

厚生科学研究費補助金

21 世紀型医療開拓推進研究事業

アルツハイマー病に対するアデノウイルスベクターを
用いた新しい治療法の開発に関する研究

(H13-痴呆・骨折-021)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 英夫

平成 14 (2002) 年 4 月

目次

I.	総括研究報告	
	アルツハイマー病に対するアデノウイルスベクターを用いた新しい 治療法の開発に関する研究-----	1
	原 英夫	
II.	分担研究報告	
1.	アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法用の アデノウイルスベクターの構築と生体反応に関する研究-----	10
	原 英夫、高橋慶吉	
2.	A β 発現アデノウイルスベクターを投与したマウスの組織解析-----	20
	田平 武	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	27
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	28

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）

統括研究報告書

アルツハイマー病に対するアデノウイルスベクターを用いた新しい 治療法の開発

主任研究者 原 英夫

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部室長

研究要旨

アルツハイマー病の新しい治療法として免疫療法が注目されている。最近の報告では、アルツハイマー病の動物モデルに対し、A β ペプチドを免疫投与したところ、老人斑の減少と高次脳機能の回復が認められている。我々は、A β を発現するアデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を試みている。アデノウイルスベクターの経口投与の利点としては、1回の投与により、比較的長期（約6ヶ月間）に腸管において抗原提示ができ、しかも胃液などにより分解されにくく、腸管上皮細胞に感染後はレトロウイルスのように染色体に組み込まれないため、細胞内でウイルスは自己増殖せず、腸管細胞の新陳代謝による脱落によりアデノウイルスも死滅し安全である。他の臓器への拡散・感染も無い。細胞性免疫は惹起せず抗体産生のみ誘導するなどが挙げられる。今回、アデノウイルス粒子を C57BL/6J マウスに経口投与し、血清中に A β に対する抗体が産生されることを確認した。さらにこの抗体は、A β 蛋白の凝集も阻害する作用も認められた。

研究組織

分担研究者

高橋慶吉（国立精神・神経センター
神経研究所疾病研究第6部室長）

田平 武（国立療養所中部病院長寿
医療研究センター センター長）

A. 研究目的

アルツハイマー病の病因として、神経細胞内の β -amyloid precursor protein (β APP)が、 β , γ -secretase により部分的に分解され、amyloid- β peptide (A β)が生成され細胞外へ沈着し、老人斑を形成することが考えられている。しかし有効な治療法は、確立されてお

らず、早急に新しい治療法の開発が必要である。最近の報告では、アルツハイマー病の動物モデルに対し、A β ペプチドを免疫投与したところ、老人斑の減少と高次機能の回復が認められている。この様に A β ペプチドをワクチンとして投与し、抗体を体内で産生させ、抗体が老人斑を除去し、さらに分泌された A β の凝集・沈着を抑制することにより神経細胞の脱落を防止しようとする免疫療法が、アルツハイマー病の新しい治療法として注目されている。欧米では、ELAN社によりアルツハイマー病患者に A β ペプチドのワクチン投与が行われているが、我々は、アデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を試みている。アデノウイルスベクターに A β cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノウイルスを経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A β 抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導するのが目的である。

B. 研究方法

1. アデノウイルスベクターの構築

amyloid- β 43(A β 43) cDNA は、ヒト amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を鋳型として PCR にて増幅した。アデノウイルスベクター (pAdeno-X)

(CLONTECH; Adeno-X Expression system)に A β 43 cDNA を組み込んだ。後に APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸)を A β 43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 43 cDNA を作成し、同様に pAdeno-X ベクターへ組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に transfections し、recombinant adenovirus を得た。さらにアデノウイルス粒子を HEK293 細胞内にて大量に産生し、セシウムクロライド超遠心にて精製した。

コントロールとして、E.coli Lac Z を発現するアデノウイルスベクター (pAdeno-X-Lac Z)を作成した。

2. ウェスタンブロット解析

APP signal sequence+ A β 43 cDNA を発現ベクター pShuttle に組み込み、lipofectamine 2000 (In vitrogen)を用いて CHO 細胞へ導入した。48 時間後に培養上清と cell lysate を抽出し、SDS-PAGE gel に泳動した。Nitrocellulose membrane に蛋白を transfer 後、抗 A β 抗体(4G8)にて A β 蛋白を検出した。

3. アデノウイルスの経口投与

C57BL/6J マウスに A β アデノウイルス 1.5×10^7 pfu, コントロールとして Lac Z アデノウイルス 1.0×10^7 pfu 経

口投与した。

4. マウス血清中の抗 A β 抗体の検出
A β 42 ペプチド(5mg/ml)を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp)の各 well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノウイルスを投与したマウスより採取した血清を加え (500 倍希釈)、peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

次に A β アデノウイルスを投与したマウスの血清中の抗体がヒトの老人斑を染色するか検討した。アルツハイマー病患者の脳皮質凍結切片を 70 % ギ酸処理した後、マウス血清 (500 倍希釈) で染色した。

マウスの血清が A β 凝集反応を阻害するか検討した。A β 1-40 ペプチドを 350mM の濃度に調整し 96well plate に加え、370C でインキュベーションした。24 時間後に A β の凝集が見られた。この A β の凝集に ¹²⁵I-A β 1-40 を 20nCi/well の濃度で加え、2 時間後に洗浄しガンマカウンターで測定した。¹²⁵I- A β 1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、マウスの血清を 5%濃度で加え測定した。

5. 組織からの RNA 精製及び RT-PCR。
アデノウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、

腎臓を摘出し、ISOGEN 溶液の中で組織を homogenate した後、RNA を精製した。Total RNA 5 mg に random primer を結合させ、逆転写酵素により 1st strand cDNA を作成した。次に、APP signal sequence の 5'塩基配列と A β 43 の 3'塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCR を行った。PCR 産物は、2 % agarose gel に泳動し、目的とする 200bp のバンドを確認した。

6. マウス脾細胞の A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。

アデノウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5 x 10⁴細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 48 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。

7. 組織染色

アデノウイルス投与したマウスの組織の凍結切片を用いて実験を行った。

a) 組織中の A β 蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、5% H₂O₂ で内因性の peroxidase 活性

を失活させた。抗 A β 抗体(1000 倍希釈) またはマウス血清(500 倍希釈)と反応させた後、 peroxidase 標識 2 次抗体を加え、DAB 染色を行った。

b) Lac Z の発現解析のため、 β -gal staining kit (In vitrogen 社)を用いて、 β -galactosidase 染色を行った。

倫理面への配慮

動物、特にマウスに対する実験は、当国立精神神経センター動物実験施設の倫理規定に基づき、動物に対して苦痛を軽減する投与方法、および安楽死後の処置を行った。遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は、国立精神・神経センター神経研究所の組み換え DNA 安全委員会の承認 (P2 規制レベル) を得た。

C. 研究結果

我々は、当初 amyloid- β 43(A β 43) cDNA を単独に組み込んだアデノウイルスベクター(pAdeno-X-A β)を作成し、この pAdeno-X-A β を HEK293 cell に遺伝子導入し、Adenovirus particle を得た。しかし、pAdeno-X-A β 43 は、細胞内で多量の A β 43 を産生するが、大部分の A β 43 は細胞内の核内および細胞質に局在し、十分な量を細胞外に分泌しない事が判明した。A β ペプチドを効率的に細胞外へ分泌させる

ためには、分泌シグナルが必要である。そこで APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸)を A β 43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; signal sequence+A β 43 cDNA を作成し、効率よく A β が細胞外に分泌されるようなベクター(pAdeno-X-signal seq-A β 43)を開発した。

次に実際に A β が細胞外に分泌される事を確認するため、APP signal sequence+A β 43 cDNA を発現ベクター pShuttle に組み込み、lipofectamine 2000 (In vitrogen)を用いて CHO 細胞へ導入した。48 時間後に培養上清と cell lysate を抽出し、SDS-PAGE gel に泳動した。A β ペプチドが oligomer を形成しながら細胞外に分泌されることを western blot にて確認した。細胞内では A β ペプチドモノマー 4kDa の蛋白が認められた。

C57BL/6J マウスにウイルス粒子を経口投与し、経時的に採血し血清中の抗 A β 抗体の産生を解析した。血清中の抗体価は、主として経口投与後 4 週間でピークを示し、調べ得た範囲では、5 ヶ月後まで抗体の産生を認めた。

このマウスの血清は、ヒトの老人斑、特に diffuse plaque と結合し、染色することができた。

次にマウスの血清が A β 凝集反応を

阻害するか検討した。A β 凝集塊に¹²⁵I-A β 1-40を加えた時の値を100%とすると、蒸す血清は、コントロールのマウス血清と比べ有意に¹²⁵I-A β 1-40の凝集・結合を阻害した。

アデノウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを確認するため、アデノウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎臓を摘出し、各組織よりRNAを精製し、1st strand cDNAを作成した。APP signal sequenceの5'塩基配列とA β 43の3'塩基配列からPCR用primerを作成し、PCRを行った。signal sequence+A β 43 cDNA (200 bp)のバンドが上部消化管にのみ認められた。

腸管に免疫した場合には、細胞性免疫を惹起しにくい現象が報告されている。そこでアデノウイルスを投与したマウス脾細胞を分離し in vitro においてA β 42ペプチドに対する細胞増殖反応を解析した。アデノウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plateの1 wellに5 x 10⁴細胞を加え、A β 42ペプチドを各濃度で加えた培養液中で48時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。ELISAリーダーで色素溶液の吸光度を測定するこ

とにより、細胞増殖能反応を判定した。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

コントロールとして、E.coli LacZ遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだウイルス粒子をマウスに経口投与し、腸管細胞におけるLac Zの発現を β -galactosidase染色を行い解析した。その結果、経口投与5ヶ月経過後も β -gal陽性細胞を腸管上皮細胞に認めた。

A β 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいても、1ヶ月後の上部消化管上皮細胞にA β 蛋白の発現を認めた。経口投与5ヶ月後にもA β 蛋白の発現を認めた。さらに同組織切片をcongo red染色し、A β の沈着を認めた。

他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、最も炎症が起こりやすいと考えられる脳および腎臓を含め、諸臓器に炎症所見は認められなかった。

D. 考察

アルツハイマー病の動物モデルとして、PD-APP transgenic mouseが作成されている。このマウスは、PDGF promotorに変異型APPを組み合わせたもので、amyloid- β を大量に作成し、

脳内に多くの老人斑を認めアルツハイマー病の病理学的特徴を示している。Schenk らが、このマウスに A β ペプチドをワクチンとしてアジュバントと共に免疫投与したところ、老人斑の形成が減少したことを報告している。Weiner らは、A β ペプチドを経口またはスプレーにてマウスの鼻粘膜に投与しても、抗体が産生され、PDAPPmice の脳内の老人斑が減少した事を報告している。さらに最近では、これらのモデルマウスの高次脳機能、すなわち短期記憶や空間認知機能の改善が A β ペプチドの免疫投与により認められたと報告されている。機序としては、A β ペプチドを投与し A β に対する抗体を体内で産生させ、老人斑の中の凝集した A β に抗体が結合し、それをミクログリアが貪食することにより、老人斑が除去され、さらに分泌された A β の凝集・沈着を抗体が抑制することにより、A β の神経細胞への毒性を抑え、痴呆の改善などの治療に結びつくと考えられている。欧米においては、既にアルツハイマー病患者に対して A β ペプチドのワクチン療法の臨床試験が Elan 社により開始されている。

我々は、アデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った。アデ

ノウイルスベクターの経口投与の利点としては、1回の投与により、比較的長期(約6ヶ月間)に腸管において抗原提示ができ、しかも胃液などにより分解されにくく、腸管上皮細胞に感染後はレトロウイルスのように染色体に組み込まれないため、細胞内でウイルスは自己増殖せず、腸管細胞の新陳代謝による脱落によりアデノウイルスも死滅し安全である。他の臓器への拡散・感染も無い。細胞性免疫は惹起せず抗体産生のみ誘導するなどが挙げられる。

方法として、アデノウイルスベクターに A β cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノウイルスを経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A β 抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導する事を想定している。我々は、APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸)を A β 43 の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+ A β 43 cDNA を作成し、効率よく A β が細胞外に分泌されるようなアデノウイルスベクター (pAdeno-X-signal seq-A β 43) を開発した。この新しいベクターを導入した細胞では、A β ペプチドが oligomer を形成しながら細胞外に分泌されることを western blot にて確認した。pAdeno-X-signal seq-A β 43

のウイルス粒子を HEK293 細胞内にて大量に産生させ、超遠心にて精製した。そしてアデノウイルス粒子を通常の C57BL/6J マウスに1回のみ経口投与した。組織の検索を行ったところ、上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現を認めた。経口投与5ヶ月後にも A β 蛋白の発現を認めた。さらに同組織切片を congo red 染色し、A β の沈着を認めた。

次に、マウスの血清を経時的に採取し、血清中に A β 42 に対する抗体が産生されたことを確認した。抗体産生は、5ヶ月後まで持続した。さらにこの抗体は、A β 蛋白の凝集も阻害する作用が認められた。

マウスの脾細胞から T 細胞を分離し、A β ペプチドへの反応性を細胞増殖を解析した。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であり、細胞性免疫は惹起されていないことを確認した。

安全性の確認のため、アデノウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを、臓器から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、上部腸管組織においてアデノウイルスの発現が認められた。

抗体による臓器の炎症が起こっていないか検索したが、脳・腎臓を含め

炎症所見は認められなかった。

コントロールとしては、E.coli LacZ 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだベクターを作成した。このコントロールウイルス粒子を経口投与し、腸管細胞における Lac Z の発現を β -galactosidase 染色により確認した。経口投与後5ヶ月経ても腸管細胞に発現を認めた。

体内にて A β 42 に対する抗体が産生されることを確認したので、アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mice にアデノウイルス粒子を経口投与し、脳内の老人斑の除去および A β の沈着・凝集抑制できるか病理学的に観察中である。マウスの高次脳機能の改善度も測定する予定である。抗体による他の臓器への障害の有無も病理学的に検索する。

欧米においては Elan 社による A β ワクチン療法の臨床試験が行われているが、最近の報告では、脳炎様の副作用が報告され一時中断されている。Elan 社からの報告が発表されていないため詳細は不明だが、2-3 人の患者からは単純ヘルペスウイルスが検出されたらしい。単純ヘルペスウイルスは、若年者では中枢神経系の潜伏感染が少ないが、高齢者では比較的多いとされている。脳炎が起こ

った理由として、老人斑に対する免疫反応により潜伏していた単純ヘルペスウイルスが活性化され、ウイルスが増殖した可能性が論議されている。それに対処する方法としては、acyclovir などの抗ウイルス剤の併用も考えられている。

我々が開発したアデノウイルスベクターを用いたワクチン療法は、細胞性免疫を惹起せず液性免疫（抗体）のみを誘導する利点があり、脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

今後は、マウス等における有効性が確認された後に、ヒトにおいて安全性を確認・申請後、臨床的にアルツハイマー病患者に投与することを計画している。実際には、Harvard Medical School, Center for Neurological Diseases の Howard Weiner 教授とともに、臨床試験を行う予定である。

E. 結論

我々のアデノウイルスベクターを用いた経口投与による免疫学的治療法の開発は、独創的であり将来有効な遺伝子治療の1つとして期待される。アデノウイルスベクターの経口投与の利点としては、1回の投与で比較的長期（約6ヶ月間）に腸管において抗原提示ができ、しかも胃液などに

より分解されにくく、腸管上皮細胞に感染後はレトロウイルスのように染色体に組み込まれないため、細胞内でウイルスは自己増殖せず、腸管細胞の新陳代謝による脱落によりアデノウイルスも死滅し安全である。他の臓器への拡散・感染も無い。細胞性免疫は惹起せず抗体産生のみ誘導するなどが挙げられる。

この治療法が確立されれば、アルツハイマー病型痴呆患者の数が減少し、高齢者の生活向上、医療費の削減など多くの社会的貢献が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Ab42 labeling. *J. Alzheim. Dis.* 3: 231-239, 2001.

2. Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T: Mutational analysis of the tau gene in patients with frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21: 450-455, 2001

3. Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Maruyama K, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. J. Biol. Chem. 275: 3681-3686, 2000.

4. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. The molecular Basis of Dementia, 920: 241-244, 2000.

5..Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Pro-apoptotic effect of presenilin 2(PS2) overexpression is associated with down regulation of Bcl-2 in cultured neurons. J. Neurochem. 79:1161-1168, 2001.

6.Tanahashi H, Tabira T.: Three novel alternative spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. Neuroscience Letters 307:9-12, 2001.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

現在、某製薬会社と特許の取得について契約中である。

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）
分担研究報告書

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法用のアデノウイルス
ベクターの構築と生体反応に関する研究

主任研究者 原 英夫
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部室長

研究要旨

我々は、 $A\beta$ を発現するアデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った。腸管細胞から効率よく $A\beta$ 蛋白を分泌できるような cDNA を作成した。アデノウイルス粒子を C57BL/6J マウスに1回のみ経口投与し、血清中に $A\beta$ に対する抗体が産生されることを確認した。抗体産生は、5ヶ月後まで持続した。さらにこの抗体は、 $A\beta$ 蛋白の凝集も阻害する作用が認められた。アデノウイルスが他の臓器に感染していないことを各臓器から精製した RNA を用いて RT-PCR で解析した。アデノウイルスは、上部消化管組織のみ検出された。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、 $A\beta$ 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。これにより、抗体産生のみ誘導でき、細胞性免疫は惹起しないという利点を確認された。

研究組織

分担研究者

高橋慶吉（国立精神・神経センター神経研究所室長）

A. 研究目的

最近の報告では、アルツハイマー病の動物モデルに対し、 $A\beta$ ペプチドを免疫投与したところ、老人斑の減少と高次機能の回復が認められている。この様に $A\beta$

ペプチドをワクチンとして投与し、抗体を体内で産生させ、抗体が老人斑を除去し、さらに分泌された $A\beta$ の凝集・沈着を抑制することにより神経細胞の脱落を防止しようとする免疫療法が、アルツハイマー病の新しい治療法として注目されている。欧米では、ELAN 社によりアルツハイマー病患者に $A\beta$ ペプチドの免疫投与が行われているが、我々は、アルツハイマー病に対する新しいタイプのワ

クチン療法を開発するためにアデノウイルスベクターを用いる系を発案した。アデノウイルスベクターに A β cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノウイルスを経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A β 抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導するのが目的である。今年度は、C57BL/6J マウスに経口投与し、その有効性を検証した。

B. 研究方法

1. アデノウイルスベクターの構築

amyloid- β 43(A β 43) cDNA は、ヒト amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を鋳型として PCR にて増幅した。アデノウイルスベクター(pAdeno-X) (CLONTECH; Adeno-X Expression system)に A β 43 cDNA を組み込んだ。後に APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸) を A β 43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 43 cDNA を作成し (図 1)、同様に pAdeno-X ベクターへ組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に transfection し、recombinant adenovirus を得た。さらにアデノウイルス粒子を HEK293 細胞内にて大量に産生し、セシウムクロライド超遠心にて精製した。

コントロールとして、E.coli Lac Z を発

現するアデノウイルスベクター (pAdeno-X-Lac Z) を作成した。

2. ウェスタンブロット解析

APP signal sequence+ A β 43 cDNA を発現ベクター pShuttle に組み込み、lipofectamine 2000 (In vitrogen) を用いて CHO 細胞へ導入した。48 時間後に培養上清と cell lysate を抽出し、SDS-PAGE gel に泳動した。Nitrocellulose membrane に蛋白を transfer 後、抗 A β 抗体(4G8)にて A β 蛋白を検出した。

3. アデノウイルスの経口投与

C57BL/6J マウスに A β アデノウイルス 1.5×10^7 pfu, コントロールとして Lac Z アデノウイルス 1.0×10^7 pfu 経口投与した。

4. マウス血清中の抗 A β 抗体の検出

A β 42 ペプチド(5 μ g/ml)を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp)の各 well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノウイルスを投与したマウスより採取した血清を加え (500 倍希釈)、peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

次に A β アデノウイルスを投与したマウスの血清中の抗体がヒトの老人斑を染色するか検討した。アルツハイマー病患者の脳皮質凍結切片を 70 %ギ酸処理した後、マウス血清 (500 倍希釈) で染色した。

マウスの血清が A β 凝集反応を阻害するか検討した。A β 1-40 ペプチドを 350 μ M の濃度に調整し 96well plate に加え、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。24 時間後に A β の凝集が見られた。この A β の凝集に 125 I- A β 1-40 を 20nCi/well の濃度で加え、2 時間後に洗浄しガンマカウンターで測定した。 125 I-A β 1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、マウスの血清を 5%濃度で加え測定した (図 5a)。

5. 組織からの RNA 精製及び RT-PCR。
アデノウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎臓を摘出し、ISOGEN 溶液の中で組織を homogenate した後、RNA を精製した。Total RNA 5 μ g に random primer を結合させ、逆転写酵素により 1st strand cDNA を作成した。次に、APP signal sequence の 5'塩基配列と A β 43 の 3'塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCRを行った。PCR産物は、2% agarose gel に泳動し、目的とする 200bp のバンドを確認した。

6. マウス脾細胞の A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。

アデノウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5 x 10 4 細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 4 8 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウ

ム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。

倫理面への配慮

動物、特にマウスに対する実験は、当国立精神神経センター動物実験施設の倫理規定に基づき、動物に対して苦痛を軽減する投与方法、および安楽死後の処置を行った。遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は、国立精神・神経センター神経研究所の組み換え DNA 安全委員会の承認 (P2 規制レベル) を得た。

C. 研究結果

我々は、当初 amyloid- β 43(A β 43) cDNA を単独に組み込んだアデノウイルスベクター(pAdeno-X-A β)を作成し、この pAdeno-X-A β を HEK293 cell に遺伝子導入し、Adenovirus particle を得た。しかし、pAdeno-X-A β 43 は、細胞内で多量の A β 43 を産生するが、大部分の A β 43 は細胞内の核内および細胞質に局在し、十分な量を細胞外に分泌しない事が判明した。A β ペプチドを効率的に細胞外へ分泌させるためには、分泌シグナルが必要である。そこで APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸)を A β 43 cDNA

の 5' 側に結合させた fusion gene ; signal sequence+ A β 43 cDNA を作成し、効率よく A β が細胞外に分泌されるようなベクター (pAdeno-X-signal seq-A β 43) を開発した (図 1)。

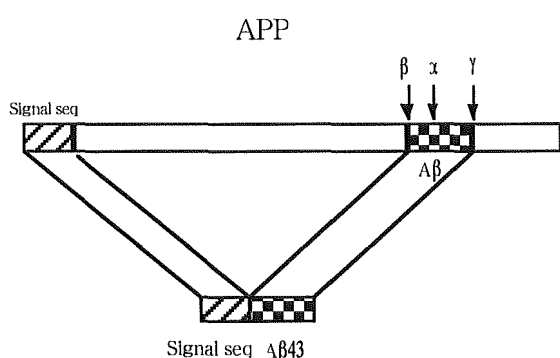


図 1 signal sequence+ A β 43 cDNA の構造

実際に A β が細胞外に分泌される事を確認するため、APP signal sequence+ A β 43 cDNA を発現ベクター pShuttle に組み込み、lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて CHO 細胞へ導入した。48 時間後に培養上清と cell lysate を抽出し、SDS-PAGE gel に泳動した。A β ペプチドが oligomer を形成しながら細胞外に分泌されることを western blot にて確認した (図 2)。細胞内では多量の A β ペプチドモノマー 4kDa の蛋白が認められた。

C57BL/6J マウスにウイルス粒子を経口投与し、経時的に採血し血清中の抗 A β

抗体の産生を解析した (図 3)。血清中の抗体価は、主として経口投与後 4 週間でピークを示し、調べ得た範囲では、5 ヶ月後まで抗体の産生を認めた。

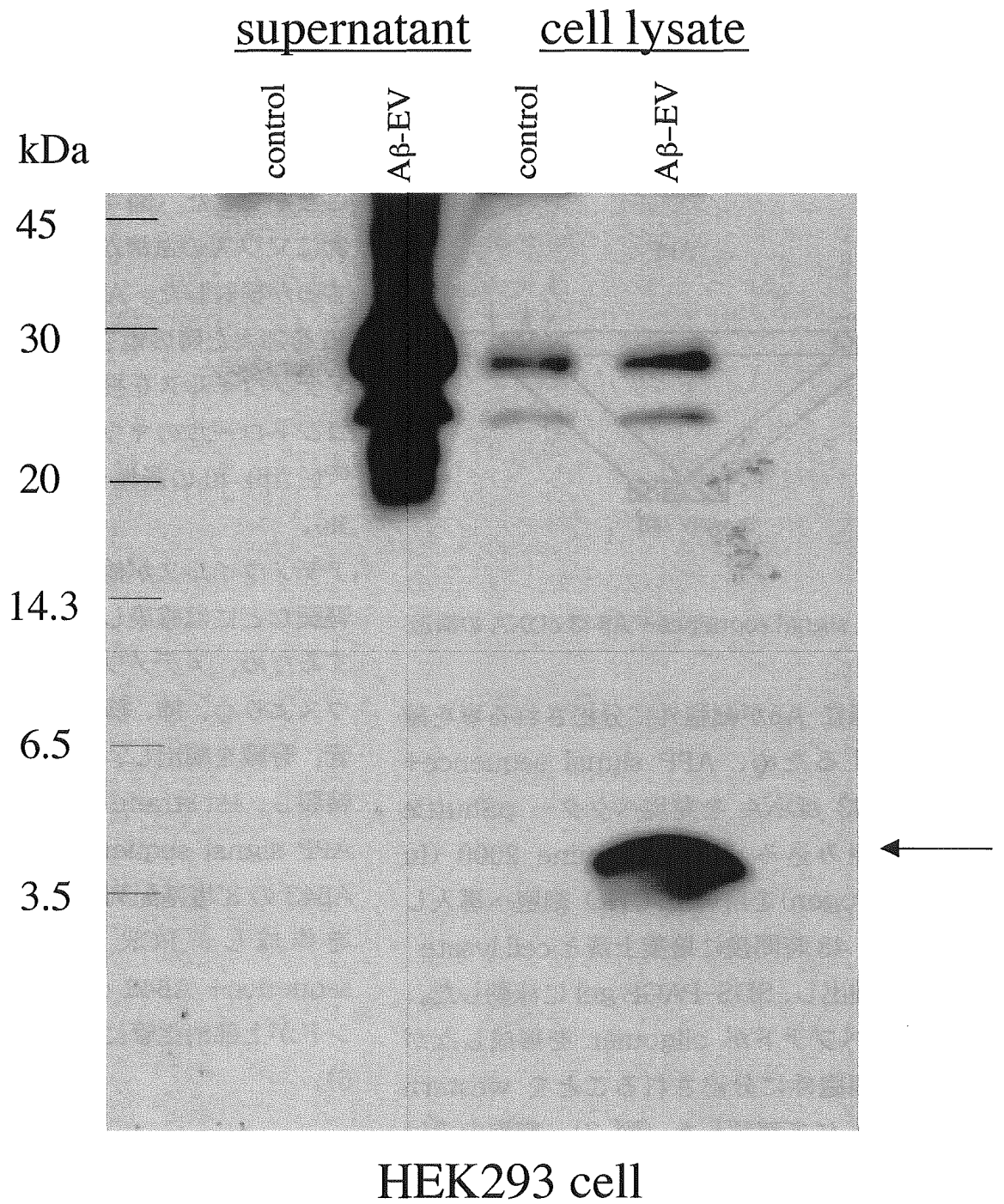
このマウスの血清は、ヒトの老人斑、特に diffuse plaque と結合し、染色することができた (図 4)。

次にマウスの血清が A β 凝集反応を阻害するか検討した。A β 凝集塊に ¹²⁵I- A β 1-40 を加えた時の値を 100% とすると、A β アデノウイルスを投与したマウス血清は、コントロールのマウス血清と比べ有意に ¹²⁵I- A β 1-40 の凝集・結合を阻害した (図 5b)。

アデノウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを確認するため、アデノウイルスを投与したマウスより心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管、腎臓を摘出し、各組織より RNA を精製し、1st strand cDNA を作成した。APP signal sequence の 5' 塩基配列と A β 43 の 3' 塩基配列から PCR 用 primer を作成し、PCR を行った。signal sequence+ A β 43 cDNA (200 bp) のバンドが上部消化管にのみ認められた (図 6)。

腸管に免疫した場合には、細胞性免疫を惹起しにくい現象が報告されている。そこでアデノウイルスを投与したマウス脾細胞を分離し in vitro において A β 42 ペプチドに対する細胞増殖反応を解析した。

図2 ウェスタンブロットテイング



アデノウイルスを投与したマウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5×10^4 細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 48 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった (図 7)。

D. 考察

我々は、アデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った。

アデノウイルスベクターの経口投与の利点としては、1 回の投与により、比較的長期 (約 6 ヶ月間) に腸管において抗原提示ができ、しかも胃液などにより分解されにくく、腸管上皮細胞に感染後はレトロウイルスのように染色体に組み込まれないため、細胞内でウイルスは自己増殖せず、腸管細胞の新陳代謝による脱落によりアデノウイルスも死滅し安全である。他の臓器への拡散・感染も無い。細胞性免疫は惹起せず抗体産生のみ誘導するなどが挙げられる。

方法として、アデノウイルスベクターに A β cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノウイルスを経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A β

抗原を腸管細胞に発現させ、免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導する事を想定している。我々は、APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence (18 アミノ酸) を A β 43 の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+ A β 43 cDNA を作成し、効率よく A β が細胞外に分泌されるようなアデノウイルスベクター (pAdeno-X-signal seq-A β 43) を開発した。この新しいベクターを導入した細胞では、A β ペプチドが oligomer を形成しながら細胞外に分泌されることを western blot にて確認した。pAdeno-X-signal seq-A β 43 のウイルス粒子を HEK293 細胞内にて大量に産生させ、超遠心にて精製した。そしてアデノウイルス粒子を通常の C57BL/6J マウスに経口投与し、血清中に A β 42 に対する抗体が産生されたことを確認した。血清中の抗体価は、主として経口投与後 4 週間でピークを示し、調べ得た範囲では、5 ヶ月後まで抗体の産生を認めた。

このマウスの血清は、ヒトの老人斑、特に diffuse plaque と結合し、染色することができた。

さらに A β アデノウイルスを投与したマウス血清は、コントロールのマウス血清と比べ有意に ^{125}I -A β 1-40 の凝集・結合を阻害した

マウスの脾細胞から T 細胞を分離し、A β

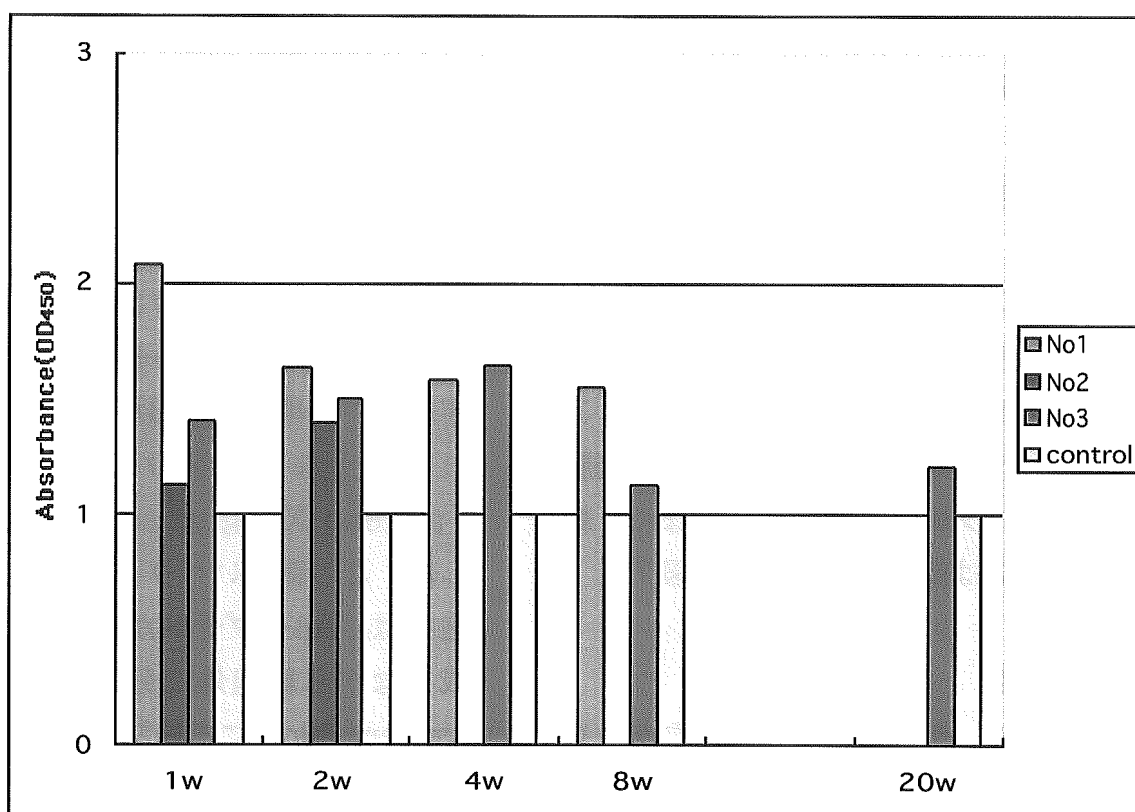


図3 マウス血清中の抗 A β 抗体の測定(ELISA)

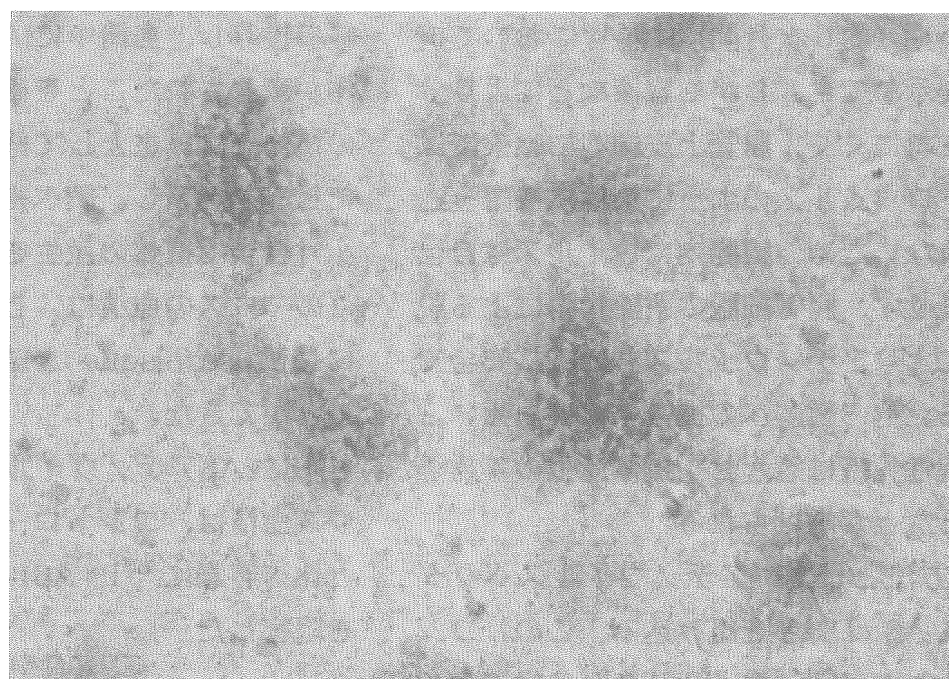


図4 マウス血清によるヒト老人斑の免疫染色

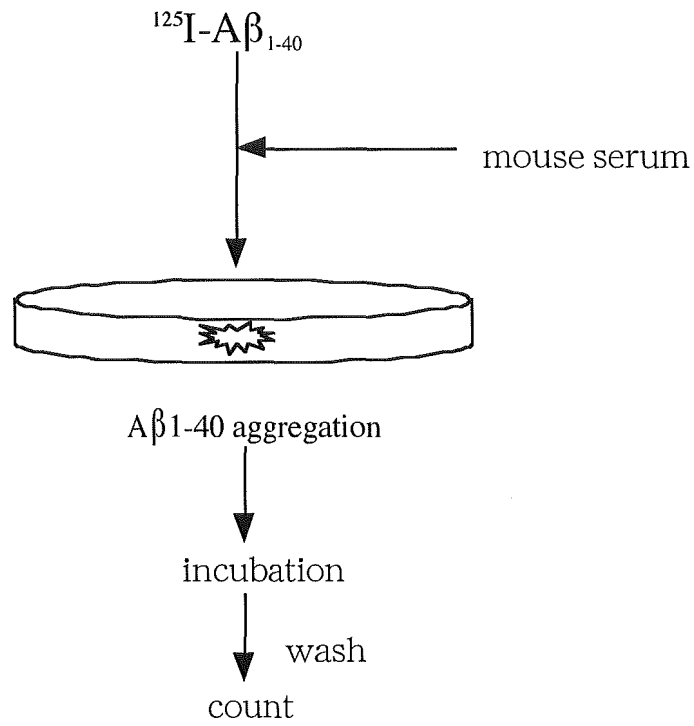


図 5a $^{125}\text{I-A}\beta_{1-40}$ binding inhibition assay の概略

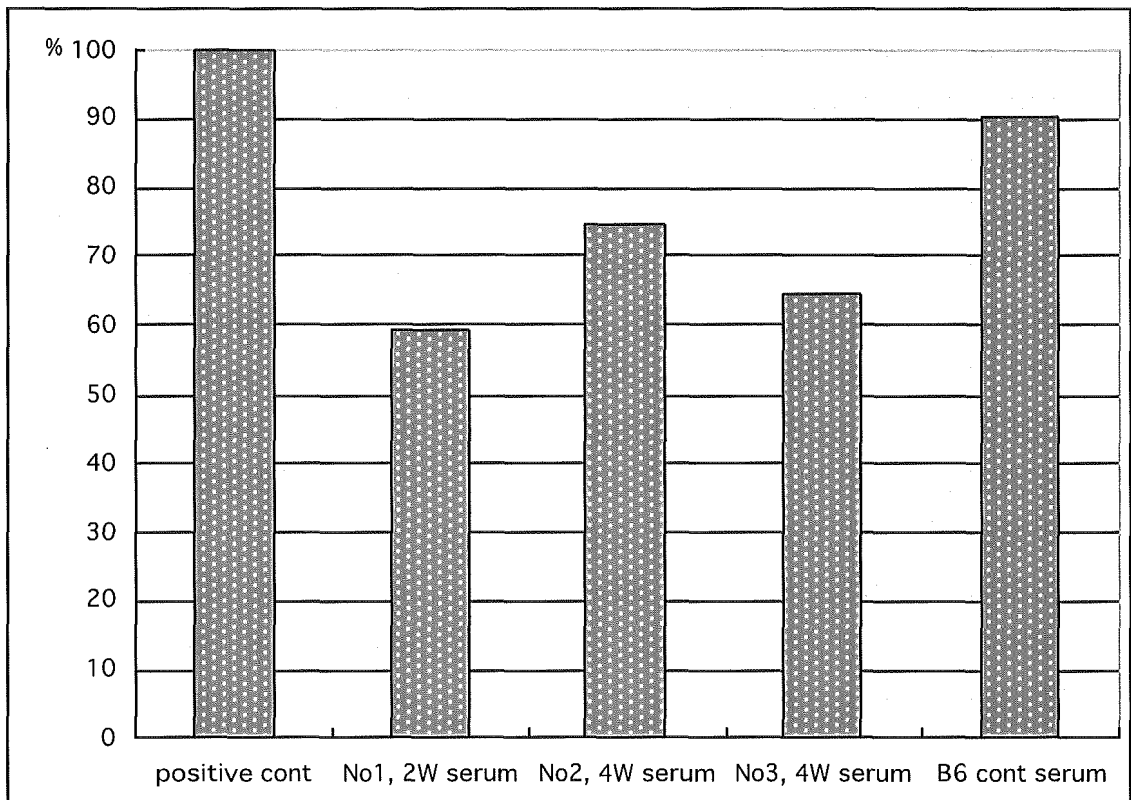


図 5b $^{125}\text{I-A}\beta_{1-40}$ binding inhibition assay 結果

ペプチドへの反応性を細胞増殖を解析した。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であり、細胞性免疫は惹起されていないことを確認した。

安全性の確認のため、アデノウイルスが他の臓器、脾臓、肝臓、腎臓などには感染していないことを、臓器から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、上部腸管組織においてアデノウイルスの発現が認められた。

E. 結論

我々は、A β を発現するアデノウイルスベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口内服治療法の開発を行った。腸管細胞から効率よく A β 蛋白を分泌できるような cDNA を作成した。アデノウイルス粒子を C57BL/6J マウスに1回のみ経口投与し、血清中に A β に対する抗体が産生されることを確認した。抗体産生は、5ヶ月後まで持続した。さらにこの抗体は、A β 蛋白の凝集も阻害する作用が認められた。アデノウイルスが他の臓器に感染していないことを各臓器から精製した RNA を用いて RT-PCR で解析した。アデノウイルスは、上部消化管組織のみ検出された。アデノウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A β 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応

は低応答であった。これにより、抗体産生のみ誘導でき、細胞性免疫は惹起しないという利点を確認された。

我々のアデノウイルスベクターを用いた経口投与による免疫学的治療法の開発は、独創的であり将来有効な遺伝子治療の1つとして期待される。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Ab42 labeling. *J. Alzheim. Dis.* 3: 231-239, 2001.

2. Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T: Mutational analysis of the tau gene in patients with frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21: 450-455, 2001

3. Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Maruyama K, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J. Biol. Chem.* 275: