

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591283

研究課題名(和文)アルツハイマー病の治療効果を高めるアミロイド・タウ連結ワクチン開発の新技术

研究課題名(英文)Generation of new DNA vaccine plasmid for the therapy of Alzheimer's disease

研究代表者

神山 邦子(KOHYAMA, Kuniko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・基盤技術研究職員

研究者番号：80301795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の進行と深い関わりを持つ脳内A β 、tauを削減することが、本疾患の治療に効果的と考えられる。本研究では、tau単独、及びA β ・tau同時標的DNAワクチンを作製し、A β ・tau・プレセネリン1がヒトアルツハイマー型変異遺伝子に置換されたトリプルトランスジェニックマウスを用い、生体投与試験を行った。その結果、マウス血漿中の抗tau、抗A β 抗体価上昇と共に、脳内tau、A β 蛋白の減少が観察された。即ち、本ワクチンが抗tau、抗A β 抗体の産生を促し、これらが脳内に蓄積しつつあるtau、A β を削減して疾患の進行を抑制する可能性が示唆された。本ワクチンは臨床開発に向け特許出願中である。

研究成果の概要(英文)：Reducing Amyloid (A β) protein and tau protein in the brain, which are closely related with Alzheimer's disease, is supposed to be effective to suppress the disease. In this study, we generated two types of DNA vaccines targeting tau or A β plus tau. We administrated them to the triple transgenic mice having three mutations (amyloid precursor protein, tau and presenilin 1) associated with familial Alzheimer's disease (B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/Mmjax). As a result, anti-tau antibody was elevated in the tau vaccine-received mouse sera and anti-tau plus anti-A β antibodies were elevated in A β ・tau vaccine-received ones. In addition, we observed the reduction of the amount of tau and A β proteins in the mouse brains. The results suggested that these vaccines were useful to suppress Alzheimer's disease. They are patent-pending.

研究分野：神経免疫学

キーワード：アルツハイマー病治療 DNAワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー型認知症を免疫療法により治療する試みとして、1999-2002年に実施された AN1792 (アミロイドβペプチド (Aβ1-42) と免疫増感剤 QS21 を混合して作製されたワクチン) の臨床試験は、6%の患者に脳炎が発生したため中断されたが、その後のフォローアップによりアミロイドβ (Aβ) 削減効果があることが示された。

(2) 我々は安全な免疫療法の確立を目指し、非ウイルス性 Aβ-DNA ワクチン (YM3711、特許出願中) を開発した。本ワクチンは、アルツハイマー病モデルマウスへの投与において十分な安全性と抗 Aβ 抗体価の上昇、それに伴う脳内 Aβ 沈着の軽減効果があることを報告した (PNAS, 2006)。更に、DNA ワクチンの作用機序を明らかにし (J Neuropath Exp Neurol, 2008)、よりヒトに近い老齢サルに投与した場合も、有効に Aβ 沈着を削減できることを示した (J Alzheimer Dis, 2010)。

(3) 近年、Aβ 沈着を削減する治療だけでは、認知症そのものの抑制効果は低いことが指摘されている (Lancet, 2008)。一因として、ある程度進行したアルツハイマー病患者の脳では、tau 蛋白の変化 (異常リン酸化) も引き起こされていることが挙げられる。認知障害を軽減するためにはこの問題も同時に解決する必要があると考えられる。

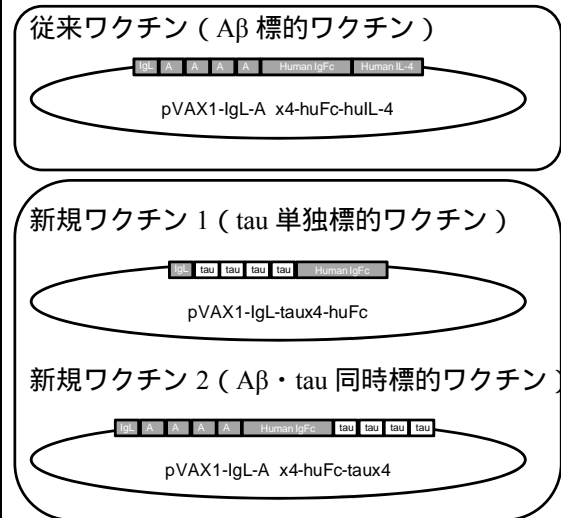
2. 研究の目的

(1) アルツハイマー型認知症治療のためには、Aβ と tau の両分子を削減する治療が重要である。そこで本研究では、これまでに我々が作製した Aβ 標的 DNA ワクチンとの同時投与を可能にする tau 標的 DNA ワクチンを、前者ワクチンと同一のプラスミド骨格、同様の手法にて作製することとした。

(2) 一方、これまでの DNA ワクチン作製の経験から、我々は複数の蛋白を同時に発現させるワクチンの作製技術を有している。一つの薬剤で2種の分子を標的にできれば、将来的な認可の取得や、用法・用量の検討、服用時の負担、或いは経済的にも有益性が高い。そこで、tau 単独標的 DNA ワクチンと並行し、初の試みとなる Aβ・tau 同時標的 DNA ワクチンの開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) Aβ、tau における疾患関連配列を、ワクチン効果を高めるためそれぞれ4回繰り返し配列に加工し、tau 単独、又は tau-Aβ 融合遺伝子として、以前作製した Aβ 標的ワクチンと同じ非ウイルス性ベクターに組み込み、プラスミド DNA を作製した。組換え大腸菌を大量培養ならびに精製し、各種試験のため十分なワクチンプラスミドを得た。



(2) 作製した tau 単独標的ワクチン及び Aβ・tau 同時標的ワクチンによる蛋白発現・分泌能を評価するため、培養細胞にこれらのワクチンプラスミドをトランスフェクトし培養後、上清に含まれる tau 蛋白及び Aβ 蛋白を ELISA 法又は western blotting 法にて解析した。

(3) Aβ・tau・プレセニン 1 (PS1) の三遺伝子がヒトアルツハイマー型変異遺伝子に置換されたトリプルトランスジェニックマウス (B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/Mmjax; プリーダーより購入)、又は一部対照として野生型 C57BL/6 マウスを用い、本ワクチンの生体投与試験を実施した。投与方法を検討するにあたり、第一選択として、過去に我々が報告した Aβ 標的ワクチンによるアルツハイマー病モデルマウスの治療 (PNAS, 2006 及び J Neuropath Exp Neurol, 2008) において有効性を認めたプロトコール (隔週にてマウス後肢への筋注を6回行い、経時的に採血すると共に、最終投与から2週後に sacrifice し血漿と脳組織を摘出) を採用した。

(4) tau 単独標的ワクチン及び Aβ・tau 同時標的ワクチンの生体内における抗体産生誘導能を評価するため、これらを投与したマウス血漿を用い、ELISA 法による解析を行った。Aβ 蛋白又は tau 蛋白を抗原として ELISA プレートにコーティングし、経時採血したマウスの血漿を段階希釈して反応させた。ワクチン投与後血漿の測定値を投与前血漿に対する比として算出し、抗体上昇率を解析した。

(5) 脳組織切片を用いた免疫組織化学的検出では、特に tau の定量的解析が困難であったため、評価法の検討が必要であった。我々は、凍結脳の一定部位を切り出して蛋白を抽出し、ELISA キットにより Aβ、tau、リン酸化 tau の各蛋白量を定量し比較する方法を採用した。高不溶性のこれらの蛋白を、強変性剤を添加した緩衝液にて抽出し、検出分子それ

それに適切な使用抽出液量を検討し評価法を確立した。ワクチン投与及び非投与マウス脳のアβ、tau、リン酸化tauの各蛋白量を定量し、両群の比較から、本ワクチン投与による脳内アβ・tau削減効果を解析した。

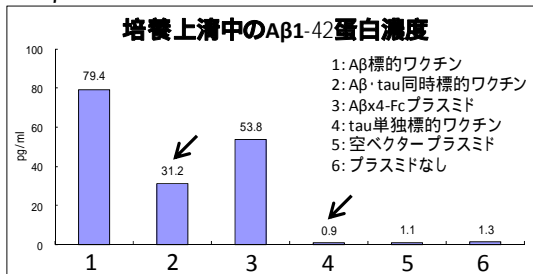
4. 研究成果

(1) ワクチンプラスミドの作製段階において、アβ、tau分子ともに繰り返し配列が自己会合を起こしやすく加工に困難を伴ったが、会合を防ぐための熱処理や、コンストラクト同士のライゲーション比の調整等の工夫により克服した。

(2) 完成したtau単独標的ワクチン及びアβ・tau同時標的ワクチンをそれぞれ培養細胞へトランスフェクトし、上清におけるtau蛋白又はtau-Aβ融合蛋白の発現を、ELISA法又はwestern blotting法により解析した。その結果、いずれのワクチンプラスミドも、可溶性の目的蛋白分泌能を有することが示された。

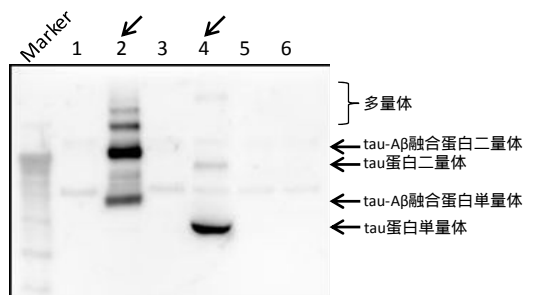
<ELISA法による蛋白発現解析>

・アβ1-42測定キットにて定量

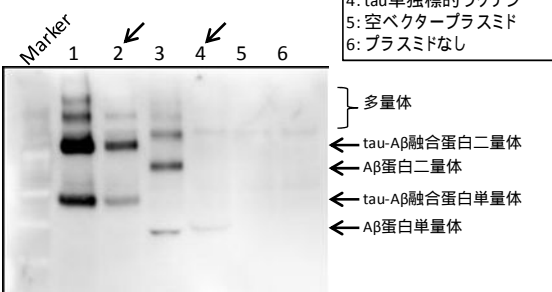


<western blotting法による蛋白発現解析>

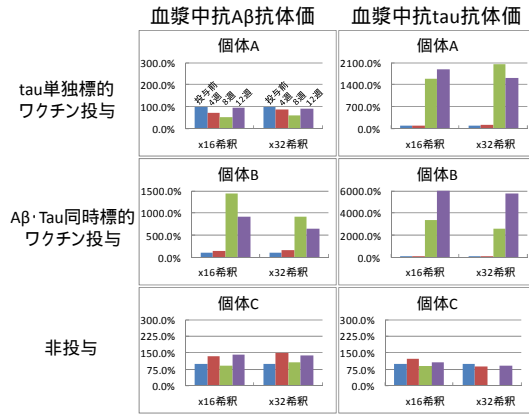
A. 抗tau抗体で検出



B. 抗アβ抗体で検出

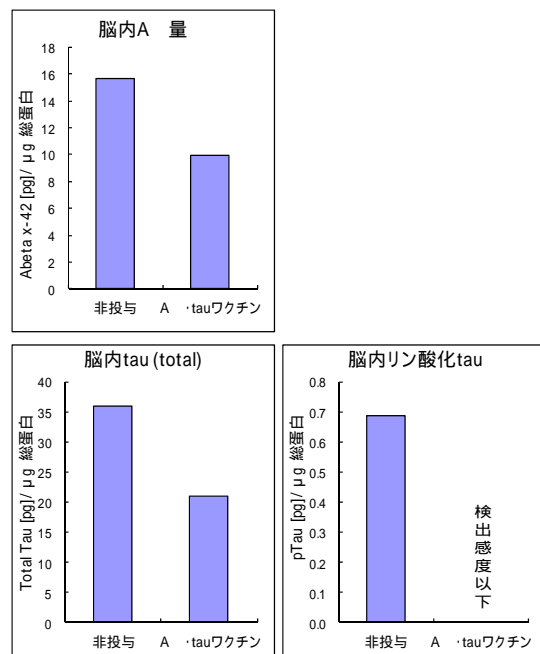


(3) tau単独標的ワクチン又はアβ・tau同時標的ワクチンの各投与群において、血漿中の抗tau抗体価、又は抗アβ、抗tau抗体価の著明な上昇が認められた。経時的解析の結果、本ワクチンはマウスにおいて投与開始4-8週から抗体産生を促し、8-12週においてこれを著しく上昇させることが明らかとなった。又、トランスジェニックマウスと野生型マウスに対し、同様の抗体産生誘導能を示した。



(4) Aβ・tau・PS1トランスジェニックマウスは、6-7ヶ月齢から脳内にアβや異常リン酸化tauが沈着し、老人斑と神経原線維変化を伴うアルツハイマー病様組織像を呈する。この脳内アβ及びtau沈着量の変化を、ELISAキットによる脳抽出液中の蛋白定量により検討した。研究期間内に解析を終えたAβ・tau同時標的ワクチン投与トランスジェニックマウス群では、アβ、tau、リン酸化tauのいずれも対照群（非投与群）に比して減少傾向が示された。即ち、本ワクチンは脳内に蓄積しつつあるアβ、tauを削減し、アルツハイマー病の進行を抑制し得る可能性が示唆された。

<ワクチン投与における脳内蛋白量の変化>



(5) これらの成果を踏まえ、本研究課題で開発した tau 単独標的ワクチン及び A β ・tau 同時標的ワクチンは、臨床開発に向け特許出願中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kohyama K, Matsumoto Y. (2015) Alzheimer's disease and immunotherapy: what is wrong with clinical trials? *ImmunoTargets and Therapy* 4; 27-34. 査読あり. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/ITT.S49923>

Matsumoto Y, Niimi N, Kohyama K. (2013) Development of a New DNA Vaccine for Alzheimer Disease Targeting a Wide Range of A β Species and Amyloidogenic Peptide. *PLoS One* 8 (9); e75203. 査読あり. DOI: [10.1371/journal.pone.0075203](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075203)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：アミロイド β 及びタウに対する DNA ワクチン

発明者：松本陽

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-207888

出願年月日：平成 27 年 10 月 22 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 邦子 (KOHYAMA, Kuniko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・基盤技術研究職員
研究者番号：80301795

(2) 研究分担者

新見 直子 (NIIMI, Naoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員
研究者番号：90405043

(削除: 平成 25 年 4 月 17 日)

松本 陽 (MATSUMOTO, Yoh)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員
研究者番号：90173921

(追加: 平成 25 年 4 月 17 日)