

厚生科学研究費補助金

効果的医療技術の確立推進研究事業

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 英夫

平成 15 (2003) 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.	アルツハイマー病の動物モデルに対する経口ワクチン療法の効果と副作 用に関する研究-----	11
	原 英夫、高橋慶吉	
2.	A β 発現アデノ随伴ウイルスを経口投与した APP トランス ジェニックマウスの免疫組織解析-----	21
	田平 武	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	31
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	32

厚生科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

総括研究報告書

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

我々は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発を行った。AAVベクターにA β cDNAを組み込み、このrAAV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、腸管粘膜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。APP-Tgマウスに経口投与後、血清中のA β に対する抗体は、4週後をピークとして、6ヶ月間持続した。またこの抗体は、in vitroでのA β の凝集を抑制した。rAAVを用いたワクチン療法は、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、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、アジュバントを必要としないため強い免疫反応を起こさず脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。10ヶ月齢のAPP-Tgマウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。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、脳および腎臓を含め他臓器に炎症所見は認められなかった。アデノ随伴ウイルスを用いた経口ワクチン療法は、脳炎などの副作用もなく、極めて有効な治療法と考えられる。

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 ペプチドの免疫投与が行われたが、脳炎などの副作用が問題となり治験は中止されている。昨年度我々は、アルツハイマー病に対する新しい安全な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報告した。今年度は、さらに抗原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターに A β cDNA を組み込みこんだりコンビナントアデノ随伴ウイルス (recombinant AAV, rAAV) を作製した。アルツハイマー病のモデルマウスの APP transgenic mouse (Tg2576, Taconic 社、Mayo Clinic) に経口投与し、腸管上皮細胞に感染させた。そして A β 抗原を腸管

細胞に発現させ、腸管粘膜免疫系に抗原提示し、A β に対する抗体産生を誘導し、中枢神経系での老人斑の形成とアミロイド沈着を抑制するかどうか、その治療としての有効性及び副作用を検証した。

B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築

amyloid- β 1-43(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。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 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence + A β 1-43 cDNA を作成し、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) に組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に transfection し、recombinant adeno-associated virus (rAAV) を得た。さらにアデノ随伴ウイルス粒子を HEK293 細胞の大量培養により産生し、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、GFP (Green fluorescence protein) を発現するアデノ随伴ウイルス (GFPrAAV) を作成した。

2. アデノ随伴ウイルスの経口投与
アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576) は、Taconic 社(Mayo Clinic)から購入した。15週齢の APP transgenic mouse に A β 1-43rAAV 5×10^{11} genome を1回のみ経口投与した。

3. 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、アデノ随伴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。

4. マウスの血清が *in vitro* で 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 120 μ M の濃度に調整し、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。24時間後に A β の凝集が開始するのが見られた。この A β の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20(vol: vol)の濃度で加え、37 $^{\circ}$ C で1週間インキュベーションした。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、2 μ M Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter (445nm, excitation; 490nm, emission)を用いて測定した。

5. 組織からの DNA 抽出及び PCR。
アデノ随伴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、Tris 溶液の中で組織を homogenate した後、proteinase K で蛋白を分解し、phenol/chloroform 処理し、DNA を精製した。次に、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)の promotor 領域の 5'塩基配列とベクターの 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 に泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

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。
アデノ随伴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。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. 免疫組織染色

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(4G8:1000 倍希釈) またはラビット抗 A β 40 抗体(1000 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。

中枢神経系にリンパ球の浸潤の有無を検索するため、抗 CD4 抗体、抗 CD86 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 GFAP 抗体(アストロサイト)、抗 Iba-1 抗体(ミクログリア) などの抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色した。

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

A β ペプチドを効率的に細胞外へ分泌させるために、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 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; signal sequence+ A β 1-43 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(A β 1-43pXX) を開発した。

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 pXXUF1 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。細胞内では多量の A β ペプチドモノマー 4kDa の蛋白が認められた。

A β アデノ随伴ウイルスの作製には、A β 1-43 pXXUF1, Rep/Cap plasmid, E2A/E4/VA plasmid を HEK293 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、293 細胞を大量培養後、cell lysate からウイルス粒子を CsCl の超遠心により精製した。

15 週齢の APP transgenic mouse (Tg2576) に A β 1-43rAAV 5x10¹¹ genome を 1 回のみ経口投与した。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、6ヶ月後まで抗体の持続的産生を認めた。

次にマウスの血清が *in vitro* で 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 120 μ M の濃度に調整し、この A β の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20(vol: vol)の濃度で加え、37°C で1週間インキュベーションした。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、2 μ M Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter で測定した。A β rAAV 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 *in vitro* で 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 DNA を精製した。アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) の promotor 領域の 5'塩基配列とベクターの 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 に泳動した。目的とする 500bp のバンドは、上部消化管組織のみに認められた。

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。

A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP Tg マウスを、投与後 6ヶ月に解剖し、上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現を認めた。

未処置の APP transgenic mouse (Tg2576) は、加齢と共にアミロイド沈着が進み、6ヶ月齢では脳に軽度の沈着を認めるのみである。

しかし 10ヶ月齢になると、アミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認められるようになる。神経細胞内のアミロイド沈着も散見される。

一方、A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、投与後 6ヶ月 (10ヶ月齢) の脳を解析すると、コントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人

斑も激減していた。脳の矢状断面におけるアミロイド斑の数を計測したところ、未治療のコントロール群では、平均 76 個に対し、A β 1-43rAAV 治療群では 8 個と約 90% 減少していた。コントロール群に散見された神経細胞内のアミロイド沈着は、治療群では殆ど認められなかった。

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、炎症所見は認められなかった。脳組織を T 細胞マーカー(CD4)、T 細胞活性化分子(CD86)で染色したが、コントロール群・治療群とも陰性であった。末梢のマクローファージ(CD11b, Mac-1)マーカーも陰性であった。アストロサイトマーカーは(GFAP)、両群で差が無かった。治療群の前頭葉、側頭葉に活性化したミクログリア(Iba-1 陽性)の増加を認めた。

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、現在 3 つの説がある。第一の説は、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、分泌された A β にも抗体が結合してミクログリアが貪食し、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。第二の説は、A β ペプチドを投与し A β に対して産生された抗体は、A β の N 末のアミノ酸を認識して結合し、凝集・不溶化した A β を可溶化し、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、アミロイド沈着を減少させるという説である。第三の説は、A β に対する抗体は、血液脳関門を越えず、末梢血・末梢組織において A β を減少させることによ

り、中枢神経系から A β を末梢に引き出すという sink 説である。

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が、5%の患者において脳髄膜炎の副作用が発現し、試験は中止されている。

この Elan 社によるワクチンも鼻粘膜に投与するワクチンもアジュバントを必要としている。アジュバントは、強い免疫活性化作用があり、T リンパ球などの細胞性免疫も惹起する。このため、一部の患者では A β に反応する T リンパ球が脳に浸潤し、アレルギー性実験的脳脊髄炎様の脳髄膜炎を引き起こしたのではないかと推察される。

我々は、アデノ随伴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。

アデノ随伴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随伴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。アジュバントを必要とせず、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。今年度は、前回用いたアデノウイルスベクターに比べ、より抗原性が低く安全なアデノ随伴ウイルスベクターを用いた。

経口ワクチンの方法として、アデノ随伴ウイルスベクターに A β 1-43 cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴ウイルス(A β rAAV)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、腸管粘膜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 1-43 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 (A β 1-43pXX) 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。A β 1-43rAAV 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。そしてアデノ随伴ウイルス粒子をアルツハイマー病のモデルマウスである APP トラン

スジェニック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、6 ヶ月後まで抗体の産生を認めた。

さらに A β rAAV 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 *in vitro* で 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 ペプチドへの反応性を細胞増殖試験で解析した。アデノ随伴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、アデノ随伴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 DNA を用いて PCR を行ったところ、上部腸管組織においてアデノ随伴ウイルスベクター DNA のバンドを認めた。

A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）の脳を解析すると、コントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も消失していた。矢状断面のアミロイド斑の数は、未治療のコントロール群

では、平均 76 個に対し、治療群では 8 個とコントロール群の 10% 程度に減少していた。また治療群のマウスの前頭葉、側頭葉に活性化したミクログリア (Iba-1 陽性) の増加を認めた。これは沈着したアミロイドに対して抗体が結合し、それをミクログリアが貪食してアミロイドを除去していると考えられる。

A β 蛋白に対する抗体が産生されるため、諸臓器において自己免疫反応による炎症が起こる可能性が考えられたが、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、炎症所見は認められなかった。脳組織での検索で、CD4 陽性 T 細胞の浸潤は認められなかった。

我々が開発したアデノ随伴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ので、さらに高等な痴呆を示すイヌやサルに経口ワクチンを行う予定である。Phase I 臨床試験でヒトにおいて安全性を確認後、Phase II 臨床試験を計画している。欧米では、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

我々のアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口投与によるワクチン療法の開発は、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。

アデノ随伴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随伴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。またアジュバントを必要としないため、脳髄膜炎などの副作用も抑えられる。

アデノ随伴ウイルスを用いた経口ワクチン療法は、アルツハイマー病に対して極めて有効な治療法と考えられる。

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. Santa Y, Uyama E, Chui D-H, Arima, M, Koto, S, Takahashi K, Tabira T: Genetic, clinical and pathological Studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscles cell degeneration for the pathogenesis. Proceeding of the second international Congress on Vascular Dementia (Korczen AD, ed), Monduzzi Editore, pp45-57, 2002.

2. 高橋慶吉: 脳血管痴呆と Notch3 遺伝子. 生体の科学, 53, 473-477, 2002

3. Tabira T, Chui DH, Kuroda S.: Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. Front Biosci. 7: a44-9, 2002

4. Tanahashi, H, Asada T, Tabira T.: c954C>T polymorphism in the Fe65L2 gene is associated with early-onset Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 52 (5): 691-693, 2002

5. Tanahashi H, Tabira T. :

Characterization of an amyloid precursor protein (APP)-binding protein Fe65L2 and its two novel isoforms lacking phosphotyrosine interaction domain. *Biochem J* 367 (Pt 3): 687-695, 2002

6. Tabira T, Chui DH, Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M.: Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. *Journal of Neuroscience Research* 70: 367-372, 2002

2. 学会発表

田平 武：アルツハイマー病と免疫。
第15回日本神経免疫学会学術集会、
3月14日、2003、長崎。

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。

アルツハイマー病の動物モデルに対する経口ワクチン療法の効果と副作用に関する研究

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、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いたアルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発を行った。AAVベクターにA β cDNAを組み込み、このrAAV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、腸管粘膜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。APP-Tgマウスに経口投与後、血清中のA β に対する抗体は、4週後をピークとして、6ヶ月間持続した。またこの抗体は、in vitroでのA β の凝集を抑制した。rAAVを用いたワクチン療法は、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、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、アジュバントを必要としないため強い免疫反応を起こさず脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

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 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 ペプチドの免疫投与が行われたが、脳炎などの副作用が問題となっている。昨年度我々は、ア

アルツハイマー病に対する新しい安全な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報告した。今年度は、さらに抗原性が低いアデノ随伴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随伴ウイルス(recombinant AAV, rAAV)を作製した。アルツハイマー病のモデルマウスの APP transgenic mouse (Tg2576, Taconic 社、Mayo Clinic)に経口投与し、腸管上皮細胞に感染させた。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し、アミロイド沈着を抑制するかどうか、その治療としての有効性及び副作用を検証した。

B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築 amyloid- β 1-43(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。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 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 1-43 cDNA を作成し (図 1)、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)に組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に transfection し、recombinant adeno-associated virus (rAAV)を得た。さらにアデノ随

伴ウイルス粒子を 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、GFP (Green fluorescence protein)を発現するアデノ随伴ウイルス (GFP rAAV)を作成した。

2. アデノ随伴ウイルスの経口投与

アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576)は、Taconic 社(Mayo Clinic)から購入した。

15 週齢の APP transgenic mouse に A β 1-43 rAAV 5×10^{11} genome を 1 回のみ経口投与した。

3. 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、アデノ随伴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。

4. マウスの血清が *in vitro* で 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 120 μ M の濃度に調整し、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。24 時間後に A β の凝集が開始するのが見られた。この A β の凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20(vol: vol)の濃度で加え、37 $^{\circ}$ C で 1 週間インキュベーションした。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、2 μ M Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter (445nm, excitation;

490nm, emission)を用いて測定した。

5. 組織からの DNA 抽出及び PCR。

アデノ随伴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、Tris 溶液の中で組織を homogenate した後、proteinase K で蛋白を分解し、phenol/chloroform 処理し、DNA を精製した。次に、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) の promotor 領域の 5'塩基配列とベクターの 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。

アデノ随伴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。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

A β ペプチドを効率的に細胞外へ分泌させるために、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 1-43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; signal sequence+ A β 1-43 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 (A β 1-43pXX) を開発した (図 1)。

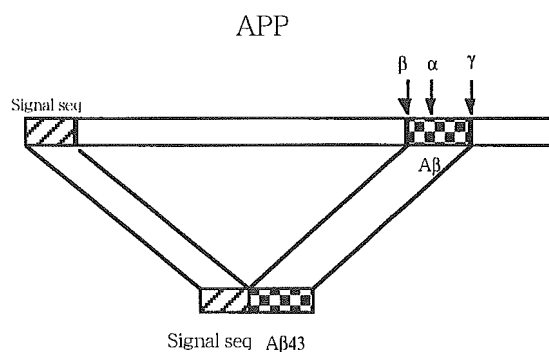


図 1 signal sequence+ A β 43 cDNA の構造

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 pXXUF1 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。Aβ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。細胞内では多量の Aβペプチドモノマー4kDa の蛋白が認められた。

(Tg2576) に Aβ1-43rAAV 5x10¹¹ genome を1回のみ経口投与した。経時的に採血し血清中の抗 Aβ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、6ヶ月後まで抗体の持続的産生を認めた。

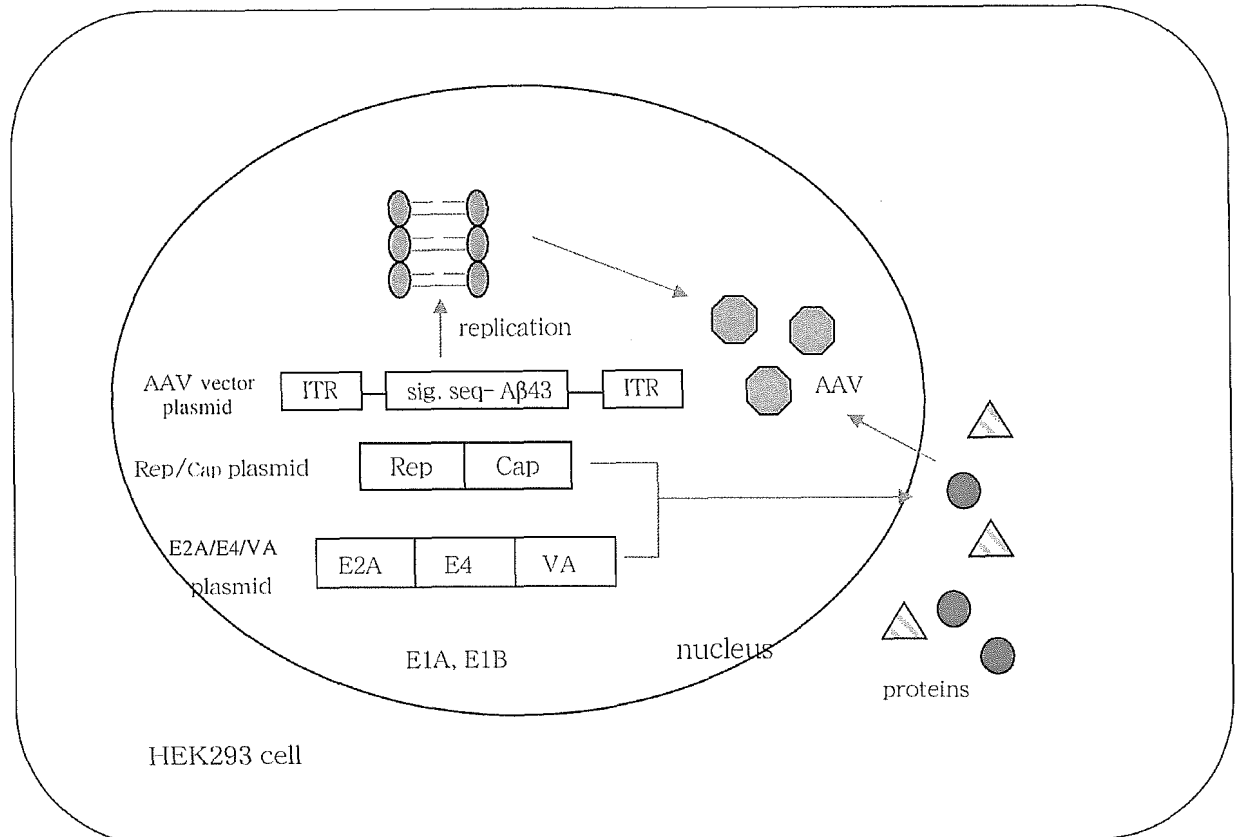


図2 Aβアデノ随伴ウイルスの作製。

Aβアデノ随伴ウイルスの作製には、Aβ1-43 pXXUF1, Rep/Cap plasmid, E2A/E4/VA plasmid を HEK293 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、293 細胞を大量培養後、cell lysate からウイルス粒子を CsCl の超遠心により精製した(図2)。

15週齢の APP transgenic mouse

次にマウスの血清が in vitro で Aβ凝集反応を阻害するか検討した。Aβ1-40 ペプチドを 120μM の濃度に調整し、この Aβの凝集にマウスの血清を 1:10, 1:20(vol: vol)の濃度で加え、37°C で1週間インキュベーションした。Aβ1-40 の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2μMThioflavin-T を加え Spectrofluorimeter で測定した。

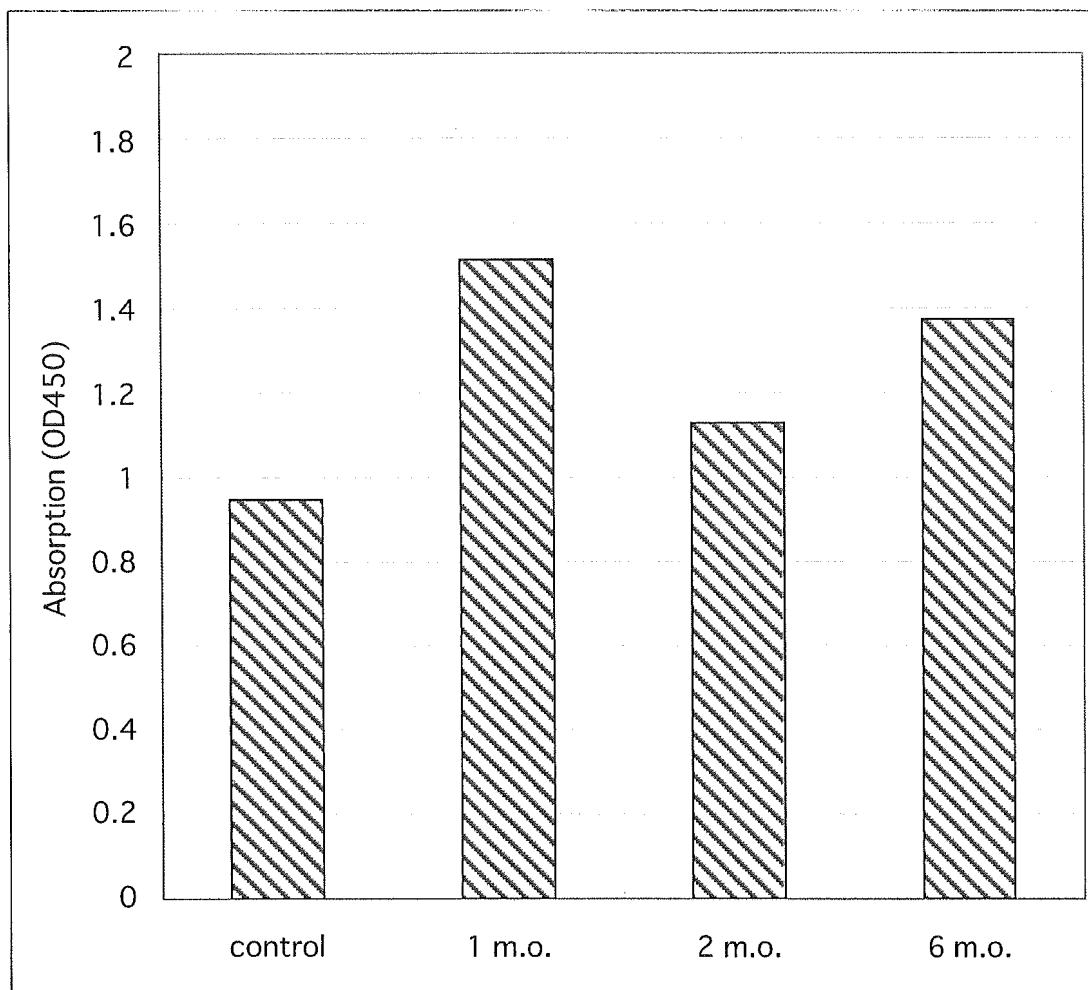


図3 マウス血清中の抗A β 抗体の産生。

A β rAAV 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 *in vitro* で A β 1-40 の凝集・結合を阻害した (図4)。

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 DNA を精製した。アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) の promotor 領域の 5'塩基配列とベクターの 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 に泳動した。目的とする 500bp のバンドは、上部消化管組織のみに認められた (図5)。

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 5×10^4 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6)。

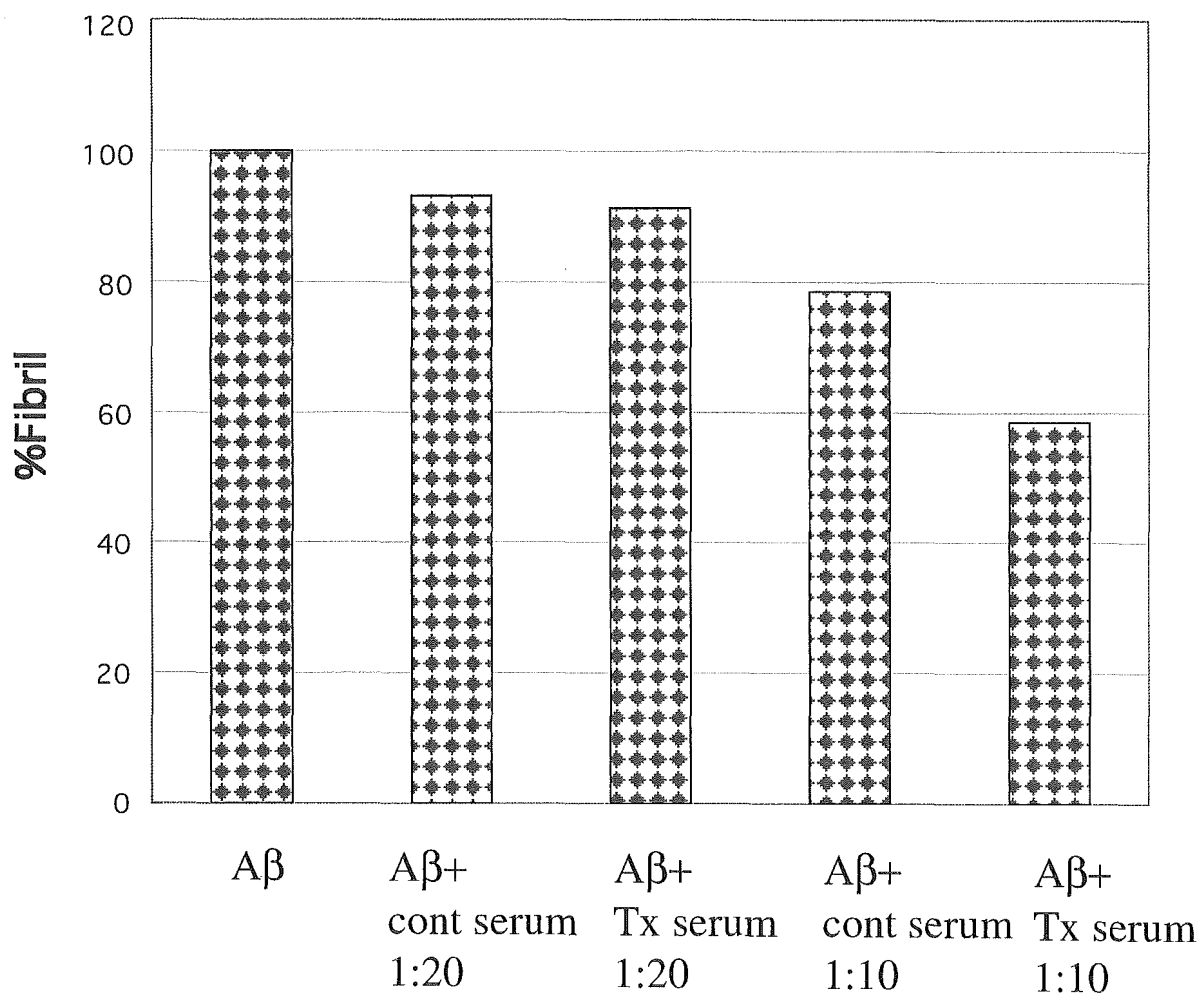


図4 マウス血清中の抗体による in vitro での A β 凝集抑制。治療したマウス(Tx)の血清は、A β 凝集を抑制した。

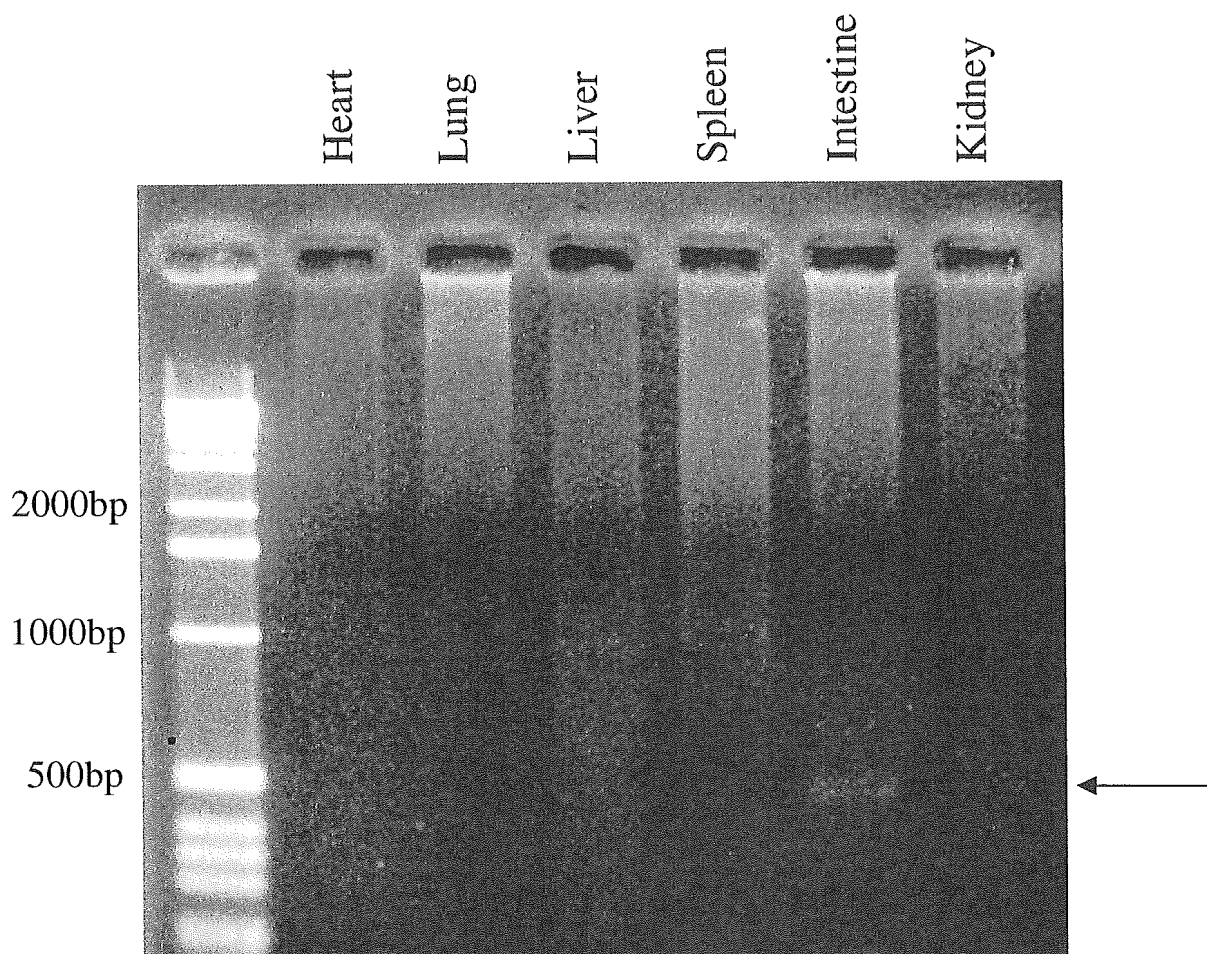


図5 治療したマウス各臓器から精製した DNA を用いて、ウイルスベクターDNA を PCR で検出した。上部消化管組織に目的の 500 bp のバンドを認める。

D. 考察

我々は、アデノ随伴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。

アデノ随伴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随伴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。前回用いたアデノウイルスベクターに比べ、より抗原性が低く安全なアデノ随伴ウイルスベクターを用いた。

経口ワクチンの方法として、アデノ随伴ウイルスベクターに A β 1-43 cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴ウイルス(A β rAAV)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、腸管粘膜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 1-43 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 (A β 1-43pXX) 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。A β 1-43rAAV 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。そしてアデノ随伴ウイルス粒子をアルツハイマー病のモデルマウスである APP トランスジェニック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、6ヶ月後まで抗体の産生を認めた。

さらに A β rAAV 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 *in vitro* で 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 ペプチドへの反応性を細胞増殖を解析した。アデノ随伴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 DNA を用いて PCR を行ったところ、上部腸管組織においてアデノ随伴ウイル