

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02807

研究課題名（和文）点鼻タウワクチンによる脳内免疫応答の解明とナノ粒子のベクター利用

研究課題名（英文）Immune response to intranasal tau vaccine in the brain and the use of nanoparticles as vectors

研究代表者

井上 治久（Inoue, Haruhisa）

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：70332327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルスワクチンベクターを投与したタウオパチーマウスの脳シングルセル解析を実施した。また、点鼻タウワクチンベクターへの利用に向けてナノ粒子を作製し、マウスへの投与を行い、その導入効率等の検討を行った。シングルセル解析データから遺伝子発現プロファイルに基づく細胞分類法によりミクログリア分画をさらに分類して解析を行ったところ、ウイルスワクチンベクターを投与したタウオパチーマウスでは抗炎症に関わる遺伝子群の発現上昇を呈するミクログリアが増加していることを見出した。結果として、ウイルスワクチンベクター投与により変化する細胞分画を同定し、ウイルスワクチンにより神経炎症が抑制される可能性がある結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウオパチーマウスにおいて、病態抑制効果を示した点鼻ワクチンの例はこれまでなく、そのワクチンの病態抑制効果の解明は学術的独自性を有する。さらに、グリア炎症は、病態悪化に寄与する面があるとされるが、本例ではワクチン投与初期に一過性のグリア炎症の上昇が見られ、通常の神経変性疾患に伴う慢性的なグリア炎症と、治療効果を有するグリア炎症それぞれの脳内免疫応答性の解明は学術的意義があると考えられる。超高齢社会における認知症の予防は重要な課題であり、高齢者数が増えていくことが想定されている状況下での、予防ワクチンの研究は創造性を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Brain single cell analysis was performed on tauopathic mice injected with viral vaccine vectors. In addition, nanoparticles were prepared for use in intranasal tau vaccine vectors, and they were administered to mice to examine their transduction efficiency, etc. The microglial fraction was further classified and analyzed by a cell classification method based on gene expression profiles from single-cell analysis data, and it was found that the number of microglia showing elevated expression of anti-inflammatory genes was increased in tauopathic mice treated with the viral vaccine vector. The results of this analysis showed that tauopathic mice treated with the viral vaccine vector exhibited increased microglia expression. As a result, they identified cell fractions that are altered by viral vaccine vector administration and it was concluded that viral vaccines may suppress neuroinflammation.

研究分野：病態神経科学

キーワード：タウワクチン 脳内免疫応答 ナノ粒子 シングルセル解析

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や前頭側頭型認知症をはじめとする高齢者の認知症は、今後、人口の超高齢化とともに増加の一途を辿ることが想定され、その対策は重要な課題となっている。その認知症の大多数において、タウタンパク質凝集体の蓄積が特徴的な病変として認められることから、タウタンパク質が蓄積する疾患は、タウオパチーと総称される。多くの研究から、認知症は、発症する前に予防することが重要であることがわかっており、これまで、タウオパチーモデルマウスにおいて、点鼻ワクチン投与によって脳内の抗タウ抗体価の上昇、タウタンパク質蓄積の減少、グリア炎症の改善、脳萎縮の改善、認知機能の改善が見られることを報告した(Takeuchi, et al. Nasal vaccine delivery attenuates brain pathology and cognitive impairment in tauopathy model mice, *npj Vaccines* 5, 28, 2020)。一方でリコンビナントタウタンパク質を用いたワクチン投与では、血中での抗タウ抗体価の上昇を認めしたが、その他の改善効果は全く認められなかった (unpublished data)。また、点鼻ワクチン投与によって、脳内のグリア炎症が早期に一過性に上昇する現象が見られることを見出した。

これまでの研究成果から、点鼻ワクチンでは、リコンビナントタンパク投与によるワクチンとは異なる機序が働いていると考えられるが、どのような機序で、どのような脳内免疫応答が生じているのかが不明である。また、点鼻ワクチンにより誘導された脳内グリア反応と、疾患による脳内グリア炎症それぞれの関連は不明である。

## 2. 研究の目的

タウオパチーモデルマウスにおいて、病態抑制効果を示した点鼻ワクチンの例はこれまでになく、そのワクチンの病態抑制効果の解明は学術的独自性を有する。さらに、グリア炎症は、病態悪化に寄与する面もあるとされるが、本例ではワクチン投与初期に一過性のグリア炎症の上昇が見られ、通常の神経変性疾患に伴う慢性的なグリア炎症と、治療効果を有するグリア炎症それぞれの脳内免疫応答性の解明は学術的意義があると考えられる。さらに、超高齢社会における認知症の予防は重要な課題であり、高齢者数が増えていくことが想定されている状況下での、予防ワクチンの研究は創造性を有すると考えられる。本研究では、タウオパチーに対する点鼻ワクチンによる免疫応答獲得のメカニズムおよび神経変性抑制の病態メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) 点鼻タウワクチンによる脳内免疫応答の解析

(a) シングルセル遺伝子発現解析による脳内免疫担当細胞のプロファイリング

3 か月齢のコントロールマウスおよびタウオパチーモデルマウスにワクチンの経鼻投与を行った。タウオパチーマウスとしてヒト変異タウ (P301S) を過剰発現する PS19 マウスを用いた(Yoshiyama et al., Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337-351, 2007)。ワクチンは、変異型タウタンパク質を細胞外に分泌するように設計した遺伝子治療用のセンダイウイルスベクターを使用する。センダイウイルスによる点鼻ワクチン投与を行ったマウス、ワクチン投与を行わなかったタウオパチーマウス、およびコントロールマウスにおいて、大脳のシングルセル

解析を行い、ワクチン投与早期および後期における脳内免疫担当細胞のプロファイリングを行う。シングルセル解析は、また、併せて病理組織学的検索による免疫担当細胞の脳内分布を検索し、ワクチンによる時間的・空間的免疫応答を解析する。

## 2) ナノ粒子の点鼻ワクチンへの利用

センダイウイルスによる遺伝子治療は臨床試験が実施されているが、長期的なウイルス遺伝子の発現による安全性は明らかではない。そこで、新たな送達技術として開発した an extracellular nanovesicle-based ribonucleoprotein delivery system (NanoMEDIC) (Gee et al., Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. Nature Communications, 11, 1334, 2020) を用いて点鼻ワクチンを行う。このシステムは細胞へ導入された RNA が一時的にのみ作用し、かつ高効率に目的タンパクを発現する。細胞内に取り込まれ、一過性に発現する送達技術で、細胞膜から放出されるナノサイズ(10 億分の 1 メートル)のカプセルであるウイルス様粒子 (VLP) を用いる方法である。形状はウイルスに似ているが、ウイルスゲノムを包含せず、発現は一過的で、安全性が高いと考えられる。

NanoMEDIC を用いたベクターの作製と発現確認のために、GFP を発現させる RNA を搭載した NanoMEDIC を作製する。293T 細胞に添加し、in vitro で GFP を発現することを確認する。

## 4. 研究成果

これまでに、タウオパチーマウスにタウワクチンを点鼻投与し、タウオパチーマウスの認知症関連表現型を改善することを報告してきた。このモデルマウスにおいて、ワクチン投与早期および後期にグリア細胞の変化を生じることを見出している。本研究では、ワクチン投与後に脳内でどのような免疫応答が生じているかを検討した。タウオパチーマウスとしてヒト変異タウタンパク質 (P301S) を過剰発現する PS19 マウスを用い、ワクチンは、分泌型ヒト変異タウタンパク質を発現するセンダイウイルスを用いた。3 か月齢のタウオパチーマウスおよびコントロールマウスにセンダイウイルスワクチンおよびコントロールワクチンを経鼻投与した。ウイルス投与 3 週間後に海馬を摘出し、シングルセル遺伝子発現解析を実施した。また、点鼻タウワクチンベクターへの利用に向けてナノ粒子を作製し、マウスへの投与を行い、その導入効率等の検討を行った。シングルセル遺伝子発現解析データから遺伝子発現プロファイルに基づく細胞分類法により、神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、マクロファージ、血管内皮細胞、上皮細胞等が分離された。各細胞種をさらに分画ごとに細分類して解析を行ったところ、ウイルスワクチンベクターを投与したタウオパチーマウスでは抗炎症に関わる遺伝子群の発現上昇を呈するミクログリアが増加していることを見出した。また、結果として、ウイルスワクチンにより神経炎症が抑制される可能性があると考えられた。

タウオパチーマウスにおいて、病態抑制効果を示した点鼻ワクチンはこれまでなく、そのワクチンの病態抑制効果の解明は学術的に重要である。グリア炎症は、病態悪化に寄与する面もあるとされるが、本例ではワクチン投与初期に一過性のグリア炎症の上昇が見られ、通常の神経変性疾患に伴う慢性的なグリア炎症と、治療効果を有するグリア炎症それぞれの脳内免疫応答性の解明は学術的意義があると考えられる。超高齢社会における認知症の予防は重要な課題であり、高齢者数が増えていくことが想定されている状況下での、予防ワクチンの研究は創造性を有し、タウオパチーに対する点鼻ワクチンによる免疫応答

獲得のメカニズムの解析と新規モダリティ導入によるワクチン療法の安全性の向上は、今後の認知症予防への貢献が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kondo T, Yada Y, Ikeuchi T, Inoue H	4. 巻 68(3)
2. 論文標題 CDiP technology for reverse engineering of sporadic Alzheimer 's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 231-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01047-8	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 Okuda S, Nakayama T, Uemura N, Hikawa R, Ikuno M, Yamakado H, Inoue H, Tachibana N, Hayashi Y, Takahashi R, Egawa N	4. 巻 23(21)
2. 論文標題 Striatal-Inoculation of $\alpha$ -Synuclein Preformed Fibrils Aggravated the Phenotypes of REM Sleep without Atonia in A53T BAC-SNCA Transgenic Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 13390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113390	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 Shirotani K, Watanabe K, Hatta D, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Kondo T, Inoue H, Iwata N	4. 巻 28(4)
2. 論文標題 Alterations of ATG4A and LC3B in neurons derived from Alzheimer 's disease patients. Genes to Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 319-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13010	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 近藤孝之, 井上治久	4. 巻 -
2. 論文標題 iPS細胞を用いたアルツハイマー病研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アルツハイマー病治療の新たなストラテジー	6. 最初と最後の頁 138-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 西下直希, 近藤孝之, 井上治久	4. 巻 100(5)
2. 論文標題 自動細胞製造技術委とiPS細胞の産業化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.5_252	査読の有無 無
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 菅三佳, 井上治久	4. 巻 80(12)
2. 論文標題 iPS細胞研究の新知見からの発展: 脳オルガノイドによるてんかんの病態研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 河野岳生, 近藤孝之, 井上治久	4. 巻 7
2. 論文標題 iPS細胞とAIによる神経変性疾患早期診断の展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NEURO LOGICA	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Homma H, Tanaka H, Jin M, Jin X, Huang Y, Yoshioka Y, Bertens JF C, Tsumaki K, Kondo K, Shiwaku H, Tagawa K, Akatsu H, Atsuta N, Katsuno M, Furukawa K, Ishiki A, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Yokota T, Inoue H, Arai H, Sobue G, Sone M, Fujita K, Okazawa H	4. 巻 4
2. 論文標題 DNA damage in embryonic neural stem cell determines FTLDs' fate via early-stage neuronal necrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101022	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 Suong D, Imamura K, Inoue I, Kabai R, Sakamoto S, Okumura T, Kato Y, Kondo T, Yada Y, Klein WL, Watanabe A, Inoue H	4. 巻 4
2. 論文標題 Induction of inverted morphology in brain organoids by vertical-mixing bioreactors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02719-5	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 Kondo T, Yamamoto T, Okayama K, Narumi H, Inoue H	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolites of soil microorganisms modulate amyloid production in Alzheimer ' s neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06513-z	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 Kondo T, Hara N, Koyama S, Yada Y, Tsukita K, Nagahashi A, Ikeuchi T, Ishii K, Asada T, Arai T, Yamada R, Japanese Alzheimer ' s Disease Neuroimaging Initiative (J-ADNI), Alzheimer ' s Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Inoue H	4. 巻 2
2. 論文標題 Dissection of the polygenic architecture of neuronal A production using a large sample of individual iPSC lines derived from Alzheimer ' s disease patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 125-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-021-00158-9	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 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 ALSに対するiPS創薬の展望
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 ALSに対する集学的治療のためのiPS細胞研究
3. 学会等名 第2回神経再生医療と機能回復治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 デジタル技術とiPS細胞による脳神経疾患基盤研究
3. 学会等名 OYC バイオシンポジウム 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 iPSコホートとcell GWASによる孤発性アルツハイマー病の研究
3. 学会等名 第11回日本認知症予防学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 cell GWASによる孤発性アルツハイマー病の分子病態研究
3. 学会等名 第9回 日本アミロイドーシス学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 iPSコホートデータを駆使したアルツハイマー病の研究
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 デジタル技術 X iPSデータによる神経変性研究
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会 第37回日本老年精神医学会合同開催 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue H
2. 発表標題 Basic and clinical research for neurodegenerative diseases by using iPSC technology
3. 学会等名 The Nineteenth Conference of Peace through Mind/Brain Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Morita S, Kondo T, Tokuda H, Kaneda Y, Rogi T, Izumo T, Nakai M, Inoue H
2. 発表標題 Docosahexaenoic acid and arachidonic acid promote synchronized neuronal activity (Poster)
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Konodo T, YadaY, Ikeuchi T, Inoue H
2. 発表標題 Cellular dissection of polygenicity (CDiP) uncover the polygenic architecture of neuropathology based on a large sample of individual iPSC lines derived from Alzheimer 's disease patients (Poster).
3. 学会等名 Cell Symposia: Advances in Therapeutic Applications of Stem Cells (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Imamura K, Yada Y, Nagahashi A, Inoue H
2. 発表標題 Development of diagnostic models for neurological diseases using stem cells and Deep Neural Network ~ Deep Learning with iPSC-based scanning (Deep iScan) ~ (Poster)
3. 学会等名 Cell Symposia: Advances in Therapeutic Applications of Stem Cells (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruhisa Inoue
2. 発表標題 Drug discovery for neurodegenerative disorders using disease-specific iPSCs, Symposium 02 Novel therapeutic approach for neurological disorders using stem cell technology
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 iPS細胞を用いた脳神経疾患の研究
3. 学会等名 第159回山口県医師会生涯研修セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 リプログラミング技術を用いた脳神経疾患研究
3. 学会等名 第4回クリニカルニューロサイエンス in 愛媛 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 アルツハイマー病の基礎研究の進歩 ~ iPS細胞研究を中心に ~
3. 学会等名 第10回認知症予防学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 ヒト幹細胞を用いた脳神経疾患の研究
3. 学会等名 第4回曙橋神経懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 リプログラミング技術を用いた神経難病の研究
3. 学会等名 第1回MBTコンソーシアム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 認知症のiPS細胞研究のお話
3. 学会等名 日本認知症予防学会 第9回米子研修会ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 認知症のゲノム医療 iPS細胞研究から認知症ゲノム医療へ
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上治久
2. 発表標題 リプログラミング技術を用いた認知症研究
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 井上治久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 一般社団法人山口県医師会	5. 総ページ数 -
3. 書名 山口県医師会会報	

1. 著者名 坂野晴彦、奥宮太郎、井上治久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本工業出版(株)	5. 総ページ数 -
3. 書名 クリーンテクノロジー31(10)	

1. 著者名 奥宮太郎、坂野晴彦、井上治久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社ワールドプランニング	5. 総ページ数 -
3. 書名 老年精神医学雑誌32(11)	

1. 著者名 坂野晴彦、井上治久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ライフ・サイエンス	5. 総ページ数 -
3. 書名 Geriatric Medicine(老年医学)59(12)	

〔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	佐原 成彦  (Sahara Naruhiko)  (40261185)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究 所 脳機能イメージング研究部・上席研究員   (82502)	
研究分担者	渡辺 亮  (Watanabe Akira)  (60506765)	京都大学・医学研究科・特定准教授   (14301)	

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