

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07989

研究課題名(和文) アミロイド 蛋白組み換えダイズ蛋白を用いたアルツハイマー病予防療法の開発

研究課題名(英文) Development of prevention of Alzheimer's disease using transgenic soybean expressing amyloid beta protein

研究代表者

瓦林 毅 (Takeshi, Kawarabayashi)

群馬大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90186156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はAmyloid beta peptide (Abeta)4-10を発現する組換えダイズ蛋白(Abeta+)を作製し、アルツハイマー病(AD)モデルマウスTgCRND8で効果を検討した。9週から毎週1mgのAbeta+またはダイズ蛋白(Abeta-)を経口投与した。Abeta+投与マウスでは21週以降で学習障害の改善を認め、脳可溶性分画でAbeta oligomerは減少し、脳Abeta蓄積は減少した。免疫療法で問題となっている脳髄膜炎や微小出血は認められなかった。組換えダイズ蛋白による経口免疫療法は安全で有効なADの予防療法になりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドbeta蛋白抗体によるアルツハイマー病(AD)の予防効果が示され、実用化されつつある。本邦でもAducanumabは承認審査中である。AD発症予防には認知症発症前からの長期の投与が必要と考えられているが、抗体療法は非常に高価で、注射のため侵襲的である。我々の開発した組み替えダイズによる経口免疫療法は有効で安全であり、さらに抗体に比べて安価に作成でき、大量生産も可能である。よってAD予防の有効な疾患修飾療法になりうると考えられる。製品化に向けて製薬会社との相談を行っている。

研究成果の概要(英文)：We generated a transgenic plant-based vaccine, a soybean storage protein containing Amyloid-beta protein (Abeta) 4-10, named Abeta+ to prevent Alzheimer's disease (AD). One mg of Abeta+ or control protein (Abeta-) was administered to TgCRND8 mice once a week from 9 weeks up to 58 weeks. Abeta+ immunization raised anti-Abeta oligomer antibodies. Spatial learning decline was prevented in the Abeta+ immunized group from 21weeks. Abeta oligomers decreased in TBS fractions, corresponding to an increase in high molecular weight Abeta oligomers in SDS extracts and Abeta smears in FA fraction of the Abeta+ treated group. There was significant inhibition of histological Abeta burden, especially in diffuse plaques, and suppression of microglial inflammation. No evidence of amyloid-related inflammatory angiopathy was observed. Abeta+ oral immunization could be a promising, cheap, and long-term safe disease-modifying therapy to prevent the pathological process in AD.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 ワクチン 組み替え蛋白 認知症 疾患修飾療法 アミロイド アミロイドbeta蛋白

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の疾患修飾療法の開発が続けられ、最近になって AB 抗体療法の効果が示された。抗 AB oligomer 抗体 Aducanumab は用量依存的な脳アミロイドの減少、臨床症状の悪化を抑制することが第 Ⅰ 相試験で始めて示され、米国食品医薬品局(FDA)へ新薬承認申請を予定されている。しかし、脳への AB の蓄積は AD 発症の 25 年前から始まることが示されており、認知症の発症時にはすでに神経障害が進行している。認知症発症前からの AB 蓄積の予防が有効とされるが、無症状者への長期の投与が必要となる。そのため、安全性が高く、非侵襲的で安価な治療法が必要と考えられている。

2. 研究の目的

我々の目的は AD 予防のための安全なワクチン開発を行うことである。植物ワクチンは、副作用を起こす T-cell 反応を減らし、免疫抑制性 cytokine を増加させることが示されている。また、経口投与が可能であり、大量生産が可能で、安価で作成でき、培養細胞や細菌で問題になる病原の混入がないことなどから、理想的な免疫療法と考えられている。その中でも我々はダイズに注目した。ダイズは年に何回も収穫でき、大量の目的蛋白の発現が可能である。我々はダイズ蛋白に AB を組み込んだ組み換えダイズ蛋白を作成し、AD モデルマウスを用いてその予防効果を検討した。

3. 研究の方法

ダイズ貯蔵蛋白である glycinin A1aB1b の disordered region の 3 箇所(2 から 4)に AB のアミノ末端の 7 アミノ酸残基 4-10 の 3 連続体を組み込んだ。この遺伝子をダイズに発現させると大量の組み換え蛋白の作成に成功した[1]。精製した AB 組み換え蛋白 AB+と対照として組み込みのない A1aB1b 蛋白 AB-を以下の実験で使用した。家族性 AD のヒト AB 前駆体蛋白を発現する AD モデルマウス TgCRND8 を使用した。TgCRND8 に脳アミロイド蓄積前の 9 週から 1mg の AB+又は AB-を 10mg の cholera toxin subunit B と共に毎週ゾンドで経口投与を行った。記憶の評価のために 1 日 4 回、連続 10 日間、水面下のプラットフォームに泳がせる Morris 水迷路試験を経口投与開始の 4 週後から 4 週毎に行った。23、43、59 週でマウスを解剖し、半脳を TBS、2% SDS、70%ギ酸で 3 段階抽出し、各分画を ELISA、western blot で解析した。残りの半脳は 8% paraformaldehyde で固定してパラフィン包埋切片を作成し、免疫染色で脳 AB 蓄積を解析した。

4. 研究成果

AB+投与マウスでは AB+に対する IgG 抗体価が上昇した。Tg マウス脳抽出液を泳動して免疫マウスの血漿で染色すると、AB+投与マウスの血漿はコントロールマウスの認識しない AB oligomer を認識した。つまり、AB+経口免疫マウスでは AB oligomer 抗体が産生されることが示された。

Morris water maze test で水面下のゴールにたどり着くまでの水泳時間と水泳距離を測定すると、AB+投与マウスは初めの 13、17 週は AB-投与マウスと差を認めないが、AB+投与 12 週後の 21 週から最終の 57 週まで水泳時間と水泳距離を改善した。これは空間参照記憶の低下が予防されたことを示している。

次に脳の各分画を AB40、AB42、AB oligomer の ELISA で測定すると、AB40、AB42 の量は免疫の有無によって差は認めなかったが(図 12A、B)、TBS 可溶性分画の AB oligomer が AB+免疫によって有意に減少した(図 1C)。western blotting で AB 量を解析すると TBS 抽出分画では AB monomer の減少が認められた(図 1D)。SDS 抽出分画では AB monomer や低分子量 oligomer には差を認め

なかったが、高分子量 AB oligomer の増加を認めた(図 1E)。ギ酸抽出分画では AB monomer、dimer は変化を認めなかったが、凝集 AB である smear が AB+群で増加していた(図 1F)。TBS 可溶性の低分子 AB oligomer は SDS western blotting で容易に monomer に分解してしまうことから、ELISA で示された AB oligomer の減少は western blot の AB monomer の低下に相当すると考えられた。つまり AB+経口免疫は TBS 可溶性 AB monomer/低分子 AB oligomer を減らし、不溶性の高分子量 AB 凝集を増加させたと考えられた。

大脳皮質の AB 蓄積を免疫染色で解析すると、AB+投与群では脳アミロイド蓄積が減少した。その多くは AB 線維が希薄で Cong red 染色に染まらない diffuse plaque の減少によるものであった(図 1G)。また、ミクログリアの染色では AB+投与群でミクログリアの占める面積が減少し、炎症反応の悪化がないことを示した。AB 前駆体蛋白(APP)およびその分解産物である APP の C 末端断片および可溶性 APP の量には変化を認めず、AB+免疫は APP の代謝を変化させないことが示された。AD の免疫療法で問題になる有害作用には髄膜脳炎と出血があるが、これらの副作用は AB+免疫マウスには認められなかった。

AB+経口免疫によって AB oligomer に対する抗体が作成され、脳 TBS 可溶性分画で AB oligomer の蓄積が減少し、空間参照記憶の低下が予防された。一方、不溶性の AB 凝集体が増加したことから、神経毒性の可溶性 AB oligomer がより毒性の低い不溶性の AB 凝集体に隔離されたものと考えられた。免疫療法の臨床試験で副作用として問題になっている炎症や出血は認めず、神経活動に必要と考えられている APP の代謝には影響を与えなかった。AB+経口免疫は有効で安全であり、さらに抗 AB 抗体に比べて安価に作成でき、大量生産も可能であった。よって AB+は AD 予防の有効な疾患修飾療法になりうると考えられた。

引用文献

[1] Maruyama N, Fujiwara K, Yokoyama K, Cabanos C, Hasegawa H, Takagi K, Nishizawa K, Uki Y, Kawarabayashi T, Shoji M, Ishimoto M, Terakawa T (2014) Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *J Biosci Bioeng* **118**, 441-447.

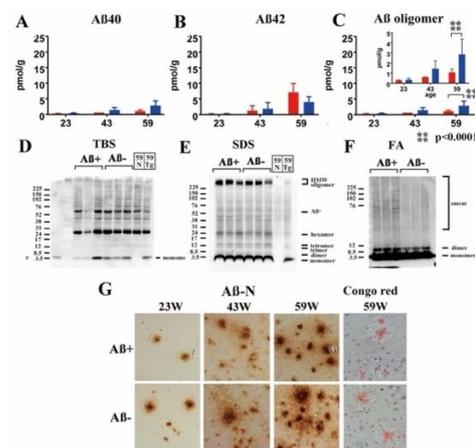


図 1 ELISA、western blot、免疫染色による AB+免疫の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Seino Yusuke, Nakamura Takumi, Harada Tomoo, Nakahata Naoko, Kawarabayashi Takeshi, Ueda Tetsuya, Takatama Masamitsu, Shoji Mikio	4. 巻 79
2. 論文標題 Quantitative Measurement of Cerebrospinal Fluid Amyloid- Species by Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 573 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-200987	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 Pichet Binette A, Vachon-Preseu E, Morris J, Bateman R, Benzinger T, Collins DL, Poirier J, Breitner JCS, Villeneuve S; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)	4. 巻 89
2. 論文標題 Amyloid and Tau Pathology Associations With Personality Traits, Neuropsychiatric Symptoms, and Cognitive Lifestyle in the Preclinical Phases of Sporadic and Autosomal Dominant Alzheimer's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 776 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2020.01.023	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 該当する
1. 著者名 Kawarabayashi Takeshi, Terakawa Teruhiko, Takahashi Atsushi, Hasegawa Hisakazu, Narita Sakiko, Sato Kaoru, Nakamura Takumi, Seino Yusuke, Hirohata Mie, Baba Nobue, Ueda Tetsuya, Harigaya Yasuo, Kametani Fuyuki, Maruyama Nobuyuki, Ishimoto Masao, St. George-Hyslop Peter, Shoji Mikio	4. 巻 70
2. 論文標題 Oral Immunization with Soybean Storage Protein Containing Amyloid- 4-10 Prevents Spatial Learning Decline	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 487 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190023	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 該当する
1. 著者名 Kawarabayashi Takeshi, Nakamura Takumi, Miyashita Kazuya, Fukamachi Isamu, Seino Yusuke, Shoji Mikio	4. 巻 722
2. 論文標題 Novel ELISAs to measure total and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134826 ~ 134826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.134826	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 Ichii Sadanobu, Nakamura Takumi, Kawarabayashi Takeshi, Takatama Masamitsu, Ohgami Tetsuya, Ihara Kazushige, Shoji Mikio	4. 巻 20
2. 論文標題 CogEvo, a cognitive function balancer, is a sensitive and easy psychiatric test battery for age related cognitive decline	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 248 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13847	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 Seino Yusuke, Nakamura Takumi, Kawarabayashi Takeshi, Hirohata Mie, Narita Sakiko, Wakasaya Yasuhito, Kaito Kozue, Ueda Tetsuya, Harigaya Yasuo, Shoji Mikio	4. 巻 68
2. 論文標題 Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarkers in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 395 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-181152	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 Dube Umer, the Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN), et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 An atlas of cortical circular RNA expression in Alzheimer disease brains demonstrates clinical and pathological associations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-019-0501-5	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 該当する

1. 著者名 Barthlemy Nicolas R., the Dominantly Inherited Alzheimer Network, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 398 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-020-0781-z	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 Nakahata Naoko, Nakamura Takumi, Kawarabayashi Takeshi, Seino Yusuke, Ichii Sadanobu, Ikeda Yoshio, Amari Masakuni, Takatama M, Murashita Koichi, Ihara Kazunari, Itoh Ken, Nakaji Shigeyuki, Shoji Mikio	4. 巻 84
2. 論文標題 Age-Related Cognitive Decline and Prevalence of Mild Cognitive Impairment in the Iwaki Health Promotion Project	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1233-1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-210699	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kawarabayashi T, Nakamura T, Takatama M, Shoji M
2. 発表標題 Oral immunization with soybean storage protein containing amyloid 4-10 prevents spatial learning decline
3. 学会等名 Alzheimer ' s Association International Conference (AAIC) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawarabayashi T, Seino Y, Nakamura T, Takatama M, Shoji M
2. 発表標題 Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in neurodegenerative diseases.
3. 学会等名 61st annual meeting of Japanese society of Neurology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瓦林毅, 高玉真光, 東海林幹夫
2. 発表標題 神経変性疾患の血漿・脳脊髄液バイオマーカー解析と新規タウELISAの開発.
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瓦林毅, 高玉真光, 東海林幹夫
2. 発表標題 神経変性疾患の脳脊髄液および血液バイオマーカーの検討.
3. 学会等名 令和2年度秋季群馬県医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawarabayashi T, Amari M, Takatama M, Shoji M
2. 発表標題 Oral immunization with soybean storage protein containing Abeta4-10
3. 学会等名 Neuroscience 2019, the Society for Neuroscience, 49th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kawarabayashi, Takumi Nakamura, Yusuke Seino, Mie Hirohata, Mikio Shoji
2. 発表標題 Oral immunization with soybean storage protein containing Abeta4-10 in Alzheimer's model mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瓦林毅, 中村巧洋, 甘利雅邦, 高玉真光, 東海林幹夫
2. 発表標題 組み換えダイズ蛋白によるアルツハイマー病発症予防療法の開発
3. 学会等名 第10回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村琢洋、瓦林毅、清野祐輔、笠原浩生、池田将樹、池田佳生、東海林幹夫
2. 発表標題 血漿Abeta値は腎機能により強い影響を受け、MMSEと相関する：岩木プロジェクト
3. 学会等名 第10回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瓦林毅、中村琢洋、清野祐輔、亀谷富由樹、池田佳生、高玉真光、東海林幹夫
2. 発表標題 組み替え大豆蛋白によるアルツハイマー病経口免疫の作用機序の検討
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kawarabayashi, Yusuke Seino, Takumi Nakamura, Tomoo Harada, Naoko Nakahata, Tetsuya Ueda, Masamitsu Takatama, Mikio Shoji
2. 発表標題 Quantitative measurement of CSF Abeta species by mass spectrometry.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Kawarabayashi, Yusuke Seino, Takumi Nakamura, Tomoo Harada, Naoko Nakahata, Tetsuya Ueda, Masamitsu Takatama, Mikio Shoj
2. 発表標題 Quantitative measurement of CSF Abeta species by mass spectrometry
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瓦林毅, 清野祐輔, 中村琢洋 原田朋夫, 中畑直子, 上田哲也, 高玉真光, 東海林幹夫
2. 発表標題 Mass spectrometryによるAbetaの定量
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瓦林毅, 東海林幹夫, 甘利雅邦, 菅原隆, 岩崎理, 岡大典, 高玉真光
2. 発表標題 質量分析法によるアミロイドbeta蛋白定量法の開発
3. 学会等名 令和3年度秋期群馬県医学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------