

2007 (8073A)

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

サルを用いたアルツハイマー病及び血管性認知症に  
対するワクチン療法の有効性、安全性の評価

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 田平 武

平成 20 (2008) 年 4 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
サルを用いたアルツハイマー病及び血管性認知症に対するワクチン療法の有効性、安全性の評価	1
田平 武	
II. 分担研究報告	
1. サルを用いたアルツハイマー病及び血管性認知症に対するワクチン療法の有効性、安全性の評価	7
田平 武、原 英夫、井上 誠	
2. 老齢サルのアミロイド $\beta$ イメージング	11
旗野 健太郎	
3. 血管性認知症のワクチン開発	13
脇田 英明	
4. 霊長類血管性認知症モデル動物の確立とMRI画像解析	15
富本 秀和	
5. 老齢カニクイザルにおけるワクチン効果の評価に関わる予備的研究	17
中村 紳一朗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	22

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

サルを用いたアルツハイマー病及び血管性認知症に対するワクチン療法の  
有効性、安全性の評価

主任研究者 田平 武

国立長寿医療センター研究所 所長

研究要旨

アルツハイマー病のワクチン開発

老齢カニクイザル 10 頭に PIB/PET を施行した。老齢サルでは若齢サルに比べ PIB の脳内集積が高かったため、この方法を用いてアミロイドワクチンの効果判定を行うことにした。本年度はまず SeV/Aβ ワクチンを 4 頭に経口投与した。投与サルは嘔吐、下痢などの症状を示さず、全身状態も良好であった。現在経過観察中であり、2008 年 4 月投与 3 ヶ月後の Aβ 抗体検査及び PIB/PET を施行する予定である。

血管性認知症のワクチン開発

カニクイザルを用い、マイクロビーズを両側内頸動脈から 1 ヶ月間隔で 2 度注入する血管性認知症モデル動物を作製し、MRI 画像と記憶機能を経時的に評価した。1 回に注入するマイクロビーズの量が一側内頸動脈あたり 330 個では、MRI 画像で大脳半球に虚血による組織障害は認められたが、記憶機能の低下は認めなかった。マイクロビーズの量を 660 個に増量すると記憶機能の低下も認められた。また、細胞接着分子 E-selectin を標的としたワクチン作製のための E-selectin 遺伝子の単離、増幅を行った。

分担研究者 田平 武  
国立長寿医療センター研究所 所長

分担研究者 原 英夫  
国立長寿医療センター研究所 客員研究員  
藤田保健衛生大学医学部神経内科 准教授

分担研究者 旗野健太郎  
国立長寿医療センター研究所 長寿脳科学  
研究部 室長

分担研究者 中村紳一郎  
滋賀医科大学動物生命科学センター  
准教授

分担研究者 脇田英明  
国立長寿医療センター研究所 血管性認知  
症研究部 室長

分担研究者 富本秀和  
京都大学 脳病態生理学講座 臨床神経学  
講師

A. 研究目的

アルツハイマー病のワクチン開発

我々はウイルスベクターを用いたアミロイドワクチンを開発し、マウス、老齢サル

で安全性、有効性を示した。これまで抗認知症薬剤の開発は認知機能の変化を対照薬と比較して行われてきたが、それでは 6 ヶ月以上の長期間を必要とする。特に MCI のような軽症例ではさらに長期間が必要と考えられる。近年 PIB/PET を用いたアミロイドイメージングが行われるようになり、アルツハイマー病の診断が客観的に行われるようになった。そこで、サルを用いて Aβ ワクチンの効果判定に PIB/PET を効果判定が有用かどうかを調べることを、併せて安全性の更なる検討を加えることを目的とする。

血管性認知症のワクチン開発

血管性認知症の原因病変は梗塞、出血、白質病変等多様であるが、皮質下型は、血管性認知症の半数以上を占め、人口の高齢化とともに増加傾向にある。また、皮質下型の主要な責任病変である大脳白質病変は高齢者や軽度認知障害の多数に認められ、軽度認知障害から認知症へと進行する危険因子とされている。これらの白質病変や脳梗塞のペナンプラは、免疫細胞による炎症・免疫反応により重症化し、免疫細胞は病巣血管内皮細胞に発現する接着分子を介して脳に侵入する。本研究では、サルを用い

た脳虚血、微小脳梗塞のモデルを作製し、接着分子 E-selectin を標的とするワクチン療法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

### アルツハイマー病のワクチン開発

医薬基盤研究所つくば霊長類医学研究センターより20歳以上のカニクイザル10頭の分与を受けた。この10頭につき、平成19年10月より3回に分けて浜松ホトニクスに搬送し、全身麻酔下にPIB/PETを施行した。検査後核物質の減衰と体力の回復を待って滋賀医科大学動物生命科学研究センターに搬送し飼育を行った。全個体よりワクチン投与前の血清を採取し、A $\beta$ 抗体の測定を行った。飼育期間中高次脳機能検査の一つとして食物回収試験の訓練を行った。訓練が終わった4頭について、平成20年1月SeV/A $\beta$ -IL-10ワクチンを経口投与した。平成20年4月血中A $\beta$ 抗体測定、PIB/PET試験、食物回収試験を施行する予定である。

SeV/A $\beta$ ワクチンについてはマウスでは経鼻投与で著効が見られたがサルでは効果が十分ではなかった。そこで、マウスを用いて投与法の検討を行った。野生マウスにSeV/lacZを経口投与し、腸管を切り出し、lacZによる青色発色を行った。

### 血管性認知症のワクチン開発

カニクイザルを用いた実験は独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにて、名古屋市立大学の間瀬光人の協力により実施した。また、社団法人予防衛生協会の研究支援を受けた。カニクイザルの血管性認知症モデル動物は2頭作製した。具体的方法は、X線透視下セルジンガー法によりガイディングカテーテルを挿入して脳血管撮影を行った後、このガイディングカテーテルをガイドワイヤーを用いて総頸動脈に留置し、その中にマイクロカテーテルを通して先端を内頸動脈のサイフォン部手前に置き、その状態で滅菌された50 micronのマイクロビーズを1頭目は330個、2頭目は660個注入した。この手技を両側頸動脈に対して行い(1頭目合計660個、2頭目は合計1320個)、さらに1ヶ月をあけて反対側(右側)の大腿動脈から両側の内頸動脈にもう一度同量のマイクロビーズの注入を行った。MRI撮影はT1, T2, Proton, DWI, PWI, Tensor, T2\*, MRAの項目を撮影した。各動物につき処置前、1回目のマイクロビーズ注入当日、3日後、1ヶ月後、2回目マイクロビーズ注入当日、3日後、1ヶ月後、3-4ヶ月後(2頭目は

3日後まで実施)に撮影した。MRI画像解析では京都大学眞木崇州の協力を受けた。記憶機能の評価として、報酬(餌)の入った穴と入っていない穴を覚えさせ、穴にフタをし、間違わずに報酬の入っている穴から報酬を取り出す過程を解析し、認知機能の評価する食物回収試験を行った。E-selectinを標的とするワクチン開発では、国立長寿医療センター研究所吉崎嘉一、武田和也の協力を受けた。E-selectinのcDNAを単離した後、E-selectinの部分cDNA配列をPCR法にて増幅し、そのN末端部にHisタグを付加可能なベクターに挿入した。作製したベクターは全て、DNAシーケンサーにて、その配列を確認した。これらを用いて大腸菌をトランスフォーメーションし、IPTG添加で目的蛋白質を発現させた。菌体を回収し、PBS不溶画分より目的蛋白質を抽出し、各種クロマトグラフィー法により精製した。

### (倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については霊長類医学研究センターの規定に従い、動物愛護精神に則り慎重にいった。組換えDNA実験は各施設の組換えDNA実験安全委員会の承認を得て行った。また、カルタヘナ条約を遵守し、必要に応じて遺伝子情報を提供した。

## C. 研究結果

### アルツハイマー病のワクチン開発

老齢カニクイザル10頭にPIB/PETを施行した。老齢ザルでは若齢ザルに比しPIBの脳内集積が高いことが分かった。

PIB/PETを受け高次脳機能検査の訓練を受けた4頭にSeV/A $\beta$ ワクチンの経口投与を行った。投与を受けたサルは嘔吐や下痢などの消化器症状を示すことなく、食欲も変わらず副作用を示す所見は見られなかった。投与3ヵ月後の平成20年4月に血中A $\beta$ 抗体測定、PIB/PET試験、高次脳機能試験を行う予定である。

野生マウスにSeV/lacZワクチンを経口投与し、lacZによる青色発色をして腸管を調べた。投与マウスでは青色発色が強いかに見えたが、内因性 $\beta$ -galactosidaseの為に結論を得ることができなかった。 $\beta$ -galactosidaseに対する抗体で免疫組織染色も行ったが、非特異的反応が強く、結論に到らなかった。現在、SeV/GFPを用いて検討中。

### 血管性認知症のワクチン開発

血管性認知症のモデル動物については、MRI の撮像条件で最も恒常的な変化は T2 強調画像で認められた。基底核の低輝度域を対照とした場合、前脳の大脳皮質、白質の輝度の全般的増加を認め、特に島皮質で顕著であった。対照では大脳皮質深層は比較的高輝度を示すが、虚血に伴って層構造の乱れ、消失、部分的拡大を認めた。38日後は認めない脳萎縮を71日後には軽度認めた。FLAIR 画像は1頭目は38日以降の撮像となり2頭目は28日目までしかデータ解析が終了していないため結論は暫定的であるが、皮質の高輝度域が虚血によって増強する可能性がある。記憶機能の評価では、マイクロビーズを330個注入した1頭目は、虚血前と比較して、虚血導入後、食物回収試験におけるエラー回数は増加せず、記憶機能の低下は認められなかった。マイクロビーズを660個に増量した2頭目では、虚血導入後、食物回収試験におけるエラー回数は増加し、記憶機能の低下を認めた。血管性認知症に対するワクチン開発は、E-selectin 遺伝子の単離、増幅を行い、大腸菌での蛋白発現を確認した。また、ワクチンの抗原候補となる E-selectin 部分蛋白質を得た。

### D. 考察

#### アルツハイマー病のワクチン開発

本研究によりカニクイザルでも PIB/PET が可能であり、老齢サルでは若齢サルに比べ PIB の脳内集積が高いことが分かった。この方法を用いることによりワクチンの効果判定が短期間にかつ客観的にできると期待される。老齢サルでは脳幹や視床などでの PIB 集積が高く、これらもワクチンで軽減するか否かに興味を持たれる。

SeV は齧歯類の呼吸器に感染し、軽い風邪様症状を引き起こすが、ヒトでは無症状である。SeV/Aβワクチンを APP tg マウスに経鼻投与したところ著効を示し、学習機能の改善も見られた。そこで、老齢アフリカミドリザルに経鼻投与したが、効果が十分ではなかった。そこで、経口投与をマウスで試みた。感染が成立すると思われたが、内因性β-galactosidase の為に結論は得られなかった。SeV/GFP により結論が得られると期待される。もし経口感染が成立するとなれば、より高い効果が期待され、IL-10 遺伝子の挿入も不要となり、ハードルが下ると期待される。

### 血管性認知症のワクチン開発

血管性認知症のモデル動物についての MRI の解析の結果、島皮質を中心とした T2 強調画像での輝度上昇、大脳皮質深層の T2 高輝度の不規則化はこれらの領域における浮腫や微小梗塞を反映する可能性がある。後者の可能性については、T1 強調画像で明らかな変化を認めない点は典型的でないが、梗塞巣が小さく検出感度以下である可能性が高い。71日の長期間観察では脳萎縮が見られ、微小梗塞の結果生じた神経細胞死などの組織変化を反映するものと思われる。一方、記憶機能については、機能低下を発症するためには一側内頸動脈、一回あたりマイクロビーズを660個以上投与することが必要と考えられた。今後、並行して検討中の病理組織像と合わせて、総合的にモデルとしての適格性を評価するとともに、再現性についても検討し、ワクチン治療の有効性・安全性の評価に適した血管性認知症モデルを確立する。血管性認知症のワクチン開発は、単離、増幅した E-selectin 遺伝子を分担研究者の DNAVEC 株式会社井上誠によりセンダイウィルスベクターに組み込みワクチンを作製する。

### E. 結論

#### アルツハイマー病のワクチン開発

老齢カニクイザルに PIB/PET を施行し、老齢サルでは若齢サルに比し PIB の脳内集積が高いことが分かった。PIB/PET 検査後 SeV/Aβ ワクチンを投与し、経過観察中である。

#### 血管性認知症のワクチン開発

血管性認知症のモデル動物については、脳虚血による記憶機能障害を認め、虚血による組織障害が MRI 画像で検出可能であったが、今後、さらにマイクロビーズの用量を検討して、MRI による梗塞巣のより高感度な検出も必要である。また、血管性認知症に対するワクチン作製のための E-selectin 遺伝子の単離、増幅を行い、大腸菌での蛋白発現を確認した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

原著論文

Lakshmana, M.K., Hara, H., Tabira, T.

Amyloid beta protein-related death-inducin protein induces G2/M arrest: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **85**, 22: 62-71, (2007).

Tanahashi, H. & Tabira, T. A novel beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) isoform regulate by nonsense-mediated mRNA decay and proteasome-dependent degradation. *Neuroscience Letters* **428**, 103-108 (2007).

Kudo, T., Kanemoto, S., Hara, H., Morimoto, N., Morihara, T., Kimura, R., Tabira, T., Imaizumi, K., Takeda M. A. Molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Deat Differentiation* **30**, 1-12, (2007).

Araki, W., Takahashi-Sasaki, N., Chui, D.H., Saito, S., Takeda, K., Shirotani, K., Takahashi, K., Murayama, K.S., Kametani, F., Shiraishi, H., Komano, H. & Tabira, T. A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. *FASEB J.* **22**, 819-27, (2008).

Wang, J., Hara, H., Makifuchi, T., Tabira, T. Development and characterization of a TAPIR-like mouse monoclonal antibody to A $\beta$ . *J. Alzheim. Dis.* in press.

Liu, H., Wang, J., Sekiyama, A., Tabira T. Juzen-taiho-to, an Herbal Medicine, Activates and Enhances Phagocytosis in Microglia/ Macrophages. *Tohoku J. Exp. Med.* in press.

## 総説

Hara, H., Tabira, T. Oral A $\beta$  vaccine using adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. In Tabira, T., Yamamura, T. & Kira, J. (eds) *Current Topics in Neuroimmunology*. Medimond, Bologna, Italy, (2007), pp. 129-137.

## 著書

Tabira, T., Yamamura, T., Kira, J. *Current Topics in Neuroimmunology. Oral A $\beta$  vaccine using adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease.* Medimond, Bologna, Italy, (2007).

田平 武 : 神経・免疫・内分泌相関と年齢軸恒常性. 第1回年齢軸生体恒常性研究会シンポジウム 生命の統合的理解にむけて, 2007.11.30, 東京.

田平 武 : アルツハイマー病のワクチン療法最近の話題. 第14回 New Horizon for Neurosciences. 2007.12.01, 東京.

## 2. 学会発表

### 国内学会

#### 学会特別講演

田平 武 : 老化とアルツハイマー病—オーバービュー. 「アルミニウムと健康」連絡協議会主催第5回アルミニウムと健康フォーラム, 2007.04.21, 東京.

田平 武 : 基調講演 認知症予防のポイント. 毎日新聞社、(財) ぼけ予防協会主催 ミッドランドホール開設記念シンポジウム, 2007.04.28, 名古屋.

田平 武：認知症の臨床. 教育企画 Meet the Expert. 第 49 回老年医学会学術集会, 2007.06.21, 札幌.

田平 武：アルツハイマー・ワクチン開発. 第 192 回中部産業活性化センター (CIAC) フォーラム 2007.06.28, 名古屋.

田平 武：特別講演「アルツハイマー病の免疫療法－最近の話題－」. 第 21 回老年期痴呆研究会, 2007.07.28, 東京.

田平 武：アルツハイマー病とアンチエイジング医学. 抗加齢医学会主催 抗加齢医学の実際, 2007.09.17, 東京.

田平 武：Alzheimer's disease vaccine. R&D 技術「次世代ワクチン・アルツハイマー病、肥満、がん」. BioJapan2007-World Business Forum-, 2007.09.21, パシフィコ横浜.

田平 武：先端医療セッション アルツハイマー病のワクチン療法. かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム, 2007.11.21, 川崎.

田平 武：高齢サルを用いたアルツハイマー病遺伝子治療研究と将来展望. 第 16 回サル類疾病国際ワークショップ 霊長類における長寿科学研究と動物福祉環境, 2007.12.07, つくば.

田平 武：ストレスと脳. 岐阜市生涯学習センター主催講座, 2007.12.15, 岐阜.

田平 武：特別講演 アルツハイマー病

の免疫療法. 第 18 回日本老年医学会九州地方会. 2008.03.01, 福岡.

田平 武：基調講演 認知症のこれから - 予防・治療・ケア -. 第 3 回大府センター認知症フォーラム. 2008.03.13, 名古屋.

田平 武：特別講演 アルツハイマー病の免疫療法. 第 40 回摩耶神経カンファレンス. 2008.03.14, 神戸.

田平 武：アルツハイマー病のワクチン療法と今後の展望. 技術情報協会主催アルツハイマー病治療薬の最新開発動向. 2008.03.18, 東京.

シンポジウム講演

田平 武：シンポジウム 認知障害を理解する－発症機序の解明と薬剤治療の進展－アルツハイマー病のワクチン療法. 第 27 回日本医学会総会, 2007.04.07, 大阪.

原 英夫、田平 武：シンポジウム アルツハイマー病のワクチン療法. 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 2007.04.13, 金沢.

田平 武：免疫・内分泌と認知機能. シンポジウム 神経年齢－認知機能とアンチエイジング. 第 7 回日本抗加齢医学会総会, 2007.07.21, 京都.

田平 武：ウイルスベクターを用いたアルツハイマー・ワクチン. 日本薬学会大 128 回年会シンポジウム, 2008.03.28, 横浜.

一般発表

武田和也、MK Laksmana、吉崎嘉一、荒木  
亘、高橋慶吉、田平 武。AB-DIPによる神  
経細胞死機構の解析。第25回日本老年学  
会総会，2007.06.21，札幌。

国際学会

学会特別講演

Tabira T: Oral Abeta Vaccine using  
Adeno-associated Virus Vector for Alzheimer  
Disease. Seminar at the National Health  
Research Institute Zhu-Nan Campus,  
2007.06.29, Taipei.

Tabira T: Oral Abeta Vaccine using  
Adeno-associated Virus Vector for Alzheimer  
Disease. Keynote Lecture at the Annual  
Meeting of Geriatric Society of Taiwan,  
National Taiwan University Hospital  
International Conference Hall, 2007.07.01,  
Taipei.

シンポジウム講演

Tabira T: Prevention of Dementia. Inter  
national Symposium [Challenge: Functional  
Aging and Well-being] Sponsored by Busan  
City and Busan National University.  
2007.07.23, Busan, Krea.

Tabira T: [Symposium] Alzheimer's disease:  
Immune response and immunotherapy. Abeta  
vaccine using viral vectors for Alzheimer's  
disease. The 8th Asia/Oceania Regional  
Congress of Gerontology and Geriatrics,  
2007.10.22, Beijing.

Tabira T: Immunotherapy of Alzheimer's  
disease. Update in Treatment of Alzheimer's

disease, Busan-Gyeongnam Dementia  
Association Meeting, 2008.03.22, Busan,  
Korea.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

工業所有権の名称：組織アミロイドプラ  
ーク親和性抗体及びそれを用いた医薬組成物

発明者氏名：王 軍、田平 武

権利者氏名：国立長寿医療センター総長

大島伸一

出願番号：特願 2008-42116

特許出願日：2008.02.22

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



サルを用いたアルツハイマー病に対するワクチン療法の  
有効性・安全性の評価

分担研究者 田平 武  
国立長寿医療センター研究所長

研究要旨

老齢カニクイザルに PIB/PET を施行した。老齢ザルでは若齢ザルに比し PIB の脳内集積が高かった。この方法をアミロイドワクチンの有効性評価に用いることができるかどうかを見るために、老齢ザルに SeV/A $\beta$ ワクチンの経口投与を行った。投与を受けたサルは嘔吐、下痢などの消化器症状を何ら示さなかった。現在、経過観察中であり、次年度初めに投与 3 ヶ月目の血中 A $\beta$ 抗体の測定および PIB/PET を行う予定である。

分担研究者

田平 武<sup>1)</sup>、原 英夫<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>、井上誠<sup>4)</sup>

- 1) 国立長寿医療センター研究所所長
- 2) 同客員研究員
- 2) 藤田保健衛生大学医学部神経内科准教授
- 3) ディナベック株式会社戦略基盤技術開発部部長

A. 研究目的

本研究者らは世界に先駆けてアルツハイマー病に対する安全と思われる経口ワクチン、経鼻ワクチンを開発し、ヒトでの治験に向けて準備中である。今最も必要なのはワクチン効果の効率的な評価方法の確立である。これまでのアルツハイマー病の治療薬の開発は 6 カ月～1 年後の認知機能の低下の程度を偽薬と比較して行われてきた。しかし、この方法では長期間を要すること、とくに極初期の患者では更に長期間必要であるこ

とから、より短期間にかつ客観的な方法でその有効性を検定する方法が求められている。

近年アミロイドイメージングが現実のものとなりつつある。ピッツバーグ大学で開発されたプローブ [<sup>11</sup>C]PIB による PET 画像ではすでに多数のアルツハイマー病患者が試験を受け、正常白質や視床などの非特異的結合を画像処理により消去することで極初期のアルツハイマー病と対照をほぼ区別できるレベルに達している。本研究は老齢サルに我々が開発したワクチンを投与し、経時的にアミロイドイメージング検査を行い、その安全性・有効性を確認するとともに、効果判定に必要な期間を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

20 歳以上の老齢サル 14 頭を医薬基盤研究所つくば霊長類センターより提供を受け、

14 頭について PIB-PET を行ない、老人斑が十分あるもの 10 頭を選択する予定であったが、全身麻酔下の PET 検査に耐えうる老齢サル 14 頭をそろえることは難しいとのことで、比較的元気な 10 頭を提供していただいた。その 10 頭について順次浜松ホトニクスにおいて全身麻酔下に PIB/PET 検査が施行された（浜松ホトニクスでは老齢赤毛ザルの PIB-PET を行い、老人斑のイメージングが可能であることをあらかじめ確認していた）。その中から PIB 集積の比較的高いサル 8 頭を選び、4 頭ずつ二分し、一方にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに組換えた A $\beta$ ワクチンを投与、他方にセンダイウイルス(SeV)ベクターに組換えた A $\beta$ ワクチンを 1 回投与し、3 ヶ月後に血中 A $\beta$ 抗体の測定と高次脳機能検査及び PIB-PET を行い、投与前画像と比較するとともに、A $\beta$ 抗体価、高次脳機能検査結果も比較することにした。十分な改善が見られない場合 3 ヶ月後に追加免疫を行なうこととした。いずれの場合も、さらに 3 ヶ月後（すなわち最初のワクチン接種から 6 ヶ月後）に血中 A $\beta$ 抗体の測定と高次脳機能検査及び PIB-PET を行い、初回、2 回目の結果と比較することにした。効果判定には画像解析法を導入し有意差検定を行なうこととした。AAV ワクチンは米国ノースカロライナ大学 Jude Samulski 博士より提供を受けることとした。SeV ワクチンはディナベック社井上誠分担研究者から提供を受けた。PIB は GE 社から提供を受けた。サルは医薬基盤研究所つくば霊長類医科学研究センターから提供を受け、当初飼育もつくば霊長類医科学研究センターで引き受けていただく予定であったが、同センターの検疫室が工事のため使え

なくなるとのことで、飼育は滋賀医科大学動物生命科学研究センターに委託して行うこととなった。つくば-浜松間、浜松-滋賀医大間の輸送は業者に委託し、空調の整った輸送車によって行われた。画像解析とその有意差検定は加藤隆司室長（国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部）の協力得て分担研究者の簗野により行なわれた。本研究者らは AAV/A $\beta$ ワクチン接種によりサルでも老人斑が著明に消失することはすでに確認をしており、貴重な研究資源を確保する為に病理検査は行なわないこととした。

#### （倫理面への配慮）

サルを用いた本研究は国立長寿医療センター研究所動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。ワクチンの作製・投与は各施設の遺伝子組換え実験安全委員会及びバイオセーフティー委員会の承認を得て行い、動物飼育施設及び PET 検査業者にはカルタヘナ条約に基づき遺伝子情報を提供した。

#### C. 研究結果

本年 10 月にワクチン投与前の PIB/PET が 10 頭に施行された。老齢ザルでは若齢ざるに比し PIB の脳内集積が高値であった。詳しくは共同研究者の簗野により報告されている。やはり老齢であったためか PET 検査後浜松ホトニクスの回復室において 1 頭が死亡しているのが見つかった。死後動物は冷蔵庫に保管されたが、死後時間がたっていたので解剖は行われなかった。残りの 9 頭は検査後滋賀医大に移動し、飼育が継続されている。

当初の計画では North Carolina 大学から

提供される AAV ワクチンを先に投与し、PIB/PET を行う予定であった。しかし、米国における AAV ワクチンの治験に向けた手続きが凍結されたため、AAV ワクチンの供給もストップした。そこで、急遽計画を変更し、本年度は SeV ワクチンを投与することとした。SeV ワクチンは F 遺伝子を欠失

する SeV ベクターに A $\beta$  とヒト IL-10 を組換えたものを用いた。SeV/A $\beta$  ワクチンはマウスに対し 1 回の経鼻投与で著効を示したが、サルでは十分な効果が得られなかった。そこで投与方法を変更し、SeV は経口投与で腸管上皮に感染が成立するとの予備的結果がマウスで得られたので、サルでも経口投与することとした。経口投与は  $1 \times 10^8$  個のウイルスをカプセルに入れ、無麻酔で行われた。投与後サルは嘔吐、下痢等の胃腸症状を何ら示さなかった。当初計画では本年度中に PIB/PET を繰り返す予定であったが、投与するワクチンが AAV から SeV に変更されたため現在、投与 3 か月後の A $\beta$  抗体と PIB/PET 検査を待っているところである。

#### D. 考察

わが国の認知症患者は軽度認知障害も含めると 65 歳以上の高齢者の約 10% と推定され、その原因の大半を占めるアルツハイマー病と血管性認知症の根本的予防・治療法の開発は急務の課題となっている。1999 年米国エラン社の Dale Schenk らはアルツハイマー病のモデルマウスであるミロイド前駆体蛋白 (APP) トランスジェニックマウスを A $\beta$  で免疫したとき、老人斑アミロイドの蓄積が著しく抑えられることを発見し

た。次いで彼らは合成 A $\beta$ 1-42 とアジュバント QS21 からなる AN-1792 ワクチンの治験を行なったが、自己免疫性と思われる髄膜脳炎が 6% の患者に起こったために治験は中止になった。現在彼らは A $\beta$  抗体による治験を実施中であると聞くが、抗体は完全ヒト型ではない為中和抗体や抗イディオタイプ抗体ができる可能性、血管炎や脳出血の可能性があり、繰り返し静脈注射するので患者負担は大きくかつ高価であり、しかも予防投与には向かない。我々が開発した腸管免疫等の粘膜免疫を利用する方法は投与が容易で患者負担は少なく、容易に抗体の上昇が得られ、かつ長期に持続する。さらに、T ヘルパー 1 細胞の反応は抑えられているので脳炎などの副作用が起こりにくい利点があり、予防投与も可能である。本研究では我々が開発した安全かつ有効なワクチンを 1 日も早く実用化するために、アミロイドイメージングを用いてその有効性を客観的に判定しようとするもので、きわめてユニークであり、これを使うことで治験期間を大きく短縮することができると期待される。

本研究者はまずアデノ随伴ウイルスベクターに A $\beta$ 1-43 cDNA を組換えた経口ワクチンを開発した。このワクチンは APP トランスジェニックマウスに 1 回だけ経口接種するだけできわめて有効であり、脳炎などの副作用は見られず、ワクチン投与マウスの学習機能は有意に改善された (1、2)。さらに老齢サルでも安全性、有効性を示した (論文準備中)。また本研究者は SeV ベクターに A $\beta$ 1-43 cDNA と IL-10 cDNA を組換えた経鼻ワクチンも開発した。これを高齢の APP トランスジェニックマウスに 1 滴だ

け経鼻投与すると 8 週間には老人斑がほとんど消失し、脳炎などの副作用は全く認めなかった（論文投稿中）。この経鼻ワクチンを老齢アフリカミドリザルで試験したところ副作用はみられなかったが、十分な効果も得られなかった。おそらく点鼻したウイルス液の量が少なかったことと、すぐにサルを立たせたためにウイルス液が鼻水と一緒に出てしまった可能性がある。マウスでは同じ 50  $\mu$ l でも鼻腔が小さいので肺まで吸い込み、肺に感染している可能性が考えられた。そこで、マウスを用いて drug delivery の研究を行った。SeV に lacZ を組換えたものを経口投与して胃、小腸の $\beta$ -gal 発色を行ったところ、一部の腸管上皮が強く青色に発色した。しかし、発色時間を 2 日、3 日と長くすると対照との差が明らかではなくなった。そこで、 $\beta$ -galactosidase の免疫組織染色を試みたが、非特異的反応のため結論を得ることができなかった。現在、SeV に GFP 遺伝子を組換えたものを経口投与し、腸管をしらべる準備をしている。

以上、本研究は 1 年目であり、まだ十分な成果は上がっていないが、サルを用いた PIB/PET 検査を行うことができた。老齢サルでは PIB の脳内集積が若齢サルより高いことが明らかとなった。来年度にはワクチンの効果を PIB/PET 検査で判定できる方法が確立されると期待される。

#### 文献

Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T: Development of a safe oral Abeta vaccine using

recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alzheim Dis.* 6: 483-8, 2004.

Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi S, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a recombinant adeno-associated viral vector attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without lymphocytic infiltration in Tg2576 mice.

老齡サルのアミロイドβイメージング

分担研究者 旗野 健太郎

国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部加齢性変化研究室長

研究要旨

老齡サルのアミロイドβイメージングを行った。老齡サルの $^{11}\text{C}$ PIB取り込みは若齢に比べ高い傾向を示し、より多くのAβが存在していることが示唆された。

A. 研究目的

サルを用いた、アミロイドβタンパク（Aβ）ワクチンの有効性検定法の確立を目指し、PETによるAβイメージングを行った。

B. 研究方法

20歳以上の老齡サルおよび5歳程度の若齡サルに対しPETによるAβイメージングを行なう。炭素-11標識ヨウ化メチルにより $^{11}\text{C}$ PIBを合成し、サルに静脈内投与してPETスキャナー（SHR-7700、浜松ホトニクス）にてダイナミック撮像した。画像に関心領域（ROI）を設定して放射能濃度をもとめ、結果はstandardized uptake value（SUV）で表した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立長寿医療センター研究所動物実験倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

図1に若齢および老齡サルの $^{11}\text{C}$ PIBの代表的な集積像を示す。両者とも脳幹、視床、線条体に比較的高い取り込みを示した。これはヒトの $^{11}\text{C}$ PIB-PETにも見られる現象である。MRI画像をガイドにして関心領域（ROI）を設定し放射能取り込みを測定した結

果を図2に示す。老齡サルの $^{11}\text{C}$ PIB取り込みは全ての脳領域で若齢よりも高い傾向を示した。

D. 考察

若齡、老齡サル間の比較検討は必ずしも本研究の目的ではないが、老齡サルの $^{11}\text{C}$ PIB取り込みが若齢に比べ高い傾向を示したことは、老齡サルにより多くのAβが存在していることを示唆しており、ワクチン処理のbaseline studyとして興味深い。

E. 結論

老齡サルのAβイメージングを行った。老齡サルの $^{11}\text{C}$ PIB取り込みは若齢に比べ高い傾向を示し、より多くのAβが存在していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

Uptake of  $^{11}\text{C}$ PIB in Young and Aged Monkey Brain

図1 Representative PET Images

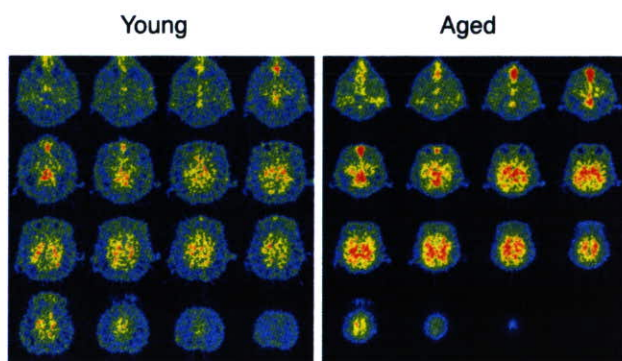
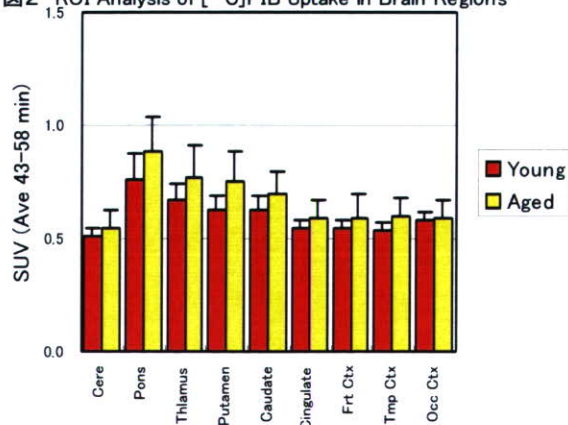


図2 ROI Analysis of  $^{11}\text{C}$ PIB Uptake in Brain Regions



H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

血管性認知症のワクチン開発

分担研究者 脇田英明 国立長寿医療センター研究所

研究要旨

カニクイザルを用い、マイクロビーズを両側内頸動脈から注入する血管性認知症モデルを作製し、記憶機能を評価した。脳虚血による記憶機能障害を認めた。また、血管性認知症に対するワクチン作製のためのE-selectin遺伝子の単離、増幅を行い、大腸菌での蛋白発現を確認した。

A. 研究目的

血管性認知症の原因病変は梗塞、出血、白質病変等多様であるが、皮質下型は、血管性認知症の半数以上を占め、人口の高齢化とともに増加傾向にある。また、皮質下型の主要な責任病変である大脳白質病変は高齢者や軽度認知障害の多数に認められ、軽度認知障害から認知症へと進行する危険因子とされている。これらの白質病変は、免疫細胞による炎症・免疫反応により重症化し、免疫細胞は病巣血管内皮細胞に発現する接着分子を介して脳に侵入する。本研究では、サルを用いた血管性認知症のモデルを作製し、認知機能の評価を行い、画像解析と比較検討し、脳虚血病変と認知機能障害の関係を明らかにするとともに、接着分子E-selectinを標的とするワクチン療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

カニクイザルを用いた実験は独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにて、名古屋市立大学の間瀬光人の協力により実施した。また、社団法人予防衛生協会の研究支援を受けた。モデル動物は富本秀和のMRI研究で作製したものを本研究でも用い、カニクイザルの血管性認知症モデル動物を2頭作製した。具体的方法は、X線透視下セルジンガー法によりガイドイングカテーテルを挿入して脳血管撮影を行った後、このガイドイングカテーテルをガイドワイヤーを用いて総頸動脈に留置し、その中にマイクロカテーテルを通して先端を内頸動脈のサイフォン部手前に置き、その状態で滅菌された50 micronのマイクロビーズを1頭目は330個、2頭目は660個注入した。この手技を両側頸動脈に対して行い(1頭目合計660個、2頭目は合計1320個)、さらに1ヶ月をあけて反対側(右側)の大腿動脈から両側の内頸動脈にもう一度同量のマイクロビーズの注

入を行った。記憶機能の評価として、報酬(餌)の入った穴と入っていない穴を覚えさせ、穴にフタをし、間違わずに報酬の入っている穴から報酬を取り出す過程を解析し、認知機能を評価する食物回収試験を行った。

E-selectinを標的とするワクチン開発では、国立長寿医療センター研究所吉崎嘉一、武田和也の協力を受けた。E-selectinのcDNAを単離し、E-selectinの部分cDNA配列をPCR法にて増幅し、そのN末端部にHisタグを付加可能なベクターに挿入した。作製したベクターは全て、DNAシーケンサーにて、その配列を確認した。これらを用いて大腸菌をトランスフォーメーションし、IPTG添加で目的蛋白質を発現させた。菌体を回収し、PBS不溶画分より目的蛋白質を抽出し、各種クロマトグラフィー法によりこれを精製した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については霊長類医学研究センターの規定に従い、動物愛護精神にのっとり慎重に行った。

C. 研究結果

カニクイザル血管性認知症モデルの記憶機能の評価では、マイクロビーズを330個注入した1頭目は、虚血導入前と比較して、虚血導入後、食物回収試験におけるエラー回数は増加せず、記憶機能の低下は認められなかった。そこで、2頭目は注入するマイクロビーズを660個に増量した。その結果、虚血導入前と比較して、虚血導入後、食物回収試験におけるエラー回数は増加し、記憶機能の低下を認めた。血管性認知症に対するワクチン開発は、

E-selectin遺伝子の単離、増幅を行い、大腸菌での蛋白発現を確認した。また、ワクチンの抗原候補となるE-selectin部分蛋白質を得た。

#### D. 考察

カニクイザルの両側内頸動脈に、マイクロビーズを1か月間隔で2回注入する方法で、記憶機能の低下を発症するためには一側内頸動脈、一回あたりマイクロビーズを660個以上投与することが必要と考えられた。並行して検討中のMRI画像、病理組織像と合わせて、総合的にモデルとしての適格性を評価するとともに、再現性についても検討し、ワクチン治療の有効性・安全性の評価に適した血管性認知症モデルを確立する。

血管性認知症のワクチン開発は、単離、増幅したE-selectin遺伝子を分担研究者のDNAVEC株式会社井上誠によりセンダイウィルスベクターに組み込みワクチンを作製する。

#### E. 結論

カニクイザルを用い、マイクロビーズを両側内頸動脈から注入する血管性認知症モデルを作製し、記憶機能の評価した。結果、脳虚血による記憶機能障害を認めた。また、血管性認知症に対するワクチン作製のためのE-selectin遺伝子の単離、増幅を行い、大腸菌での蛋白発現を確認した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 研究協力者

間瀬光人

名古屋市立大学大学院医学研究科

社会復帰医学講座

神経機能回復学

准教授

吉崎嘉一

国立長寿医療センター

外来研究員

武田和也

国立長寿医療センター

特任研究員



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

霊長類血管性認知症モデル動物の確立とMRI画像解析

分担研究者 富本秀和 京都大学 脳病態生理学講座

研究要旨

カニクイザルを用い、マイクロビーズを両側内頸動脈から注入する血管性認知症モデル動物を作製しMRI画像を評価した。MRI画像上大脳半球に虚血による組織障害を検出した。

A. 研究目的

血管性認知症の原因病変は梗塞、出血、白質病変等多様であるが、皮質下型は、血管性認知症の半数以上を占め、人口の高齢化とともに増加傾向にある。また、皮質下型の主要な責任病変である大脳白質病変は高齢者や軽度認知障害の多数に認められ、軽度認知障害から認知症へと進行する危険因子とされている。本研究では、サルを用いた血管性認知症のモデルを作製し、MRIによる大脳白質病変を含めた画像解析を行い、脳虚血病変と認知機能障害の関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

モデル動物の作製は独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにて実施した。カニクイザルを用いたモデル動物の作製を2頭について行った。モデル動物は名古屋市立大学の間瀬光人の協力により作製した。また、社団法人予防衛生協会の研究支援を受けた。具体的には、X線透視下セルジンガー法により右大腿動脈にガイディングカテーテルを挿入して脳血管撮影を行った。この後、このガイディングカテーテルをガイドワイヤーを用いて総頸動脈に留置し、その中にマイクロカテーテルを通して先端を内頸動脈のサイフォン部手前に置き、その状態で滅菌された50 micronのマイクロビーズを1頭目は330個、2頭目は660個注入した。この手技を両側頸動脈に対して行い(1頭目合計660個、2頭目は合計1320個)、さらに1ヶ月をあけて反対側(右側)の大腿動脈からもう一度同量のマイクロビーズを両側に注入した。

MRI撮影はT1, T2, Proton, DWI, PWI, Tensor, T2\*, MRAの項目を撮影した。各動物につき処置前、1回目のマイ

クロビーズ注入当日、3日後、1ヶ月後、2回目マイクロビーズ注入当日、3日後、1ヶ月後、3-4ヶ月後(2頭目は3日後まで実施)に撮影した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については霊長類医学研究センターの規定に従い、動物愛護精神にのっとり慎重に行った。

C. 研究結果

撮像条件で最も恒常的な変化はT2強調画像で認められた。基底核の低輝度域を対照とした場合、前脳の大脳皮質、白質の輝度の全般的増加を認め、特に島皮質で顕著であった。対照では大脳皮質深層は比較的高輝度を示すが、虚血に伴って層構造の乱れ、消失、部分的拡大を認めた。38日後は認めない脳萎縮を71日後には軽度認めた。FLAIR画像は1頭目は38日以降の撮像となり2頭目は28日目までしかデータ解析が終了していないため結論は暫定的であるが、皮質の高輝度域が虚血によって増強する可能性がある。

D. 考察

島皮質を中心としたT2強調画像での輝度上昇、大脳皮質深層のT2高輝度の不規則化はこれらの領域における浮腫や微小梗塞を反映する可能性がある。後者の可能性については、T1強調画像で明らかな変化を認めない点は典型的でないが、梗塞巣が小さく検出感度以下である可能性が高い。71日の長期間観察では脳萎縮が見られ、微小梗塞の結果生じた神経細胞死などの組織変化を反映するものと思われる。

E. 結論

マイクロビーズの動脈内投与による組織障害がMR画像で検出可能であった。今後、さらにマイクロビーズの用量を検討して梗塞巣のより高感度な検出が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

眞木崇州

京都大学 脳病態生理学講座

大学院生

間瀬光人

名古屋市立大学大学院医学研究科

社会復帰医学講座

神経機能回復学

准教授

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

サルを用いたアルツハイマー病及び血管性認知症に対するワクチン療法の有効性、安全性  
の評価

老齢カニクイザルにおけるワクチン効果の評価に関わる予備的研究

分担研究者 中村 紳一朗 滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授

研究要旨：サル類を用いたアルツハイマー病ワクチンの効果を、前臨床試験として評価するためには、生体から得られる情報のみで評価する必要がある。本分担研究ではサル類を用いた評価系を開発する基礎的検討を行った。1) ワクチン効果が高次機能の改善をもたらすとの予想の元、食物回収試験による行動学的評価を計画した。試験に供与された高齢ザルは試験課題に積極的に取り組みするまでに馴致された。ワクチン効果による効果の評価は検討中である。2) サルの脳脊髄液（CSF）内のアミロイドβ蛋白（Aβ）量が脳内のAβ沈着量と相関すれば、ワクチンの評価に使えるものと考え、CSFのAβ量と年齢ならびに脳内Aβ沈着量との関係を、すでに保管してあるサルの脳と当該症例のCSFを用いて検索した。年齢と脳脊髄液内のAβ量との間には、明らかな関係は見られなかった。CSFのAβ量と脳内Aβ沈着量との関係は現在検討中である。

A. 研究目的

アルツハイマー病ワクチンの効果をヒトに外挿するためには、前臨床試験としてサル類を用いた評価系が必要である。前臨床試験には生体から得られた情報のみで効果を見るための評価系が必要であるが、サル類の場合、評価を行うための基礎的情報に乏しい。そこで、本分担研究では、1) ワクチン効果が高次機能の改善をもたらすとの予想の元、食物回収試験による行動学的評価を行った。また2) サルの脳脊髄液（CSF）内のアミロイドβ蛋白（Aβ）量が脳内の

Aβ沈着量と相関すれば、ワクチンの評価に使えるものと考え、CSFのAβ量と年齢ならびに脳内Aβ沈着量との関係を、すでに保管してあるサルの脳と当該症例のCSFを用いて検索した。

B. 研究方法

実験1: 20歳から26歳の高齢カニクイザル9頭を用いて、1cmの9つの可動式ふた付き穴が空いたパネルから、約5mm角のリンゴ小片を取り出す食物回収試験を行った。9つすべての穴からエサを取るまでの時間、すべてのエサを取るまでの間に、すでにエサを取ってしま

った穴に誤って再度指を入れてしまうエラーをどの程度行うか、によって認知能を評価した。

実験 2 : 死亡個体である 5 歳から 36 歳のカニクイザル 14 頭の脳脊髄液 (CSF) 中の A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 を ELISA kit (WAKO) で計測し、年齢との関係を確認した。これらの動物はいずれも脳のパラフィンブロックがあるが、脳に沈着する A $\beta$ 量との関係は、今回、検索しなかった。

(倫理面への配慮)

本実験 1 は滋賀医科大学の動物実験委員会で適正な審議によって承認され、適切な飼育ならびに管理環境の元に実施されたものである。実験 2 は死亡動物の材料を使用した実験で、倫理的には問題はない。

### C. 研究結果

実験 1: 高齢ザルの 9 例中 8 例の動物が、試行に対して 30 秒以内に、9 つの穴のすべてからエサを回収した。1 頭は術者が少しでも近くにいと課題に取り組まない。すべてを取る間に、すでにエサを採取してしまった穴を繰り返し開ける個体が数頭いた。エラーを含めた評点、ワクチン接種前後の評点の差などについては今後、検討する予定である。

実験 2 : CSF の A $\beta$ 量と年齢との関係は見られなかった (Table)。1 例を除いて、A $\beta$ 40 が高い動物は A $\beta$ 42 も高い傾向にあった (Table)。

Table A $\beta$  concentration in CSF of cynomolgus monkeys

	Sex	Age	CSF (pmol/L)	
			A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
1	F	9y3m	250.5	26.1
2	M	5y10m	197.6	26.2
3	M	6y1m	227.8	14.7
4	F	17y6m	10.9	3.9
5	M	6y6m	295.8	1.4
6	F	23y3m	59.3	16.5
7	F	22y7m	15.7	3.1
8	F	18y11m	14.7	2.1
9	F	5y11m	9	1.2
10	F	19y9m	122.1	8.2
11	M	6y3m	356.1	52.5
12	F	24y9m	114.6	26.3
13	F	36y3m	265.6	35.9
14	F	29y9m	250	8.2

### D. 考察

アルツハイマー病ワクチンの効果を検証するためには、衰えた何らかの機能の回復を確認する指標が必要である。しかしサルでは、それに関わる基礎的な情報が少ない。一方で、高齢のカニクイザルでは難しい課題にはなかなか取り組まないという欠点が指摘されている。久保ら (Kubo et al. 2001) はエサを使った食物回収の比較的簡単な課題を与えることで、上記の欠点を改善した。今年度の研究で、滋賀医科大学においても久保らの方法を適応が可能であることを確認した。

近年では A $\beta$ の沈着量を MRI にて描出するピッツバーグコンパウンド (PIB) が広く知られているが、特殊な施設が必要である。一方、CSF は生体