

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 英夫

平成17（2005）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. アルツハイマー病動物モデルマウスの高次脳機能解析-----19  
鍋島俊隆
2. 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  
ジェニックマウスの TGF- $\beta$ 1 の変化-----30  
田平 武
3. 経口ワクチン (A $\beta$ 発現アデノ随伴ウイルス) を短期投与した老齡アフリ  
カミドリザル脳の免疫組織学的解析-----36  
原 英夫、高橋慶吉

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----50

## IV. 研究成果の刊行物・別刷-----53

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ている。アルツハイマー病の病因として amyloid cascade 仮説に基づき、分泌型 A $\beta$  cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの経口ワクチン療法により抗 A $\beta$ 抗体を腸管粘膜免疫において産生させ、脳に沈着した A $\beta$ 蛋白を除去し、さらに A $\beta$ の凝集を抑制することが目的である。昨年度、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(Tg2576)マウスに経口投与し、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アミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ明らかに減少していた。今年度は、経口ワクチン療法により APP トランスジェニックマウスの血清及び脳組織での TGF- $\beta$ 濃度が減少し、脳アミロイドアンギオパチーや小血管周囲の炎症を抑制する可能性が示唆された。また APP トランスジェニックマウスが、どの月齢から高次脳機能の異常を示すのか検索するため、6 ヶ月齢での学習機能の評価を行った。さらに老齢のアフリカミドリザルに経口ワクチンを投与し、短期間での効果を解析した。

### 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）

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

急速な高齢化社会を迎えつつある日本では、65歳以上の老人の約10%が老年期痴呆であると報告されている。アルツハイマー病は、痴呆性疾患の二大原因の1つであり約50%を占め、現在有効な治療法はなく、介護問題も含め社会的にも問題とな

っている。

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 $\beta$ 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 $\beta$ 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た報告もある。この様に A $\beta$ ペプチドをワクチンとして投与し、抗 A $\beta$ 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。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分泌型 A $\beta$  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。昨年度は、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 $\beta$  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。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、経口ワクチンを投与したマウス脳においてアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ明らかに減少していた。

今回、経口ワクチン療法により APP トランスジェニックマウスの血清及び脳組織での TGF- $\beta$  濃度を測定し、どのような変化が起こるか測定した。また APP トランスジェニックマウスが、どの月齢から高次脳機能の異常を示すのか検索するため、6 ヶ月齢での学習機能の評価を行った。さらに老人斑形成が見られる老齢のアフリカミドリザルに経口ワクチンを投与し、短期間 (3 ヶ月間) での効果を解析した。

## B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築

amyloid- $\beta$ 1-43(A $\beta$ 1-43) cDNA は、ヒト amyloid- $\beta$  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 $\beta$ 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A $\beta$ 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 $\beta$ 1-43 の半分の長さの A $\beta$  を発現する A $\beta$ 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 $\beta$ 1-43rAAV  $5 \times 10^{11}$  genome

を 1 回のみ経口投与した。さらに A $\beta$ 1-43 の半分の長さの A $\beta$  を発現する A $\beta$ 1-21rAAV を同様に 3 つの時期に分けて投与した。

アフリカミドリザルに対しては分泌型 A $\beta$  発現アデノ随伴ウイルスベクター(A $\beta$ 1-43/rAAV)または GFP 発現アデノ随伴ウイルスベクター(GFP/rAAV)  $1 \times 10^{13}$  genome (1ml) 水溶液をゼラチン化し、腸溶剤カプセルに詰めた薬剤を 1 回のみサルに経口投与し、3 ヶ月後に解剖した。

### 3. アフリカミドリザル

野生型の年齢不詳 (推定年齢 20 歳以上) の雌サル 3 頭と 23 歳齢の雌サル 1 頭に経口ワクチンを投与した。分泌型 A $\beta$  発現アデノ随伴ウイルスベクター投与群 2 頭とコントロールの GFP 発現アデノ随伴ウイルスベクター(GFP/rAAV)投与群 2 頭に分類した。アフリカミドリザルは、国立感染症研究所霊長類センターより入手した。

### 4. アフリカミドリザル血清中の抗 A $\beta$ 抗体の検出

A $\beta$ 42 ペプチド(5 $\mu$ 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（1000 倍希釈）、peroxidase 標識抗サル IgG 抗体で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度(OD450)を測定した。

#### 5. 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) またはラビット抗 A $\beta$ 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。

中枢神経系組織中の TGF- $\beta$ の発現を検索するために、凍結切片をポリクロナル・ウサギ抗 TGF- $\beta$ 抗体で染色後、ABC 法にて発色した。

#### 6. TGF- $\beta$ 1 ELISA

マウス血清中の TGF- $\beta$ 1 濃度は、R&D systems 社の ELISA kit を用いて測定した。

未治療の 6 ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス (Tg2576) の高次脳機能解析を行った。

#### 7. 自発的交替行動試験 (1 日目)

実験装置・手順：1 本のアームの長さが 40 cm、壁の高さ 12 cm、床幅 3 cm、上部幅 10 cm の 3 本のアームがそれぞれ 120 度の角度で接続された Y 字迷路を用い、常時一定

の明るさになるように間接照明のみを当てた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後 8 分間にわたって装置内を自由に散策させ、移動したアームの位置を移動した順に記録した。マウスが測定時間内にアームに移動した回数を total arm entries とした。つぎに、連続して異なる三つのアームを選択した組み合わせを調べ、この数を no. of alternation とした。No. of alternation を total arm entries から 2 を引いた数で割り、それに 100 を掛けて求めた値を percent alternation とし、これを自発的交替行動の指標とした。

#### 8. 新規物質認識試験 (1-5 日目)

実験装置・手順：中央に 2 種類の異なった object を離して設置した装置（縦 30 cm、横 30 cm、高さ 35 cm）内にマウスを入れ、各 object に対する探索嗜好行動を 5 分間隔で 10 分間測定した（訓練試行）。訓練 24 時間後に、2 種類の object のうち片方の object を全く異なった新規 object と置換し、各 object に対する探索嗜好行動を 5 分間隔で 10 分間測定した（テスト試行）。

#### 9. モリス水迷路試験

（陳述記憶試験 6-15 日目 プローブテスト;15 日目）

実験装置・手順：直径 120cm のプ

ールに直径 7cmのプラットホームを水面より 1cm下に設置し、プールに入れられたマウスが周りの空間を手がかりにしてプラットホームに到達する時間 (escape latency) および到達するまでの距離 (swimming distance) を測定した。

#### 検定

野生型マウス、APP 過剰発現マウス間で一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により群間比較を行い、その後 post-hock テスト (T-test および Scheffe's Ftest) を用い個々の比較を行った。

#### 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) 分泌型 A $\beta$  cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発。

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。

A $\beta$ アデノ随伴ウイルスの作製には、A $\beta$ 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。

1 5 週 齢 の APP transgenic mouse (Tg2576) に A $\beta$ 1-43rAAV 5x10<sup>11</sup> 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 $\beta$  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。

(b) APP トランスジェニックマウスに対する経口ワクチン投与による沈着したアミロイド $\beta$ 蛋白改善。

通常 of 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、1 0 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。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。

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。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。

### (c) APPトランスジェニックマウス (Tg2576) の高次脳機能解析

未治療の6ヶ月齢のAPPトランスジェニックマウス (Tg2576) の高次脳機能解析を行った。

#### 1. 自発的交替行動試験

APP トランスジェニックマウス (Tg2576) の percent alternation は野生型に比べは有意に低下しており、自発交替行動の障害が認められた。しかし、total arm entries には差は認められなかった。

#### 2. 新規物質認識試験

訓練試行時において、いずれのマウスも各 object に対して約 50%の割合で探索嗜好行動 (exploratory preference) を示した。テスト試行においては APP 過剰発現マウスと野生型マウスにおける、新規 object に対する探索時間は有意に延長し、両

マウス間には有意な差は認められなかった。また、全探索行動時間 (total approach time) に有意な差は認められなかった。

3.モリス水迷路試験 (陳述記憶実験)  
APP トランスジェニックマウス (Tg2576) の escape latency は、野生型マウスのそれに比べに有意な差は認められなかった。APP 過剰発現マウスの Swimming distance は野生型マウスのそれに比べ有意に延長していた。

#### (d) 経口ワクチン投与した APP トランスジェニックマウス血清中の TGF- $\beta$ 1 濃度

A $\beta$ 1-43rAAV または A $\beta$ 1-21rAAV を経口投与した 13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス (Tg2576) 血清を用いて、TGF- $\beta$ 1 濃度を ELISA にて測定した。

A $\beta$ 1-43rAAV 投与 Group A ; 80.5 $\pm$ 12.9ng/ml,  $p=0.09$ , Group B; 76.0 $\pm$ 6.3ng/ml,  $p=0.06$ , Group C; 74.3 $\pm$ 21.0ng/ml,  $p=0.07$  でコントロール群の TGF- $\beta$ 1 濃度 111.6 $\pm$ 40.0ng/ml と比べ有意に減少していた。

A $\beta$ 1-21rAAV 投与 Group D; 99.4 $\pm$ 21.2ng/ml, Group E; 80.2 $\pm$ 17.2ng/ml,  $p=0.09$ , Group F; 72.9 $\pm$ 15.8ng/ml,  $p=0.06$  の TGF- $\beta$ 1 濃度もコントロール群と比べ低下していた。

#### 脳組織での TGF- $\beta$ 1 免疫組織染色

コントロール群の APP トランスジェニックマウス脳では、TGF- $\beta$ 1 の発現が強く認められる。

一方、A $\beta$ 1-43rAAV 経口投与した 13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳では、有意に TGF- $\beta$ 1 の発現は減少していた。

#### (e) 老齢のアフリカミドリザルに対する経口ワクチンの効果

1. 各アフリカミドリザルの剖検所見を記す。

- 1) 動物番号 G-4 (体重: 2.60kg・脳重量: 48.581g)
  - ・左腎: 白色結節 (5mm 程度、2箇所) 及びのう胞 (1mm 程度)
  - ・右腎: のう胞 (1-2mm 程度、表面に散在)
  - ・左肺: 癒着 (左肺上部が胸膜と癒着)
  - ・左右肺: 気腫
  - ・右下顎リンパ節 (右下顎部に 10mm 程度の白色のう胞あり、内容液: 粘度なし)
  - ・大脳: 黒色変 (左右月状溝に 1mm 程度の黒色変あり)
- 2) 動物番号 G-5 (体重: 2.36kg・脳重量: 49.518g)
  - ・肝臓: 表面粗 (肝全体)
- 3) 動物番号 G-6 (体重: 2.42kg・

脳重量：55.491g)

- ・左右腎：退色
- ・左腎：桑実状変化

4) 動物番号 G-7 (体重：2.44kg・  
脳重量：53.934g)

- ・十二指腸：水疱（胃～十二指腸  
結合部（十二指腸より）に存在、  
5mm 程度の透明水胞あり、内容  
液：粘度あり）

## 2. アフリカミドリザル血清中の抗Aβ 抗体価

経口ワクチン投与により、アフリカ  
ミドリザル血清中の抗 Aβ抗体価は2  
つのパターンを示した。

1つは、投与前に比べ著しい増加は  
ないが、4週後には上昇しており、  
8週後には投与前の値に下降した。

2番目のパターンは、投与群・コン  
トロール群とも、開始前より既に高  
値を示し、観察期間中持続する傾向  
を示した。高抗体価を示す血清は、Aβ  
ペプチド以外の未同定の蛋白に交差  
反応している可能性も考えられる。

## 3. 老人斑免疫組織染色

成熟型老人斑(mature senile plaques)と  
びまん型老人斑(diffuse senile plaques)  
を認める。小血管に沈着したアミロ  
イドβ蛋白も認められる。

アフリカミドリザルの前頭葉では、  
コントロール群および治療群とも老  
人斑の数は比較的少数であるが、コ

ントロール群では神経細胞内 Aβ蛋白  
沈着が有意に増加していた。

アフリカミドリザルの頭頂葉では、  
治療群 G-4 サルに老人斑がやや目立  
つが、コントロール群においても老  
人斑の形成や、神経細胞内 Aβ蛋白沈  
着が多く認められた（図3）。

治療群 G-5 サルでは、殆どアミロ  
イドβ蛋白の沈着は認められない。

アフリカミドリザル側頭葉のアミ  
ロイドβ染色を示す。治療群 G-4 サ  
ルにアミロイドβ蛋白の沈着は軽微で  
ある。治療群 G-5 サルでは、殆どア  
ミロイドβ蛋白の沈着は認められない。  
一方、コントロール群では、老人斑  
の形成や、神経細胞内 Aβ蛋白沈着が  
目立つ。

アフリカミドリザル後頭葉では、  
コントロール群において老人斑の形  
成や、著明な神経細胞内 Aβ蛋白沈着  
が認められる。治療群では、小さな  
老人斑の形成を認めるのみで、神経  
細胞内 Aβ蛋白沈着の所見は認められ  
ない。

アフリカミドリザル小脳において  
は、ヒトと同様に小脳プルキンエ細  
胞層にアミロイドβ蛋白が1列に沈着  
し、プルキンエ細胞層・顆粒層にお  
いては老人斑の形成が認められる。  
コントロール群に比べ、治療群では  
小脳プルキンエ細胞層のアミロイドβ  
蛋白沈着は少なく、顆粒層の老人斑

も著明に減少していた。

#### D. 考察

神経性変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症等）の原因は、近年かなり明らかになってきたが、詳細な発症機序は未だに不明である。これらの疾患の治療法としては、明確な発症機序の解明後に開発される根治治療が理想であるが、例え発症機序が解明されたとしても、現段階の医学・分子生物学的技術では新たな治療法を開発出来ない可能性もある。アルツハイマー病の A $\beta$  ワクチン療法は、免疫学的手法（抗体）を用いて自己蛋白である蓄積したアミロイドベータ蛋白を除去しようとする治療法であり、新しい治療ストラテジーの1つとして大変注目されている。

アルツハイマー病の病理学的所見として、神経細胞の萎縮・脱落、アミロイド $\beta$  (amyloid- $\beta$ , A $\beta$ ) 蛋白の凝集・沈着による老人斑の形成、異常タウ蛋白からなる神経原繊維変化 (neurofibrillary tangles: NFT) の3つが大きな特徴である。アミロイドベータ蛋白は、21番染色体上にあるアミロイド前駆蛋白から、 $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼにより切断されてできた 40~42(43)個のアミノ酸からなる蛋白で

ある。老人斑は、細胞外に蓄積された集合体で、アミロイドベータ蛋白 (A $\beta$ 40,42) を核に周囲を取り囲むようにミクログリア、繊維型アストログリア、異栄養神経突起で構成されている。

アルツハイマー病の病因として、Selkoe 等が唱える amyloid cascade 仮説、即ち神経細胞内の  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) が、 $\beta$ ,  $\gamma$ -secretase により部分的に分解され、amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) 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、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。

Bard らは、A $\beta$  に対するモノクロナール抗体 (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 $\beta$  モノクロナー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。

この様にアルツハイマー病の免疫療法 (A $\beta$ ワクチン療法) には、A $\beta$ ペプチドをアジュバントと共に免疫する能動免疫(active immunization)と A $\beta$ に対する抗体を直接投与する受動免疫(passive immunization)の2つに大きく分けられる。

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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ に対する抗体も確認された。

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 $\beta$ 42; 50 $\mu$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T cell であった。CD8<sup>+</sup>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 $\beta$ 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 $\beta$ または APP 反応性 Th1 type CD4<sup>+</sup> 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 $\beta$ 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。

Hock らは、APP<sup>sw</sup> x PS1<sup>M146L</sup> 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 $\beta$ 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 $\beta$ 抗体陽性群では、1年後の MMSE で  $-1.4 \pm 3.5$  点の減少であったが、未治療のコントロール群では、 $-6.3 \pm 4.0$  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  $-3.9 \pm 3.7$  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 $\beta$ 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 $\beta$ ペプチドを投与し A $\beta$  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 $\beta$ 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 $\beta$ にも抗体が結合してミクログリアが貪食し、A $\beta$ 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 $\beta$ ペプチドを投与し A $\beta$ に対して産生された抗体は、

A $\beta$ 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 $\beta$ を可溶化し、さらに分泌された A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ を減少させることにより、脳組織から髄液を經由して A $\beta$ を末梢血中に引き出すという Peripheral sink 仮説である。

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 A $\beta$ 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、A $\beta$ に対するモノクローナ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、投与したモノクローナル抗 A $\beta$ 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 A $\beta$  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 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<sup>+</sup>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。

脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性は、アルツハイマー病患者に高頻度で認められる病理所見である。TGF- $\beta$ 1は、多機能を有するサイトカインで、アルツハイマー病においては、脳血管へのアミロイド沈着（アミロイドアンギオパチー）や微小血管変性などのアルツハイマー病脳病理の形成に深く関与している。

アルツハイマー病脳において TGF- $\beta$ 1 は、ミクログリアを活性化し、A $\beta$ 蛋白の取り込み・貪食を促進する良い効果もあるが、一方でアストロサイトを刺激し、アストロサイトでの A $\beta$ 蛋白産生を亢進し、これにより脳血管へのアミロイド沈着（アミロイドアンギオパチー）が起こる。

さらに TGF- $\beta$ 1 が微小血管内皮細胞を刺激し、内皮細胞からの炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 産生を促進し、微小血管変性を引き起こすと考えられている。

今回我々は、A $\beta$ を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口ワクチン投与により、アルツハイマー病のモデルマウス中の血清や脳組織の TGF- $\beta$ 1が変化するか検索した。13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス(Tg2576)血清中の TGF- $\beta$ 1濃度  $111.6 \pm 40.0$ ng/ml であったが、A $\beta$ 1-43rAAV または A $\beta$ 1-21rAAV を経口投与した APP トランスジェニックマウスでは、有意に TGF- $\beta$ 1濃度は低下していた。

さらに APP トランスジェニックマウス脳では、TGF- $\beta$ 1 の発現が強く認められたが、A $\beta$ 1-43rAAV 経口投与した13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳では、有意に TGF- $\beta$ 1 の発現は減少していた。

この現象の理由は不明であるが、腸管粘膜免疫では、制御性のT細胞より TGF- $\beta$ 1 が分泌されているが、経口ワクチン投与によるバランスの変化が起こった可能性や、経口ワクチン投与による脳組織での可溶性 A $\beta$ 蛋白が減少したため、アストロサイトへの刺激も減り、アストロサイトでの TGF- $\beta$ 1 産生が減少した可能性が考

えられる。

今回のデータで、TGF- $\beta$ 1の関与が深く示唆される脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性等のアルツハイマー病病理所見をも経口ワクチンにより改善される可能性が示唆された。

アルツハイマー病の記銘力障害などの高次脳機能障害の原因は不明である。神経細胞の萎縮・脱落が起こる以前の軽度認知障害の時期より認められる事より、現在では A $\beta$ オリゴマーによるシナプス障害という仮説が支持されつつある。我々が使用したアルツハイマー病の動物モデルマウスである APP トランスジェニックマウス(Tg2576)は、prion promotor 下にヒト変異型 APP を発現するマウスで、10ヶ月齢頃より脳にアミロイド $\beta$ 蛋白の沈着・老人斑形成が認められる。この APP トランスジェニックマウスが、どの月齢から高次脳機能の異常を示すのか検索するため6ヶ月齢での学習機能の評価を行った。本研究において3種の学習・記憶試験を行ったところ、新規物質認識試験における新規 object に対する探索時間は、6ヶ月齢の野生型マウスおよび APP 過剰発現マウスのいずれにおいても有意に延長していた。したがって、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスは、野生型マウスと同程度の新規

物質認識能力を有しているものと示唆される。一方、自発的交替行動試験において6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの percent alternation は、同月齢の野生型マウスのそれに比べ有意に低下しており、自発的交替行動の障害が認められた。自発的交替行動試験は、マウスの作業記憶を調べることができることから、APP 過剰発現マウスの6ヶ月齢の早期からこの記憶は障害されていることが示唆される。また、モリス水迷路を用いて6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの陳述記憶能を調べたところ、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの escape latency は、同月齢の野生型のそれと差はなかったにもかかわらず、swimming distance は有意に延長していた。プローブテストにおいて両マウスの swimming speed および swimming distance に差はなかったことから、両マウスの遊泳能力には差がないものと示唆される。モリス水迷路を用いて陳述記憶試験を行った他の報告 (Science 274: 99-103) において、3ヶ月齢の野生型マウスと APP 過剰発現マウスの両者の escape latency には有意な差がなかったが、最終実験日にのみ両マウスに差が認められ、10ヶ月齢においては両者の escape latency には有意な差が認められる。これは、APP 過剰発現マウ

スの3ヶ月齢の早期から認知障害を示す傾向が認められ、10ヶ月齢において顕著な障害が認められることを示す。したがって、6ヶ月齢のAPP過剰発現マウスは、軽微であるが作業記憶能および陳述記憶能が障害されているものと示唆される。以上の結果より、6ヶ月齢のAPP過剰発現マウスは一部ではあるが、軽微な認知障害が認められ、この結果は、以前の報告と一致したもので、この月齢で既にA $\beta$ オリゴマーによるシナプス障害が起こっている可能性が示唆された。

今年度は、さらにヒトに近い、老人斑形成が見られる老齢のアフリカミドリザルに経口ワクチンを投与し、短期間（3ヶ月間）での効果を解析した。

類人猿およびサルにおいても老人斑やアミロイドアンギオパチー(cerebral amyloid angiopathy; CAA)の出現については報告があるが、神経原線維変化については報告がない。サル類ではタウ蛋白の存在なしに多数の老人斑が認められる。これによりサル類での老人斑形成にはタウ蛋白の存在は必須でなく、むしろ apoE などの関与が推測されている。

カニクイザルの老人斑は、ヒトと同様に2つの型の老人斑、すなわち成熟型老人斑(mature senile plaques)と

びまん型老人斑(diffuse senile plaques)に分類されている。カニクイザルでは、20歳以上の動物に成熟型老人斑が認められている。出現初期の20歳から30歳以上の動物に至るまで老人斑の殆どが成熟型老人斑であり、びまん型老人斑から出現するヒトの傾向とは異なるとの報告がある。総成熟型老人斑数は、加齢とともに増加する傾向があるが、個体差も存在する。成熟型老人斑の出現分布は、初期に外側溝に沿った上及び下側頭回皮質または扁桃核を中心に出現し、加齢に伴い前頭葉、頭頂葉、後頭葉など広範な大脳皮質に観察されると報告されている。

我々は、アフリカミドリザルの野生型で推定年齢20歳以上の雌サル3頭と23歳の雌サル1頭に経口ワクチンを投与した。

アデノ随伴ウイルスベクターは耐酸性があるが、我々が考案した方法は、腸管粘膜免疫を用いるため、胃組織より腸管粘膜免疫の発達した小腸を中心とする部位でのウイルスベクター感染を想定している。そのため単に経口投与した場合、胃組織への感染導入が多くなるため、分泌型A $\beta$ 発現アデノ随伴ウイルスベクター水溶液をゼラチン化し腸溶剤カプセルに詰めた薬剤の経口投与を行った。

アフリカミドリザル血清中の抗 A $\beta$

抗体価は、投与前に比べ著しい増加はないが、4週後には上昇しており、8週には投与前の値と同等に下降した。

またサル个体差もあるが、ELISAにて原因不明の抗A $\beta$ 抗体価高値を示すサルも認められた。交差反応による可能性も考えられる。

カニクイザルでは、出現初期の20歳から30歳以上の動物に至るまで老人斑の殆どが成熟型老人斑であるとの報告と異なり、アフリカミドリザルでは、成熟型老人斑とびまん型老人斑の両方の型が認められた。今回使用したアフリカミドリザルは、年齢不詳のサルが大部分ではあるが、脳組織では老人斑の形成が全般的に比較的少量であった。

分泌型A $\beta$ 発現アデノ随伴ウイルスベクターの経口ワクチン投与により、アフリカミドリザルの脳老人斑は減少傾向を示した。さらに著明な変化は、神経細胞内A $\beta$ 蛋白に見られ、コントロール群では、神経細胞内A $\beta$ 蛋白沈着の所見が多く認められたが、治療群では激減していた。さらに小脳プルキンエ細胞層のアミロイド $\beta$ 蛋白沈着や、プルキンエ細胞層・顆粒層の老人斑の形成は、経口ワクチン投与により改善を示した。

## E. 結論

アルツハイマー病の動物モデルマウスであるAPPトランスジェニックマウス(Tg2576)は、6ヶ月齢で自発交替行動の障害が認められ、この月齢で既にA $\beta$ オリゴマーによるシナプス障害が起こっている可能性が示唆された。

分泌型A $\beta$ 発現アデノ随伴ウイルスベクターの経口ワクチンは、脳組織及び血清TGF- $\beta$ 1を減少させることにより、アルツハイマー病脳血管へのアミロイド沈着（アミロイドアンギオパチー）や微小血管変性等の病理を改善する可能性が示唆された。

分泌型A $\beta$ 発現アデノ随伴ウイルスベクターを老齢サルに経口投与後3ヶ月間の期間で、神経細胞内A $\beta$ 蛋白沈着が激減し、小脳プルキンエ細胞層のアミロイド $\beta$ 蛋白沈着や、プルキンエ細胞層・顆粒層の老人斑の減少などの改善を示した。

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

学会発表

1. 日本神経学会総会（東京、2004年5月12-14日）  
アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発  
原 英夫、田平 武
2. 日本神経免疫学会（東京、2004年1月30-31日）  
アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発  
原 英夫、Alon Monsonego、湯浅勝敏、足立香代、武田伸二、高橋慶吉、Howard L. Weiner、田平 武
4. 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.
5. 原 英夫：アルツハイマー病のワクチン療法 Geriatric Medicine 42(4): 494-497, 2004.
6. 原 英夫：Alzheimer 病のワクチン療法 日本臨床 62増刊号4：254-258、2004.
7. 原 英夫：アルツハイマー病-早期診断と治療研究の最前線、ワクチン療。カレントセラピー22: 71-75, 2004.

#### 論文発表

1. Hideo Hara, Alon Monsonego, Katsutoshi Yuasa, Kayo Adachi, Shinichi Takeda, Xiao Xiao, Keikichi Takahashi, Howard L. Weiner and Takeshi Tabira. : Development of a safe oral A $\beta$  vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. J. Alz. disea. 5:483-488, 2004.
2. 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.
3. 田平 武、原 英夫：アルツハイマー病のワクチン療法 updated 125回日本医学会シンポジウム記録集 54-60、2003.
8. 原 英夫：ワクチン療法 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 30: 212-214, 2004.
9. 原 英夫：アルツハイマー病のワクチン療法 Dementia Japan 18:80-83, 2004.
10. 原 英夫：アルツハイマー病のA $\beta$ ワクチン療法 最新医学別冊:新しい診断と治療のABC22、神経3「アルツハイマー病」、158-165、2004。
11. 原 英夫、田平 武： $\beta$ アミロイドワクチン療法。先端医療技術研究所刊 先端医療シリーズ 30：「神経内科の最新医療」、pp103-107。
12. 原 英夫、田平 武：アルツハイマー病の A $\beta$ ワクチン療法 「Annual Review 神経 2005」、印

刷中。

13. 原 英夫、田平 武：アルツハイマー病の A $\beta$ ワクチン療法。  
「病態の分子生物学 脳神経疾患」南山堂、印刷中。
14. 原 英夫：アルツハイマー病のワクチン療法。臨床と研究、Vol.82, No3, pp47-52.

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター；  
出願番号 2003-169714、平成 15 年  
6 月 13 日、PTC 出願（発明者；原英夫、田平武）。