

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591023

研究課題名（和文）アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの作用機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of Abeta reduction mechanisms by non-viral DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease

研究代表者 大倉 良夫(OKURA YOSIO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：10392367

研究成果の概要：

アルツハイマー病は認知障害を主症状として中年以降発症する神経疾患である。我が国では120万人以上の患者が存在すると推定されているが、今後、人口の高齢化に伴い、患者数が急増することは確実である。治療法の開発は医学的にも、社会的にも、また経済学的にも極めて重要な解決課題である。

我々は有効で、安全性の高い治療法を確立する目的で、DNA ワクチンを開発した。DNA ワクチンは1回の投与で長時間体内にとどまり DNA でコードされた A β ペプチドを緩徐に作り続けるため、過剰な免疫反応を避けられる。そこで、非ウイルス性 A β -DNA ワクチンを製作し、アルツハイマー病のモデルマウスに投与すると、既に A β 沈着が認められた 12 ヶ月齢から開始した治療的投与群においては対照群の 50% まで A β 沈着が減少していた。(Okura, Y. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103, 9619-9624, 2006)。平成 20 年度は、その作用機序を検索し、DNA ワクチンによって産生された抗 A β 抗体が脳内に移行して老人斑に付着し、ミクログリアノドン機能を活性化すること明らかにして報告した (Okura, Y. et al., J Neuropathol Exp Neurol, 67, 1063-1071, 2008)。さらに、これらの作用機序に基づいて新型ワクチンを開発し、モデルマウスにおいて顕著な A β 削減効果を観察している。また、老齢サル実験においても、DNA ワクチン投与群で有意の A β の減少を観察している。年度当初予定していた (1) A β -DNA ワクチンの作用機序を解明し、より効果や安全性の高い新型ワクチンを開発する、(2) 新型ワクチンを用いて、サルでの安全性と効果を確認し、臨床試験へ結びつける、の 2 点に重点研究を達成することができた。

これらの成果を基に臨床試験の前段階としての前臨床試験(非臨床試験)の完成を目指す。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：7206

キーワード：アルツハイマー病、DNA ワクチン、A ベータ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は今から 100 年前、ドイツの精神医学者アルツハイマーにより最初に

報告された神経疾患である。認知障害（記憶障害、見当識障害、学習の障害、注意の障害、空間認知機能、問題解決能力の障害など）を主症状として中年以降に多発し、世界中で1200万人を超える患者が存在すると考えられている。数年の経過を経て徐々に症状は進行し、重度になると摂食や着替え、意思疎通なども不可能となり、発症後数年から十数年で寝たきりになり死に至る。経過中に被害妄想、幻覚や暴言・暴力・徘徊・不潔行為などの問題行動が出現することが多く、患者本人ばかりか家族や介護者を含めた大きな社会問題となっている。

アルツハイマー病は、肉眼病的に高次機能をつかさどる前頭葉、前頭葉連合野や側頭葉、海馬領域の中等度から高度の脳萎縮によって特徴付けられ、大脳皮質や海馬の萎縮を反映して脳室は拡大する。顕微鏡レベルでは、老人斑、神経原線維変化(neurofibrillary tangle)、神経細胞脱落の3つの特徴がある。アミロイドの蓄積がタウや神経細胞の変化に先行することは多くの研究により報告され、非認知症老人やダウン症の剖検脳でも観察されている。近年、アミロイドの沈着がこの病態の最上流に位置しアミロイドの蓄積を防止できるならば、その後に起きる事象、すなわち、神経細胞内のタウの蓄積、神経細胞の脱落などをある程度防ぐことができるとする「アミロイド仮説」が広く受け入れられるようになった。アミロイド仮説を基に、1999年 Schenk らによりアルツハイマー病の根治的治療法として A β ペプチド・ワクチン療法が提唱された。彼らは、体外から A β ペプチドを免疫賦活剤(アジュバンド)と共に投与し、体内で抗 A β 抗体の産生を誘導し、脳内の A β 蓄積が減少することをアルツハイマーモデルマウスで証明した。その後、脳内の病理学的所見のみならず学習記憶能力もワクチン投与により改善されることが明らかになり、欧米において A β ワクチン(A β 1-42 アジュバンド)のヒト臨床試験が開始されることとなった。Elan 社にて製造された合成 A β 42 製剤である Betabloc (AN-1792)を用いた第 I 相試験(安全性試験)では、約 100 例の軽度から中等度のアルツハイマー病の患者に投与された。この試験は重要な副作用もなく終了し、投与された患者の血清中に抗 A β 抗体が生体内で合成されたことが確認された。第 I 相試験に引き続きアメリカとヨーロッパの 30 の施設において軽度から中等度のアルツハイマー患者に対して第 II 相試験(2重盲検試験)が行われた。しかし実薬投与を受けた 298 例のうち 18 例(6%)に髄膜脳炎

が発症し、障害を残す重症症例も出たため、2002年1月に治験自体が中止された。ワクチンの免疫活性化作用により T リンパ球などの組織障害性細胞性免疫が惹起され、一部の患者で A β に反応する Th1 型 CD4 陽性細胞が脳に浸潤し、アレルギー性実質の脳脊髄炎のような髄膜脳炎を引き起こしたのではないかと推察された。

臨床試験は不満足な結果に終わったものの、その後の検索によってワクチン治療が有益であるという重要な所見が示された。2003年、ワクチン投与を受けた患者の最初の剖検例が報告された。症例は72歳の女性で5年間の緩徐進行性の記憶障害の経過があり、AN-1792 (pre-aggregated A β 42; 50 μ g) を5回投与された後、2001年5月から脳炎症状が出現した。投薬は直ちに中止され脳炎の治療が行われたものの、寝たきりとなり 20ヶ月後の2002年2月に肺梗塞のため死亡した。脳病理は Braak stage V-VI のアルツハイマー病の所見であった。脳炎の所見として髄膜、髄膜血管周囲及び大脳皮質への T 細胞とマクロファージの浸潤が認められ、大脳白質には髄鞘繊維の減少が認められた。しかしその一方、新皮質では老人斑が消失し、それに伴うアストロサイトの増殖や変性軸索も消えていた。老人斑が消失している部位では A β 分解産物を貪食したミクログリアの像も認められ、この所見からワクチンがヒトのアルツハイマー病においても老人斑の減少効果があると推測された。さらにその後、Gilman らは臨床試験の抗 A β 抗体の抗体価と高次機能の改善について最終報告を行った。ワクチン投与 300 名中 59 人が抗体陽性であり、陽性群では各種高次機能試験のうち neuropsychological test battery (NTB) で有意の改善を認めた。これらの事実は、能動免疫療法により一部患者に脳内炎症症状が出現したものの、ワクチンによる A β 減少効果がヒトアルツハイマー病症例においても認められることを示すものであり、過剰な免疫反応を抑制することができれば、ヒトにおいてもワクチン療法が有効である可能性が高いことを示唆している。

2. 研究の目的

我々の研究室では、これまでラットの実験的脳脊髄炎(EAE)などの自己免疫疾患モデルに対し非ウイルス性 DNA ワクチンを作製し、その効果を報告してきた。そのデータの蓄積を基に、哺乳類細胞発現ベクターに

A β -protein(1-42)及び付属のシーケンスを挿入して3種類の非ウイルス性DNAワクチンを製作した。(1) A β 1-42のみを挿入したもの(K-A β ワクチン)、(2) 発現タンパク質の分泌を向上させるためにマウス Igk シグナルを付加したもの(IgL-A β ワクチン)、(3) 分泌したタンパク質の安定性を向上させるために Immunoglobulin の Fc 領域を付加したもの(A β -Fc ワクチン)の3種類である。3種類のベクターをHEK293Tにtransfectし、その細胞内にA β 1-42ペプチドが発現し、培養上清に分泌されているか否かをELISA法により検討した。IgL-A β 、A β -Fc ワクチンは培養上清中にA β 1-42ペプチドが分泌されていた。A β 1-42のみを挿入したK-A β ワクチンはA β 1-42ペプチドの分泌がみとめられなかった。その後、K-A β ワクチンはA β 抑制効果が他の二つのワクチンに比べて低いことが分かったので、詳細な検討から除外した。

作製したDNAワクチンをアルツハイマー病のモデルマウス(APP23 Tg mouse)に2週間に1回投与することにより治療を試みた。このモデルマウスはスウェーデンの家族性アルツハイマー病家系にみられる遺伝子変異をもつアミロイド前駆蛋白が遺伝子導入されており、6ヶ月齢から老人斑が出現し、加齢と共に増加することがわかっている。ワクチン投与後、マウスの脳を免疫組織化学染色し、沈着したA β を画像解析した。A β 沈着がまだ出現していない3-4ヶ月齢からワクチンを投与した予防的投与群においては70-90%、既にA β 沈着が認められた12ヶ月齢から治療的にワクチンを投与した治療的投与群においては50-60%のA β 沈着がコントロール群に比較し有意に減少していた。ワクチンの効果は投与回数に依存する傾向があり1ヶ月に1度投与した場合A β の減少効果は減弱した。DNAワクチン投与後の脳を免疫組織化学的に詳細に検索したがA β ペプチド・ワクチンを投与したときに見られるT細胞や炎症細胞の浸潤などの脳髄膜炎を思わせる所見はまったく認められなかった。さらにモデルマウスと同系で遺伝子操作を行っていないマウスにワクチンを投与し、そのリンパ節細胞からT細胞を分離しA β ペプチドへの反応性を細胞増殖試験で解析したが、抗原反応性T細胞の活性化はまったく誘導されていなかった。これらの所見からDNAワクチンによる過剰な免疫反応はほとんどなく、A β を減少する効果があると考えられた。

アルツハイマー病は、数年から十数年の経過でゆっくり進行する。このため、患者の治療を行う場合、長期に投与する必要性が高く、薬剤の安全性が強く求められる。能動免

疫療法においては、脳炎などの過剰な免疫反応を惹起しないような薬剤を作製することが、今後のワクチン開発の課題になるであろう。また、受動免疫療法では、抗体投与後に脳出血が起こる可能性があること、抗イデオタイプ抗体が産生され複数回の投与により効果が現弱する可能性があること、治療費が莫大になることなどに注意する必要がある。

3. 研究の方法

治療効果の判定は以下のように行った。治療群、対照群の脳に矢状断を加え固定後、パラフィン切片を作製した。抗A β 抗体を用いた免疫染色を行い、大脳皮質と海馬においてA β 沈着を画像解析により定量化した。

A β ペプチドとA β -DNAワクチンをそれぞれ数回投与したモデルマウスと野生型マウスの所属リンパ節、脾細胞を採取して、A β 1-40に対するT細胞反応性を検索した。また、抗A β 抗体はELISAで、脳内の炎症巣の有無は抗T細胞抗体、抗マクロファージ抗体を用いた免疫染色で検討した。

ワクチンの作用機序を解析するために、治療群及び未治療群の脳切片をIba-1 (microglia)及び6F3D (A β)で二重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。さらに、抗A β 抗体によるA β 沈着の直接分解、及び引き抜き効果についても検討を加えた。

治療効果の判定は以下のように行った。治療群、対照群の脳に矢状断を加え固定後、パラフィン切片を作製した。抗A β 抗体を用いた免疫染色を行い、大脳皮質と海馬においてA β 沈着を画像解析により定量化した。

A β ペプチドとA β -DNAワクチンをそれぞれ数回投与したモデルマウスと野生型マウスの所属リンパ節、脾細胞を採取して、A β 1-40に対するT細胞反応性を検索した。また、抗A β 抗体はELISAで、脳内の炎症巣の有無は抗T細胞抗体、抗マクロファージ抗体を用いた免疫染色で検討した。

ワクチンの作用機序を解析するために、治療群及び未治療群の脳切片をIba-1 (microglia)及び6F3D (A β)で二重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。さらに、抗A β 抗体によるA β 沈着の直接分解、及び引き抜き効果についても検討を加えた。

4. 研究成果

今回哺乳類細胞発現ベクターである pTarget

プラスミド(Promega)に A β 1-42、及び付属のシークエンスを挿入して3種類のアルツハイマー病非ウイルス性 DNA ワクチンを製作した。一つ目は A β 1-42 のみを挿入したもの(K-A β ワクチン)、二番目に発現タンパク質の分泌を向上させるためにマウス Igk シグナルを付加したもの(IgL-A β ワクチン)、三番目に、分泌したタンパク質の可溶性を向上させるために Immunoglobulin の Fc 領域を付加したもの(A β -Fc ワクチン)である。作成した3種類のベクターは HEK293T cell に transfect し、その細胞内に A β 1-42 ペプチドが発現し、培養上清に分泌されているか否かを ELISA 法により検討した。IgL-A β 、A β -Fc ワクチンは培養上清中に A β 1-42 ペプチドが、良好に分泌されていたが、A β 1-42 のみを挿入した K-A β ワクチンは、A β 1-42 ペプチドが培養上清中に分泌されておらず、予備的実験で A β 抑制効果が他の二つのワクチンに比べて低いことが分かり、K-A β ワクチンは詳細な検討から除外した。

ワクチン投与後種々の時期に、マウスの脳を免疫組織化学染色し、沈着した A β を画像解析したところ、A β 沈着がまだ出現していない4ヶ月齢からワクチンを投与した予防的投与群においては70-90%、既に A β 沈着が認められた12ヶ月齢から治療的にワクチンを投与した治療的投与群においては50-60%の A β 沈着がコントロール群に比較し減少していることが確認された。ワクチンの効果は投与回数に依存する傾向があり1ヶ月に1度投与した場合 A β の減少効果は減弱した。DNA ワクチン投与後の脳を詳細に検索したが A β ペプチド・ワクチンを投与したときに見られる T 細胞の浸潤や炎症細胞の浸潤といった脳髄膜炎を思わせる所見はまったく認められなかった。さらにモデルマウスと同系で遺伝子操作を行っていないマウスにワクチンを投与し、そのリンパ節細胞から T 細胞を分離し A β ペプチドへの反応性を細胞増殖試験で解析したが、抗原反応性 T 細胞の活性化はまったく誘導されていなかった。これらの所見から DNA ワクチンによる過剰な免疫反応はほとんどなく A β を減少する効果があると考えられた。

作用機序の分析では、まず初めに DNA ワクチン投与後のミクログリアの活性化の程度を知るためにワクチン投与したマウスと対照群のマウスの脳切片を Iba-1 (microglia surface marker)、及び 6F/3D (anti-A β 8-17) で二重染色し、病理学的に検索した。Wild type の B6 マウスにおいては、小さな細胞質と細い突起を持つ休止型ミクログリアが脳全体に分布していた。未治療のアルツハイマーモデル

マウス(APP23)では、アミロイド斑周囲領域(periplaque area)に、大きな細胞質と太い突起を持つ活性化ミクログリアがアミロイド斑周囲に認められ、ミクログリアの突起はアミロイド斑に入り込んでいた。アミロイド斑から離れた領域(remote area)ではミクログリアは wild type B6 マウスで観察されたように休止型であり、活性化像認められなかった)。これに対して、治療群のアルツハイマーモデルマウスでは periplaque area のミクログリアはアミロイド斑の周囲で塊状となって有意に数を増して(P<0.01)おり、remote area でも、ミクログリアはその数を増し、活性型に変化していた。ミクログリアの数の増加の割合は periplaque area よりも remote area で大きかった。

二重染色においてミクログリア内にアミロイドを認めることがしばしばあり、ミクログリアの食食能が亢進している可能性が考えられたために、蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡を用いてミクログリアの食食能の変化を検索した。共焦点顕微鏡による観察ではミクログリアの中に、A β 沈着が観察された。三次元解析をすることにより A β 沈着がミクログリア内にあることを確認した。アミロイドを食食したミクログリア数は、ワクチン投与群で有意に増加していた(P<0.01)。さらに、ワクチン投与群、および対照群の脳組織を用いてウエスタンブロットを行い、A β オリゴマーの変化を定量した。その結果、対照群に比し、ワクチン投与群において有意に A β オリゴマーが減少していた。活性型ミクログリアの増加は、A β oligomer の除去にも関与しているものと考えられた。

ミクログリアは、あるときは神経保護的に、あるときは神経損傷的に作用することが知られており、ワクチン投与後のミクログリアの増加がどちらの場合にあたるのかを、神経障害性サイトカインである TNF- α を指標にして推測した。LPS 処理マウス及び MOG-EAE-誘導マウスでは TNF- α が著明に増加していたものの、ワクチン投与後の増加は認められなかった。増加したミクログリアは神経保護的に作用しているものと考えられた。

さらに我々は、DNA ワクチンの投与後、体内で誘導された抗 A β 抗体が直接 A β に反応し、解離、可溶化を引き起こし沈着した A β を除去する可能性について検討した。これは直接的評価が難しく、治療群及び未治療群のマウス血清がアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド斑と反応性を持つか否かを tissue amyloid plaque immunoreactivity

(TAPIR)にて検討し、間接的に推測した。治療群の抗 A β 抗体は未治療群の抗体に比較して抗体価が高かったものの A β に対する結合反応は著明ではなかった。抗体による A β の解離、可溶化作用はさほど強くないと考えられた。

次に脳内から末梢血中に A β の引き抜きが起こっている可能性 (peripheral sink hypothesis) を知るために治療群及び未治療群のマウスの血清 A β を測定した。9 ヶ月齢のマウスでは治療群の一部で血清 A β 量が高値であり脳から血液への A β の移行が亢進していると考えられた。しかし 15 ヶ月齢では治療群及び未治療群で血清 A β 値に変化はなかった。血管にアミロイドーシスが進行していない 9 ヶ月齢ではワクチン投与後、引抜きが亢進している可能性があるものの、15 ヶ月齢では血管のアミロイドーシスが進行し、引抜きがほとんど起こらないことを示している。Peripheral sink 仮説は DNA ワクチン治療後の主要なルートではないと考えられた。

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 7 件)

① Okura, Y., Matsumoto, Y. (2009) Recent advance in immunotherapies for Alzheimer's disease, with special reference to DNA vaccination, *Human Vaccine*, 5, 3-10

② Okura, Y., Kohyama K., Park, I., Matsumoto, Y. (2008) Non-viral DNA vaccination augments microglial phagocytosis of A β deposits as a major A β clearance pathway in an Alzheimer disease model mice, *J Neuropathol Exp Neurol*, 67,1063-1071

③ Okura, Y., Matsumoto, Y. (2008) DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease: Present status and future direction, *Rejuve Res*, 11, , 301-308 *

④ 大倉良夫、松本陽 (2008) アルツハイマー病の新ワクチン療法－現状と我々の試み、*BRAIN and NERVE*, 60, 931-940

⑤ Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease., *Curr Topics Neuroimmunol*, 139-145

⑥ Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease, *Drug News Perspect*, 20, 1-8

⑦ Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufenbiel, M., Matsumoto, Y. (2006) Non-viral A beta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long term-effects and safety, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 9619-9624

[学会発表] (計 3 件)

① 時田偉子、大倉良夫、松本陽、アカゲザルを用いたアルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの効果と安全性試験、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、(2008)

② 松本陽、大倉良夫、朴一権、神山邦子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の効果と作用機序に関する解析、第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、(2007)

③ 松本陽、大倉良夫、神山邦子、平木啓子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の作用機序に関する解析、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、(2007)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

① アルツハイマー病に対する DNA ワクチン、特許、発明者 松本 陽、特願 2 0 0 9 - 0 7 5 8 2 3、出願年月日 平成 21 年 3 月 26 日
国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

週間アエラ、アルツハイマー病に対する A ベータ DNA ワクチン療法の開発、平成 19 年 9 月 10 日号掲載。

NHK 教育サイエンス ZERO「アルツハイマー病研究最前線」平成 20 年 12 月 3 日 0 時 0 分～0 時 45 分放送、計 8 回再放送

日本経済新聞、平成 20 年 12 月 22 日掲載・

6. 研究組織

(1)研究代表者

大倉 良夫 (OKURA YOSIO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

(2)研究分担者

蕨 陽子 (柴崎 陽子) (WARABI YOKO, SIBASAKI YOKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

神山 邦子 (KOHYAMA KUNIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員