性で Iba-1 陽性のミクログリアは CD40 陽性であり、骨髄由来であると考えられた。脳のサイトカインを調べたところ十全大補湯治療マウスでは IL-6 のみ増強が見られ、TNF- α 、IL-12、IL-16、TGF- β の増強は見られなかった (この研究成果は Hara H らにより Journal of Alzheimer Disease に発表された、図 1)。

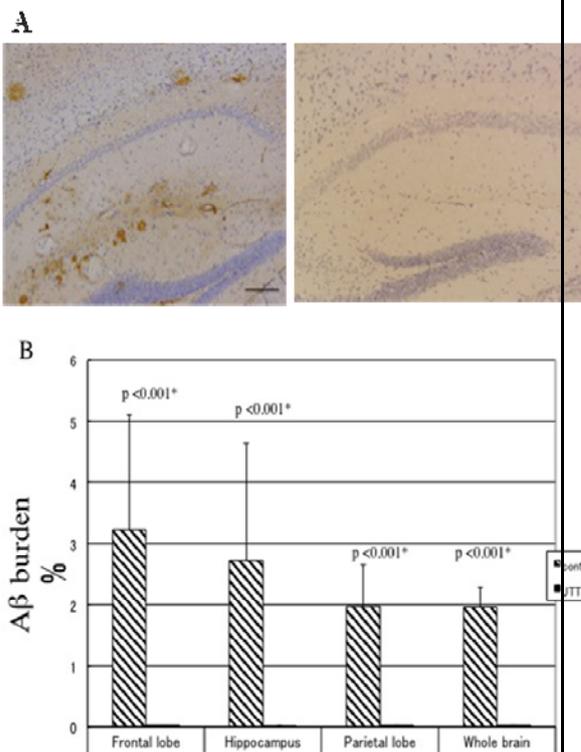


図 1. アルツハイマー病モデルマウス (tg2576) における十全大補湯の効果

次に十全大補湯のミクログリアおよび骨髄由来マクロファージに対する in vitro の効果を検討した。新生仔マウス脳由来ミクログリアを分離・培養し、種々濃度の十

全大補湯で刺激後ミクログリアの増殖反応、凝集 Abeta42 の貪食能を調べた。その結果十全大補湯は in vitro でミクログリアを活性化し、増殖を促進した。また、十全大補湯を添加するとミクログリアの Abeta42 貪食能が亢進した。また、活性化マーカーである CD-11b が LPS と同等に表出された。次に野生型マウスに十全大補湯を経口投与し、一定期間後に骨髄細胞を分離し、M-CSF で短期間分化誘導したマクロファージ系の細胞について、凝集 Abeta42 の貪食能を調べた。その結果十全大補湯を経口投与したマウスの骨髄由来マクロファージの Abeta42 貪食能に亢進が見られた。

さらに B6 を遺伝的背景とする GFP トランスジェニックマウス由来骨髄細胞を致死性 X 線照射した B6 マウスに移植した後、脳内に凝集 Abeta42 を注入し、脳に浸潤する GFP 陽性のミクログリア/マクロファージについて十全大補湯投与マウスと対照マウスを比較した。その結果、十全大補湯を投与した骨髄移植キメラマウスでは GFP 陽性細胞の脳内浸潤が対照より多く見られたが、Abeta42 注射部位のみでなく、反対側の生理食塩水注入部位でも多数観察された。これは外傷の影響が大きいと考えられた。

以上より十全大補湯は in vitro, in vivo でミクログリア、骨髄由来ミクログリア/マクロファージの活性化を誘導し、アミロイド貪食を亢進させるので、AD の予防・治療薬になり得ると考えられた (この研究成果は Liu H らにより Tohoku Journal of Experimental Medicine に発表された、図 2)。

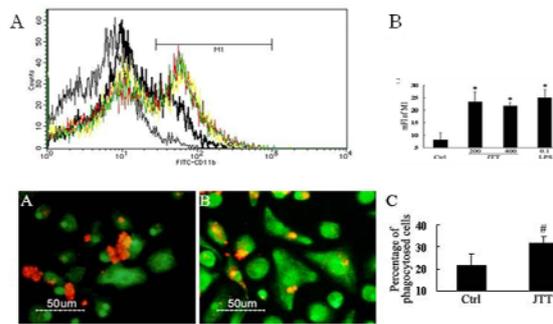


図2. 十全大補湯によるミクログリア/マクロファージの活性化

上段：A, FACS 解析 Ra2 ミクログリアを十全大補湯で処理すると CD11b の発現が増強された。黒：対照、赤：JTT 200 μg/ml, 黄：JTT 400 μg/ml; 緑：LPS 0.1 μg/ml
B, 蛍光強度の定量 下段：骨髄由来マクロファージ (緑) の凝集 Aβ (赤) 貪食能に対する十全大補湯の効果。
A, 対照, B, JTT, C, 貪食細胞の定量。

3. TAPIR 抗体の開発

TAPIR 抗体は老人斑の芯の部分に染色され、周囲部分が主として染色されるので、Aβ42 により親和性が高く oligomer などをよりよく認識すると思われる。もしこのような抗体が得られれば臨床上さらに有用性が高いと考えられる。

まずファージ抗体ライブラリーからそのような抗体のスクリーニングを行ったが、目的とする抗体は得られなかった。そこで BALB/c マウスを凝集 Aβ1-42 とアジュバントで免疫し、脾細胞と形質細胞腫との融合細胞の上澄をスクリーニングした。合計 8 クローンが得られ、そのうちの 1 つ (3.4A10) が IgG2b であったのでこのクローンの詳しい解析を行った。

3.4A10 は凝集 Aβ1-42 に高い親和性を有し (表 1)、Aβ1-40, Aβ1-28 に対する反応は弱かった。Aβ1-42 モノマーに対する親和性も低く、APP は認識しなかった。ピア

コアを用いて抗原認識部位をしらべると、N 末部分にあることが分かった。3.4A10 は Aβ の凝集を抑制、

表 1. 3.4A10 の Aβ₁₋₄₀, Aβ₁₋₄₂ に対する解離定数

	Aβ ₁₋₄₀	Aβ ₁₋₄₂
解離定数	3.77 × 10 ⁻⁸ M	5.64 × 10 ⁻¹¹ M
χ ²	10.4	11.7

凝集した Aβ の融解作用も有した。3.4A10 で免疫組織染色すると老人斑の周辺部に主に結合し、芯の部分への結合は弱かった (図 3)。3.4A10 (10 mg/kg) を 18 カ月齢の tg2576 に週に 1 回腹腔注射し 8 週後に脳を調べると老人斑の有意な減少 (図 4)、オリゴマーの減少と認知機能の改善が見られ、脳出血の有意な増加は観察されなかった。そこで V 領域の塩基配列を決定し特許出願した。(この研究成果は Wan J らにより J Alzheimer Disease に発表された)。

この抗体に興味をもつ企業と共同研究を開始し、先ず V 領域の CDR1-3 のみをマウス由来とした部分ヒト型化抗体を作製していただいて、in vitro での抗原との反応性をしらべた。しかし、Aβ に対する反応性が失われていた。そこで Fab 領域はマウスのままとし、Fc 領域のみをヒト由来とするキメラ抗体を作製していただいた。残念なことに、キメラ抗体でも Aβ に対する反応性が失われていた。恐らく Fc 部分が抗原結合性に関与している抗体であると思われる、Fc 部分の塩基配列を決定し、類似の配列をもつヒト抗体を用いることで rescue できるのではないかと考えている。

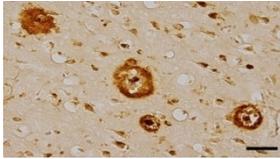
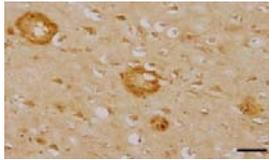
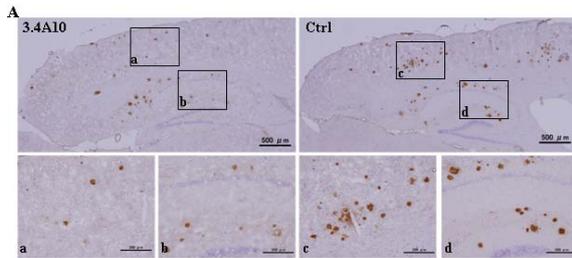


図3. 3.4A10によるAD脳の免疫組織染色

3. 4A10抗体は老人斑の周辺部に好んで結合し、芯の部分にはほとんど結合しなかった。下：4G8抗体。

図4. 3.4A10抗体による治療効果

3. 4A10抗体を1週間に1回8週間tg2576マウスの腹腔に注射したところ、老人斑の有意な減少が見られた。



結語

1. 十全大補湯にはミクログリア/骨髄由来マクロファージを活性化し、老人斑アミロイド除去効果があることを見出した。

2. Aβ42に高い親和性を有し、老人斑及びAβオリゴマー除去効果を有し、脳出血増強作用の少ないモノクローナル抗体を樹立した。

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 25 件)

1. Mouri, A., Noda, Y., Hara, H., Mizoguchi, H., Tabira, T. & Nabeshima, T. Oral vaccination with a recombinant adeno-associated viral vector attenuates age-related Abeta accumulation and memory

deficits without lymphocytic infiltration in Tg2576 mice. *FASEB J.* 21, 2135-48 (2007).

2. Wang, J., Hara, H., Makifuchi, T. & Tabira, T. Development and characterization of a TAPIR-like mouse monoclonal antibody to Aβ. *J Alzheimer Dis* 14: 161-73, 2008.

3. Tabira T. Decorated plaques in Alzheimer's disease. *Ann Neurology* 65(1):4-6, 2009.

4. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: A comprehensive review of active immunization strategies. *Tohoku J Exp Med* 2010;220:95-106.

5. Hara H., Kataoka S, Anan M, Ueda A, Mutoh T, Tabira T. The therapeutic effects of herbal medicine, Juzen-taiho-to on the reduction of Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2010 (in press).

[学会発表] (計 127 件)

1. 学会名 : 2ND German-Japanese Neuroimmunology Symposium, 発表者名 : Tabira T, 発表標題 : Alzheimer's disease vaccine, July 11 2009, Eibsee, Germany

[図書] (計 27 件)

著者名 : 田平 武、出版社 : 朝日新書、書名 : アルツハイマー病に克つ、発行年 : 2009 年、総ページ : 255 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : アルツハイマー病治療の為のタピール様抗体

発明者 : 田平 武、王 軍

権利者 : 田平 武、王 軍

種類 : 特願

番号 : PCT/JP2009/53029

出願年月日 : 2008 年 2 月 22 日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田平 武 (TABIRA TAKESHI)
順天堂大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80112332

(2) 研究分担者

高橋 慶吉 (TAKAHASHI KEIKICHI)
国立長寿医療センター研究所・血管性認知
症研究部・部長
研究者番号：40117148

原 英夫 (HARA HIDEO)
国立長寿医療センター研究所・血管性認知
症研究部・室長
研究者番号：00260381

関山 敦生 (SEKIYAMA ATSUO)
国立長寿医療センター研究所・血管性認知
症研究部・室長
研究者番号：30403702

松本 信英 (MATSUMOTO SHINEI)
順天堂大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40432950

(3) 連携研究者

なし