

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発に

関する研究

(H15-長寿-009)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 英夫

平成16 (2004) 年4月

目次

I.	総括研究報告	
	アルツハイマー病に対する経口ワクチン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投与：治療 効果と副作用に関する研究-----	16
	原 英夫、高橋慶吉	
2.	経口ワクチン（A β 発現アデノ随伴ウイルス）を投与した APP トランス ジェニックマウス脳の免疫組織学的解析-----	29
	田平 武、鍋島俊隆	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	39
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	40

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発に関する研究

主任研究者 原 英夫

国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部室長

研究要旨

我々は、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。アルツハイマー病の病因として amyloid cascade 仮説に基づき、経口ワクチン療法により抗 A β 抗体を産生させ、沈着した A β 蛋白を除去し、さらに A β の凝集を抑制することが目的である。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに分泌型 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 抗原を腸管上皮細胞に発現させ、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た。アルツハイマー病の動物モデルである APP トランスジェニック(Tg)マウスに経口投与した。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。13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。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る。さらに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（国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部室長）

田平 武（国立長寿医療センター研究所所長）

鍋島俊隆（名古屋大学大学院医学研究科医療薬学教授）

A. 研究目的

アルツハイマー病の病因として、Selkoe 等が唱える amyloid cascade 説、即ち神経細胞内の β -amyloid precursor protein (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。アルツハイマー病に対するワクチン療法は、Schenkらが、前凝集 A β 42 ペプチドをアジュバントと共に PDAPP トランスジェニックマウスに投与し、脳アミロイド沈着が減少したという報告より始まる。さらに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た報告もある。この様に A β ペプチドをワクチンとして投与し、抗 A β 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。その後、ELAN/Wyeth 社によりアルツハイマー病患者への臨床治験 (AN-1792)が開始されたが、phase II trial で、6%の患者に髄膜脳炎の副作用が起こり、1名の死亡例も報告され、治験は中止された。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随伴ウイルスベクターを用いる系を発案した。人体での抗原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターに A β cDNA を組み込みコンダ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、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 1-43) cDNA は、ヒト amyloid- β 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、大量培養により recombinant adeno-associated virus (rAAV) を産生し、セシウムクロライド超遠心にて精製した。

別に A β 1-43 の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV も同様に PCR で増幅後、アデノ随伴ウイルスベク

ター(pXXUF1)に組み込み、大量培養後に精製した。

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、30週齢の45週齢の APP transgenic mouse にそれぞれ A β 1-43rAAV 5×10^{11} genome を1回のみ経口投与した。さらに A β 1-43の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV を同様に3つの時期に分けて投与した。

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°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°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。

アミロイド沈着を定量的に解析するため、マウス脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を 4G8 抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き 3CCD カメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位 (アミロイド沈着) の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。

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、当国立長寿医療センター研究所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、当国立長寿医療センター研究所の組み換え 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 1-43pXXUF1) 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, AAV packaging plasmid, adeno helper 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 5×10^{11} 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確認するため、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、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 rAAV 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。

rAAV 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。rAAV 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。

30 週齢時に A β 1-43rAAV 粒子を APP Tg マウスに経口投与し、6 ヶ月後に解剖し、上部消化管上皮細胞の lamina propria に A β 蛋白の発現を認めた。

通常の 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が、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。

APP transgenic mouse に対して、投与時期を Group A(15 週齢時投与)、Group B(30 週齢時投与)、Group C(45 週齢時投与)の3つのグループに分け、A β 1-43rAAV をそれぞれ1回のみ経口投与した。

A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、12~13 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。アミロイド沈着を定量的に解析するため、脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を 4G8 抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き 3CCD カメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位(アミロイド沈着)の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。未治療のコ

ントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、A β 1-43rAAV 治療群では Group A ($0.55 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$), Group B ($0.48 \pm 0.35\%$, $P < 0.001$) and Group C ($0.46 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$) と有意差を持って減少していた。

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、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。末梢のマクロファージ(CD11b)マーカーも陰性であった。アストログリオーシスは治療群で改善が認められた。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。

一方、A β 1-21rAAV についても、APP transgenic mouse に対して、投与時期を Group D(15 週齢時投与)、Group E(30 週齢時投与)、Group F(45 週齢時投与)の3つのグループに分け、それぞれ1回のみ経口投与した。A β 1-21rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、12~13 ヶ月齢の脳を解析すると、同様にコントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少していた。定量的解析でもアミロイド沈着がコントロー

ル群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、Group D ($0.39 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$), Group E ($0.45 \pm 0.30\%$, $P < 0.001$), Group F ($0.37 \pm 0.20\%$, $P < 0.001$)と著明な改善が認められた。

D. 考察

アルツハイマー病は、痴呆性疾患の二大原因の1つであり、現在有効な治療法はなく、高齢化社会の進行と共に患者が増加し、社会的にも問題となっている。

アルツハイマー病の病理学的所見として、アミロイド β タンパクの凝集・沈着による老人斑の形成と異常タウ蛋白からなる神経原繊維変化 (neurofibrillary tangles: NFT)の2つが大きな特徴である。アルツハイマー病の病態仮説として、現在ではアミロイドカスケード仮説が有力である。すなわち細胞外に分泌された $A\beta$ ペプチドが不溶化し凝集・蓄積することがアルツハイマー病の病態の本質であるという仮説である。アルツハイマー病のワクチン療法の治療的根拠は、このアミロイドカスケード仮説を基盤としている。

アルツハイマー病に対するワクチン療法は、Elan社のSchenkらが、pre-aggregated $A\beta_{42}$ をアジュバントと共にPDAPP-Transgenic (Tg)マウスに筋肉投与し、脳アミロイド沈着が減

少したという報告より始まる。PDAPP transgenic mouseは、PDGF promotorに変異型アミロイド前駆タンパク (amyloid precursor protein, APP)を組み合わせたもので、amyloid- β を大量に産生し、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、アルツハイマー病の動物モデルとして用いられている。Schenkらは、最初6週齢のPDAPPマウスにpre-aggregated $A\beta_{42}$ $100\mu\text{g}$ を計11回免疫し、13ヶ月齢になったマウスの脳を解析した。マウス血清中の抗 $A\beta$ 抗体価は、10,000倍以上に上昇した。pre-aggregated $A\beta_{42}$ で免疫したマウスでは脳アミロイド沈着が消失し、変性軸索やアストログリオシスも有意に減少していた。さらに11ヶ月齢のマウスに同様のプロトコールで免疫したところ、 $A\beta$ 蓄積が15ヶ月齢では96%、18ヶ月齢では99%以上、コントロールに比べ減少した。Weinerは、 $A\beta$ ペプチドをスプレーにてマウスの鼻粘膜に投与しても、抗体産生が誘導され、PDAPP miceの脳内の老人斑が減少した事を報告している。この方法で投与されたマウスの脳には、単核球 (リンパ球) が浸潤しており、IL-4, IL-10, TGF- β を分泌していた。

Bardらは、 $A\beta$ に対するモノクローナル抗体 (10D5, 3D6)をPDAPPマウス

の腹腔に週2回、6ヶ月間投与した (Passive transfer)。脳アミロイド斑は80%以上減少したと報告している。また彼らは PDAPP マウス脳の未固定凍結切片上にミクログリア細胞と抗 A β モノクローナル抗体を同時に加えたところ(ex vivo assay)、アミロイド斑が消失した。その機序としてミクログリア細胞の Fc-receptor mediated phagocytosis によるアミロイド除去が考えられた。

これらのアルツハイマー病のモデルマウスの高次脳機能を water maze test (T 型水迷路試験) を用いて解析したところ、A β ペプチドの免疫投与により短期記憶や空間認知機能の改善が認められたという報告もされている。

Elan 社および Wyeth 社によるアルツハイマー病患者への臨床治験(AN-1792)が開始された。AN-1792 は、合成 A β 42 をアジュバント(QS21)とともに筋肉注射するもので、投与された患者の血清中に A β に対する抗体も確認された。この患者血清抗体を用いて APP^{sw} x PS1^{M146L} マウスの脳切片を染色すると、老人斑(diffuse plaque) やくも膜下血管、穿通枝血管が染色され(血管壁に沈着した amyloid- β に反応)、thioflavin S による二重染色で同じパターンを示したことより、血清抗体はアミロイドの β シート構造を

認識していることが判明した。一方この血清抗体は、ニューロンやグリア細胞を染色せず、アミロイド前駆タンパク(APP)や細胞内 A β とは反応しなかった。患者髄液中にも抗 A β 抗体が存在し、脳血液関門(blood-brain barrier, BBB)の障害の有無(髄液・血清アルブミン比、IgG index が正常)に関わらず抗体が検出されたことより、血清中の抗 A β 抗体が髄液中に移行しうることが考察された。また髄膜脳炎を起こした患者例では、中等度の抗体価の増加があり、メチルプレドニゾロンによる治療後に脳炎の症状は改善したが、髄液中の抗体価は治療前と同程度であった。

2001年に始まった AN-1792 phase II trial で、6% (298名中18名)の患者に髄膜脳炎の副作用が起り、1名の死亡例も報告され、治験は2002年1月に中止された。一方、placebo投与群では、一例も髄膜脳炎の発症は無かった。髄膜脳炎は、初回ワクチン投与後3ヶ月以内に起こっており、大部分の患者は数週間で改善を示したが、4名の患者では再発があった。1名の死亡例は、72歳の女性で、5年の経過の緩徐進行性の記憶障害があった。この女性は、2000年7月から AN-1792(pre-aggregated A β 42; 50 μ g)を5回投与され、42週後の2001年5月に脳炎を発症してい

る。治験は直ちに中断され脳炎の治療が行われたが、最初の治療より 20 ヶ月後の 2002 年 2 月に肺塞栓のため死亡した。この患者の脳組織を病理学的に詳細に検索したところ、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が、神経原繊維変化、neuropil thread, アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy, CAA) は残存していた。老人斑が消失している部位の中では、A β 分解産物を貪食したミクログリアの像も認められた。この所見は、A β に結合した抗体を Fc receptor を介してミクログリアが貪食していることを示している。大脳白質では、髄鞘繊維の減少とマクロファージの浸潤している部位が認められ、この部位は、MRI 画像上の高信号領域と一致していた。脳炎の所見としては、髄膜、髄膜血管周囲および大脳皮質への T 細胞の浸潤が認められ、この T 細胞は、CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺T cell であった。CD8⁺T cell と B cell の浸潤は認められなかった。

先ほど述べたように、患者血清中の抗 A β 抗体は、ニューロンやグリア細胞とは反応しなかったことより、抗体による脳の炎症が起きたとは考えにくい。Elan 社による AN-1792 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 または APP 反応性 Th1 type CD4⁺ T cell が脳に浸潤し、アレルギー性実験的脳脊髄炎様の髄膜脳炎を引き起こしたのではないかと推察される。

AN-1792 ワクチンにより、血清中に抗 A β 抗体ができ、大脳皮質の老人斑も消失したことより、病理学的には老人斑を除去するというワクチンの効果は認められた。しかし神経原繊維変化やアミロイドアンギオパチーが残存したことは、このワクチンの今後の課題となる。

果たしてこの AN-1792 ワクチンにより、アルツハイマー病患者の高次脳機能が改善されたかどうかの問題となる。その答えとして Hock らは次のように報告している。彼らは、先述した APP^{sw} x PS1^{M146L} マウス (18 ヶ月齢) の脳切片を患者血清で染色し、老人斑の染色の程度で血清中の抗体価を測定した (Tissue amyloid plaque immunoreactivity assay, TAPIR assay)。AN-1792 投与された患者 24 名、プラセボ投与群 6 名の計 30 名中 20 名に抗 A β 抗体が陽性であった。アルツハイマー病患者の高次脳機能は、Minimental state examination (MMSE), Disability assessment for dementia

(DAD), Visual paired associates test of delayed recall from the Wechsler memory scale という3つの試験で評価した。MMSE について経過を追って測定したところ、抗 A β 抗体陽性群では、1年後の MMSE で -1.4 ± 3.5 点の減少であったが、未治療のコントロール群では、 -6.3 ± 4.0 点と著明に減少し痴呆が進行したと報告している。しかしこの報告では症例数が少なく、またアルツハイマー病患者の自然経過による MMSE の1年後の点数の減少は、一般に -3.9 ± 3.7 点であり、報告にあるコントロール群の点数の減少の割合は大きすぎる懸念は残る。今後さらに多数例の解析が必要である。

ワクチンによる β アミロイド除去の機序として、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、Fc receptor を介して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末のアミノ酸を主に認識して結合し、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、脳組織から髄液を経由して A β を末梢血中に引き出すという Peripheral sink 仮説である。しかし Hock らは、AN-1792 を投与し抗 A β 抗体が陽性になった患者の血清および髄液中の A β 量は変化がなかったと報告している。この Peripheral sink 仮説に基づき、免疫反応を惹起せずに脳内 A β を減少させた論文を、Matsuoka 等が報告している。

A β ペプチドワクチンにより体内で産生された抗体は、主として A β ペプチドのN末の3番～10番アミノ酸を認識し結合している(B cell epitope)。一方、T細胞レセプターが認識する部位 (T cell epitope)は、A β ペプチドの後半部位が主である。

Monsonigo 等は、一部の健常高齢者やアルツハイマー病患者血中において A β タンパクに反応するT細胞が増加していることを報告している。これは一般的に加齢と共に免疫力が低下する事実と相反する事象であり、AN-1792ワクチン投与で報告された髄膜脳炎の発症の背景と考え合わせても興味深い。A β 反応性 T細胞は、主として A β ペプチドの16～33番アミ

ノ酸を認識しており (HLA-DR 拘束性において)、特に22、23番アミノ酸のAla置換によりT細胞の増殖が著明に減少するので、この部位がT細胞の反応に重要であると考えられている。さらにAβペプチドの28~42番アミノ酸に反応するT細胞もあり、このT細胞は、Aβ1-40ペプチドに反応しないことから、AβペプチドのC末の41~42アミノ酸がT細胞の認識に重要である。このAβ反応性T細胞が分泌するサイトカインは、IL-5, IL-13 (33%), IFN-γ (4.5%), IL-10 (3%), IL-12 (0.77%) と、Th0, Th1, Th2 サイトカインが混在していた。

今後のワクチンの改良型として、T cell epitope を欠き B cell epitope のみを含む AβペプチドのN末の短いペプチドにT細胞が認識できるキャリアータンパクを結合させ、Th2 アジュバント (Th2 T cell を主として活性化する) とともに免役する方法が発案されている。この場合、キャリアータンパクの種類および Th2 アジュバントがどの程度、Th1 T細胞の活性化を抑制できるかが問題となる。一方、Aβに対するモノクロナール抗体を直接血中に投与する passive transfer の有効性もマウスの実験で証明されており、欧米では治験が行われている。抗体の passive transfer の問題点として、投与したモノクロナール抗 Aβ抗体に対

する抗体 (抗イデオタイプ抗体) が、体内で容易に産生されやすいことである。そのため複数回の投与が困難となる可能性がある。

我々は、副作用の少ないワクチン療法として、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。腸管粘膜免疫系は、Th2 type T細胞が誘導されやすい点に着目した。アデノ随伴ウイルスベクターに Aβ cDNA を組み込み、このリコンビナントアデノ随伴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 Aβ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、Aβ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動物モデルである APP-Tg マウス (Tg2576) にウイルス粒子を1回のみ経口投与した。

12~13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、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T細胞の浸潤や炎症所見は認められな

かった。

成人の約 80%は、アデノ随伴ウイルスの既感染があり、ウイルスそのものはヒトに対して病原性は無いとされている。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大部分が episomal として核内にとどまり、細胞内でウイルスは自己増殖せず、他の臓器への拡散・感染も無い。Th1 type の T 細胞性免疫は惹起され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強い免疫反応を起こさず、Th1 CD4⁺T 細胞による髄膜脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。

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。

Aβ1-43rAAV 粒子を経口投与したAPP-Tg マウスにおいて、12~13 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。アミロイド沈着を定量的に解析するため、脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を4G8抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き3CCDカメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位（アミロイド沈着）の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。未治療のコントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、Aβ1-43rAAV 治療群では Group A ($0.55 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$), Group B ($0.48 \pm 0.35\%$, $P < 0.001$) and Group C ($0.46 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$)と有意差を持って減少していた。Aβ1-21rAAV 粒子を経口投与したAPP-Tg マウスにおいても、12~13 ヶ月齢の脳を解析すると、同様にコントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少していた。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。

Aβ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サルに経口ワクチンを行っている。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。

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. 田平 武、原英夫：アルツハイマー病と免疫 神経免疫学 11：193-196, 2003.
2. 原英夫：アルツハイマー病のワクチン療法。基礎老化研究

27:122-127,2003.

3. 原英夫：Alzheimer 病に対する経口ワクチン療法の開発。医学のあゆみ 206：990, 2003.
4. Santa Y, Uyama E, Chui DH, Arima M, Kotorii S, Takahashi K, Tabira T: Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. J Neurol Sci 212:79-84, 2003.
5. Tabira T, Chui DH, Kuroda S.: Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. Front Biosci. 7: a44-9, 2002
6. Tabira T, Chui DH., Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M: Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. J Neurosci Res. 70:367-372, 2002.
7. Tabira T.: Clinoquinol's return: caution from Japan. Science 292:2251, 2001.
8. Takeda K, Araki W, Tabira T: Enhanced generation of intracellular Aβ42 amyloid

peptide by mutation of
presenilins PS1 and PS2. Eur J
Neurosci 19:258-564, 2004.

9. Tabira T: Alzheimer's disease :
mechanisms and
development of therapeutic
strategies. Geriatric Gerontol
Internat. in press.
10. 原 英夫: ワクチン療法。Current
Therapy. 22 : 71-75, 2004.

2. 学会発表

(1) 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。

(2) 原 英夫、田平武 : AAV ベクタ
ーを用いたアルツハイマー病の治療
法の開発。

日本神経学会総会 2003年5月17
日 横浜。

(3) 原英夫、高橋慶吉、田平武 :
Development for a safe vaccine.

日本老年学会総会シンポジウム
2003年6月19日 名古屋。

(4) 原英夫、高橋慶吉、田平武 : アル
ツハイマー病に対する経口ワクチン
療法の開発。第16回神経免疫学会
(東京)平成16年1月31日 東京。

(5) Hara H, Adachi K, Tabira T et al.
NEW ORAL VACCINE FOR
ALZHEIMER'S DISEASE USING

RECOMBINANTAAV.

Neuroscience 2003. New Orleans,
Nov 8-12, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号 2003-169714、平成 15 年
6 月 13 日

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投与：
治療効果と副作用に関する研究

主任研究者 原 英夫

国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部室長

研究要旨

我々は、アルツハイマー病に対してアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた経口ワクチン療法の開発を行った。AAVベクターに分泌型 $A\beta$ 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。腸管細胞に発現した $A\beta$ 抗原が腸管粘膜免疫系に抗原提示され、 $A\beta$ に対する抗体産生を誘導した。アルツハイマー病モデルマウスの APP トランスジェニック(Tg)マウスに経口投与後、血清中の $A\beta$ 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 $A\beta$ の凝集を抑制した。13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。

研究組織

分担研究者

高橋慶吉（国立長寿医療センター研究所
血管性痴呆研究部室長）

A. 研究目的

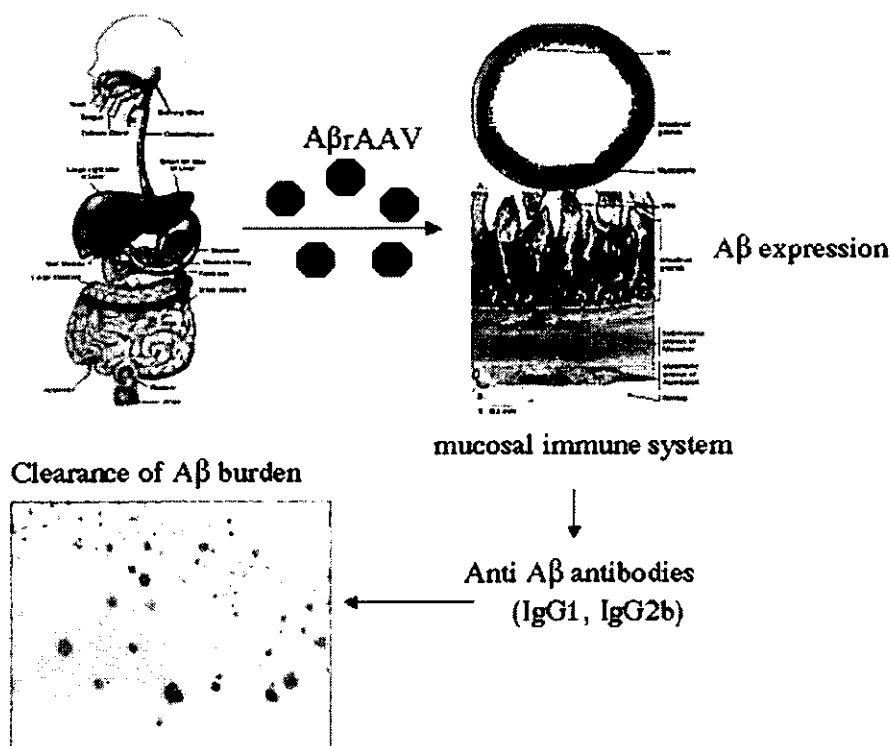
アルツハイマー病は、痴呆性疾患の二大原因の1つであり、現在有効な治療法はなく、高齢化社会の進行と共に患者が増加し、社会的にも問題となっている。アルツハイマー病の病態仮説として、現

在ではアミロイドカスケード仮説が有力で、細胞外に分泌された $A\beta$ ペプチドが不溶化し、凝集・蓄積することがアルツハイマー病の病態の本質であると考えられている。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。 $A\beta$ 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のが目的である。

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。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。

Oral vaccine with A β rAAV



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 adaptor(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 XX2 (AAV packaging plasmid), XX6 (adeno helper plasmid) と共に transfection し、recombinant adeno-associated virus (rAAV) を得た。そしてセシウムクロライド超遠心にて精製した。

別に A β 1-43 の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV も同様に PCR で増幅後、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1) に組み込み、大量培養後に精製した。

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。Group A (15 週齢時投与)、Group B (3

0 週齢時投与)、Group C (45 週齢時投与) の APP transgenic mouse に A β 1-43rAAV を各々 5×10^{11} genome、1 回のみ経口投与した。別に A β 1-43 の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV を、Group D (15 週齢時投与)、Group E (30 週齢時投与)、Group F (45 週齢時投与) に分けた APP transgenic mouse に各々 5×10^{11} genome、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。またマウス血清中の抗 A β 抗体のアイソタイプを判定した。

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°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°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