

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790902

研究課題名(和文)アルツハイマー病に対する新規ワクチンが誘導する抗体の同定

研究課題名(英文) Identification of the antibody induced by the new vaccine against Alzheimer's disease induces

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は未だ発症機序が不明で、根本的な治療法がないのが現状である。近年、ADの発症はアミロイド(A β)が凝集し、沈着することではなく、凝集過程のA β オリゴマーによるという考えが主流になってきている。また、ADは蛋白質の立体構造変化が引き起こす疾患であるという視点から、アミロイドの立体構造を標的とする治療が有効であると考えられている。本研究では開発中のA β DNAワクチンがA β オリゴマーに対する抗体産生を誘導し、A β オリゴマーを削減することを示した。このことから開発中のワクチンはAD治療薬の候補薬として有効であると評価した。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of Alzheimer's disease remain unknown. A recent study suggested that amyloid oligomer not the senile plaques formed by Ab cause strong synaptic injurious effects. In this study, we demonstrated that the anti-Ab oligomer antibody is potentiated and the Ab oligomer reduced by developing new DNA vaccines. This vaccines is worth examining in preclinical and clinical trials.

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：DNAワクチン 抗体特異性 アルツハイマー

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。認知症の代表的な疾患であるアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease, 以下 AD と略す) はいまだ発症原因が不明であり、根本的な治療薬が開発されていない。従来、AD の発症についてはアミロイド (Amyloid, A) と呼ばれる約 40 個のアミノ酸からなるペプチドが凝集し、大きな集合体を形成し不溶性の蛋白質として脳に沈着することで発症すると考えられていた。しかし近年、欧米での A ペプチドワクチン臨床試験に対する報告では (Holmes, Lancet, 2008)、ワクチンにより A 沈着の除去は行われたが、AD の進行を阻止できなかったと結論し、世界中を驚かせた。現在では、より早期の治療の重要性や AD の発症原因として A 沈着以外に Tau 蛋白質が関与する説や A 沈着前から存在する A の小さな集合体 (オリゴマー) による説が提唱されている。また、蛋白質の立体構造の変化が引き起こす疾患であるという説も提唱されている。

2. 研究の目的

研究室で開発中の非ウイルス性 A DNA ワクチンはすでに AD モデルマウスの脳内で A 沈着を削減することを示し (PNAS 2006)、臨床応用に向けた解析も進んでいる (J Neuropath Exp Neurol, 2008; J Alz Dis, 2010)。しかし、開発当時は A オリゴマー仮説が有力ではなく、蓄積された A の大きな集合体に対する抗体がワクチンにより産生され、その蓄積を削減することを目的としていた。近年オリゴマー原因説が有力になってきたことから、開発中のワクチンが A オリゴマーを対象とする抗体も産生していないか調べることにした。このワクチンは A が数回繰り返された配列と、A 複合蛋白質の細胞外放出促進と安定化のためにヒトイミューングロブリン Fc 領域配列、抗体産生増強のためにヒト IL-4 配列を持つ。そのためワクチンから発現する蛋白質は A オリゴマー様複合体である。したがって、A オリゴマーに対する抗体がこの DNA ワクチンにより産生される可能性が高い。

そこで本研究では、開発中の DNA ワクチンが抗 A オリゴマー抗体産生を誘導すること、脳内 A の削減効果があることを明らかにすることを目的とした。これにより、このワクチンが AD 治療の候補薬として有効であると評価することを目指す。

3. 研究の方法

開発中の非ウイルス性 DNA ワクチンが A

オリゴマーと似た立体構造をとる蛋白質を産生するか、また、生体へのワクチン投与により A オリゴマーに対する抗体価が増加するか、脳内 A オリゴマーの量が減少するかを調べた。

(1) リコンビナント A オリゴマー作製

A オリゴマーは生体内から立体構造を保った状態で高純度に精製することが非常に困難な上、A 単量体の合成ペプチドから作製するオリゴマーは安定性に問題がある。そこでリコンビナント A オリゴマー発現ベクターを作製し、大腸菌に蛋白を発現させ精製した。このベクターからの発現蛋白質は A 配列を数回繰り返した構造を持ち、発現後、安定なオリゴマー状態になると考えられる。HisTag 配列を含むよう設計してあるため、Ni-NTA レジン (金属親和性レジン) によって大量に精製する。

(2) DNA ワクチン産生 A 複合体蛋白質と A オリゴマーの立体構造の類似性検定

生体への DNA ワクチン投与により産生誘導される抗体が A オリゴマーを認識して抗原抗体反応を起こすのであれば、DNA ワクチンは A オリゴマーと似た立体構造を持つ蛋白質を産生していると考えられる。そこで、ワクチン投与された動物の血漿とリコンビナント A オリゴマーを用いてウエスタンブロット解析を行った。

(3) DNA ワクチン投与プロトコル

マウス

AD モデルマウスの一種である B6C3-Tg(APPswe, PSEN1dE9)85Dbo/J (A 遺伝子とプレセニン遺伝子のそれぞれに家族性アルツハイマー型変異を有するダブルトランスジェニックマウス) を用いた。DNA ワクチン 100 µg/匹を 8 ヶ月齢のマウスの両下肢筋肉内に、最初の 2 週間は週 2 回、以降 7 週まで週 1 回投与し、8 週目に血漿・脳を採取した。

ウサギ

DNA ワクチン 1 mg/羽を 12 週齢のウサギ (New Zealand White) の両下肢筋肉内に、週 1 回、5 週目まで投与し、6 週目に血漿・脳を採取した。

サル

DNA ワクチン 0.5mg/体重 kg を 3-4 才のカニクイザルの左肢大腿部に週 1 回、8 週間投与。10 週目に血漿を採取した。

(4) 抗体価の測定

DNA ワクチンを投与した生体（マウス、ウサギ、サル）から得られた血漿と、抗原として A₁₋₄₂（モノマー）、リコンビナント A オリゴマー、pEA₃₋₄₂（AD 患者の脳で検出されることの多いペプチド、アミノ基末端がポリグルタミン酸により修飾されている）、A fibril（A が繊維状に凝集したもの）、ABri（家族性英国型認知症で蓄積する A と別系統のアミロイドペプチド）を用いて抗原抗体反応量を定量的に調べられる ELISA やウエスタンブロットングを行った。

(5) 生体内オリゴマー量の測定

ワクチンを投与したマウス・サルの脳の組織切片を抗 A 抗体（6E10、6F/3D）で免疫染色して A が削減しているか観察する。また、同じくワクチン投与したマウスの脳抽出液中の A₁₋₄₂、A オリゴマー、pEA₃₋₄₂ の蛋白量を、各定量サンドイッチ ELISA により測定する。

4. 研究成果

(1) DNA ワクチン産生 A 複合体蛋白質と A オリゴマー立体構造の類似性

大腸菌にてリコンビナント A オリゴマーを発現・精製することができた。これを抗原としてサル血漿とウエスタンブロットングをしたところ、リコンビナント A オリゴマーを検出することが確認できた。また、A オリゴマーがさらに重合したのもも認識した。このことから、DNA ワクチンは A オリゴマーに似た立体構造を持つ蛋白質を産生し、A の凝集体の他に A オリゴマーを認識する抗体の産生も誘導していると考えられる。

(2) DNA ワクチンによる抗 A オリゴマー抗体価の増加

リコンビナント A オリゴマーを抗原として、ELISA によりワクチン投与前後のサル血漿中の抗体価を測定した結果、ワクチン投与後の血漿では A オリゴマーに対する抗体価が増加していた。

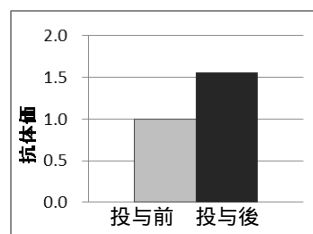


図1. ワクチンにより抗 A オリゴマー抗体が増加

(3) DNA ワクチンによる A オリゴマーの削減を検出

DNA ワクチン投与したマウスと未投与のマウスの脳組織切片を抗 A 抗体で染色したところ、DNA ワクチン投与により A が減少していることが観察された。さらにマウス・サルの脳抽出液中の様々な A 関連蛋白に関して定量サンドイッチ ELISA を行った。その結果、ワクチン投与により A₁₋₄₂、A オリゴマー、pEA₃₋₄₂ とともに蛋白量が減少していた。

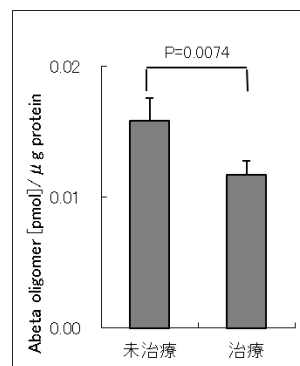


図2. ワクチンにより脳内 A オリゴマーは削減される

以上のことから DNA ワクチン産生 A 複合体蛋白質は A オリゴマーと似た立体構造をもつことを明らかにした。また、DNA ワクチンは A オリゴマーに対する抗体の産生を誘導し、これにより脳内 A オリゴマーを削減することが示唆された。これらのことから開発中の DNA ワクチンは AD 治療の候補薬として有効であると考えられる。

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1件)

Yoh Matsumoto, Naoko Niimi, Kuniko Kohyama
Development of a new DNA vaccine for Alzheimer disease targeting a wide range of a species and amyloidogenic peptides.

PLoS One, 査読あり、8(9):e75203, 2013,
doi: 10.1371

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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