

スペクターDNA のバンドを認めた。

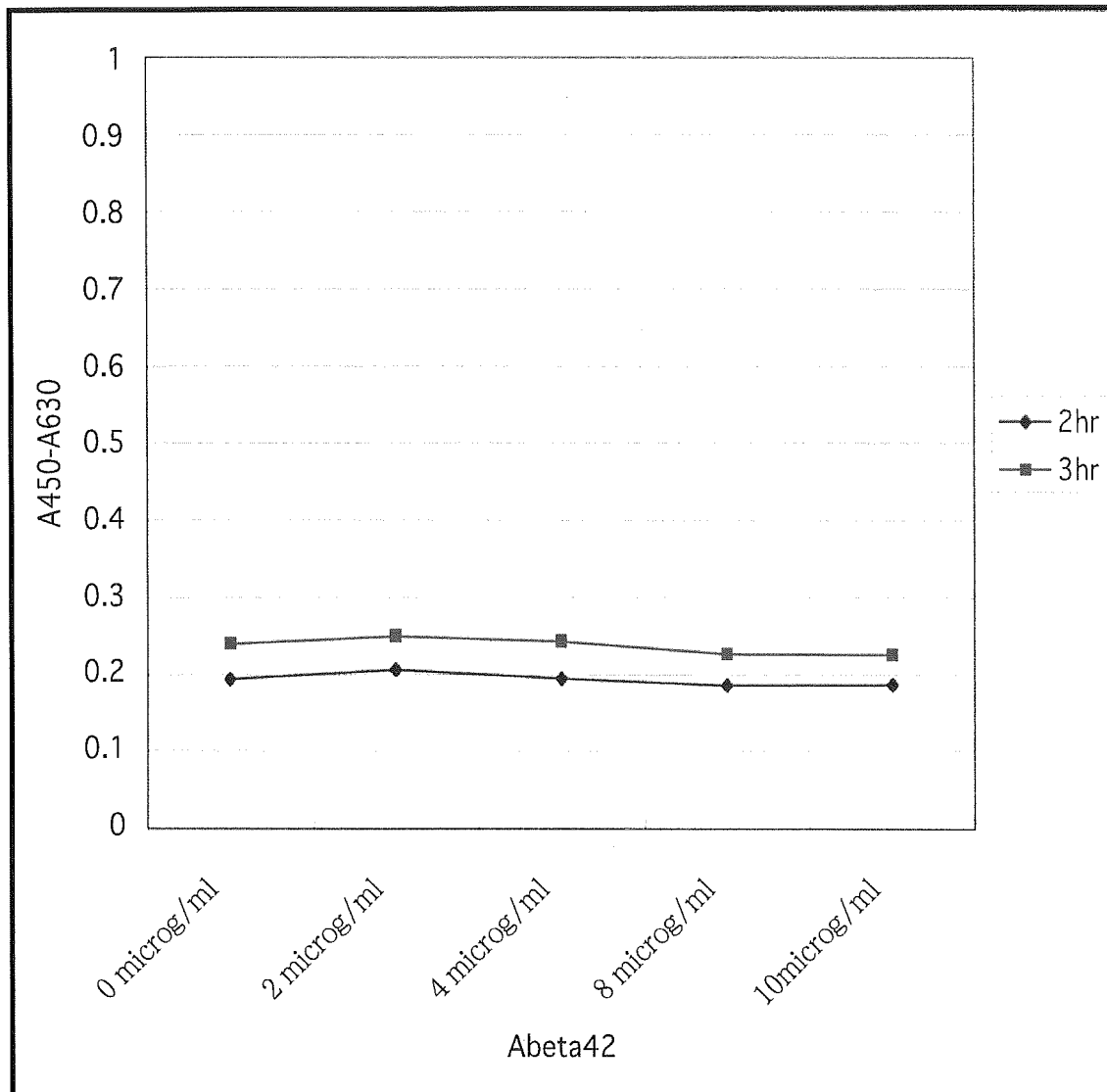


図6 治療したマウスの脾細胞の Aβ42 ペプチドに対する細胞増殖反応。Aβ42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

E. 結論

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。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。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。アルツハイマー病のモデルである 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。

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。

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 (Korczyn 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

2. 学会発表

なし

H. 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。

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

分担研究者 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 β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターをアルツハイマー病のモデルマウスに投与し各組織を解析した。APP-Tg マウスに経口投与 6 ヶ月後に解剖し、上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現を認めた。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。

A. 研究目的

欧米では、アルツハイマー病の治療として A β ペプチドのワクチン療法が行われているが、我々は、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた新しい経口ワクチン治療法の開発を試みている。今年度は、A β 発現アデノ随伴ウイルス粒子を経口投与したマウスにおいて、中枢神経系におけるアミロイド沈着や老人斑の減少・消失、上部消化管上皮細胞における A β 蛋白の発現の経過や、自己免疫反応による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ので報告する。

B. 研究方法

1.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。10-12 ヶ月齢時のマウスの組織の凍結切片を用いて実験を行った。

2.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 Aβ抗体(4G8:1000 倍希釈) またはラビット抗 Aβ40 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。

2) 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。

C. 研究結果

Aβ1-43rAAV 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 Aβ蛋白の発現を認めた(図 1)。

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(図 2)。

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(図 3 a,b)。神経細胞内のアミロイド沈着も散見される(図 4)。

一方、Aβ1-43rAAV 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(図 5)。脳の矢状断面におけるアミロイド

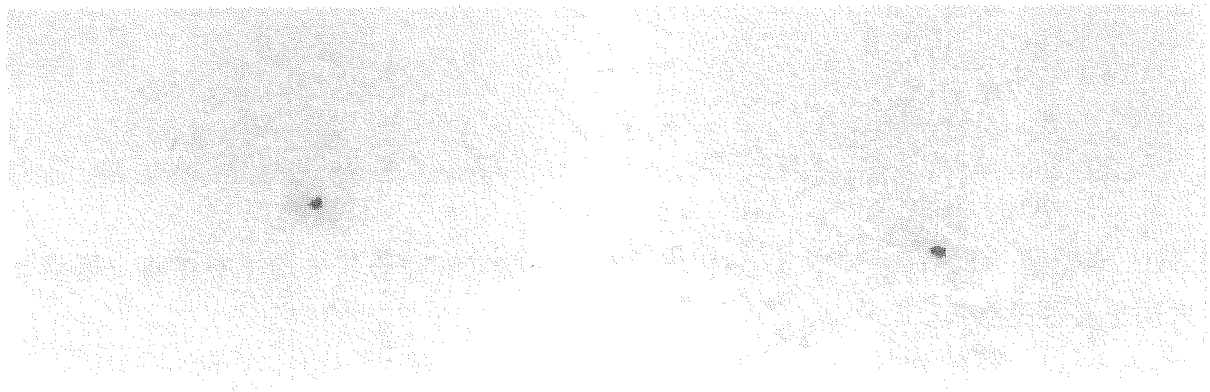
斑の数を計測したところ、未治療のコントロール群では、平均 76 個に対し、Aβ1-43rAAV 治療群では 8 個と約 90%減少していた(表 1)。コントロール群に散見された神経細胞内のアミロイド沈着は、治療群では殆ど認められなかった。

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(図 6)。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。末梢のマクロファージ(CD11b)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

欧米では、アルツハイマー病の治療として Aβペプチドのワクチン療法が行われているが、我々は、アデノウイルスベクターを用いた新しい経口ワクチン治療法の開発を試みている。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 Aβ43 の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+ Aβ43 cDNA を作成し、効率よく Aβが細胞外に分泌されるようなアデノ随伴ウイルスベクター (Aβ1-

図1 A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスの上部消化管上皮細胞に発現する A β 蛋白。



Anti A β 40 Ab

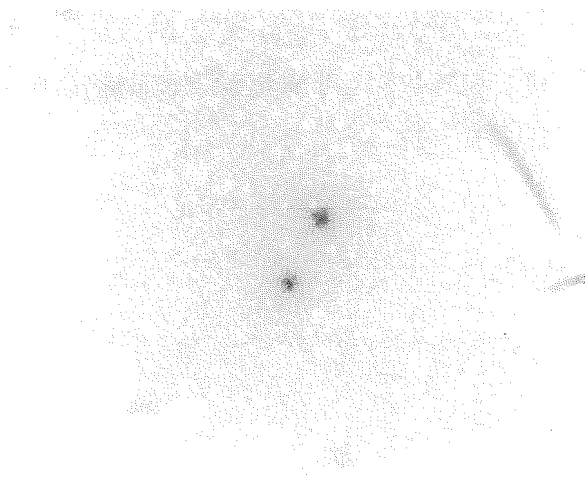
図2 未処置 APP-Tg マウス（6ヶ月齢）の脳におけるアミロイド沈着。



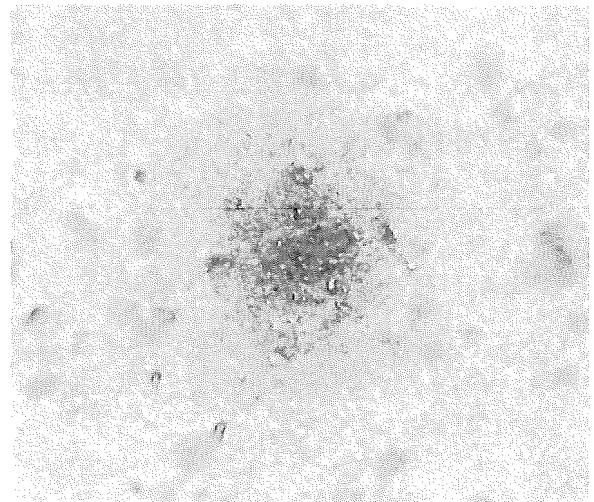
Anti A β 40 Ab

4G8

図3a 未処置 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) の脳におけるアミロイド沈着。



Anti A β 40 Ab



4G8

図3b 未処置 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) の脳におけるアミロイド沈着。著明な老人斑を多数認める。

43pXX) を開発した。

15週齢の APP transgenic mouse に A β 1-43rAAV 5x10¹¹ genome を1回のみ経口投与した。10-12ヶ月齢時にマウスを解剖し組織を解析した。

A β 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウス（治療群）においては、経口投与6ヶ月後に解剖したマウスの上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現を認めた。

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。

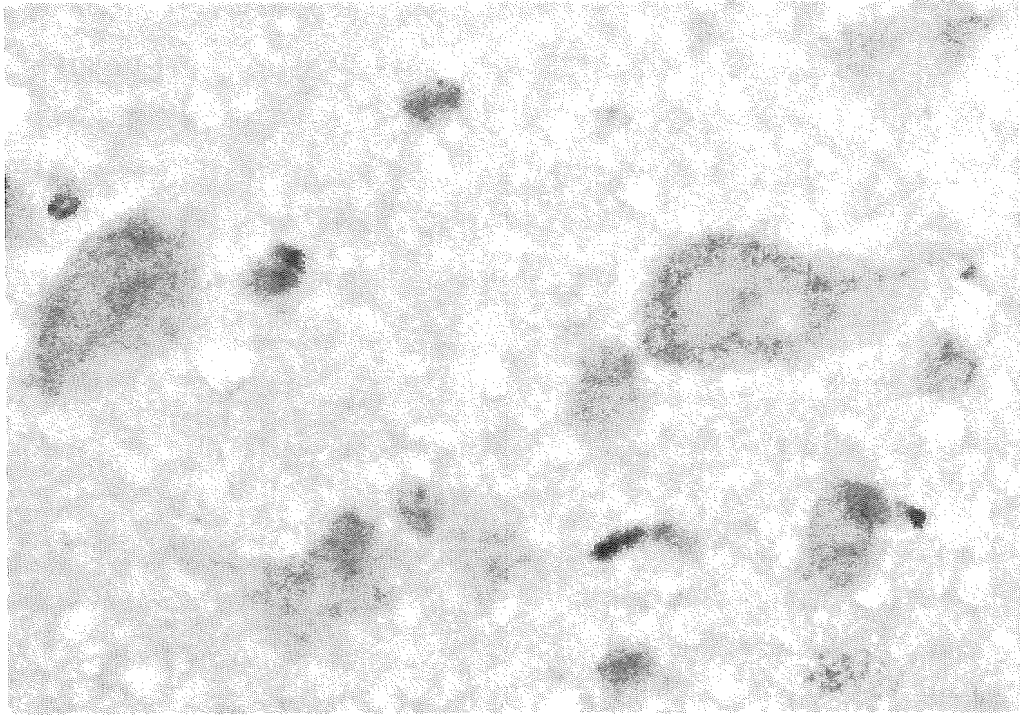
A β 蛋白に対する抗体が産生されるため、諸臓器において自己免疫反応による炎症が起こる可能性が考えられたが、最も炎症が起こりやすいと考えられる脳および腎臓を含め、炎症所見は認められなかった。脳組織での検索で、CD4 陽性 T細胞の浸潤は認められなかった。

E. 結論

15週齢の APP-Tg マウスに A β 1-43rAAV を経口投与し、6ヶ月後に解剖した。上部消化管上皮細胞に A β 蛋白が少量ではあるが持続的に発現していた。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。

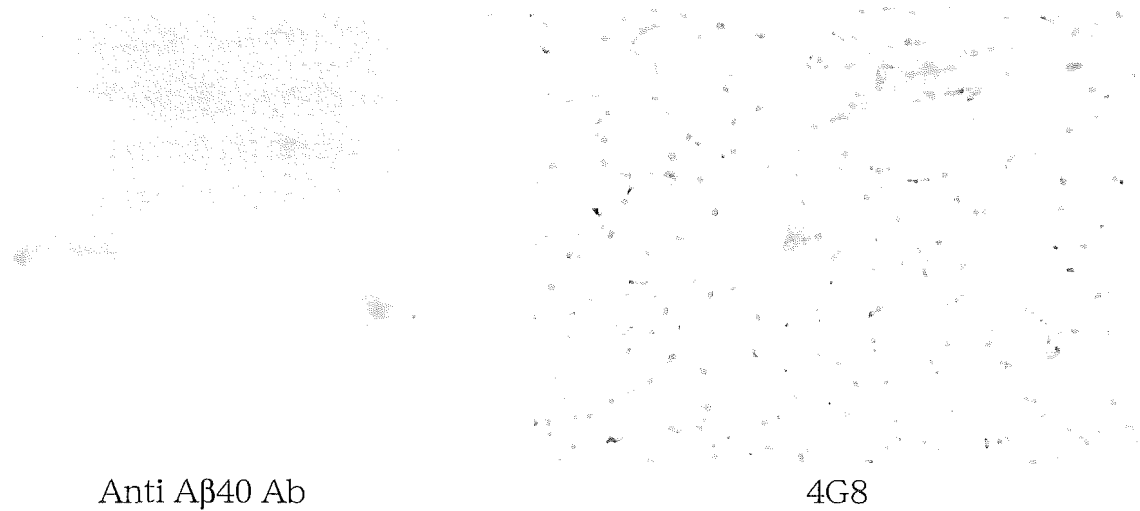
F. 健康危険情報

該当なし



4G8

図4 未処置 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) の神経細胞内のアミロイド沈着。



Anti A β 40 Ab

4G8

図5 A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) の脳におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、アミロイド沈着が著明に減少している。



コントロール

治療群

図6 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) のコントロール群と治療群の脳のアミロイド沈着の比較。

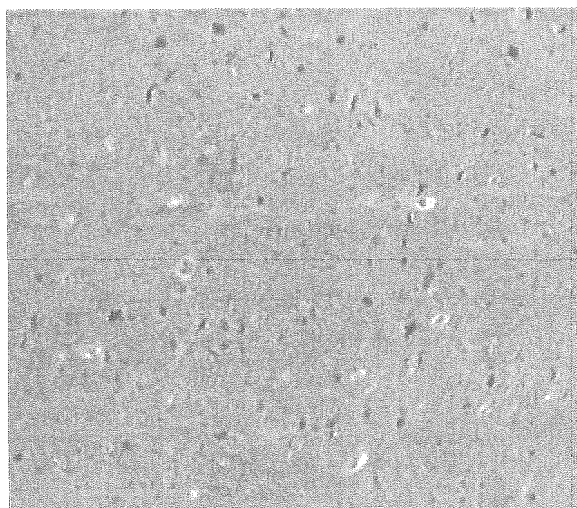
表 1

	Extracellular amyloid deposits	Intracellular amyloid deposits
Control	76	++
Treated mouse	8	±

Age; 10 months old

表 2 免疫組織染色の要約

	Control	Treated
CD4	(-)	(-)
CD86	(-)	(-)
CD11b	(-)	(-)
GFAP	(+)	(+)
Iba-1(microglia)	(+)	(++~+++)



コントロール



治療群

図7 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) のコントロール群と治療群の脳の HE 染色。両群ともにリンパ球浸潤は認められない。

Frontal lobe (Iba-1)

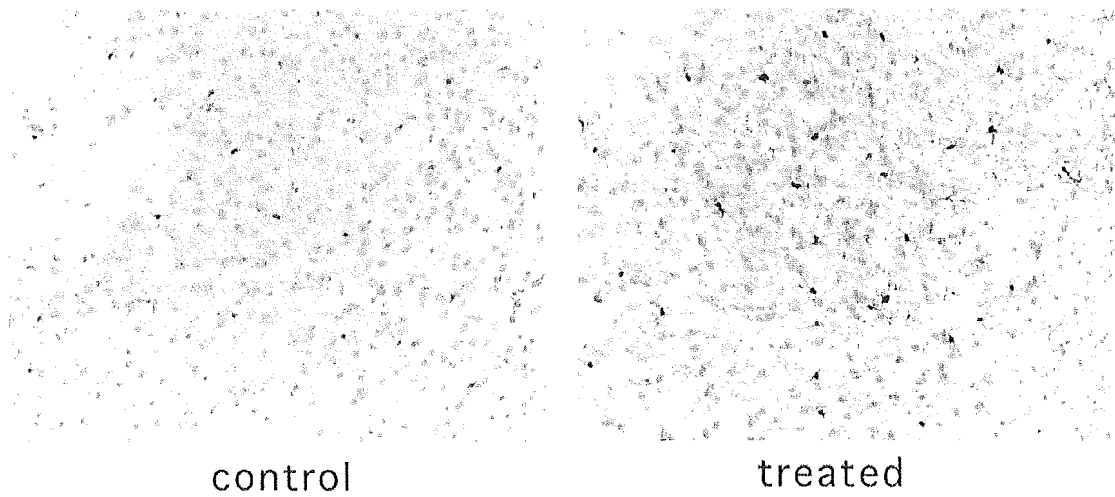


図8 APP-Tg マウス (10 ヶ月齢) のコントロール群と治療群の脳のマクログリア染色。治療群に活性化したマクログリア細胞の増殖を認める。

G. 研究発表

1)論文発表

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

2. 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

3. Tanahashi H, TabiraT. : 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

4. 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

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

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, TabiraT. : 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

20020570

以降P32－P46は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P31「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください