

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460598

研究課題名(和文) アルツハイマー病のモデルマウスを用いたT細胞介在性慢性炎症機序の解明

研究課題名(英文) A study of T cell-mediated chronic inflammation in Alzheimer model mice

研究代表者

田平 武 (TABIRA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号：80112332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド ペプチド(A $\beta$ )の能動免疫ワクチンは、A $\beta$ に反応するT細胞を活性化し自己免疫性脳炎を惹起した。このことはA $\beta$ 反応性T細胞が末梢血中に存在し、脳炎を起こさないまでも絶えず免疫サーベイランスを行っており、脳に侵入して炎症を惹起している可能性を示唆している。これを証明するためにはADモデルマウスをA $\beta$ で免疫し、A $\beta$ 反応性脳炎惹起性T細胞株を樹立し、ADモデルマウスに移入することで可能となる。そこでインターフェロンガンママウスを用いて、A $\beta$ 反応性T細胞集団を得ることができた。これをさらに株化して移入実験を行う予定であったが、マイコプラズマの感染事故があり研究は中断したままとなっている。

研究成果の概要(英文)：Active immunization with amyloid beta peptide (A $\beta$ ) induced autoimmune encephalitis in humans, suggesting that A $\beta$ -reactive encephalitogenic T cells exist in the peripheral blood and are involved in chronic inflammation of AD brain. In order to prove this, we tried to establish A $\beta$ -reactive encephalitogenic T cell clones. After immunization of interferon-gamma mice with A $\beta$  and Freund's complete adjuvant, lymphocytes were obtained from popliteal lymph nodes and the spleen, and repeatedly stimulated with A $\beta$  in the presence of interleukin-12. We could observe significantly higher proliferative responses against A $\beta$ . However, while we are enriching A $\beta$ -reactive T cells in vitro, we had mycoplasma infection in the laboratory, and this project is suspended.

研究分野：神経内科学、神経免疫学、アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 免疫 アミロイドベータ T細胞 炎症 ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は高齢者の認知症で最も多い疾患であり、我が国では 320 万人の患者がいると推計されている。AD はアミロイドタンパク (A $\beta$ ) が何らかの機序で凝集体を形成し、神経細胞を傷害する結果生じる変性疾患であると考えられる。しかし、最近の研究により脳の炎症反応が深く関わっていることが分かってきた。

脳の炎症反応といってもウイルスや細菌感染が直接関わっているのではなく、凝集した A $\beta$  によって引き起こされる免疫反応により引き起こされるものである。免疫反応には原始免疫反応と獲得免疫反応がある。原始免疫反応は好中球やマクロファージなどが異物を認識して引き起こされる炎症反応であり、AD の場合は脳のミクログリアが凝集 A $\beta$  により活性化され、炎症を引き起こすものである。これには多くの研究があり、炎症を抑える新規治療薬の開発が鋭意行われている。

一方、AD の病態形成に獲得免疫の関与もあると考えられる。獲得免疫は T 細胞を介する細胞性免疫と抗体産生細胞である B 細胞を介する液性免疫が関与する。これを利用した AD の治療法が開発が行われており、A $\beta$  に対するモノクローナル抗体や A $\beta$  ペプチドあるいは DNA を用いた能動免疫法が開発されている。一方 AD の発症機序に A $\beta$  反応性の T 細胞の関与があるのではないかと考えられる。その理由は以下の通りである。

A $\beta$  は自己のタンパク質である。本来自己に反応する T 細胞は発生段階で除去されるが、A $\beta$  に反応する T 細胞は除去されておらず、末梢血中に証明される。その頻度は若年者より高齢者で高く、AD 患者ではさらに高いという (1)。

A $\beta$  を接種するワクチン療法 (AN-1792) の治験に於いて、脳炎が多発したため治験が中止になった (2)。その脳炎ではウイルスや細菌の感染は証明されず、T 細胞の浸潤が認められたことから、A $\beta$  に反応する T 細胞が活性化されて引き起こされたものと考えられる。

実際、マウスを A $\beta$  で免疫すると、脳炎を引き起こすことができる (3)。そのときインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) を強発現するマウスを用いると炎症反応が起こりやすい (4)。IFN- $\gamma$  は T ヘルパー 1 型 (Th1) の T 細胞を活性化するので、Th1 T 細胞がその炎症に関与していると考えられる。

抗原特異的脳炎惹起性 Th1 T 細胞は抗原刺激を繰り返すことで株化することができる。そこで、A $\beta$  に反応し脳炎を惹起する T 細胞株を作れば、AD のモデルマウスにおける T 細胞の関与を詳細に解析できると考え、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

A $\beta$  反応性脳炎惹起性 Th1 T 細胞株を樹

立する。この T 細胞を AD のモデルマウスに移入し、AD の発症機序に T 細胞がどのように関与しているかを詳細に明らかにする。

次いで、インターロイキン 10 刺激を繰り返しながら同様にして T ヘルパー 2 型 (Th2) T 細胞株を樹立する。この T 細胞を AD のモデルマウスに移入し、炎症反応を起こすことなく凝集アミロイドの除去が可能になることを証明する。

この研究がうまくいけば、より安全なワクチン療法の開発に向けた貴重なデータを提供できると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1) 動物の種類

AD のモデルマウスの多くが B6 (H-2<sup>b</sup>) の遺伝的背景を有するので、B6 マウスを用いるほうが後の研究に利用しやすい。しかし、B6 マウスは A $\beta$  に対し免疫寛容が強く、うまく T 細胞株が作れない可能性がある。その時は B6 の遺伝的背景をもつ IFN- $\gamma$  遺伝子トランスジェニックマウス (IFN- $\gamma$  マウス) を用いる。どうしても作れないときは SJL (H-2<sup>s</sup>) マウスを用いる。

IFN- $\gamma$  マウスは T. Owen らにより樹立されたもので (5)、クリーニング後本学動物実験施設に納入された。繁殖効率が悪かったため IVF により作り直し、B6 マウスと交配を繰り返した。

### 2) T 細胞株の樹立

A $\beta$  反応性脳炎惹起 T 細胞株の樹立は本研究者がプロテオリピッド反応性脳炎惹起性 T 細胞株を樹立したときの方法に順じて行った (6)。マウスの足蹠に A $\beta$  1-42 と H37Ra を加えた Freund 完全アジュバントで免疫した後、百日咳菌毒素を当日と 1 週間後に注射した。4 週後鼠径リンパ節と脾臓からリンパ球を採取し、RPMI 1640 で 5 日間培養し、Abeta40 と IL-12、正常 B6 マウス血清とフィーダー細胞を加えて抗原刺激を行った。2 週ごとに抗原刺激を繰り返し、最後の抗原刺激から 2 週後に T 細胞の A $\beta$  に対する増殖反応を WST-1 法により調べた。A $\beta$  反応性 T 細胞ラインが樹立されたら、抗原刺激後の T 細胞をマウスに注射し、脳炎惹起性のあるものを選択することとした。その後脳炎惹起性 T 細胞ラインを 1 細胞 / ウェルで培養し、T 細胞クローンを樹立することとした。次いで、同様にマウスを A $\beta$  1-42 で免疫し、IL-12 の代わりに IL-10 を加えてリンパ球を培養し、Th2 株を樹立することとした。

### 3) T 細胞株の AD 病態に対する影響の検証

得られた Th1 タイプの脳炎惹起性 T 細胞株と Th2 タイプの脳炎制御性 T 細胞株を AD モデルマウスに注射し、AD の病態形成 (老人斑、学習記憶障害) に対する A $\beta$  反応性 T 細胞の影響を調べる。

#### 4) T細胞受容体解析と遺伝子発現マウスの作成

A 反応性脳炎惹起性T細胞クローンのT細胞受容体の遺伝子配列を明らかにし、その受容体遺伝子を強発現するトランスジェニックマウスを樹立する。このマウスは脳炎を自然発症すると予想される。このマウスとADモデルマウスを掛け合わせ、A 反応性脳炎惹起性T細胞の影響を強く示す新しいADモデルマウスを樹立する。

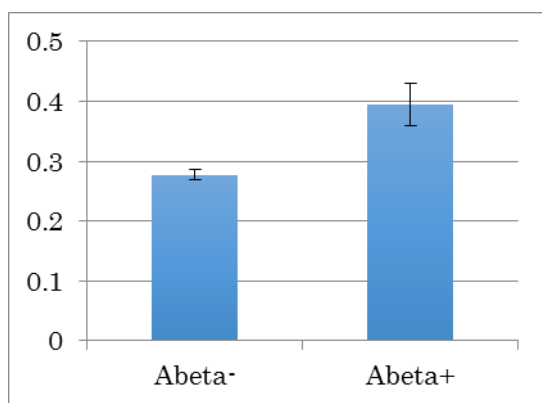
#### 4. 研究成果

##### 1) B6 マウスを用いた研究

初年度は C57BL6 マウスを用いた研究を行った。B6 マウスをA 42 と H37Ra を加えたフロインド完全アジュバントで免疫した後、百日咳菌毒素を当日と1週間後に注射した。4 週間後鼠径リンパ節と脾臓からリンパ球を採取し、RPMI 1640 で5日間培養し、A 40 と IL-12, 正常 B6 マウス血清とフィーダー細胞を加えて抗原刺激を行った。2 週間後抗原刺激を繰り返し、その2週間後T細胞のA 40に対する増殖反応をWST-1法により調べた。しかし有意な増殖反応は見られなかった。やはり B6 マウスは免疫寛容性が高いものと思われた。

##### 2) IFN- $\gamma$ マウスを用いた研究

2 年目には IFN- $\gamma$ マウスを用いて研究を行った。IFN- $\gamma$ マウスを同様に免疫し、同様にリンパ球の増殖反応を調べた。その結果抗原を加えた細胞の増殖反応は抗原を加えないもののそれに比し1.43倍であり、A 反応性T細胞の存在が示唆された(図1)。



A 反応性T細胞を enrich するためにA 40 で再度抗原刺激を行い、これを繰り返すことでA 反応性T細胞ラインを樹立する作業を行っていたが、研究室内でマイコプラズマ感染が発生し、調べたところ本研究者の細胞も感染が確認されたので除菌作業を行った。マイコプラズマ感染が陰性となったことを確認したところで、研究室全体が落ち着くまで凍結保存することにした。

研究を再開するに当たり凍結保存した細

胞からマイコプラズマが再び広がる恐れもあり、除菌作業が細胞に影響を及ぼしていることを考え、新たに IFN- $\gamma$ マウスを免疫してもう一度初めからやり直すことにした。しかし今度は IFN- $\gamma$ マウスが高齢になっており実験にふさわしくないとのことで、新たに若齢の IFN- $\gamma$ マウスを得て免疫することを試みた。しかし、IFN- $\gamma$ マウスは繁殖効率が悪く、子供を得ることができず、研究を遂行することができなかった。

#### 【考察】

アルツハイマー病の免疫療法は自己免疫性脳炎が起こったため、その可能性が低い抗体療法が先行している。すでにA に対するモノクローナル抗体2つの第III相試験が終了した。その一つ bapineuzumab はA のN末端側を認識する抗体で老人斑除去効果に優れているが、無効であった。もう一つの抗体 solanezumab はA のモノマーを認識する抗体で、老人斑除去効果は有しない。この抗体は primary endpoint は無効であったが、サブ解析の結果、軽症例での有効性が認められたので、現在世界規模で軽症例を対象に治験が進められている。1-2年以内に結果が得られる予定で、もし有効性が認められればADに対する初の病態修飾薬になるであろう。

抗体療法で予防・治療が可能であることが分かれば、高価な抗体療法から安全な能動免疫療法に代わるであろう。能動免疫療法ではA を抗原とする自己免疫性脳炎が最も大きな問題となる。残念ながら本研究は当初の目的であったA 反応性脳炎惹起性T細胞株を得るところまで行かなかつたので、ADの病態形成にどの程度T細胞が関与するかについて詳細な解析をすることができなかった。理論的にはこの方法で行けることが分かったので、機会があったら再挑戦したい。

本研究者はアデノ随伴ウイルスベクターを用いた組換えA ワクチンを開発しマウス、サルで有効性を示した。このワクチンは経口投与するもので、Th2 反応優位である腸管免疫を利用するので脳炎惹起性は低いと予想される。しかし、今回ワクチンを投与したサルの脳を詳細に解析したところ、老人斑は減少したが、可溶性A やオリゴマーが有意に増加していることが分かった。従って、脳炎だけではなくアミロイド融解により生じるオリゴマー対策を講じる必要があることが分かった。Bapineuzumab は老人斑アミロイドを融解する作用が強く、オリゴマー除去効果がないために有効性が得られなかった可能性がある。一方、solanezumab は老人斑アミロイドの融解作用がないのでオリゴマーが形成されることはなく、モノマーを認識するのでむしろオリゴマー形成を阻止すると考えられ、その差が出たものと思われる。

我々は以前にA に対するモノクローナル抗体 3.4A10 を樹立し、12 マーをよく認識することを示した(7)。今回この抗体は

dimer その他のオリゴマーをよく認識することが分かり、特許出願に至った。我々のワクチンは老人斑が形成される前に投与するか、老人斑形成後であればワクチン投与後に $3.4 \times 10^4$ のような抗体をカップルさせる必要があると思われる。

#### 参考文献

- 1) Monsonogo, A. et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.*, **112**, 415-22, 2003.
- 2) Nicoll, J.A. et al. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.*, **9**, 448-52, 2003.
- 3) Furlan R. et al. Vaccination with amyloid- $\beta$  peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain*. **126**, 285-291, 2003.
- 4) Monsonogo, A. et al. A $\beta$ -induced meningo-encephalitis is IFN- $\gamma$ -dependent and is associated with T cell-dependent clearance of A $\beta$  in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 5048-53, 2006.
- 5) Renno, T. et al. Interferon- $\gamma$  in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE. *Mol. Cell. Neurosci.* **12**, 376-389, 1998.
- 6) Satoh J, et al. Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T cell lines specific for myelin proteo- lipid apoprotein. *J. Immunol.* **138**, 179-84, 1987.
- 7) Wang, J., Hara, H., Makifuchi, T. & Tabira, T. Development and characterization of a TAPIR-like mouse monoclonal antibody to A $\beta$ . *J. Alzheimer. Dis.* **14**, 161-73, 2008.

#### 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 18 件)

- 1) Vaishnav RA, Liu R, Chapman J, Roberts AM, Ye H, Rebolledo-Mendez JD, Tabira T, Fitzpatrick AH, Achiron A, Running MP, Friedland RP. Aquaporin 4 molecular mimicry and implications for neuromyelitis optica. *J. Neuroimmunol.* **260**, 92-8, 2013. (査読あり)
- 2) Shiota S, Takekawa H, Matsumoto SE, Takeda K, Nurwidya F, Yoshioka Y, Takahashi F, Hattori N, Tabira T, Mochizuki H, Takahashi K. Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid- $\beta$  generation in mice. *J. Alzheimer. Dis.* **37**, 325-33, 2013. (査読あり)
- 3) Tong Y, Yang H, Tian X, Wang H, Zhou

T, Zhang S, Yu J, Zhang T, Fan D, Guo X, Tabira T, Kong F, Chen Z, Xiao W, Chui D. High manganese, a risk for Alzheimer's disease: high manganese induces amyloid- $\beta$  related cognitive impairment. *J. Alzheimer. Dis.* **42**, 865-78, 2014. (査読あり)

4) Liu H, Wang J, Tabira T. Juzen-Taiho-to, an herbal medicine, promotes the differentiation of transplanted bone marrow cells into microglia in the mouse brain injected with fibrillar amyloid  $\beta$ . *Tohoku J. Exp. Med.* **233**, 113-22, 2014. (査読あり)

5) Ohba T, Yoshino Y, Ishisaka M, Abe N, Tsuruma K, Shimazawa M, Oyama M, Tabira T, Hara H. Japanese Huperzia serrata extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1838-44, 2015. (査読あり)

6) Wang H-C, Zhang T, Kuerban B, Jin Y-L, Le W, Hara H, Fan D-S, Wang Y-J, Tabira T, Chui D-H. Autophagy is involved in oral rAAV/A $\beta$  vaccine-induced A $\beta$  clearance in APP/PS1 transgenic mice. *Neurosci. Bull.* **31**: 491-504, 2015. (査読あり)

7) 田平 武. アルツハイマー病と炎症. 早期認知症学会誌 **8**:6-15, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) Tabira T. The Prospects of immunotherapy for Alzheimer's disease. NSFC-CAS-JSPS International Workshop on Frontier of Science and Technology 2013, Dec 3, 2013, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, China
- 2) 田平 武. シンポジウム Neuroinflammation イントロダクション. 第 55 回日本神経学会総会, 平成 26 年 5 月 22 日、福岡国際会議場、福岡
- 3) Tabira T, Hara H. Immunotherapy for Alzheimer disease. 6<sup>th</sup> Chongqing International Neurology Forum, Nov 22, 2014, Chongqing, China
- 4) 田平 武. シンポジウム 認知症治療研究の新展開 A $\beta$ 免疫療法, 第 33 回日本神経治療学会、平成 27 年 11 月 28 日名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計 5 件)

1) 田平 武 かかりつけ医のための認知症  
診療テキスト 実践と基礎。診断と治療社、  
2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：アミロイド 蛋白質オリゴマー用モノ  
クローナル抗体及びその利用  
発明者：田平 武、松本信英、原英夫、福原  
武志、服部信孝  
権利者：順天堂大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-093868  
出願年月日：2016年5月9日  
国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田平 武 (TABIRA, Takeshi)  
順天堂大学・医学部・客員教授  
研究者番号：80112332

### (2) 研究分担者

松本信英 (MATSUMOTO, Shinei)  
順天堂大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40432950

### (3) 連携研究者

なし