

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02732

研究課題名(和文)生活習慣病とアルツハイマー病を同時に標的とする新規治療法の基盤構築

研究課題名(英文)Basic research for a new concurrent treatment against lifestyle diseases and Alzheimer disease.

研究代表者

山本 浩一 (Yamamoto, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00528424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアンジオテンシンII(AII)の1型受容体(AT1)が、アルツハイマー型認知症(AD)を促進するアミロイド(A β)の細胞反応を担うことを見出し、本研究では、AT1に対するワクチン療法がAD治療に有効かについて基礎的検討を行った。まず、3種類の抗AT1ワクチンがAIIによるマウスの血圧上昇反応を抑制することを確認した。また、抗AT1ワクチン投与後のマウス血清や精製した抗AT1抗体がA β の細胞内移行を抑制することを確認した。一方、高齢マウスに対して1種類の抗AT1ワクチンを投与し、6ヵ月後に認知機能を評価したところ、コントロールのワクチンに比べて認知機能の改善は明らかではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症(AD)の根本的治療薬(DMT)は未だに確立されておらず、研究の進展が望まれている。本研究は独自の研究結果に基づいて、アンジオテンシンII1型受容体(AT1)に対するワクチンがAD治療に有効であるか基礎的に検証する計画であった。研究成果からはアミロイド(A β)がADを促進する細胞反応を抗AT1ワクチンで産生される抗体が抑制する結果が得られたが、高齢マウスの認知機能の改善作用は認められなかった。本研究の過程でAT1に対する阻害療法がADを改善することを支持する研究成果が得られており、今後も継続的に検討を行うことでADのDMT開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on our findings that the type 1 receptor of angiotensin II (AII) (AT1), which regulates blood pressure, is responsible for the cellular response of amyloid- β (A β), which promotes Alzheimer's disease (AD), we conducted a basic study to investigate whether vaccine therapy against AT1 could be a disease-modifying-drug for AD. First, we confirmed that three anti-AT1 vaccines suppressed AII-induced hypertensive response in mice. We also confirmed that mouse serum after anti-AT1 vaccine administration or purified anti-AT1 antibody inhibited intracellular A β uptake. On the other hand, when one type of anti-AT1 vaccine was administered to aged mice and their cognitive function was evaluated 6 months later, there was no apparent improvement in cognitive function compared to the control vaccine.

研究分野：アルツハイマー型認知症

キーワード：認知症 アルツハイマー病 生活習慣病 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は認知症最大の原因疾患であり、AD に対する有効な治療手段の確立は国家戦略的にも重要な課題に位置づけられる。AD の発症病理は簡略的には脳内へのアミロイド (A β) の蓄積と続発する Tau の異常リン酸化に伴う神経原繊維変化であり、その病態形成過程を標的とした根本治療薬(Disease-modifying therapy, DMT) の開発が数多く試みられてきた。DMT を AD 治療に臨床応用する際の問題として、認知機能低下が顕在化する時点では神経細胞死を効果的に抑制できない点があり、バイオマーカーや画像診断による発症前診断の開発が進められている。一方、糖尿病や高血圧などの生活習慣病は認知症のリスク因子であることが多くの研究から明らかにされている。罹患率の高い生活習慣病への治療介入は全体の AD 発症リスクを軽減する点で寄与度が高いと考えられるが、生活習慣病治療薬がリスク因子改善効果だけでなく DMT としての性質を有していれば理想的である。申請者らはそのような生活習慣病治療薬の候補としてアンジオテンシン II(ANGII)1 型受容体(AT1)拮抗薬(ARB)に着目し検討を行ってきた。ARB 内服者では ACE 阻害薬を含めた他の降圧薬内服者に較べて AD や認知症発症が抑制される事を示唆する観察研究が剖検脳での検討も含めて近年報告されている(1)。基礎研究においては、認知症モデルマウスに対する ARB 投与が他の降圧薬にはない認知機能低下抑制効果を発揮する事が、研究分担者も含めた複数のグループから報告されている(2)。このように ARB は AD に対する DMT として機能する可能性があるが、従来の概念ではその機序の説明は困難であった。パターン認識受容体(PRR)の RAGE は脳血液関門(BBB)で脳毛細血管内皮細胞を介した血管から脳への A β の移行や、脳内での A β 細胞内蓄積を担うこと、神経細胞で細胞傷害性シグナル活性化を惹起する事で AD の進行に寄与する(3)。申請者らは RAGE が G 蛋白共役型受容体(GPCR)の AT1 と細胞膜上で複合体を形成し、A β を含む RAGE リガンドが AT1 を活性化させる機構がある事を見出しており(4)、それが ARB による AD 進展抑制を説明する機序である事を解明すべく検討を行ってきた。これまでに、RAGE リガンドによる G 蛋白依存性の細胞内シグナル活性化は ARB により抑制される結果を得ている。一方、申請者らは RAGE リガンドの細胞内移行が AT1 活性化時に生じる アレスチン依存性の AT1 細胞内移行に伴って起こる結果を得ているが、この現象は ARB で抑制されなかった。すなわち、ARB は RAGE による AD 進展機構のうち神経細胞のシグナル活性化による細胞傷害は抑制するが、血管から脳への A β の移行や、脳内での A β 細胞内蓄積は抑制しないことが示唆される。このような ARB の特異的な効果は、近年解明が進んでいる、GPCR の構造変化による選択的活性化で説明可能である。すなわち、ARB による AT1 構造変化阻害は RAGE リガンドによる G 蛋白依存性経路の活性化は抑制するが、アレスチン依存性の AT1 細胞内移行は抑制しないことが考えられる。一方、研究分担者らは生活習慣病を標的とした治療ワクチンの開発を行っており、内因性蛋白に対して自己免疫応答を来さずに抗体産生を主導する技術を確立している。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究結果を基に A β の RAGE 依存性細胞内移行を抑制する抗 AT1DNA ワクチンを開発し、モデルマウスを用いて AD に対する DMT としての有効性を検討する。

3. 研究の方法(申請時(研究期間中に修正した計画も含む))

(概要) 3 つの戦略に基づく計画を立案する。戦略 1 では抗 AT1DNA ワクチンを複数作成してマウスにおける抗体産生能や昇圧抑制能を評価する。戦略 2 では戦略 1 で選別した DNA ワクチンを投与したマウス血清から抽出した抗体を用いて A β の細胞内移行を抑制する抗 AT1 抗体をスクリーニングにより同定する。戦略 3 では戦略 2 で同定された抗 AT1DNA ワクチンが AD マウスの認知症発症抑制効果に優れる事を、ARB 等との比較により検証する。

(方法) 戦略 1: AT1 の細胞外領域をエピトープとする 3 種類のペプチド((16-25)-DDCPGRGRHS, (91-101)-EYRWPFGNHLC, (180-187)-CAFHYESR)をキャリア(KLH)とコンジュゲートしたペプチドワクチンを作成し 8 週齢の野生型マウス(各 n=6)に 2 週間毎に 3 回投与する。

投与後 2 週毎に血清を採取し抗体価を評価し、初回投与 8 週後に ANGII を腹腔内に持続注入し血圧変化をテレメトリー法により評価する。

戦略 2: 戦略 1 で抗体価の上昇や昇圧反応の抑制を惹起したワクチンを投与したマウスの血清から IgG 抗体分画を抽出し、誘導された抗 AT1 抗体の機能を評価する。

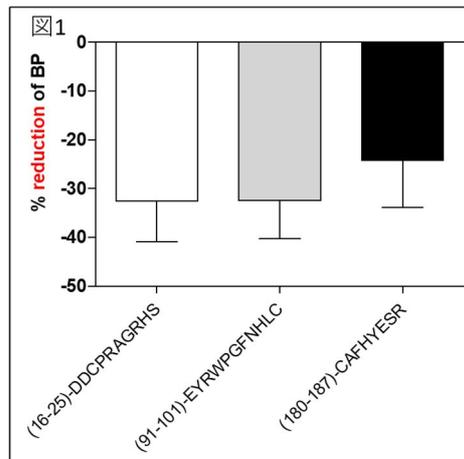
蛍光標識 A β を RAGE, AT1 単独発現 CHO 細胞、RAGE, AT1 共発現 CHO 細胞に投与する。蛍光標識 A β は RAGE, AT1 共発現 CHO 細胞にのみ取り込まれる事を予測するが、この現象を抑制する抗体を産生するワクチンを同定する。また Cos7 細胞に蛍光 tag 付きの AT1-GFP(緑)、RAGE-mCherry(赤)、Clathrin(AT1 細胞内移行に関与する蛋白)-BFP(青)ベクターを導入し、高解像 Spinning disk 顕微鏡(Olympus, SD-OSR)を用いて細胞膜面の観察を行い、リガンド刺激時の蛍光動態を live imaging により可視化する。これまでの予備実験により、RAGE リガンド刺激により 3 種類の蛍光が一体化(merge)し消失するイメージが得られる事が予測されるが、その現象を抑制する抗体を同定する。また、脳毛細血管内皮細胞や神経細胞への蛍光標識 A β 投与時の細胞内取り込みが同定した抗体を用いて抑制されるかについて検討を行う。また血液脳関門(BBB)in vitro 再構成系モデル(ファーマコセル社)を用いて A β の BBB 通過の抗体による抑制についても検討を行う。

戦略 3: 戦略 2 で同定した抗体を産生する抗 AT1 ワクチンを用いて行う。AD モデルマウスである脳神経特異的ヒト変異 APP 過剰発現マウス (APP23 マウス) と AT1 欠損 APP23 マウスと糖尿病発症 (db/db)APP23 マウスに対して 12 週齢時に抗 AT1 ワクチン、コントロールワクチン、媒介(ワクチンなし、ARB 投与群と非投与群に分ける)を投与する。12 週齢、24 週齢、48 週齢に認知機能検査と血圧測定を施行する。その後解剖し組織学的評価を行う。また既報に従い、放射性標識した A β を経静脈的にマウスに投与し、脳内への移行が ARB 投与マウスでは抑制されずワクチン投与マウスで抑制される事を確認する実験も計画する(5)。

4. 研究成果

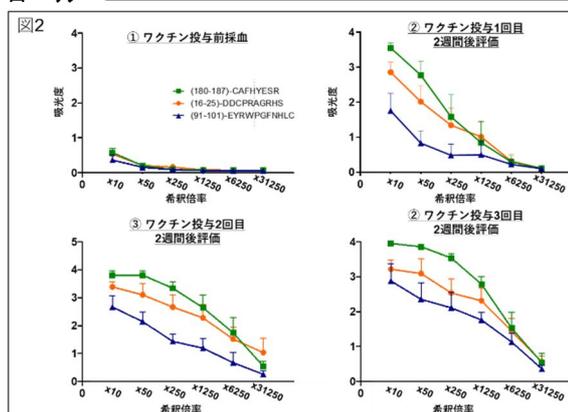
研究結果)

戦略 1: AT1 の細胞外領域をエピトープとする 3 種類のペプチド((16-25)-DDCPRAGRHS, (91-101)-EYRWPGFNHLC, (180-187)-CAFHYESR)をキャリア(KLH) とコンジュゲートしたペプチドワクチンを作成した(以下、(16-25)、(91-101)、(180-187)とする。)。方法通りにワクチンの投与を行い、6 週間後に angiotensin II を 1 週間投与した結果血圧の上昇は 3 種類のワクチンともにコントロール群に比して 20-30%程度抑制されていた(図 1)。ワクチン投与ごとの抗体価はいずれも投与前に比して上昇を認めた(図 2)。

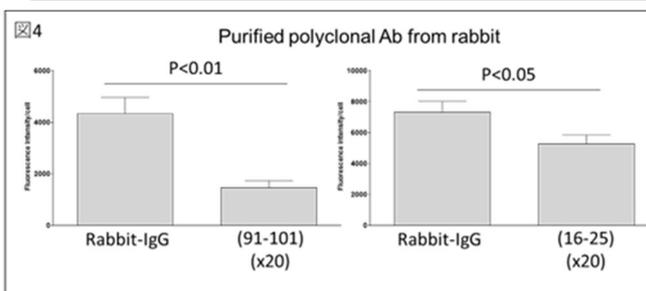
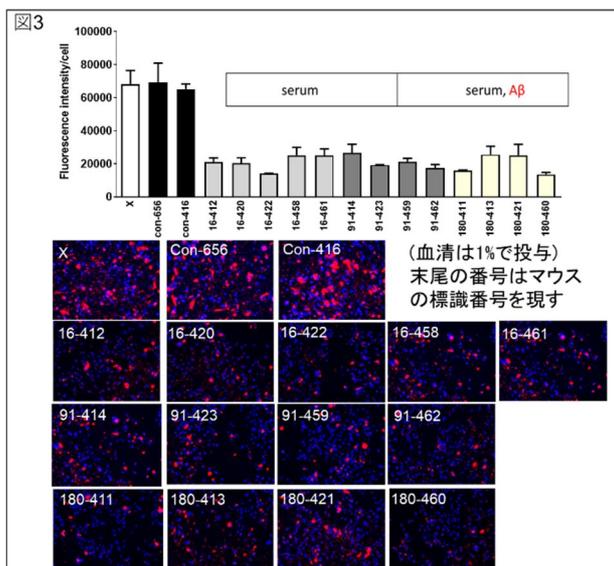


戦略 2: 3 種類のペプチドワクチン投与マウスとコントロール

マウスの血清を抽出した。RAGE や AT1 を安定発現させた CHO 細胞 (CHO-RAGE-AT1) に蛍光標識 A β (1-42)を投与し、24 時間後の細胞内蛍光 A β の発現量を定量評価した。図 3 に示す通り、コントロールマウスや、異なる蛋白(X)を標的としたペプチドワクチンを投与したマウスの血清に比して AT1 ワクチン投与と血清の前投与は 3 種類ともに細胞内蛍光 A β の発現量低下を認めた(図 3)。次に、我々は(16-25)と(91-101)ペプチドを用いてウサギからポリクローナル抗体を精製した。CHO-RAGE-AT1 を用いた同様の検討で、いずれの抗体もコントロール(rabbit-IgG)に比し細胞内蛍光 A β の発現量を減少させる結果が得られた(図 4)。一方、培養血管細胞を用いた検討も行ったが、結果のばらつきが大きく有意な結果は得られなかった。尚、方法に記載した Spinning disk 顕微鏡を用いた実験では細胞膜面の AT1-eGFP(緑)、RAGE-mCherry(赤)が A β 刺激時に Merge して細胞内に消失する現象を観察、定量評価することに成功した(6)。(Clathrin-BFP との triple merge に関しては検出できず断念)。一方、抗体の効果判定には適していないと判断し実験は行わなかった。また、BBB in vitro 再構成系モデルに関しては、内皮細胞間の細胞間隙からの A β 漏出の影響を除外した適切なモデルの構築が困難であったため、抗体の効果判定には用いなかった。戦略 2 の結果から、少なくとも二種のペプチドワクチン((16-25)、(91-101))から産生された抗 AT1 抗体は RAGE,AT1 を介する A β 細胞内移行を抑制する可能性が示唆された。



戦略 3:方法に記載した通り、当初は AD モデルマウスである APP23 マウスを実験に用いる予定であったが、マウスの繁殖不良で交配が進まなかったことや、また、ワクチン投与により死亡するマウスが想定以上に出現したため想定通り進めることはできなかった。一方、我々は AT1 欠損マウスが野生型 (C57BL6)マウスに比して中年期以降の認知機能の低下が抑制されることを、受動回避試験を用いて見出した(未発表)。また、



AT1 欠損マウスでは加齢による骨格筋機能低下が抑制されることが報告されている。そこで、我々は抗 AT1 ワクチンが高齢マウスの認知機能や骨格筋機能に及ぼす影響に関して検討を行った。18 か月齢のマウスにコントロール(KLH)ワクチンと (16-25)-KLH ワクチンを戦略 1 と同様の間隔で投与し、24 か月齢で握力検査と受動回避試験を用いた認知機能の評価を行った。その結果、(16-25)ワクチン群ではコントロールワクチン群に比して 24 か月齢における血圧の低下、握力の低下、体重の減少、骨格筋重量の有意な減少を認めた。一方、受動回避試験においては両群に有意差を認めない結果であった。

考察)本研究計画では抗 AT1DNA ワクチンが我々の見出した、「RAGE, AT1 を介する A β の細胞内移行」を抑制することで AD の病態を改善するか検証することを目標とした。戦略 1 においては、3 種類のワクチンともに AII による昇圧作用を抑制する結果が得られた。戦略 2 においては細胞実験において、3 種類のワクチン血清や 2 種類のワクチンの精製抗体が「RAGE, AT1 を介する A β の細胞内移行」を抑制することを支持する結果が得られた。一方、当初の方法を変更して行った、ワクチンの生体での効果検証実験においては、抗 AT1DNA ワクチンがマウスの老化による認知機能や骨格筋機能を抑制する結果が得られなかった。その要因として以下の可能性を推測している。

1. モデルが抗体効果の検証には不適切であった。

上述のように当初計画の AD モデルマウスを使った実験から老齢野生型マウスを使った実験に変更した。老化による認知機能低下と AD による認知機能低下はメカニズムが異なるため、抗体の効果が検出できなかった可能性がある。一方、AT1 欠損マウスにおける抗老化形質がワクチンでは再現されず、その要因は更なる検証が必要である。

2. 実験に用いたワクチンが不適であった。

戦略 3 では今後の開発戦略も考慮して(16-25)-KLH ワクチンを使用した。(16-25)-DDCPRAGRHS は AT1 の N 末端側の細胞外領域に一致するペプチドであり、他の 2 種類のペプチドと領域が異なる。結論を得るためには他のワクチンの効果検証も必要である。

3. 細胞実験と動物実験で効果が異なる。

均一の環境下での細胞実験と生体モデルを用いた実験の環境の違いが結果に影響を及ぼした可能性がある。特に本研究では高齢マウスを実験に用いたため、ワクチン投与による非特異的な影響が大きいことを考慮する必要があり、結論を得るためには異なるモデルを用いた検証が必要と考えられる。

このように抗 AT1DNA ワクチンが AD の病態を改善する疾患修飾薬となり得るかについては本研究では結論を得ることができなかった。一方、「A β による AT1 活性化機構が AD 発症に関与するか？」については本研究期間中にマウスモデルを用いたデータを蓄積しており、その結果からは AT1 を標的した治療が AD の根本治療となり得ることが支持される。また、DNA ワクチン以外の AT1 を阻害する薬物介入が ARB と異なり、A β を介した AT1 活性化を完全に抑制することを見出している。AD に対する疾患修飾薬の開発に向けて、複数の戦略で今後も検討を進める予定にしている。

(引用文献)

1. Hajjar I, Rodgers K. Do angiotensin receptor blockers prevent Alzheimer's disease? *Curr Opin Cardiol.* 2013;28(4):417-25.
2. Takeda S, Sato N, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Niisato K, et al. Angiotensin receptor blocker prevented beta-amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension.* 2009;54(6):1345-52.
3. Crunkhorn S. Neurodegenerative disease: Taming the RAGE of Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(5):351.
4. Yokoyama S, Kawai T, Yamamoto K, Yibin H, Yamamoto H, Kakino A, et al. RAGE ligands stimulate angiotensin II type I receptor (AT1) via RAGE/AT1 complex on the cell membrane. *Sci Rep.* 2021;11(1):5759.
5. Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003;9(7):907-13.
6. Huang Y, Takahashi T, Gaisano H, Rakugi H, Yamamoto K. A live-imaging protocol for tracking receptor dynamics in single cells. *STAR Protoc.* 2022;3(2):101347.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokoyama Serina, Kawai Tatsuo, Yamamoto Koichi, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 RAGE ligands stimulate angiotensin II type I receptor (AT1) via RAGE/AT1 complex on the cell membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85312-4	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 Takahashi Toshimasa, Huang Yibin, Yamamoto Koichi, et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 The endocytosis of oxidized LDL via the activation of the angiotensin II type 1 receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102076 ~ 102076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102076	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 Huang Yibin, Takahashi Toshimasa, Gaisano Herbert, Rakugi Hiromi, Yamamoto Koichi	4. 巻 3
2. 論文標題 A live-imaging protocol for tracking receptor dynamics in single cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101347 ~ 101347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101347	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本浩一
2. 発表標題 Withコロナ時代の RA系阻害薬の考え方
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	沢村 達也 (Sawamura Tastuya) (30243033)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	武田 朱公 (Takeda Shuko) (50784708)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	

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