

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670415

研究課題名(和文)中和抗体定説への挑戦：画期的A オリゴマー標的ワクチン開発

研究課題名(英文)Challenge for neutralizing antibody theory: Vaccine development specific to Abeta oligomers

研究代表者

松原 悦朗(Etsuro, Matsubara)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70219468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：A オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー病における記憶障害発症の分子基盤であり、創薬の標的分子と考えられている。本研究ではこれまで未開発のA オリゴマーのみを標的としたワクチン(抗イデオタイプワクチン)を開発することで、抗体医療の最大の弱点とされる従来の中和抗体定説に挑戦した。しかし、中和抗体取得には成功したが、抗イデオタイプ抗体での免疫マウス血液中への抗体誘導が困難であった。今回の検討では、抗体療法で問題となる中和抗体生じても、自然免疫依存の生体内でワクチン的な効能を発揮する環境に至る可能性は極めて低いと考えられた。改めて、抗イデオタイプワクチン設計が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that A oligomers are synaptotoxic and molecular basis of memory loss, which is candidate molecules for drug development in Alzheimer's disease. We aimed to develop a novel vaccine targeting A oligomers alone to assess if the appearance of neutralizing antibody against parent one is really problematic or not from therapeutic point of view. It was easy to make neutralizing antibodies. However, when anti-ideotype antibodies themselves were directly immunized to mouse pad, we can hardly detect anti-ideotypic antibodies in blood obtained from immunized mice, suggesting that we need to design something like anti-ideotype vaccine to retrieve of in vivo action.

研究分野：神経内科学

キーワード：ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

生理的に産生された amyloid (A) 分子の立体構造変化の結果形成される A オリゴマーがアルツハイマー型認知症のシナプス障害・認知機能障害を引き起こす直接原因で治療標的であると考えられている(A オリゴマーカスケード仮説)。申請者等はアルツハイマー型認知症モデルマウス脳内の神経細胞内外 A オリゴマー蓄積抑制とシナプス・スフィン蛋白保護効果、記憶障害発症予防効果を有し先制医療にも応用可能なモノクローナル抗体(日本特願 2008-201058, 米国特願 12/533,294 & 12/533,348, Mol Neurodegener 2011)と、記憶障害回復と神経原線維変化形成阻止を可能とする根本的治療用抗体(日本特願 2008-201058, 米国特願 12/533,294 & 12/533,348, Life Sci 2012)開発に成功した。しかしながら、抗体は高コストで先制医療へのその使用は非現実的であり、予防を念頭に置いたワクチンによる根本的先制医療構築が必須である。

## 2. 研究の目的

A オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー病における記憶障害発症の分子基盤であり、創薬の標的分子と考えられている。本研究ではこれまで未開発の A オリゴマーのみを標的としたワクチン(抗イデオタイプワクチンとその CDR 領域で設計された DNA ワクチン)を開発することで、抗体医療の最大の弱点とされる従来の中和抗体定説に挑戦する。アルツハイマー病における根本的な先制医療と治療薬としての有用性を前臨床試験で実証し、抗体医療自体が根本的ワクチン治療へと変貌しうるとの、新たな治療概念を提唱・確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 72D9 抗イデオタイプ抗体作製

抗 A 重合体特異的抗体(日本特願

2008-201058, 米国特願 12/533,294 & 12/533,348)作製法に準じて、完全フロイントアジュバントにより乳化させた抗 A オリゴマー特異的抗体(72D9, IgG2b, 100 µg)を BALB/c マウスに免疫処置する。続いて 4 回の追加免疫を行った後、鼠経リンパ節を用いて、ポリエチレングリコール 1500 を用いた Sp2/O-Ag14 黒色腫細胞との融合によりハイブリドーマを作製する。抗 A 重合体特異的抗体(72D9)を固相化した ELISA や dot-blot 法を用いて、固相化免疫抗原に特異的に結合する抗イデオタイプ抗体ハイブリドーマを選択する。プロテイン A もしくは G 精製免疫グロブリンのアイソタイプ判定は Serotec (Oxford, UK) マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キットを用いて行う。

同様の検討を IgG2b (123HY)で免疫寛容誘導したマウスでも施行した。

### 72D9 抗体中和活性スクリーニング

A オリゴマーを SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞に添加し、その細胞毒性の検証を LDH assay や Live/dead assay にて評価する実験系で、72D9 による神経毒性抑制効果を中和しうる抗イデオタイプ抗体をスクリーニングする。

## 4. 研究成果

### 72D9 抗イデオタイプ抗体取得

免疫マウスの血液中から抗イデオタイプ抗体を同定することはできなかった。

細胞融合後の親抗体への陽性反応で抗イデオタイプ抗体の存在が明らかとなった。免疫寛容非誘導マウスと免疫寛容誘導マウスでの抗イデオタイプ抗体取得率に優劣は認められなかった。

免疫寛容非誘導マウス：72D9 抗体への ELISA プレート陽性率は、スクリーニングでは 44/3936(1.1%)、クローニング施行時

は 12/4032(0.3%)であった。

免疫寛容誘導マウス：72D9 抗体への ELISA プレート陽性率は、スクリーニングでは 15/2976(0.5%)、クローニング施行時は 8/4032(0.2%)であった

取得クローン中のアイソタイプ評価の結果、ほとんどが IgG3 (77.8%)であり、IgG3 (11.1%)と IgG2a (11.1%)がマイナータイプとして認められた。

A オリゴマーの抗原構造を内在すると考えられる抗イデオタイプ抗体自身には、H-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞に添加しても毒性は認められなかった。

A オリゴマーを SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫細胞に添加すると、その細胞毒性が LDH assay で確認された。この系に 72D9 抗体を添加しておくとその毒性は見事に中和された。

さらに、取得した抗イデオタイプ抗体を添加すると、その抗毒性が中和され、A オリゴマーの毒性が復活した。抗イデオタイプ抗体自身には毒性がないことが確認できており、この毒性復活は親抗体抗イデオタイプ抗体反応に依存していると考えられた。

## 課題

今回の検討では、抗体療法で問題となる中和抗体生じて、自然免疫依存の生体内でワクチン的な効能を発揮する環境に至る可能性は極めて低いと考えられた。改めて、抗イデオタイプワクチンやその CDR 領域で設計された DNA ワクチン設計が必要と考えられた。

## 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. Haji M, Kimura N, Hanaoka H, Aso Y, Takemaru M, Hirano T, Matsubara E.

Evaluation of regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease patients with subclinical hypothyroidism. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 査読有, 39(5-6):360-367, 2015. DOI:1159/000375298

2. Amano Y, Kimura N, Hanaoka T, Aso Y, Takemaru M, Hirano T, Murai H, Satoh K, Matsubara E. Creutzfeldt-Jakob disease with a prion protein gene codon 180 mutation presenting striking asymmetric abnormalities on magnetic resonance imaging. *Prion*. 査読有, 9(1):29-33, 2015. DOI:10.1080/19336896.2015.1017703
3. Hirakawa H, Terao T, Ninomiya T, Amano Y, Aso Y, Matsubara E. The effects of carbamazepine and lithium combination on serious aggression and anger outbursts in a case of seronegative limbic encephalitis. The primary care companion for CNS disorders. 査読有, In press.
4. Pappolla M, Sambamurti K, Vidal R, Pacheco-Quinto J, Poeggeler B, Matsubara E. Evidence for lymphatic A clearance in Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 査読有, 71C:215-219, 2014. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.07.012
5. Miyashita A, Wen Y, Kitamura N, Matsubara E., Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Furukawa K, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Imagawa M, Hamaguchi T,

- Yamada M, Morihara T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Yamaguchi H, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R: Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis.* 査読有, 41(4):1031-1038, 2014. DOI: 10.3233/JAD-140225
6. Matsubara E, Takamura A, Okamoto Y, Oono H, Nakata T, Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Shoji M. Disease modifying therapies for Alzheimer's disease targeting A oligomers: implications for therapeutic mechanisms. *Biomed Res Int.* 査読有, 2013;2013:984041. DOI: 10.1155/2013/984041.
7. Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim JW, Ki CS, Won HH, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I; Alzheimer Disease Genetics Consortium,

St George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One.* 査読有, 2013;8(4):e58618. DOI: 10.1371/annotation/fcb56ea7-d32a-4e45-818d-39cef330c731

〔学会発表〕(計1件)

シンポジウム

1. 松原悦朗 「予防的創薬の現状」第26回日本脳循環代謝学会総会 平成26年11月22日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

〔図書〕(計1件)

1. 松原悦朗 第4章 治療とケア 経過・予後、アルツハイマー型認知症 改訂第2版 田平武編、最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC22 pp177-183, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原悦朗(Matsubara, Etsuro)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 70219468

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし