

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学 研究事業

ヒト・アルツハイマー病に対するDNAワクチン療法
の確立を目指して

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 陽

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト・アルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法確立を目指して・・・4
松本 陽

II. 分担研究報告

1. アルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法の開発・・・14
松本 陽
2. DNA ワクチンの作用機序に関する研究・・・20
大倉良夫
3. DNA ワクチン投与動物の行動解析に関する研究・・・24
蕨 陽子
4. DNA ワクチンの作製に関する研究・・・26
神山邦子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・30

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・34

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ヒト・アルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法の確立を目指して

主任研究者 (財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

参事研究員、プロジェクトリーダー 松本 陽

研究要旨

非ウイルス性 A β -DNA ワクチンはヒト・アルツハイマー病に対して有効で、副作用のない治療法になりうる。また、その作用機序としてはワクチン投与によって活性化したミクログリアによる A β 沈着物の食食が主体である事が明らかとなった。

分担研究者 大倉良夫
東京都神経科学総合研究所
客員研究員

分担研究者 藤 陽子
東京都立神経病院 医師
東京都神経科学総合研究所
客員研究員

分担研究者 神山邦子
東京都神経科学総合研究所
研究員

A. 研究の背景と目的

アルツハイマー病は、今から約 100 年前

ドイツの精神医学者アルツハイマーにより最初に報告された神経疾患である。認知障害(記憶障害、見当識障害、学習の障害、注意の障害、空間認知機能、問題解決能力の障害など)を主症状として中年以降に多発し、世界中で 1200 万人を超える患者が存在すると考えられている。症状は、数年の経過を経て徐々に進行し、しばらくすると社会的に適応できなくなり、重度になると摂食や着替え、意思疎通なども不可能となる。発症後数年から十数年で寝たきりになり死に至る。経過中に被害妄想、幻覚や暴言・暴力・徘徊・不潔行為などの問題行動が出現することが多く、患者本人ばかりか家族や介護者を含めた大きな社会問題となっている。

アルツハイマー病の病理像の特徴は、老

人斑、神経原線維変化(neurofibrillary tangle)、神経細胞脱落の3つを挙げることができる。老人斑は β アミロイド ($\text{A}\beta$) が細胞外に沈着したものでアミロイド前駆体蛋白から蛋白分解を受けて作られる。神経原線維変化は主として過リン酸化したタウ蛋白の沈着であると考えられている。近年、 $\text{A}\beta$ の沈着がこの病態の最上流に位置し、 $\text{A}\beta$ 蓄積を防止できるならば、その後起きる事象、すなわち、神経細胞内のタウの蓄積、神経細胞の脱落、そして痴呆を防ぐことができるとする「アミロイド仮説」が広く受け入れられるようになっていく。

アミロイド仮説を基に1999年画期的な $\text{A}\beta$ ペプチド・ワクチン療法がSchenkらにより提唱された。彼らは、体外から $\text{A}\beta$ ペプチドを免疫賦活剤(アジュバンド)と共に投与し、体内に抗 $\text{A}\beta$ 抗体の産生を誘導し、脳内の $\text{A}\beta$ 蓄積が減少することをアルツハイマーモデルマウスで証明した。その後、学習記憶能力もワクチンにより改善されることが報告された。これらの報告以後、急速にワクチン療法の研究開発が進むことになり、動物実験のデータを基に欧米においてヒトにおける $\text{A}\beta$ ワクチン($\text{A}\beta$ 1-42アジュバンド)の臨床試験が開始されることとなる。Elan社にて製造された合成 $\text{A}\beta$ 42製剤であるBetabloc (AN-1792)は、第I相試験において約100例の軽度から中等度のアルツハイマー病の患者に投与された。第I相試験は重要な副作用もなく終了し、投与された患者の血清中に抗 $\text{A}\beta$ 抗体が生体内で合成されたことが確認された。第I相試験に引き続き2001年9月からアメリカとヨーロッパの30の施設において外来アルツハイマー患者に第II相試験が

行われた。しかし実薬投与を受けた298例のうち18例(6%)に髄膜脳炎が発症し障害を残す重症症例も出たため、2002年1月に治験自体が中止された。これらの患者では $\text{A}\beta$ に反応するTh1型CD4陽性細胞が脳に浸潤し、アレルギー性実質的脳脊髄炎のような髄膜脳炎を引き起こしたのではないかと推察された。以上のように臨床試験は不満足な結果に終わったものの、後に、その詳細が明らかにされ、ワクチン療法に重要な情報を提供することになった。2003年に死亡例の剖検所見が発表された。死亡例は72歳の女性で5年間の緩徐進行性の記憶障害の経過があった。AN-1792を5回投与された。初回投与の42週後である2001年5月から脳炎症状が出現したため、投薬は直ちに中止され脳炎の治療が行われたものの、寝たきりとなり2ヶ月後の2002年2月に肺梗塞のため死亡した。脳病理はBraak stage V-VIのアルツハイマー病の所見であった。脳炎の所見として髄膜、髄膜血管周囲及び大脳皮質へのT細胞とマクロファージの浸潤が認められ、大脳白質には髄鞘繊維の減少が認められた。一方、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。老人斑が消失している部位では $\text{A}\beta$ 分解産物を貪食したミクログリアの像も認められ、ワクチンがヒトのアルツハイマー病においても老人斑の減少効果があると推測された。さらにその後、Gilmanらは臨床試験の最終報告を行いワクチン投与300名中59人が抗体陽性であり、陽性群では各種高次機能試験のうちneuropsychological test battery (NTB)で改善の有意差を示したと報告した。これらの事実は、能動免疫療法により

脳内炎症症状が出現したものの、ワクチンによる A β 減少効果が、ヒト・アルツハイマー病症例においても認められることを示すものである。従って、過剰な免疫反応を抑制することができれば、ヒトにおいてもワクチン療法が有効である可能性が高いことを示している。

本研究ではペプチド・ワクチンに変わる副作用の少ない治療法として、非ウイルス性 DNA ワクチンを開発し、臨床応用の可能性を検討した。また、DNA ワクチンの作用機序についても検討を加えた。

B. 研究方法

pTarget プラスミド(ProMega)に A β 1-42 を組み込み、A β ペプチドが細胞外に分泌されるワクチンを開発した。A β -DNA ワクチンをアルツハイマー病のモデルマウス(APP23 Tg mouse)の4ヶ月齢、12ヶ月齢群に3-8ヶ月間投与し脳アミロイドの沈着の変化を検討した。ワクチンは、最初の6回まで週1回、7回目以後は2週間に1度の間隔で100 μ g ずつ筋注した。

治療効果の判定は以下のように行った。治療群、対照群の脳に矢状断を加え固定後、パラフィン切片を作製した。抗 A β 抗体を用いた免疫染色を行い、大脳皮質と海馬において A β 沈着を画像解析により定量化した。

A β ペプチドと A β -DNA ワクチンをそれぞれ数回投与したモデルマウスと野生型マウスの所属リンパ節、脾細胞を採取して、A β 1-40 に対する T 細胞反応性を検索した。また、抗 A β 抗体は ELISA で、脳内の炎症巣の有無は抗 T 細胞抗体、抗マクロファージ抗体を用いた免疫染色で検討した。

ワクチンの作用機序を解析するために、治療群及び未治療群の脳切片を Iba-1 (microglia)及び6 F3D (A β)で二重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。さらに、抗 A ベータ抗体による A β 沈着の直接分解、及び引き抜き効果についても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

動物の飼養および実験上の処置については、「動物の愛護及び管理に関する法律」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び東京都神経科学総合研究所動物実験倫理委員会が定める動物実験指針を遵守して行なった。

また、本研究では遺伝子操作により DNA ワクチンを作製し、それを遺伝子改変マウス、及びサルに投与した。研究目的での遺伝子操作はすでに当研究所の研究倫理委員会、遺伝子組換え実験委員会での審査を受け承認されており、動物実験については動物実験倫理委員会の審査を受けている。

C. 研究結果

今回哺乳類細胞発現ベクターである pTarget プラスミド(Promega)に A β 1-42、及び付属のシークエンスを挿入して3種類のアルツハイマー病非ウイルス性 DNA ワクチンを製作した。一つ目は A β 1-42 のみを挿入したもの(K-A β ワクチン)、二番目に発現タンパク質の分泌を向上させるためにマウス Ig κ シグナルを付加したもの(IgL-A β ワクチン)、三番目に、分泌したタンパク質の可溶性を向上させるた

めに Immunoglobulin の Fc 領域を付加したもの (A β -Fc ワクチン)である。作成した 3 種類のベクターは HEK293T cell に transfect し、その細胞内に A β 1-42 ペプチドが発現し、培養上清に分泌されているか否かを ELISA 法により検討した。IgL-A β 、A β -Fc ワクチンは培養上清中に A β 1-42 ペプチドが、良好に分泌されていたが、A β 1-42 のみを挿入した K-A β ワクチンは、A β 1-42 ペプチドが培養上清中に分泌されておらず、予備的実験で A β 抑制効果が他の二つのワクチンに比べて低いことが分かり、K-A β ワクチンは詳細な検討から除外した。

ワクチン投与後種々の時期に、マウスの脳を免疫組織化学染色し、沈着した A β を画像解析したところ、A β 沈着がまだ出現していない 4 ヶ月齢からワクチンを投与した予防的投与群においては 70-90%、既に A β 沈着が認められた 12 ヶ月齢から治療的にワクチンを投与した治療的投与群においては 50-60% の A β 沈着がコントロール群に比較し減少していることが確認された。ワクチンの効果は投与回数に依存する傾向があり 1 ヶ月に 1 度投与した場合 A β の減少効果は減弱した。DNA ワクチン投与後の脳を詳細に検索したが A β ペプチド・ワクチンを投与したときに見られる T 細胞の浸潤や炎症細胞の浸潤といった脳髄膜炎を思わせる所見はまったく認められなかった。さらにモデルマウスと同系で遺伝子操作を行っていないマウスにワクチンを投与し、そのリンパ節細胞から 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が、抗原反応性 T 細胞の活性化はまったく誘導されていなかった。これらの所見から DNA ワクチンによる過剰な免疫反応はほとん

どなく A β を減少する効果があると考えられた。

作用機序の分析では、まず初めに DNA ワクチン投与後のミクログリアの活性化の程度を知るためにワクチン投与したマウスと対照群のマウスの脳切片を Iba-1 (microglia surface marker)、及び 6F/3D (anti-A β 8-17) で二重染色し、病理学的に検索した。Wild type の B6 マウスにおいては、小さな細胞質と細い突起を持つ休止型ミクログリアが脳全体に分布していた。未治療のアルツハイマーモデルマウス (APP23) では、アミロイド斑周囲領域 (periplaque area) に、大きな細胞質と太い突起を持つ活性化ミクログリアがアミロイド斑周囲に認められ、ミクログリアの突起はアミロイド斑に入り込んでいた。アミロイド斑から離れた領域 (remote area) ではミクログリアは wild type B6 マウスで観察されたように休止型であり、活性化像認められなかった。これに対して、治療群のアルツハイマーモデルマウスでは periplaque area のミクログリアはアミロイド斑の周囲で塊状となって有意に数を増して ($P < 0.01$) おり、remote area でも、ミクログリアはその数を増し、活性型に変化していた (Fig. 5-A)。ミクログリアの数の増加の割合は periplaque area よりも remote area で大きかった。

二重染色においてミクログリア内にアミロイドを認めることがしばしばあり、ミクログリアの貪食能が亢進している可能性が考えられたために、蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡を用いてミクログリアの貪食能の変化を検索した。共焦点顕微鏡による観察ではミクログリアの中に、A β 沈着が観察された。三次元解析をすることにより A β 沈着がミクログリア内に

あることを確認した。アミロイドを貪食したミクログリア数は、ワクチン投与群で有意に増加していた($P < 0.01$)。

ミクログリアは、あるときは神経保護的に、あるときは神経損傷的に作用することが知られており、ワクチン投与後のミクログリアの増加がどちらの場合にあたるのかを、神経障害性サイトカインである $TNF-\alpha$ を指標にして推測した。LPS 処理マウス及び MOG-EAE-誘導マウスでは $TNF-\alpha$ が著明に増加していたものの、ワクチン投与後の増加は認められなかった。増加したミクログリアは神経保護的に作用しているものと考えられた。近年、oligomer として存在する可溶性 $A\beta$ (soluble $A\beta$) にも、シナプス障害等の神経細胞障害作用が認められることが報じられているが、我々の系においてもワクチン投与により脳内の oligomer が減少することが western blotting 法により確かめられており、特に remote area の活性型ミクログリアの増加は、 $A\beta$ oligomer の除去に関与しているものと考えられる。

さらに我々は、DNA ワクチンの投与後、体内で誘導された抗 $A\beta$ 抗体が直接 $A\beta$ に反応し、解離、可溶化を引き起こし沈着した $A\beta$ を除去する可能性について検討した。これは直接的評価が難しく、治療群及び未治療群のマウス血清がアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド斑と反応性を持つか否かを tissue amyloid plaque immunoreactivity (TAPIR) にて検討し、間接的に推測した。治療群の抗 $A\beta$ 抗体は未治療群の抗体に比較して抗体価が高かったものの $A\beta$ に対する結合反応は著明ではなかった。抗体による $A\beta$ の解離、可溶化作用は

さほど強くないと考えられた。

次に脳内から末梢血中に $A\beta$ の引き抜きが起こっている可能性 (peripheral sink hypothesis) を知るために治療群及び未治療群のマウスの血清 $A\beta$ を測定した。9ヶ月齢のマウスでは治療群の一部で血清 $A\beta$ 量が高値であり脳から血液への $A\beta$ の移行が亢進していると考えられた。しかし15ヶ月齢では治療群及び未治療群で血清 $A\beta$ 値に変化はなかった。血管にアミロイドーシスが進行していない9ヶ月齢ではワクチン投与後、引抜が亢進している可能性があるものの、15ヶ月齢では血管のアミロイドーシスが進行し、引抜がほとんど起こらないことを示している。Peripheral sink 仮説はDNA ワクチン治療後の主要なルートではないと考えられた。

D. 考察

DNA ワクチン療法はアジュバントが不要であり、抗体産生のみを誘導するため、脳髄膜炎などの副作用が抑えられたと考えられる。非ウイルス性ベクターはウイルス性ベクターに比し高い安全性が保障されており、今後臨床応用を考えた場合多数の同意を得やすいと考えられる。非ウイルス性ベクターは取り込み効率が低いいため頻回の投与を必要とする。しかし副作用が生じた場合は直ちに投与を中止ことにより、長期の副作用が避けうるものと考えられる。従って、取り込み効率の低さは一概に欠点とは言えない。

ワクチン投与により活性化したミクログリアは $A\beta$ 沈着周囲に付着し、沈着物の貪食に関与する事が示された。さらに、活性化し

たミクログリアは目に見えない A β 沈着物を
貪食している事を明らかにした。本研究で明
らかになったワクチンの作用機序は新型ワク
チンを開発する上で有用な情報を提供すると
考えられる。これらの事実から DNA ワクチン
投与後の A β の除去はミクログリアによる A β
の貪食によるところが大きいと考えられ、抗
A β 抗体の直接作用や peripheral sink 仮説の関
与は少ないと考えられた。DNA ワクチンはベ
クター内の遺伝子配列を変えることにより、
簡単に再構成することができることから、今
後さらに効果が高く副作用が少ないワクチン
を開発発展する場合において有益である。

E. 結論

非ウイルス性 A β -DNA ワクチンはアル
ツハイマー病に対して有効で、副作用のない治
療法になりうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okura, Y., Kohyama, K., Hiraki, K., Park, I.,
Staufenbiel, M., Matsumoto, Y. (2007) Non-viral
DNA vaccination augments phagocytosis of A β
deposits by microglia as a major A β clearance
pathway in Alzheimer model mice, in submission

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Abeta
vaccination as a promising therapy for
Alzheimer's disease., *Drug News Perspect*, 20,
379-386

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) DNA vaccine
therapy for Alzheimer's disease-the present status
and future direction, *Rejuv. Res.*, in press.

Park, I., Kohyama, K., Matsumoto, Y. (2007)
Differential effects of decoy chemokine (7ND)
gene therapy on acute, biphasic and chronic
autoimmune encephalomyelitis: Implication for
pathomechanisms of lesion formation, *J.
Neuroimmunol.*, in press.

Matsumoto, Y., Kohyama, K., Park, I., Nakajima,
M., Hiraki, K., (2007) Characterization of
pathogenic T cells and autoantibodies in
C-protein-induced autoimmune polymyositis., *J
Neuroimmunol*, 190, 90-100

Warabi, Y., Matsumoto, Y., Hayashi, H., (2007)
Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis
with severe optic nerve and spinal cord
demyelination, *J. Neurol. Sci.*, 252, 57-61.

Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K. (2007) B
cell epitope spreading is a critical step for the
switch from C-protein-induced myocarditis to
dilated cardiomyopathy, *A J Pathol.*, 170, 43-51

Okura, Y., Matsumoto, Y., Anti-Abeta vaccination
as a promising therapy for Alzheimer's disease
(2007) *Current Topics in Neuroimmunology*,
139-145

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K.,
Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y.,
Miyasaka, N., Kohsaka, H. (2007) A new murine
model to define the critical pathologic and
therapeutic mediators of polymyositis., *Arthritis
and Rheumatism* 56, 1304-1314

Kim, H., Moon, C., Ahn, M., Lee, Y., Kim, S.,
Matsumoto, Y., Koh, C., Kim, M., Shin, T.,
Increased phosphorylation of cyclic AMP
response element-binding protein in the spinal
cord of Lewis rats with experimental autoimmune
encephalomyelitis. (2007) *Brain Res*, 1162,
113-120

Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Park,
I., Paralysis of CD4+CD25+ regulatory T cell
response in chronic autoimmune
encephalomyelitis. (2007) *J Neuroimmunol*, 187,
44-54

Katsumata, Y., Harigai, M., Sugiura, T., Kawamoto,
M., Kawaguchi, Y., Matsumoto, Y., Kohyama, K.,
Soejima, M., Kamatani, N., Hara, M. (2007)
Attenuation of experimental autoimmune myositis
by blocking ICOS-ICOS ligand interaction., *J*

Immunol, 179, 3772-3779

Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufienbiel, M., Matsumoto, Y. (2006) Non-viral A beta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long term-effects and safety, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 9619-9624

大倉良夫、松本陽 (2006) Alzheimer 病の新ワクチン療法, *医学のあゆみ*, 219,, 164-165

Matsumoto, Y., Matsuo, H., Sakuma, H., Park, I., Tsukada, Y., Kohyama, K., Kondo, T., Kotorii, S., Shibuya, N., (2006) CDR3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in myasthenia gravis., *J Immunol*, 176, 5100-5107

Kim, H., Ahn, M., Lee J., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T., (2006) Increased phosphorylation of caveolin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis., *Neurosci Lett*, 402, 76-80

Sakuma, H., Park, I, Kohyama, K., Feng, D., Matsumoto, Y. (2006) Quantitation of myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein in the thymus and central nervous system and its relationship to the clinicopathological features of autoimmune encephalomyelitis., *J Neurosci Res*, 84, 606-613

Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., Matsumoto, Y. (2006) Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis., *Acta Neuropathol*, 112, 195-204

Kim, H., Ahn, M., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T. (2006) Immunohistochemical study of flotillin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis., *Brain Res*, 1114, 204-211

Ahn, M., Kim, H. , Matsumoto, Y., Shin, T. (2006) Increased expression of caveolin-1 and -2 in the heart of Lewis rats with experimental autoimmune myocarditis., *Autoimmunity*, 39 , 489-495

Warabi, Y., Yagi, K., Hayashi, H., Matsumoto, Y. (2006) Characterization of the T cell receptor repertoire in the Japanese neuromyelitis optica: T cell activity is up-regulated compared to multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.*, 249, 145-15

2.

2. 学会発表

神山邦子、朴一権、松本陽, ラット拡張型心筋症の繊維化機序における肥満細胞と IP-10、MMP の役割, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-12)

Matsumoto, Y., Park, I-K., Kohyama, K., Non viral A beta DNA vaccine therapy against Alzheimer disease. Long term effects and mechanisms of action., 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-12)

松本陽、大倉良夫、神山邦子、平木啓子, アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の作用機序に関する解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-12)

蕨陽子、林秀明、松本陽, 多発性硬化症の Foxp3 遺伝子発現の病型による比較解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-12)

松本陽、平木啓子、神山邦子, 慢性再発性脳脊髄炎に対する IVIG の治療効果と作用機序, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-13)

平木啓子、神山邦子、松本陽, 慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎の病変に認められる CD8 陽性マクロファージの特性解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-13)

平木啓子、神山邦子、松本陽, 慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎の病変に認められる CD8 陽性マクロファージの特性解析, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22)

神山邦子、平木啓子、松本陽, ラット心筋炎におけるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生細胞の特性解析, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22)

松本陽、神山邦子、平木啓子, MOG 誘発自己免疫性脳脊髄炎の再発と進行に関わる T 細胞と自己抗体の役割, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22) 18909

松本陽、大倉良夫、朴一権、神山邦子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性DNAワクチン療法の効果と作用機序に関する解析, 第48回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2007-06-01)

神山邦子、平木啓子、松本陽、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の慢性化における CD8 陽性マクロファージの役割, 第48回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2007-05-30)

Matsumoto, Y., Non-viral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease -Long-term effects and mechanisms of A β reduction-. , 27th Blankenese Conference, Hamburg, Germany, (2007-05-14)

Matsumoto, Y., Non-viral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease -Safety, long-term effects and mechanisms of A β reduction-. , 3rd SENS (Strategies for Engineered Negligible Senescence) Conference, Cambridge, UK, (2007-09-08)

松本陽、朴一権、神山邦子、慢性自己免疫性脳脊髄炎における制御性 T 細胞の反応不全, 第18回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-02)

松本陽、朴一権、神山邦子、疑似ケモカイン遺伝子療法に対する自己免疫性脳脊髄炎の亜型間での感受性の差について, 第18回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-03)

神山邦子、朴一権、松本陽、自己免疫性心筋炎の増悪及び拡張型心筋症への移行に関する自己抗体の解析, 第18回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-03)

杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、松本陽、中江孝、宮坂信之、上阪等、多発性筋炎の病態解析と新規治療法の開発に有用なモデルマウスの確立, 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, (2006-04-26)

藤陽子、林秀明、松本陽、多発性硬化症の二次進行に関する Matrix Metalloproteinase-9 および T細胞の役割, 第47回日本神経学会総会, 東京, (2006-05-12)

Park, I., Kohyama, K., Nakajima, M., Matsumoto, Y., Differential effects of decoy chemokine (7ND)

gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: Implication for the pathomechanisms of lesion formation., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Wraith, D. C., Matsumoto, Y., Immune regulation in CNS autoimmune disease., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Nakajima, M., Park, I. K., Paralysis of CD4+CD25+ regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Tanuma, N., Sakuma, H., Matsumoto, Y., Chemokine gradients play a role in lesional expansion of secondary progressive multiple sclerosis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Warabi, Y., Yagi, K., Hayashi, H., Matsumoto, Y., Characterization of the T cell receptor repertoire in neuromyelitis optica: T cell activity is up-regulated compared to multiple sclerosis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Ahn, M., Moon, C., Kim, H., Lee, J., Koh, C., Matsumoto, Y., Shin, T., Expression of caveolin-1 in experimental autoimmune neuritis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Kohyama, K., Park, I. K., Nakajima, M., Matsumoto, Y., The role of autoantibodies in C-protein-induced experimental polymyositis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-18)

Kim, H., Ahn, M., Lee, J., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C. S., Shin, T., Increased phosphorylation of caveolin-1 and p38 mitogen-activated protein kinase in EAE., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

松本陽、神山邦子、朴一権、急性、および慢性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を規定する因子の解析, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, (2006-05-25)

朴一權、神山邦子、松本陽、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における CD8 陽性マクロファージの役割, 第 47 回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, (2006-05-25)

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Suzuki, M., Okiyama, N., Kohyama, K., Harigai, M., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., Kohsaka, H., A new murine model of polymyositis for dissection of pathology and development of new treatment., 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-11)

Matsumoto, Y., Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufenbiel, M., Development of non-viral Abeta DNA vaccines against Alzheimer disease: long term-effects and safety., 9th International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva, Switzerland, (2006-04-19)

H. 知的財産権の出願・登録状況

新型ワクチンの出願を準備中。

II. 分担研究報告

分担研究報告書

アルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法の開発

主任研究者 (財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

参事研究員、プロジェクトリーダー

松本 陽

研究要旨

非ウイルス性 A β -DNA ワクチンはヒト・アルツハイマー病に対して有効で、副作用のない治療法になりうる。

A. 研究の目的

最近、アルツハイマー病モデルマウスに対して A β ペプチド・ワクチン療法が有効であることが複数の施設から報告された。しかし、ヒト臨床試験において、一部の患者に髄膜脳炎が起こり、治験は中止となった。今回我々はこれに変わる副作用の少ない治療法として、非ウイルス性 DNA ワクチンを開発し、臨床応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

pTarget プラスミド(ProMega)に A β 1-42 を組み込み、A β ペプチドが細胞外に分泌されるワクチンを開発した。A β -DNA ワクチンをアルツハイマー病のモデルマウス(APP23 Tg mouse)の4ヶ月齢、12ヶ月齢群に3-8ヶ月間投

与し脳アミロイドの沈着の変化を検討した。ワクチンは、最初の6回まで週1回、7回目以後は2週間に1度の間隔で100 μ g ずつ筋注した。治療効果の判定は以下のように行った。治療群、対照群の脳に矢状断を加え固定後、パラフィン切片を作製した。抗 A β 抗体を用いた免疫染色を行い、大脳皮質と海馬において A β 沈着を画像解析により定量化した。

A β ペプチドと A β -DNA ワクチンをそれぞれ数回投与したモデルマウスと野生型マウスの所属リンパ節、脾細胞を採取して、A β 1-40 に対する T 細胞反応性を検索した。また、抗 A β 抗体は ELISA で、脳内の炎症巣の有無は抗 T 細胞抗体、抗マクロファージ抗体を用いた免疫染色で検討した。

(倫理面への配慮)

動物の飼養および実験上の処置については、「動物の愛護及び管理に関する法律」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び東京都神経科学総合研究所動物実験倫理委員会が定める動物実験指針を遵守して行なった。

また、本研究では遺伝子操作によりDNAワクチンを作製し、それを遺伝子改変マウス、及びサルに投与した。研究目的での遺伝子操作はすでに当研究所の研究倫理委員会、遺伝子組換え実験委員会での審査を受け承認されており、動物実験については動物実験倫理委員会の審査を受けている。

C. 研究結果

今回哺乳類細胞発現ベクターである pTarget プラスミド (Promega) に Amyloid β -protein(1-42) 及び付属のシーケンスを挿入して 3 種類のアルツハイマー病非ウイルス性 DNA ワクチンを製作した。一つ目は A β 1-42 のみを挿入したもの (K-A β ワクチン)、二番目に発現タンパク質の分泌を向上させるためにマウス Ig κ シグナルを付加したもの (IgL-A β ワクチン)、三番目に、分泌したタンパク質の可溶性を向上させるために Immunoglobulin の Fc 領域を付加したもの (A β -Fc ワクチン) である。作成した 3 種類のベクターは HEK293T cell に transfect し、その細胞内に A β 1-42 ペプチドが発現し、培養上清に分泌されているか否かを ELISA 法により検討した。IgL-A β 、A β -Fc ワクチンは培養上清中に A β 1-42 ペプチドが、良好に分泌されていたが、A β 1-42 のみを挿入した

K-A β ワクチンは、A β 1-42 ペプチドが培養上清中に分泌されておらず、予備的実験で A β 抑制効果が他の二つのワクチンに比べて低いことが分かり、K-A β ワクチンは詳細な検討から除外した。

ワクチン投与後種々の時期に、マウスの脳を免疫組織化学染色し、沈着した A β を画像解析したところ、A β 沈着がまだ出現していない 4 ヶ月齢からワクチンを投与した予防的投与群においては 70-90%、既に A β 沈着が認められた 12 ヶ月齢から治療的にワクチンを投与した治療的投与群においては 50-60% の A β 沈着がコントロール群に比較し減少していることが確認された。ワクチンの効果は投与回数に依存する傾向があり 1 ヶ月に 1 度投与した場合 A β の減少効果は減弱した。DNA ワクチン投与後の脳を詳細に検索したが A β ペプチド・ワクチンを投与したときに見られる T 細胞の浸潤や炎症細胞の浸潤といった脳髄膜炎を思わせる所見はまったく認められなかった。さらにモデルマウスと同系で遺伝子操作を行っていないマウスにワクチンを投与し、そのリンパ節細胞から 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が、抗原反応性 T 細胞の活性化はまったく誘導されていなかった。これらの所見から DNA ワクチンによる過剰な免疫反応はほとんどなく A β を減少する効果があると考えられた。

D. 考察

DNA ワクチン療法はアジュバントが不要であり、抗体産生のみを誘導するため、脳髄膜炎などの副作用が抑えられたと考えられる。非ウイルス性ベクターはウイルス性ベクター

に比し高い安全性が保障されており、今後臨床応用を考えた場合多数の同意を得やすいと考えられる。非ウイルス性ベクターは取り込み効率が低いため頻回の投与を必要とする。しかし副作用が生じた場合は直ちに投与を中止ことにより、長期の副作用が避けうるものと考えられる。従って、取り込み効率の低さは一概に欠点とは言い難い。

E. 結論

非ウイルス性 A β -DNA ワクチンはアルツハイマー病に対して有効で、副作用のない治療になりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okura, Y., Kohyama, K., Hiraki, K., Park, I., Staufenbiel, M., Matsumoto, Y. (2007) Non-viral DNA vaccination augments phagocytosis of A β deposits by microglia as a major A β clearance pathway in Alzheimer model mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, in submission

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease., *Drug News Perspect*, 20, 379-386

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease-the present status and future direction, *Rejuv. Res.*, in press.

Park, I., Kohyama, K., Matsumoto, Y. (2007) Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: Implication for pathomechanisms of lesion formation, *J. Neuroimmunol.*, in press.

Matsumoto, Y., Kohyama, K., Park, I., Nakajima, M., Hiraki, K., (2007) Characterization of pathogenic T cells and autoantibodies in C-protein-induced autoimmune polymyositis., *J*

Neuroimmunol, 190, 90-100

Warabi, Y., Matsumoto, Y., Hayashi, H., (2007) Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination, *J. Neurol. Sci.*, 252, 57-61.

Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K. (2007) B cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy, *A J Pathol.*, 170, 43-51

Okura, Y., Matsumoto, Y., Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease (2007) *Current Topics in Neuroimmunology*, 139-145

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., Kohsaka, H. (2007) A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis., *Arthritis and Rheumatism*, 1304-1314

Kim, H., Moon, C., Ahn, M., Lee, Y., Kim, S., Matsumoto, Y., Koh, C., Kim, M., Shin, T., Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. (2007) *Brain Res*, 1162, 113-120

Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I., Paralysis of CD4+CD25+ regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis. (2007) *J Neuroimmunol*, 187, 44-54

Katsumata, Y., Harigai, M., Sugiura, T., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Matsumoto, Y., Kohyama, K., Soejima, M., Kamatani, N., Hara, M. (2007) Attenuation of experimental autoimmune myositis by blocking ICOS-ICOS ligand interaction., *J Immunol*, 179, 3772-3779

Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufenbiel, M., Matsumoto, Y. (2006) Non-viral A beta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long term-effects and safety, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 9619-9624

大倉良夫、松本陽 (2006) Alzheimer 病の新ワクチン療法, *医学のあゆみ*, 219,, 164-165

Matsumoto, Y., Matsuo, H., Sakuma, H., Park, I., Tsukada, Y., Kohyama, K., Kondo, T., Kotorii, S., Shibuya, N., (2006) CDR3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in myasthenia gravis., *J Immunol*, 176, 5100-5107

Kim, H., Ahn, M., Lee J., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T., (2006) Increased phosphorylation of caveolin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis., *Neurosci Lett*, 402, 76-80

Sakuma, H., Park, I., Kohyama, K., Feng, D., Matsumoto, Y. (2006) Quantitation of myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein in the thymus and central nervous system and its relationship to the clinicopathological features of autoimmune encephalomyelitis., *J Neurosci Res*, 84, 606-613

Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., Matsumoto, Y. (2006) Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis., *Acta Neuropathol*, 112, 195-204

Kim, H., Ahn, M., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T. (2006) Immunohistochemical study of flotillin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis., *Brain Res*, 1114, 204-211

Ahn, M., Kim, H., Matsumoto, Y., Shin, T. (2006) Increased expression of caveolin-1 and -2 in the heart of Lewis rats with experimental autoimmune myocarditis., *Autoimmunity*, 39, 489-495

Warabi, Y., Yagi, K., Hayashi, H., Matsumoto, Y. (2006) Characterization of the T cell receptor repertoire in the Japanese neuromyelitis optica: T cell activity is up-regulated compared to multiple sclerosis., *J. Neurol. Sci.*, 249, 145-152.

2. 学会発表

神山邦子、朴一権、松本陽、ラット拡張型心筋症の繊維化機序における肥満細胞と IP-10、MMP の役割, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-12)

Matsumoto, Y., Park, I-K., Kohyama, K., Non viral A beta DNA vaccine therapy against

Alzheimer disease. Long term effects and mechanisms of action., 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-12)

松本陽、大倉良夫、神山邦子、平木啓子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の作用機序に関する解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-12)

蕨陽子、林秀明、松本陽、多発性硬化症の Foxp3 遺伝子発現の病型による比較解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-12)

松本陽、平木啓子、神山邦子、慢性再発性脳脊髄炎に対する IVIG の治療効果と作用機序, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-13)

平木啓子、神山邦子、松本陽、慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎の病変に認められる CD8 陽性マクロファージの特性解析, 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, (2007-04-13)

平木啓子、神山邦子、松本陽、慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎の病変に認められる CD8 陽性マクロファージの特性解析, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22)

神山邦子、平木啓子、松本陽、ラット心筋炎におけるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生細胞の特性解析, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22)

松本陽、神山邦子、平木啓子、MOG 誘発自己免疫性脳脊髄炎の再発と進行に関わる T 細胞と自己抗体の役割, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, (2007-11-22) 18909

松本陽、大倉良夫、朴一権、神山邦子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の効果と作用機序に関する解析, 第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2007-06-01)

神山邦子、平木啓子、松本陽、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の慢性化における CD8 陽性マクロファージの役割, 第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2007-05-30)

Matsumoto, Y, Non-viral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease -Long-term

effects and mechanisms of A β reduction-. , 27th Blankenese Conference, Hamburg, Germany, (2007-05-14)

Matsumoto, Y., Non-viral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease -Safety, long-term effects and mechanisms of A β reduction-. , 3rd SENS (Strategies for Engineered Negligible Senescence) Conference, Cambridge, UK, (2007-09-08)

松本陽、朴一権、神山邦子、慢性自己免疫性脳脊髄炎における制御性 T 細胞の反応不全, 第 18 回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-02)

松本陽、朴一権、神山邦子、擬似ケモカイン遺伝子療法に対する自己免疫性脳脊髄炎の亜型間での感受性の差について, 第 18 回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-03)

神山邦子、朴一権、松本陽、自己免疫性心筋炎の増悪及び拡張型心筋症への移行に關与する自己抗体の解析, 第 18 回日本神経免疫学会学術集会, 名古屋, (2006-03-03)

杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、松本陽、中江孝、宮坂信之、上阪等、多発性筋炎の病態解析と新規治療法の開発に有用なモデルマウスの確立, 第 50 回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, (2006-04-26)

藤陽子、林秀明、松本陽、多発性硬化症の二次進行に關する Matrix Metalloproteinase-9 および T 細胞の役割, 第 47 回日本神経学会総会, 東京, (2006-05-12)

Park, I., Kohyama, K., Nakajima, M., Matsumoto, Y., Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: Implication for the pathomechanisms of lesion formation., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Wraith, D. C., Matsumoto, Y., Immune regulation in CNS autoimmune disease., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Nakajima, M., Park, I. K., Paralysis of CD4+CD25+ regulatory T cell response in chronic

autoimmune encephalomyelitis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Tanuma, N., Sakuma, H., Matsumoto, Y., Chemokine gradients play a role in lesional expansion of secondary progressive multiple sclerosis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Warabi, Y., Yagi, K., Hayashi, H., Matsumoto, Y., Characterization of the T cell receptor repertoire in neuromyelitis optica: T cell activity is up-regulated compared to multiple sclerosis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Ahn, M., Moon, C., Kim, H., Lee, J., Koh, C., Matsumoto, Y., Shin, T., Expression of caveolin-1 in experimental autoimmune neuritis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

Kohyama, K., Park, I. K., Nakajima, M., Matsumoto, Y., The role of autoantibodies in C-protein-induced experimental polymyositis., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-18)

Kim, H., Ahn, M., Lee, J., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C. S., Shin, T., Increased phosphorylation of caveolin-1 and p38 mitogen-activated protein kinase in EAE., 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, JAPAN, (2006-10-16)

松本陽、神山邦子、朴一権、急性、および慢性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を規定する因子の解析, 第 47 回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, (2006-05-25)

朴一権、神山邦子、松本陽、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における CD8 陽性マクロファージの役割, 第 47 回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, (2006-05-25)

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Suzuki, M., Okiyama, N., Kohyama, K., Harigai, M., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., Kohsaka, H., A new murine model of polymyositis for dissection of pathology and development of new treatment., 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, (2006-12-11)

Matsumoto, Y., Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufenbiel, M , Development of non-viral Abeta DNA vaccines against Alzheimer disease: long term-effects and safety., 9th International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva,

Switzerland, (2006-04-19)

G. 知的財産権の出願・登録状況

新型ワクチンの出願を準備中。

分担研究報告書

DNA ワクチンの作用機序に関する研究

分担研究者 (財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

研究員

大倉良夫

研究要旨

アルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法における A β 除去の機序を分析したところ、ワクチン投与によって活性化したミクログリアによる A β 沈着物の貪食が主体である事が明らかとなった。

A. 研究目的

本研究の目的はアルツハイマー病に対する DNA ワクチン療法における β アミロイド (A β) 除去の機序を明らかにすることである。現在以下の 3 つの機序が考えられている。第 1 の説は、抗 A β 抗体が、凝集した A β に結合し、Fc receptor を介してミクログリアから貪食されることにより老人斑が除去されるというものである。第 2 は抗 A β 抗体が 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。本研究ではこれらの仮説をそれぞれ検証した。

B. 研究方法

DNA ワクチンを APP23 マウスに筋注し、3-15 ヶ月後に検索した。治療群及び未治療群の脳切片を Iba-1(microglia)及び 6 F3D(A β)で二重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。さらに、ウエスタンブロット解析により A β オリゴマーに対する影響を分析した。また、抗 A β 抗体による A β 沈着の直接分解、及び引き抜き効果についても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

動物の飼養および実験上の処置につ