

かどうか、 $2\mu\text{M}$ 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 promoter 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 $\beta$ 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  $5 \times 10^4$ 細胞を加え、A $\beta$ 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、当国立長寿医療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 $\beta$ 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 $\beta$ 1-43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; signal sequence+ A $\beta$ 1-43 cDNA を作成し、効率よく A $\beta$ が細胞外に分泌されるようなベクター(A $\beta$ 1-43pXXUF1)を開発した(図1)。

Construct of secretion form of A $\beta$ 1-43, A $\beta$ 1-21 cDNA

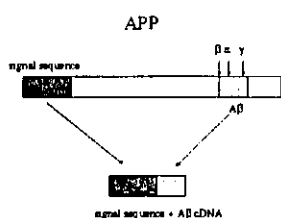


図1 signal sequence+ A $\beta$ 43 cDNAの構造。

実際に A $\beta$ が細胞外に分泌される事を確認するため、APP signal sequence+ A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ ペプチドモノマー4kDa の蛋白が認められた。

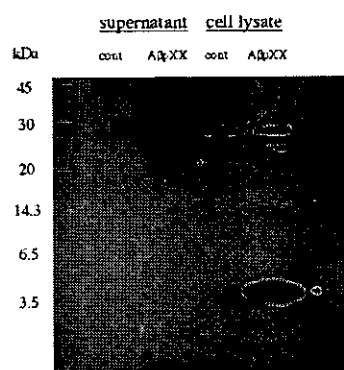


図2. Western blot 解析。

A $\beta$ アデノ随伴ウイルスの作製には、A $\beta$ 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。

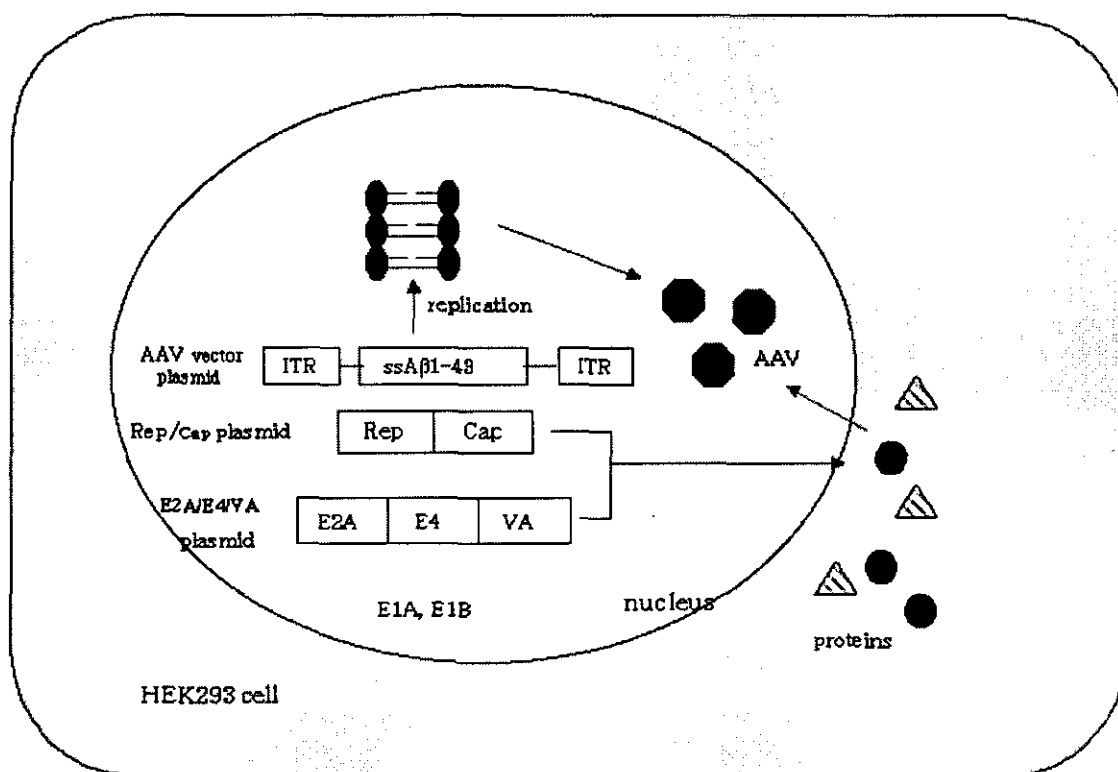


図3. リコンビナントAβアデノ随伴ウイルスの作製。

15週齢、30週齢、45週齢の APP transgenic mouse (Tg2576) に Aβ1-43rAAV  $5 \times 10^{11}$  genome を1回のみ経口投与した。経時的に採血し血清中の抗Aβ抗体の産生を解析した(図4)。血清中の抗Aβ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。抗Aβ抗体のアイソタイプは、主としてIgG1, IgG2bであり、Th2型IgGであった。一方、Aβ1-21rAAVを投与したマウスの血清中に、13ヶ月齢においても抗Aβ抗体が検出された(図5)。

さらにマウス血清を用いてヒトの老人斑を thioflavin S と共に二重染色した。Aβ1-43rAAV を投与したマウス血清によりヒトの老人斑が染色された。

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  $120 \mu\text{M}$  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、 $37^\circ\text{C}$  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、 $2 \mu\text{M}$  Thioflavin-T を加え Spectrofluorimeter で測定した。

Serum IgG antibody against A $\beta$ 42 in the treated APP-Tg mouse

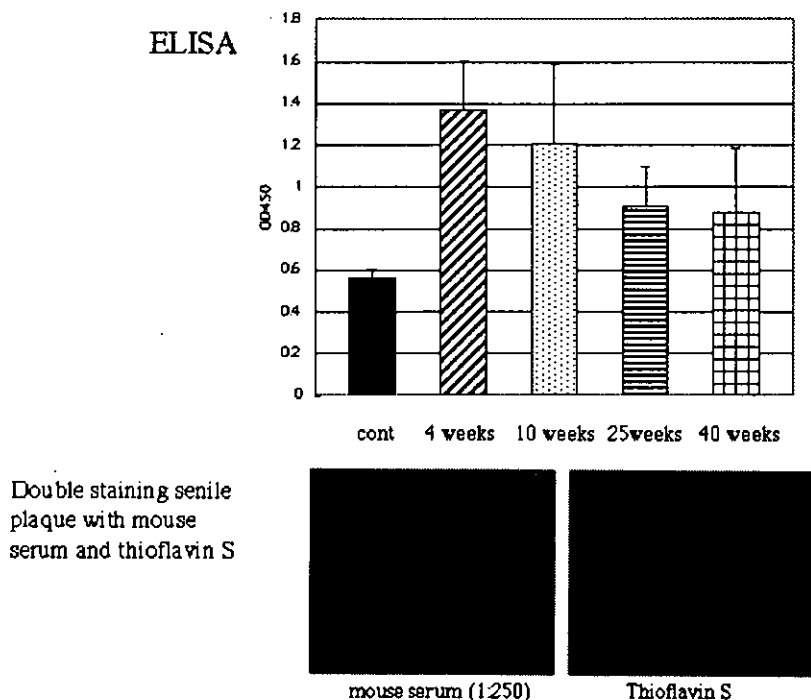


図4 マウス血清中の抗 A $\beta$ 抗体の産生。ヒトの老人斑をマウス血清と thioflavin S と共に二重染色した。

A $\beta$ 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 A $\beta$ 1-40 の凝集・結合を *in vitro* で阻害した (図6)。

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 promoter 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6)。

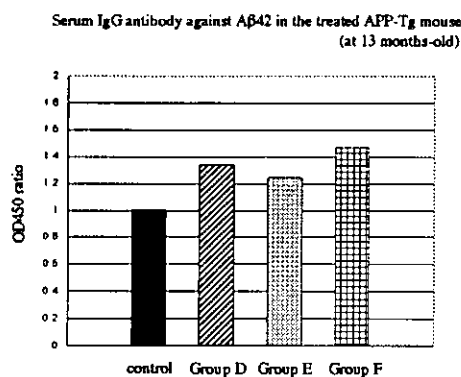


図5 A $\beta$ 1-21rAAV を投与したマウス (13ヶ月齢) の血清中の抗 A $\beta$ 抗体。

## Inhibition of A $\beta$ aggregation *in vitro*. Thioflavin T Binding Assay

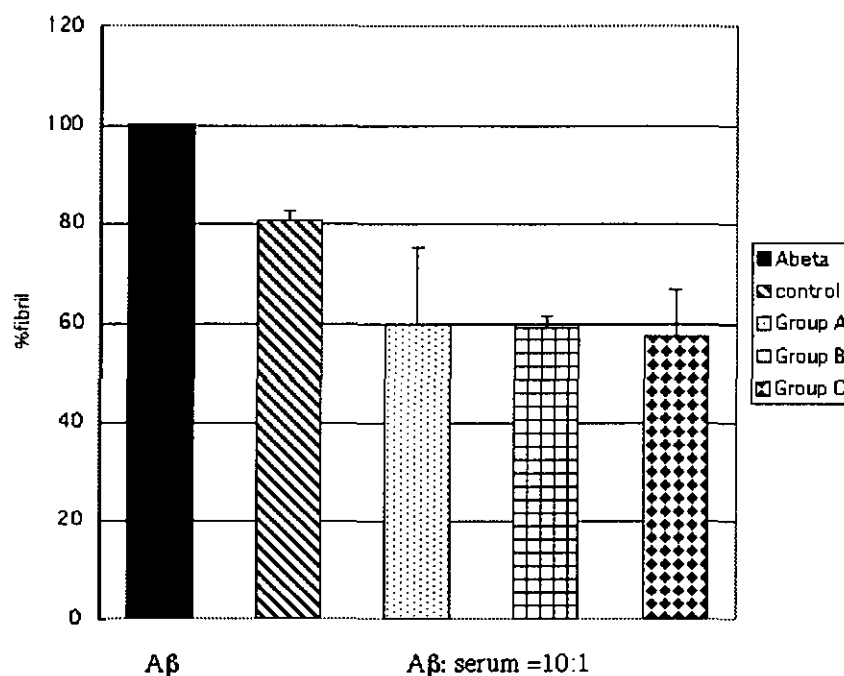


図6. マウス血清中の抗体による *in vitro* での A $\beta$ 凝集抑制。治療したマウス(Tx)の血清は、A $\beta$ 凝集を抑制した。

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 promoter 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7)。

## Detection of rAAV DNA by PCR

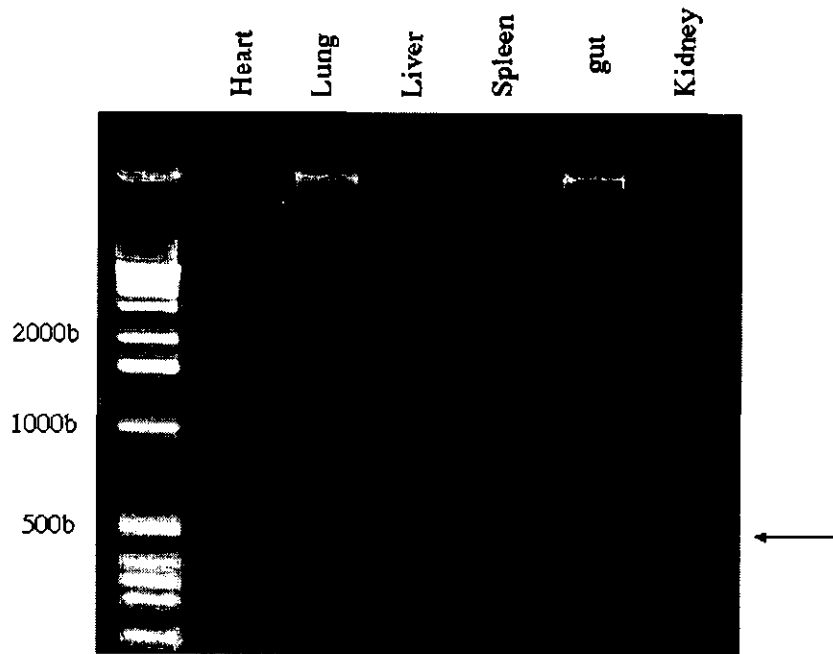


図7.治療したマウス各臓器から精製した DNA を用いて、ウイルスベクターDNA を PCR で検出した。上部消化管組織に目的の 500 bp のバンドを認める。

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 $\beta$ 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  $5 \times 10^4$  細胞を加え、A $\beta$ 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 $\beta$ 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 (図8)。

## Low lymphocytes proliferation against A $\beta$ 42 peptide

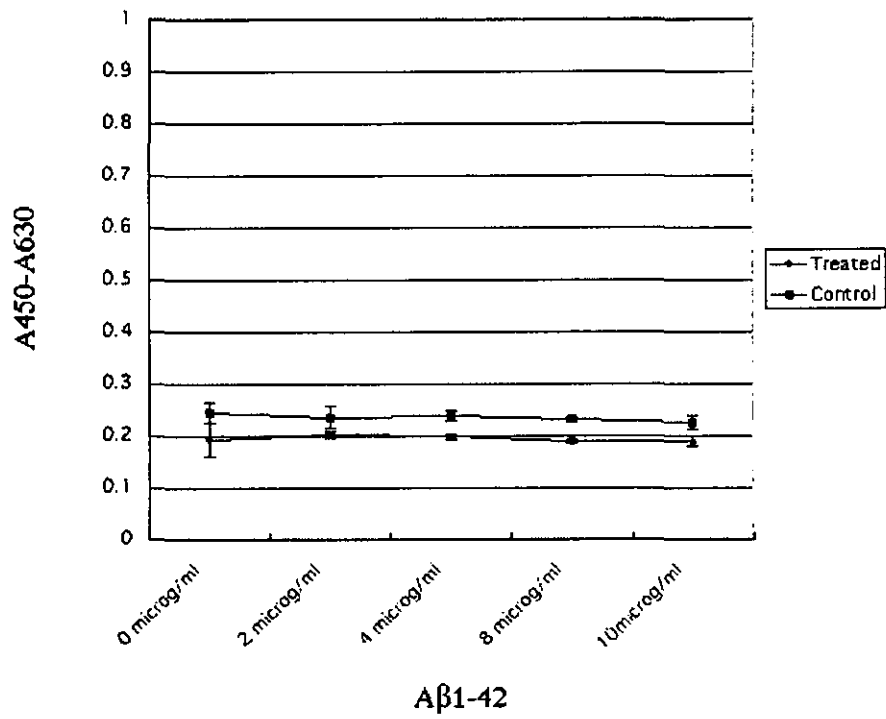


図8 治療したマウスの脾細胞の A $\beta$ 42 ペプチドに対する細胞増殖反応。  
A $\beta$ 42 ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

#### 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。

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 $\beta$ 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 $\beta$ rAAV)を経口投与し、腸管上皮細胞に感染させる。そして A $\beta$  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 $\beta$ 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 $\beta$ 1-43 の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+ A $\beta$ 43 cDNA を作成し、効率よく A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 1-40 の凝集・結合を阻害した。

マウスの脾細胞からリンパ球を分離し、A $\beta$ ペプチドへの反応性を解析した。アデノ随伴ウイルスを投与したマウスの脾細胞は、A $\beta$ 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スベクター DNA のバンドを認めた。

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。



## 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 $\beta$  蛋白を分泌できるような cDNA を作成した。AAV ベクターに 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。そして A $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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。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. 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. 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  
RECOMBINANT AAV. Neuroscience  
2003. New Orleans, Nov 8-12, 2003.

H. 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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

経口ワクチン（A $\beta$ 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免疫組織学的解析

分担研究者 田平 武<sup>1)</sup>、鍋島俊隆<sup>2)</sup>

- 1) 国立長寿医療センター研究所 研究所長  
2) 名古屋大学大学院医学研究科医療薬学教授

A $\beta$ 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 トランスジェニックマウスに経口投与後、12~13ヶ月齢時に解剖した。投与6ヶ月後でも上部消化管上皮細胞にA $\beta$ 蛋白の発現を認めた。13ヶ月齢のAPP トランスジェニック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。脳ではリンパ球の浸潤は認められず、ミクログリアが増勢し、アストログリオシスは逆に改善が認められた。

A. 研究目的

欧米では、アルツハイマー病の治療としてA $\beta$ 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 $\beta$ 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、リンパ球の浸潤の有無、上部消化管上皮細胞におけるA $\beta$ 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。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APP transgenic mouseにA $\beta$ 1-43rAAVを各々 $5 \times 10^{11}$  genome、1回のみ経口投与した。別にA $\beta$ 1-43の半分の長さのA $\beta$ を発現するA $\beta$ 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  $5 \times 10^{11}$  genome、1回のみ経口投与した。12-13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 $\beta$  蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で内因性の peroxidase 活性を失活させた。抗 A $\beta$  抗体(4G8:1000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。

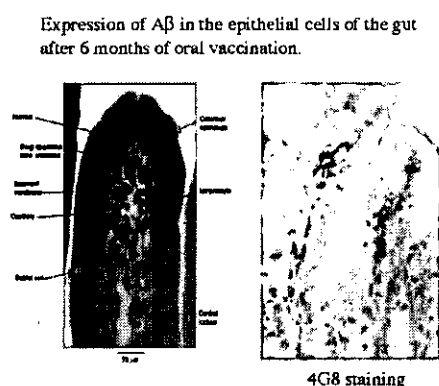


図1 A $\beta$ 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスの上部消化管上皮細胞。A $\beta$  蛋白の発現が lamina propria に認められた。

## C. 研究結果

30週齢時に A $\beta$ 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 $\beta$  蛋白の発現を認めた(図1)。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 $\beta$ 1-43rAAV をそれぞれ1回のみ経口投与した。

A $\beta$ 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(図2)。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 $\beta$ 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。(表1)。

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3)。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、 $A\beta 1-21rAAV$  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。 $A\beta 1-21rAAV$  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

(図4)。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(表2)。

#### D. 考察

欧米では、アルツハイマー病の治療として  $A\beta$  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  $A\beta 43$  の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+  $A\beta 43$  cDNA を作成し、効率よく  $A\beta$  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 ( $A\beta 1-43pXX$ ) を開発した。

15週齢の APP transgenic mouse に  $A\beta 1-43rAAV$   $5 \times 10^{11}$  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。

$A\beta$  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  $A\beta$  蛋白の発現を認めた。

$A\beta 1-43rAAV$  粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、投与後6ヶ月(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、老人斑も消失していた。コンピューターに取り込んだ画像の定量的解析では、コントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$  に対し、 $A\beta 1-43rAAV$  治療群では Group A ( $0.55 \pm 0.5\%$ ,  $P < 0.001$ ), Group B ( $0.48 \pm 0.35\%$ ,  $P < 0.001$ )、Group C

( $0.46 \pm 0.27\%$ ,  $P < 0.001$ )と有意に改善していた。さらに A $\beta$ 1-43 の半分の長さを発現する A $\beta$ 1-21rAAV 粒子を経口投与した場合でも、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。

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 $\beta$ 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

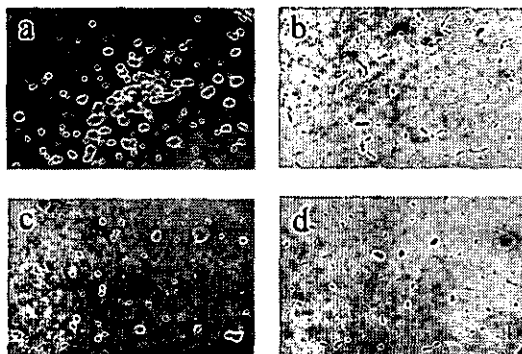
30 週齢の APP-Tg マウスに A $\beta$ 1-43rAAV を経口投与し、6 ヶ月後に解剖した。上部消化管上皮細胞に A $\beta$ 蛋白が少量ではあるが持続的に発現していた。投与時期を15週齢時、30週齢時投与、45週齢時の3つのグループに分け、13 ヶ月齢(56~57 週齢)の APP-Tg マウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、脳および腎臓を含め他臓器に炎症所見は認められなかった。アデノ随伴ウイルスを用いた経口ワクチン療法は、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

rAAV/A $\beta$ 43

Frontal cortex



Parietal cortex

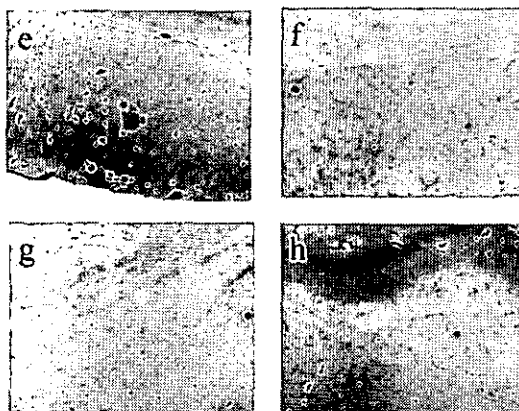


図2 A $\beta$ 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) の脳 (前頭葉、頭頂葉) におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a,e; コントロール、b,f; 15 週齢時投与、c,g; 30 週齢時投与、d,h; 45 週齢時投与。

Reduction of A $\beta$  burden at 13 months of age in mice treated with A $\beta$ 1-43 rAAV.

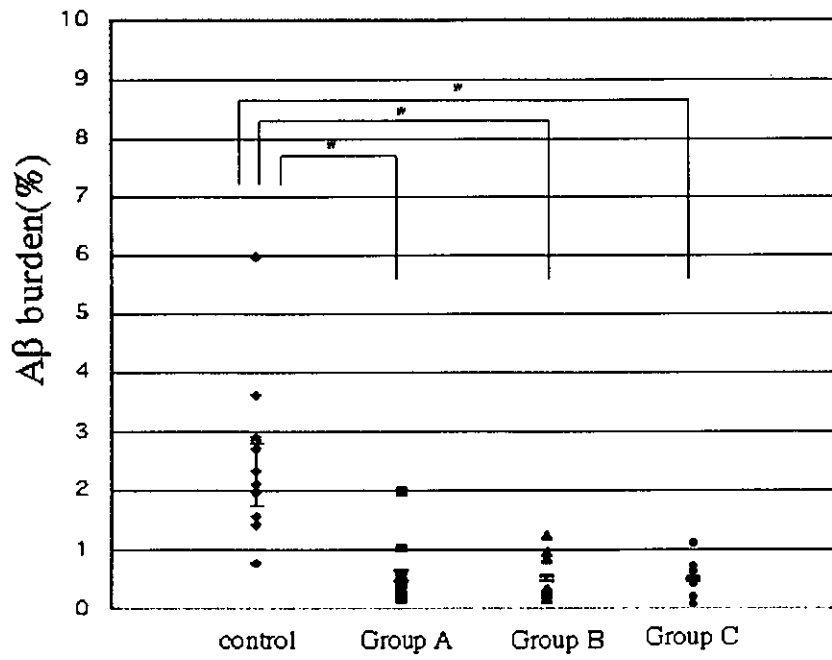


表 1



## マウス脳組織

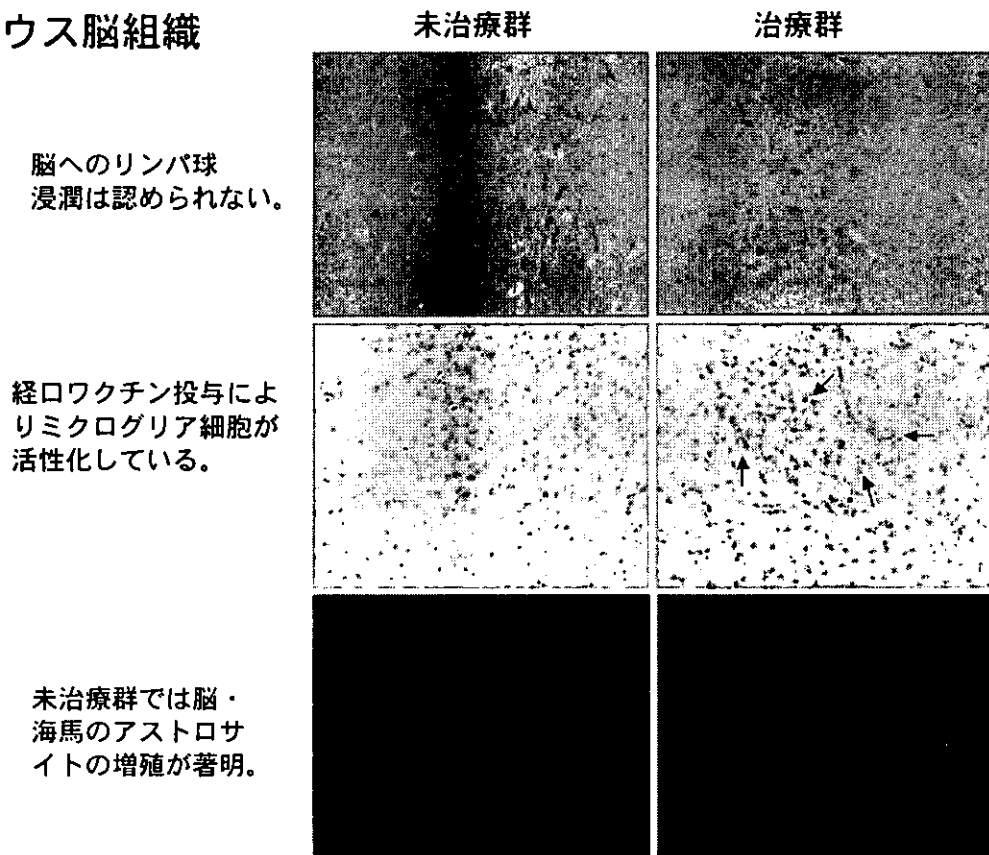
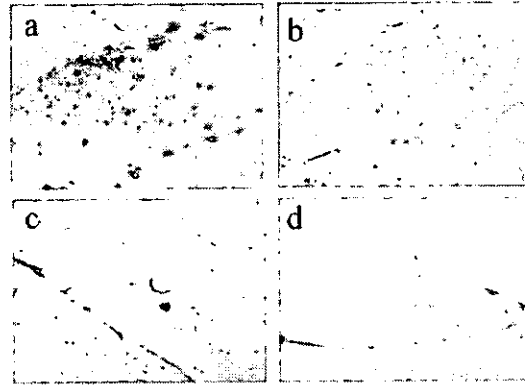


図3 APP-Tg マウス (13 ヶ月齢) のコントロール群と治療群の脳の HE 染色。両群ともにリンパ球浸潤は認められない。

2 段目：脳のミクログリア染色。治療群に活性化したミクログリア細胞の増殖を認める。

rAAV/A $\beta$ 21

hippocampus



Frontal cortex

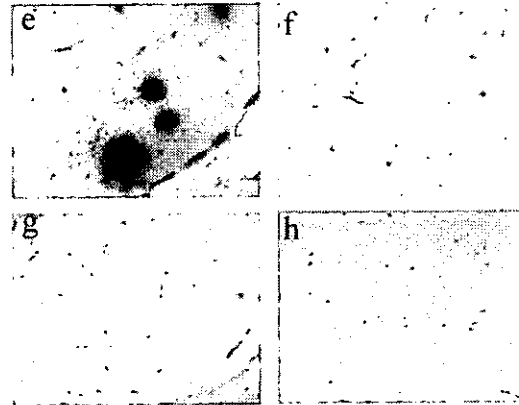


図4 A $\beta$ 1-21rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13ヶ月齢) の脳 (海馬、前頭葉) におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a,e; コントロール、b,f; 15 週齢時投与、c,g; 30 週齢時投与、d,h; 45 週齢時投与。

Reduction of A $\beta$  burden at 13 months of age in mice treated with A $\beta$ 1-21 rAAV.

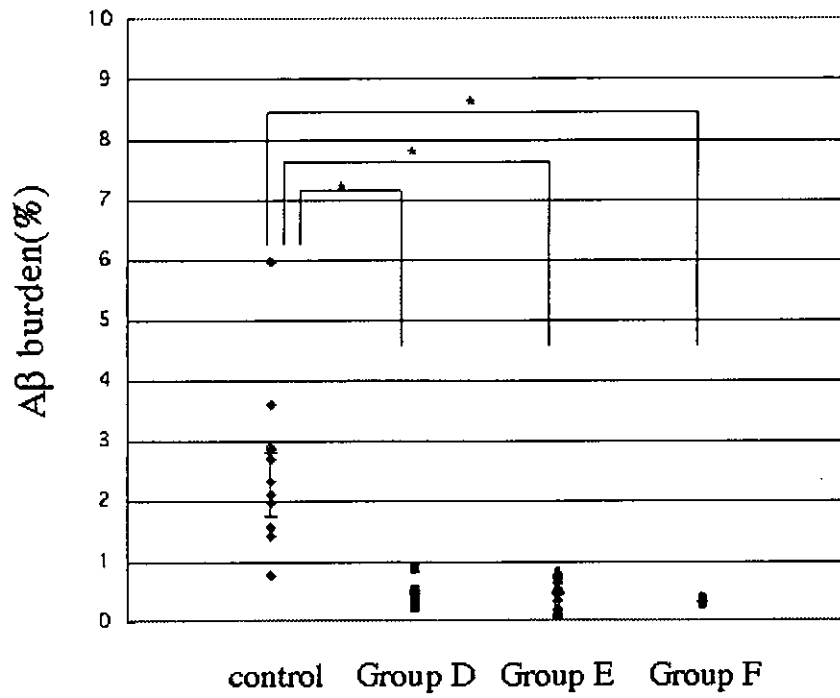


表 2

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.

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

1) 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.

1) Tabira T. : Clinoquinol's return: caution from Japan. Science 292:2251, 2001.

5) Takeda K, Araki W, Tabira T: Enhanced generation of intracellular A $\beta$ 42 amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. Eur J Neurosci 19:258-564, 2004.

1) Tabira T.: Alzheimer's disease : mechanisms and development of therapeutic strategies. Geriatric Gerontol Internat. in press.

(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