

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591103

研究課題名(和文) 作用機序に基づいたアルツハイマー病に対する高性能・新型 DNA ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a new and effective DNA vaccine for Alzheimer's disease

研究代表者 大倉 良夫 (OKURA YOSIO)

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：10392367

## 研究成果の概要(和文)：

アルツハイマー病は認知障害を主症状として中年以降発症する神経疾患である。我が国においてアルツハイマー病患者は120万人以上存在する。その治療法の開発は極めて重要な解決課題である。我々は有効で、安全性の高い治療法を確立する目的で、DNA ワクチンを開発した。これをアルツハイマー病のモデルマウスに投与すると有意にA $\beta$ 沈着を削減することが明らかとなった。

DNA ワクチン治療効果を高めるためには、(1) より力価の高い抗体を誘導すること、(2) A $\beta$  亜種 (A $\beta$  から派生した類似分子) を幅広くカバーする抗体を誘導すること、が重要である。本研究では本基準に従って新規 DNA ワクチン (開発コード、YM3711) を開発した。YM3711 ワクチン投与すると A $\beta$  抗体や抗 A $\beta$  pE3-42 抗体、A $\beta$  オリゴマー抗体などの広範な抗 A $\beta$  亜種抗体を誘導し、アルツハイマー病のモデルマウスにおける A $\beta$  1-42、A $\beta$  pE3-42、A $\beta$  オリゴマーの沈着を軽減することが示された。これらの所見を基に、臨床試験の前段階である非臨床試験を行うことを計画している。

## 研究成果の概要(英文)：

<Background> It is recently known that in Alzheimer disease, not only A $\beta$  oligomers, but also posttranslationally modified A $\beta$  species and other amyloidogenic peptides are neurotoxic. In the present study, we have attempted to develop a new DNA vaccine targeting these molecules.

<Materials and Methods> Characterization of a newly developed DNA vaccine (Code name, YM3711) was performed in in vitro and in vivo studies. A $\beta$  production and A $\beta$  secretion abilities were evaluated using YM3711-transfected cultured cells. Anti-A $\beta$  and anti-A $\beta$  species antibody-inducing and A $\beta$ -reducing abilities were determined using plasma and brains from YM3711-vaccinated animals.

<Results> YM3711-transfected cells produced 5-6 fold larger amount of A $\beta$  and secreted A $\beta$  3-4 fold higher in the culture supernatant compared with previous DNA vaccines. When vaccinated to mice and rabbits, YM3711 induced not only anti-A $\beta$  antibodies, but also antibodies against A $\beta$  species and amyloidogenic peptides. Importantly, YM3711 vaccination induced reduction of A $\beta$  and A $\beta$  species in model mice.

<Conclusion> Based on the findings, we are currently performing preclinical trials of YM3711.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：7206

キーワード：アルツハイマー病、DNA ワクチン、A ベータ

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知障害（記憶障害、見当識障害、学習の障害、注意の障害、空間認知機能、問題解決能力の障害など）を主症状として中年以降に多発し、世界中で 3500 万人を超える患者が存在すると考えられている。数年の経過を経て徐々に症状は進行し、重度になると摂食や着替え、意思疎通なども不可能となり、発症後数年から十数年で寝たきりになり死に至る。経過中に被害妄想、幻覚や暴言・暴力・徘徊・不潔行為などの問題行動が出現することが多く、患者本人ばかりか家族や介護者を含めた大きな社会問題となっている。

アルツハイマー病は、肉眼病的に前頭葉、前頭葉連合野や側頭葉、海馬領域の中等度から高度の脳萎縮が認められ、大脳皮質や海馬の萎縮を反映して脳室は拡大する。顕微鏡レベルでは、老人斑の形成、神経原線維変化 (neurofibrillary tangle)、神経細胞脱落の 3 つの特徴がある。

1999 年 Schenk らは、アルツハイマーモデルマウスに A $\beta$  ペプチドと免疫賦活剤を投与し、体内で抗 A $\beta$  抗体の産生を誘導し、脳内の A $\beta$  蓄積が減少することを証明した。その後、学習記憶能力もワクチン投与により改善されることが明らかとなった。これらの所見に基づいて、A $\beta$  ペプチド・ワクチンのヒト臨床試験が開始されることとなった。Elan 社において製造されたペプチド・ワクチン (AN-1792) を用いた第 I 相試験 (安全性試験) では、重要な副作用もなく終了し、投与された患者の血清中に抗 A $\beta$  抗体が生体内で合成されたことが確認された。引き続き行われた第 II 相試験では実薬投与を受けた 298 例のうち 18 例 (6%) に髄膜炎が発症し、2002

年 1 月に治験自体が中止された。

臨床試験は不満足な結果に終わったものの、その後の検索によってワクチン治療が有益であるという重要な所見が示された。2003 年、ワクチン投与を受けた患者の最初の剖検例が報告された。脳病理は Braak stage V-VI のアルツハイマー病の所見であった。脳炎の所見として髄膜、髄膜血管周囲及び大脳皮質への T 細胞とマクロファージの浸潤が認められ、大脳白質には髄鞘繊維の減少が認められた。しかしその一方、新皮質では老人斑が消失し、それに伴うアストロサイトの増殖や変性軸索も消えていた。この所見からワクチンがヒトのアルツハイマー病においても老人斑の減少効果があると推測された。その後、Gilman らは臨床試験の抗 A $\beta$  抗体の抗体価と高次機能の改善について報告した。ワクチン投与 300 名中 59 人が抗体陽性であり、陽性群では各種高次機能試験のうち neuropsychological test battery (NTB) で有意の改善を認めた。これらの事実は、能動免疫療法により一部患者に脳内炎症症状が出現したものの、ワクチンによる A $\beta$  減少効果がヒトアルツハイマー病症例においても認められることを示すものである。過剰な免疫反応を抑制することができれば、ヒトにおいてもワクチン療法が有効である可能性が高いことを示唆している。

## 2. 研究の目的

我々の研究室では、これまで哺乳類細胞発現ベクターに A $\beta$ -protein(1-42)及び付属のシーケンスを挿入して 3 種類の非ウイルス性 DNA ワクチンを製作した。これらを HEK293T に transfect し、その細胞内に A $\beta$  1-42 ペプ

チドが発現し、培養上清に分泌されているかを ELISA 法により検討した。

そのうち、最も A $\beta$  産生能の高い DNA ワクチンをアルツハイマー病モデルマウス投与した。A $\beta$  沈着がまだ出現していない 3-4 ヶ月齢からワクチンを投与した予防的投与群においては 70-90%、既に A $\beta$  沈着が認められた 12 ヶ月齢から治療的にワクチンを投与した治療的投与群においては 50-60% の A $\beta$  沈着がコントロール群に比較し有意に減少していた。

最近の知見では、A $\beta$  オリゴマーだけに神経毒性があるのではなく、翻訳後修飾を受けた A $\beta$  やアミノ酸配列の異なるアミロイド原性脳蛋白も発症に関与している可能性が指摘されている。本研究ではアミロイド関連物質に幅広く対応する DNA ワクチンの開発を試みた。さらに、より効果の高い新型・高性能の DNA ワクチンを作製するために、プラスミド内に抗体産生を増加させるペプチドやマイクログリアの貪食能を増進するペプチドを挿入し、新たな数種類のワクチンを試作した。それらをアルツハイマー病モデルマウスに投与して、現有ワクチンより強い A $\beta$  削減効果があるかを検討した。本研究の目的は今までの基礎的研究の集大成として、実際の臨床応用に向けたアルツハイマー病に対する創薬を実現することである。

### 3. 研究の方法

新たに開発した DNA ワクチン(開発コード、YM3711)の種々の効果を既存のワクチンと比較した。in vitro 検索としては、培養細胞にトランスフェクション後、A $\beta$  産生能を検討した。in vivo 検索では YM3711 をマウス、ウサギ、サルに投与して、抗体価の上昇と A $\beta$  削減効果を見た。抗体価は A $\beta$  1-42、A $\beta$  オリゴマー、A $\beta$  3(pE)-42、ABri1(pE)-34、ADan1(pE)-34 を抗原として特異抗体の力価を測定した。A $\beta$  削減効果はサンドイッチ ELISA により測定した。また、YM3711 免疫によって誘導される抗体の特性をより詳細に解析するために、YM3711 転写翻訳産物を精製して、結合試験、競合試験を行った。

### 4. 研究成果

新たに開発した DNA ワクチン、YM3711、は既存ワクチンに比し、A $\beta$  産生能は 5-6 倍、細胞外放出能は 3-4 倍上昇していた。YM3711

投与により誘導される抗 A $\beta$  抗体価は既存ワクチンより有意に高く、また A $\beta$  亜種である A $\beta$  3(pE)-42 やアミロイド原性脳内蛋白である ABri 1(pE)-34、ADan 1(pE)-34 に対する抗体価でも YM3711 投与群が有意に高値を示した。モデルマウスの脳内に沈着した種々の A $\beta$  亜種の削減効果も認められた。

YM3711 ワクチンは A $\beta$  亜種やアミロイド原性脳蛋白など神経毒性を示す物質に幅広く対応することを目的として設計したが、充分その作用を有しており、現在前臨床試験が進行中である。

### 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)

(1) Tokita Y, Kaji K, Lu J, Okura Y, Kohyama K, Matsumoto Y. (2010) Assessment of non-viral A $\beta$  DNA vaccines on A $\beta$  reduction and safety in rhesus monkeys, J Alzheimer Dis, 22, 1351-1361 (査読あり)

(2) Okura, Y., Matsumoto, Y. (2009) Recent advance in immunotherapies for Alzheimer's disease, with special reference to DNA vaccination, Human Vaccine, 5, 3-10 (査読あり)

(3) 大倉良夫, 松本陽 (2009) Alzheimer 病のワクチン療法の現状, 医学の歩み, 229, 220-221 (査読なし)

(4) 大倉良夫, 松本陽 (2009) 「アルツハイマー病に対するワクチン療法」バイオ医薬の開発技術とシーズ 351-364 (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

松本陽, 時田偉子, 神山邦子, 大倉良夫, 老齡アカゲザルを用いたアルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの薬効と安全性試験, 第 21 回日本神経免疫学会学術集会, 大阪, (2009 年 3 月 15 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 良夫 (OKURA YOSIO)

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

(2) 研究分担者

松本 陽 (MATSUMOTO YOH)

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

神山 邦子 (KOHYAMA KUNIKO)

財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員

(3) 連携研究者