

令和元年6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09232

研究課題名(和文) 脳血管認知症ラット白質障害とワクチン療法：アミロイド 代謝異常に注目して

研究課題名(英文) Therapeutic vaccine for white matter lesion and amyloid in vascular dementia model in rat;

研究代表者

若山 幸示 (Wakayama, Kouji)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50349263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管性認知症の新規治療の確立を目指しラットモデルを用いAngiotensin II ペプチドワクチンの脳白質障害保護作用を明らかにするとともに作用機序としてアミロイド代謝異常の関連性について検討した。ワクチン接種群では生食投与対照群と比べ脳白質での炎症や脱髄変化が抑制され、認知機能の改善もみられたが、最長観察期間である56日目の両群の比較でアミロイド代謝関連遺伝子発現に差はみられなかった。オリゴデンドロサイトの分化に注目して研究を進めワクチン治療群ではCREBリン酸化、オリゴデンドロサイトの分化促進がみられ、脳血管内皮障害軽減、FGF2発現増加が脳白質病変の修復に作用すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己抗原を標的としたワクチン治療は慢性疾患に対する新たな治療手段として注目されている。認知症のワクチン治療としてはアミロイドを標的としたアルツハイマー病のワクチン療法が有名であるが、脳炎の合併という重大な副作用が生じたことで開発が滞った。Angiotensin IIを標的としたワクチン療法は高血圧ワクチン療法として実用化を目指しすでに治験が進行中であることから安全性の高い治療手段と考えられる。我が国では認知症の原因疾患としてアルツハイマー型認知症に次いで多い脳血管性認知症の安全かつ有効性の高い治療法の確立は重要な課題であり、本研究の進展は学術的のみならず社会的にもその意義は大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of Angiotensin II (Ang II) peptide vaccine against vascular dementia (VD) using 2 vessel occlusion (2VO) rat which is the rat model of VD. We demonstrated that vaccinated rats presented reduced astrocytes and microglia and amelioration of oligodendrocytes depletion in the white matter lesion as well as improvement of cognitive deficit. We observed no difference in expression level of  $\beta$ -amyloid precursor protein gene and secretase-1 gene at a maximum observation period of 56 days, thus we tried to elucidate whether white matter protection induced by Ang II vaccination related to the differentiation of oligodendrocyte. Our findings suggested that the efficacy of Ang II vaccine was related with increased expression of endothelial FGF2 through endothelial protection by Ang II blockade. Endothelial FGF2 was considered to induce cAMP response element binding protein activation and the differentiation of the oligodendrocyte lineage cells.

研究分野：脳血管障害の基礎研究

キーワード：脳血管性認知症 ワクチン療法 Angiotensin II

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

**1. 研究開始当初の背景** 慢性脳低灌流は脳白質病変形成を促すが近年、脳血管認知症 (Vascular dementia, VD) とアルツハイマー病 (Alzheimer's dementia, AD) のオーバーラップが広く認識され、脳 A $\beta$  代謝異常を主徴とする AD での脳白質病変の併存が注目されている。また脳白質ホメオスタシスにおける白質細胞と脳血管内皮細胞のクロストークの重要性が認識されるようになり、Neurovascular Unit(NVU)から派生した oligovascular signaling<sup>1</sup> の概念も提唱されるようになった。近年、Angiotensin II (Ang II)を標的とした高血圧ワクチン療法<sup>2</sup>が試みられ注目されている。脳梗塞でも ACE 阻害薬(ACE-I)や Ang II 受容体拮抗薬 (ARB)での脳保護効果が報告され、われわれは Ang II ワクチンの急性期脳梗塞における脳保護効果につき検討し Ang II ワクチンの接種が抗酸化作用を介して神経保護的に作用、脳梗塞治療効果を有することをラット脳梗塞モデルをもちいた研究で報告した<sup>3</sup>。そこでわれわれは脳梗塞のみならず、認知症においても renin-angiotensin-system (RAS)の阻害が認知症リスクの低減に寄与するとの報告があること、さらに脳 RAS 活性化が脳異常 A $\beta$  の産生増加、クリアランス低下に作用するとも報告されていること、さらに VD の病態である慢性脳低灌流が AD でもみられ異常 A $\beta$  産生を促進させ、cerebral amyloid angiopathy (CAA)を悪化させる、など AD、VD の病態には共通プロセスの存在も考えられる。しかしながら脳 A $\beta$  代謝異常、脳白質病変の関連性と RAS 阻害療法に注目した研究はない。AD のワクチン療法としては A $\beta$  ワクチンが有名であるが、髄膜脳炎の発症という重大な副作用があり実用化には至っていない。一方で Ang II ワクチンはこれまでの検討で安全性も確認できていることから認知症に対するワクチン治療の開発を目指す観点からも本研究の意義は大きい。

**2. 研究の目的** 本研究では両側総頸動脈結紮術(2VO)による脳血管認知症動物モデルをもちい、脳白質保護や高次脳機能障害改善の観点から Ang II ワクチン療法の認知症治療法としての有効性を証明する。脳低灌流の病態におけるアミロイドへの影響にも注目し、脳血管性認知症の新規治療法としての Ang II ワクチンの作用機序解明を目指す。

### 3. 研究の方法

**Ang II ワクチン接種プロトコール** Wistar ラット (オス、6 週齢) をワクチン接種群、生理食塩水 (生食) 投与群の 2 群に分け 6, 8, 10 週齢の計 3 回、背部 4 か所に皮下注射 (10  $\mu$ g/200  $\mu$ L/回) を行った。初回投与は complete Freund's adjuvant を 2, 3 回目は incomplete Freund's adjuvant を Ang II-KLHg と等量混合乳化し接種した。生食群はワクチンと同容量を同タイミングで皮下注する(図 A)。

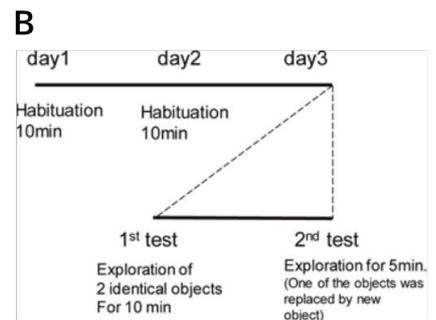
**脳血管認知症モデル作成** 3 回目のワクチン接種の 2 週間後、あるいは生食投与の 2 週間後、12 週齢の時点で両群ラットの 2VO を行い、脳血管認知症モデルを作成 (図 A)。シャム群は生食投与ラットの総頸動脈結紮以外を同様に施行

**血清 Ang II 抗体価の算出** 2VO の時点を 0 日目とし 14, 28 日目に採血、ELISA を行い血清 Ang II 抗体価 (OD50%) を算出した。さらに一部ラットでは長期抗体価追跡のため 56, 84, 112, 140, 168 日目の血清採取し ELISA を施行した(図 A)。

**血圧の測定** Ang II ワクチン接種による血圧への影響を調べるためワクチン群、生食群それぞれ 6, 8, 10, 12 週齢 (2VO 術前-42, -28, -14, 0 日) の時点の収縮期血圧と、2VO 術による血圧への影響とワクチン接種の関連を調べるため 16 週齢 (2VO 術後 28 日) の時点における各群の収縮期血圧をそれぞれ測定した (図 A)。



**新規物体認識試験** 術後 12,13 日目 (試験 day1,2) にケージの中に 10 分ずつ自由行動させ環境への慣らしを行い、術後 14 日 (試験 day3)、1<sup>st</sup> test で 2 個の同一形態の物体を置いたケージ内で 10 分間ラットを自由探索させた。2<sup>nd</sup> test では 1st test で学習した 2 個の物体のうち一つを別形態の物体 (新規物体) に置き換え 5 分間探索させた。新規物体探索の合計時間を N, 既存物体探索時間を F とし探索総時間 N+F, 識別指数  $(N-F)/(N+F)$  をそれぞれ求めた (図 B)。



**脳白質障害の評価** シャム、ワクチン、生食各群の 2VO14, 28 日の凍結切片を用いて脳梁における Iba1(マイクログリア), GFAP(アストロサイト), GST (成熟オリゴデンドロサイト), NG2(オリゴデンドロサイト前駆細胞)染色を行い定量比較した。

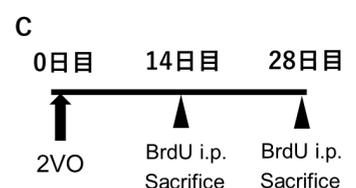
**脱髄性変化の評価** ワクチン群、生食群の 2VO14 日目の時点の脳パラフィン切片を用いた Kluver-Barrera 染色にて評価した。

**脳白質病変における RAS コンポーネントの定量** シャム群、2VO 7、14、28 日で各群の脳梁における RAS コンポーネントの発現を比較するため rtPCR により GAPDH を内在性コントロールとし ang II 1 型受容体(AT1R)、Angiotensinogen の発現を定量比較した。

**アミロイド 代謝異常の評価** 2VO 56 日の時点で脳梁におけるアミロイド 代謝異常を比較するため各群脳梁組織から RNA を抽出し rt PCR により GAPDH を内在性コントロールとし APP, BACE-1 の発現を比較した。

**脳血管内皮細胞障害の評価** 2VO 7 日の時点での各群の脳梁のホモネートを用い VCAM-1 ウエスタンブロッティングにて血管内皮障害を定量した。

**脳白質病変における増殖細胞の検討** 2VO 14、28 日目に各群ラットに 5-bromodeoxyuridine (BrdU, 50mg/kg)を 4 時間ごとに 3 回腹腔内投与を行い、最終投与後 1 時間以内に脳を摘出し凍結ブロックを作成した(図 C)。 BrdU 染色にて 2VO14、28 日の脳梁における陽性細胞を定量した。また各群の 2VO 14 日における BrdU 陽性細胞に占めるオリゴデンドロサイト系細胞の割合を定量するため BrdU/Olig2 免疫二重染色を行った。



**脳白質病変における増殖細胞の成熟オリゴデンドロサイトへの分化** 各群の 2VO 14 日の脳梁における増殖細胞の 2VO 28 日後に成熟オリゴデンドロサイトへ分化する割合を比較するため、2VO14 日に BrdU (50mg/kg)を 4 時間ごとに 3 回腹腔内投与し 2VO28 日に犠牲死させ、脳摘出を行った(図 D)。凍結切片を作成し BrdU/GST $\Pi$  免疫二重染色を行い、BrdU+GST $\Pi$ +細胞数を定量した。



**白質病変における CREB リン酸化の評価** オリゴデンドロサイトの分化促進に作用するリン酸

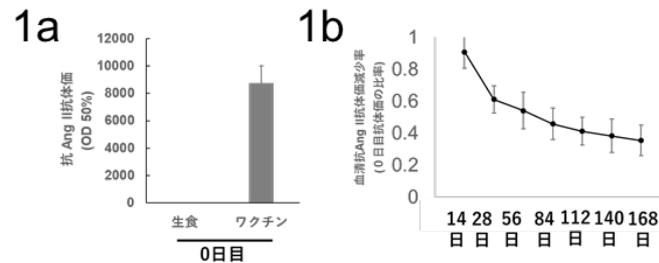
化 CREB 発現レベルを比較するため、各群の脳梁からタンパクを抽出、CREB/リン酸化 CREB の比率をウエスタンブロットにより定量した。また脳梁における CREB のリン酸化の生じているオリゴデンドロサイト系列細胞の割合を pCREB/Olig2 免疫二重染色により定量した。

**白質病変における FGF2 発現レベルの評価** FGF2 は脳白質病変の修復を促す栄養因子として知られるが rtPCR により各群脳梁における FGF2 発現レベルを比較した。

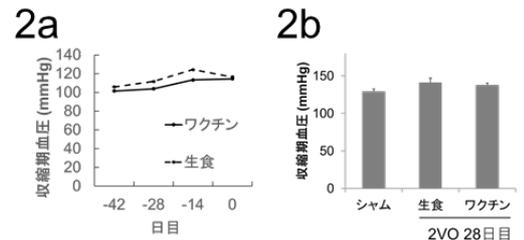
**bFGF 発現細胞の検討** 脳白質病変における FGF2 発現細胞の同定のため FGF2 と IB4 (血管内皮細胞), GFAP(アストロサイト), Olig2(オリゴデンドロサイト系列細胞), Iba1(マイクログリア) の免疫二重染色を行った。

#### 4. 研究成果

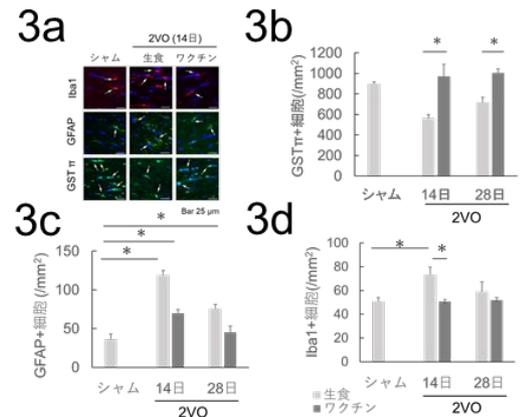
**Ang II ワクチンによる抗体産生** 0日(3回目のワクチンあるいは生食投与の2週間後)の時点における抗 Ang II 抗体価を ELISA にて検討したところ、ワクチン群では  $8752 \pm 1258$  (OD50%), 生食群 0 (OD50%) であり、ワクチン群で有意に抗体価上昇が認められた(図 1a)。また 168日の時点(3回目ワクチンあるいは生食投与2週間後の6か月後)での抗 Ang II 抗体価は0日の抗体価の  $31 \pm 9.5\%$ であった(図 1b)。



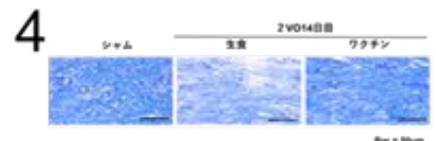
**Ang II ワクチンの血圧への影響** 各群のワクチンあるいは生食投与前(-42日)、2回目投与前(-28日)、3回目投与前(-14日)、3回目投与後2週目(0日)の時点の収縮期血圧の比較で両群に差は認めなかった(図 2a)。2V0 28日の時点での収縮期血圧についてもシャム、ワクチン投与2V0ラット、生食投与2V0ラットの各群間で差は認めなかった(図 2b)。



**Ang II ワクチンによる2V0ラット脳梁における脳白質保護作用** マイクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト細胞数をシャム群と比較。オリゴデンドロサイト(GST 陽性細胞)は2V0 14, 28日の時点で生食群に比しワクチン群でその減少が抑制されていた(図 3b)。2V0 28日の時点で生食投与ラットにみられたアストロサイト(GFAP 陽性細胞)の増加は、ワクチン投与ラットでは抑えられた(図 3c)。2V0 14日の時点で生食投与ラットではマイクログリア(Iba1 陽性細胞)は増加したが、ワクチン投与群では生食群に比し有意な減少が認められた(図 3d)。

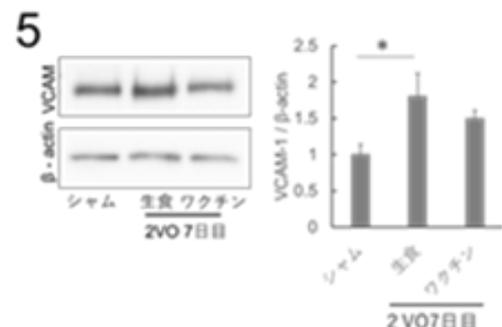


**Ang II ワクチンによる脱髄変化に及ぼす影響について** 2V0 14日の各群のパラフィン脳切片を用い Kluver-Barrera 染色で評価した。生食群でみられた脱髄変化はワクチン群では抑制されていた(図 4)。



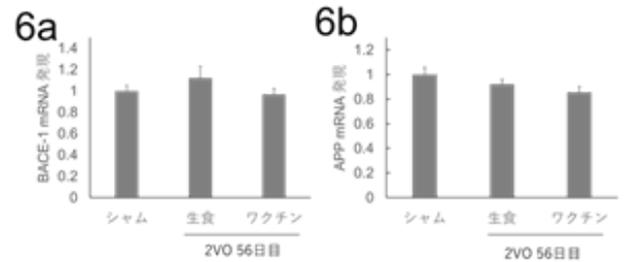
#### Ang II ワクチンによる脳血管内皮の保護作用

ウエスタンブロットングで各群の脳梁における VCAM-1 発現量を定量したところ、2V0 7日に、生食群でみられた VCAM-1 の発現増加がワクチン群では有意に抑制されていた(図 5)。

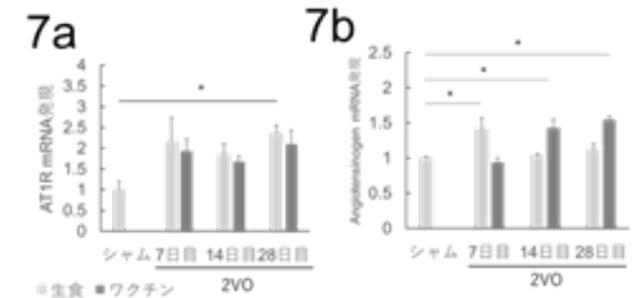


## 脳白質病変における アミロイド代謝について

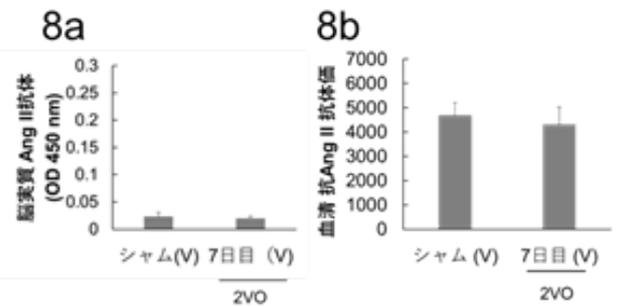
シャム群、2VO 術後 56 日の生食投与群、ワクチン投与群の 3 群の脳梁から抽出した RNA をもちい BACE-1, APP の遺伝子レベルでの発現を検討するため rtPCR を行ったが BACE-1, APP の発現レベルは 3 群間で有意差は認めなかった(図 6a,b)。



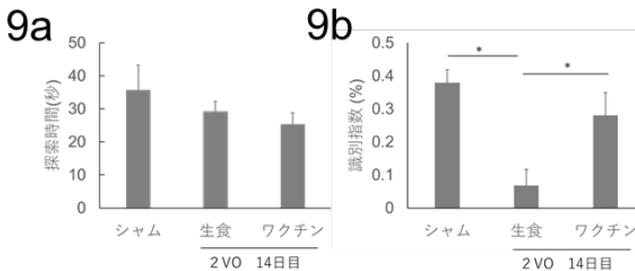
**ワクチン投与による脳白質病変における RAS コンポーネントの発現変化** AT1R はシャム群に比し 2VO 28 日の生食群でのみ増加を認め、ワクチン群では増加は抑えられた(図 7a)。Angiotensinogen はシャム群に比し、2VO 術後 7 日では生食群で発現増加、14, 28 日ではワクチン群で有意な増加を認めた(図 7b)。



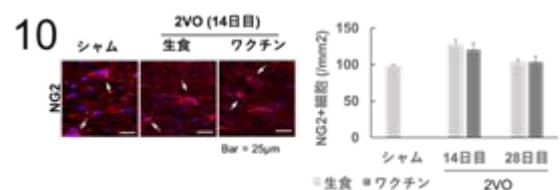
**2VO ラットにおける抗 Ang II 抗体の脳実質への抗体移行性の検討** 慢性脳低灌流による脳血液関門(BBB)の破綻が報告されているが、脳血管内皮細胞障害のみられた 2VO 7 日の時点で抗 Ang II 抗体が脳実質で増加しているかを ELISA にて検討した。シャム群と 2VO 7 日のワクチン接種ラットの脳実質中の OD450 値を測定した。2VO 7 日の血清 Ang II 抗体価、脳実質中の抗 AngII 抗体のレベルいずれも両群間に差は認めなかった(図 8a,b)。



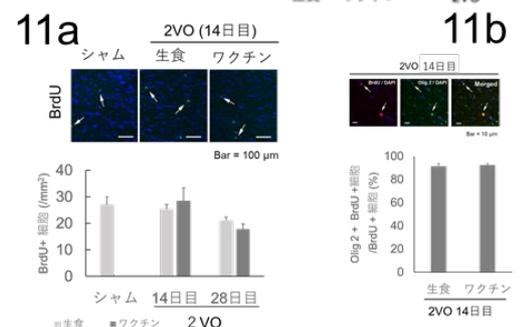
**2VO ラットにおける抗 Ang II 抗体による認知機能改善作用の検討** 2VO 14 日で新規物体認識試験を行った。シャム群、2VO 生食群、ワクチン群の 3 群で探索時間を比較したところ有意差はみとめなかった(図 9a)。識別指数は生食投与群では健常群に比べ低下したがワクチン群では健常群とは差を認めなかった(図 9b)。



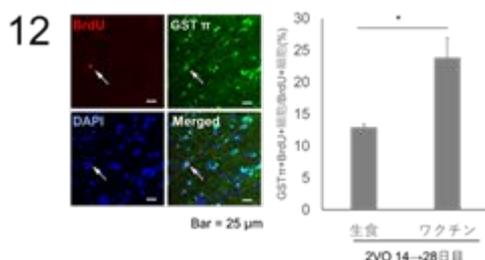
**脳白質病変におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)への影響** シャム、14 日、28 日の脳梁における NG2 陽性細胞の定量を行った。各群の NG2 陽性細胞数に差は認めなかった(図 10)。



**脳白質病変における増殖細胞** シャム群、術後 14, 28 日における脳梁での BrdU 陽性細胞数の経時変化を調べたが、経過を通して有意な増減は認めなかった(図 11a)。14 日の増殖細胞におけるオリゴデンドロサイト系列細胞の割合を両群で比較したが、両群間に有意差は認めなかった(図 11b)。

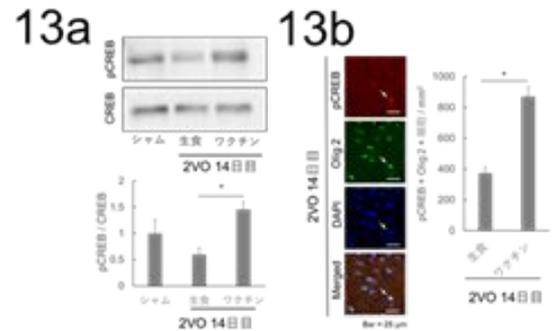


**脳白質病変におけるオリゴデンドロサイトの分化** 2VO14 日に

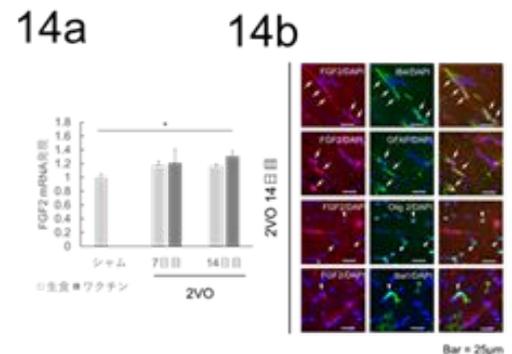


BrdU を投与した両群のラットの 28 日目の BrdU 陽性細胞における GST π 陽性細胞の割合を両群で定量した結果ワクチン投与群で有意な増加がみられた (図 12)。

**脳白質病変における CREB リン酸化の検討** オリゴデンドロサイト分化を促すリン酸化 CREB の発現に与えるワクチンの影響をしらべるためシャム群、2V014 日目の生食群、ワクチン群の脳梁タンパクをもちいてウエスタンブロットを施行した。生食投与群と比べワクチン治療群で有意に CREB リン酸化が亢進していた(図 13a)。また脳梁における 14 日目の pCREB/Olig2 とともに陽性である細胞数を比較したところ、ワクチン群で有意に増加していた(図 13b)。以上よりワクチンは CREB リン酸化を介し、オリゴデンドロサイト系列細胞の分化を促進すると考えられた。



**脳梁白質病変における FGF2 発現の変化** FGF2 発現レベルをシャム群あるいは生食群、ワクチン群の 2V0 7、14 日の脳梁を用いて検討した。rtPCR では 14 日目のワクチン群でシャム群に比較して FGF2 遺伝子発現レベルの増加を認め(図 14a)、FGF2 発現の局在をしらべるため免疫二重染色を行ったところ、FGF2 は IB4 陽性細胞、GFAP 陽性細胞と一致した(図 14b)。



**まとめ** 本申請課題では Ang II ワクチンの接種がラット脳血管認知症モデルにおける脳白質病変を改善し認知機能も改善することを明らかにした。当初の目的の AngII ワクチンが アミロイド代謝を介した脳白質保護、認知機能障害を改善するとの仮説は本研究の設定では対照群との差は認めなかったが、今後はアミロイド 過剰発現動物といった遺伝子改変動物を用いることも検討することが望ましい。本研究では Ang II ワクチンが 2V0 ラットでのオリゴデンドロサイト細胞への分化を促進することを示したが、その機序は Ang II ワクチンが 2V0 での慢性脳低灌流により生ずる脳血管内皮障害を抑制したこと Ang II ワクチンにより脳白質組織中の FGF2 産生が増加し、これは主として脳血管内皮細胞、アストロサイトで産生されていたが、FGF2 はオリゴデンドロサイト、血管内皮細胞の連関(Oligovascular Signaling)において代表的な因子であり、脳白質修復を促進することが報告されている。以上の知見から考察すると、AngII の阻害はこれまで報告されてきたように抗酸化作用などを介して血管内皮保護的に作用することから、Ang II ワクチン接種により脳血管内皮障害改善し、内皮からの FGF2 産生を増加させ、ターゲットであるオリゴデンドロサイト系列細胞において CREB シグナル経路を分化促進的に作用し脳白質障害を改善、さらには認知機能を改善したと考えられた。

引用文献

1. Miyamoto N et al. *Cell Mol Life Sci.* 71:1055,2014
2. Bachmann MF. *Lancet.* 2008, 8+371(9615):821-7
3. Wakayama K et al. *Stroke.* 2017;48:1362-1368.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

若山幸示 Therapeutic Application of Angiotensin II Vaccine in Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. 第 44 回日本脳卒中学会学術集会, 2019 年 3 月 21 日, 横浜

若山幸示 AngiotensinII Vaccine Attenuates White Matter Damage after Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. 第 57 回日本神経学会学術大, 2016 年 5 月 19 日, 神戸

6. 研究組織 (1)研究分担者 該当なし (2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。