

DNA ワクチンの効果と安全性試験, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, (2008)

Matsumoto, Y., Non-viral Aβ DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease - Long-term effects and mechanisms of Aβ reduction -, 4th Symposium of American Academy of Nanomedicine, Potomac, Maryland, USA, (2008)

Matsumoto, Y., Kohyama, K., Hiraki, K., The role of pathogenic T cells and autoantibodies in relapse and progression of myelin oligodendrocyte-induced autoimmune encephalomyelitis., 9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, TX, USA, (2008)

Matsumoto, Y., Aβ reduction mechanisms after non-viral DNA vaccination against Alzheimer's disease., International Congress on Alzheimer's disease, Chicago, USA, (2008)

松本陽, アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチン療法の開発, 日本神経ウイルス研究会特別講演, 鹿児島県屋久島, (2008)

Matsumoto, Y., NON-VIRAL DNA VACCINATION AUGMENTS PHAGOCYTOSIS OF Aβ DEPOSITS BY MICROGLIA AS A MAJOR Aβ CLEARANCE PATHWAY IN ALZHEIMER MODEL MICE., 10th International Hong Kong/Springfield Pan-Asian Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Hong Kong, China, (2008)

松本陽, 慢性・再発性自己免疫性脳脊髄炎の発症機序の解析、及び治療の試み, 鹿児島大学医学部特別講演, 鹿児島, (2008)

神山邦子, 平木啓子, 松本陽, ラット心筋炎・拡張型心筋症の発症と進行における MMP-2、MMP-9 の異なる作用機序, 第 20 回日本神経免疫学会学術集会, 新潟, (2008)

神山邦子, 平木啓子, 松本陽, in situ zymography 及び蛍光免疫染色によるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生細胞同定法の開発, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

松本陽, 神山邦子, アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの効果と作用機序

に関する解析, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

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)

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)

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)

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)

郭 曉麗, 中村和昭, 原田知加子, 神山邦子, Behanna, H. A., Watterson, D., 松本陽, 原田高幸, Inhibition of glial cell activation ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis., Neuroscience 2007, San Diego, CA, USA, (2007)

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)

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)

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)

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)

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

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

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)

松本陽、神山邦子、朴一權、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)

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)

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)

神山邦子、朴一權、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)

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)

Park, I. K., 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)

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

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)

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)

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)

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)

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)

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)

松本陽、朴一權、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)

松本陽、朴一權、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)

神山邦子、朴一權、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)

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)

巖陽子、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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成21年3月末までに新型ワクチンの特許出願を終了。

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

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

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。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($P<0.01$)。さらに、ワクチン投与群、
および対照群の脳組織を用いてウエスタンブ
ロットを行い、A β オリゴマーの変化を定量し
た。その結果、対照群に比し、ワクチン投与群
において有意にA β オリゴマーが減少していた。
活性型ミクログリアの増加は、A β oligomerの
除去にも関与しているものと考えられた。

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- α 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- α 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

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 β 抗体が直接 A β に反応し、解離、可溶化を引き起こし沈着した A β 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 β 抗体は未治療群の抗体と比較して抗体価が高かったものの A β に対する結合反応は著明ではなかった。抗体による A β 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 β 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 β 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 β 量が高値であり脳から血液への A β 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 β 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、引抜き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、引抜き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

ワクチン投与により活性化したミクログリアは A β 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

DNA ワクチン療法における A β 蓄積の削減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貪食が主体である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2009) Recent advance in immunotherapies for Alzheimer's disease, with special reference to DNA vaccination, Human Vaccine, 5, 3-10

Okura, Y., Kohyama K., Park, I., Matsumoto, Y. (2008) Non-viral DNA vaccination augments microglial phagocytosis of A β deposits as a major A β clearance pathway in an Alzheimer disease model mice, J Neuropathol Exp Neurol, 67,1063-1071

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2008) DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease: Present status and future direction, Rejuve Res, 11, 301-308

大倉良夫、松本陽 (2008) アルツハイマー病の新ワクチン療法—現状と我々の試み, BRAIN and NERVE, 60, 931-940 *

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

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease, *Drug News Perspect*, 20, 1-8

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

2. 学会発表

時田偉子、大倉良夫、松本陽、アカゲザルを用いたアルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの効果と安全性試験, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, (2008)

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成 21 年 3 月末までに新型ワクチンの特許出願を終了。

分担研究報告書

DNA ワクチン投与動物の行動解析に関する研究

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 東京都立神経病院 医員

蕨 陽子

研究要旨

DNA ワクチンによる治療群と対照群に Morris 水迷路試験を行い、ワクチン投与群で学習能力が改善する傾向が認められた。

A. 研究目的

アルツハイマー病は認知障害(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、発症後数年から十数年で寝たきりになり死に至る。その根治療法の開発は急務である。

近年、種々のアルツハイマー病のモデルマウスが開発され、候補薬剤のスクリーニングは容易になった。治療効果の判定は組織学的にA β を検出し、治療によってA β 蓄積がどれだけ減少するかを定量解析する方法と行動実験で明らかとなった認知障害がどれだけ改善するかを分析する方法の2種がある。

本研究はDNA ワクチン投与群と対照群の行動実験を以下の方法で行い、治療による認知障害の改善を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

定法のごとく Morris 水迷路試験を行う。直径1メートルの円形プールを用い、隠れたプラットフォームにたどり着く時間を計測する。一日3回のトライアルを4日間行い、その改善時間で認知障害の有無を判定する。すべての被検動物の行動はビデオ撮影し、PhenoScan (Primetech, Corp.) 分析装置で解析する。

(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」及び東京大学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う。

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、及びサルに投与する。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

予備実験ではワクチン投与群で学習能力が改善する傾向が認められた。しかし、研究期間が短く(産休のため平成19年4月より8月まで)、十分な個体数の検索ができなかった。

D. 考察

文献的にはモデルマウスのA β 沈着を半減すると認知障害はほとんど認められなくなると言う。今回の検索ではそれほどはっきりした結果は出なかったが、DNAワクチン療法はA β 沈着の削減だけでなく、認知障害も改善することが期待できる。

E. 結論

DNAワクチン療法によるアルツハイマー病モデルマウスの認知障害の改善は本法に

よって評価可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

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)

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)

蕨陽子、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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

平成21年3月末までに新型ワクチンの特許出願を終了。

分担研究報告書

DNA ワクチンの作製に関する研究

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

神山邦子

研究要旨

DNA ワクチンによる A β 蓄積の削減メカニズムの解析から、脳内ミクログリアの活性化が重要であることが明らかとなった。その効果を増強することができると考えられる 2 種の新型ワクチンを作製してモデルマウスに投与したところ、現有ワクチン比して顕著な A β 削減効果を示した。平成 21 年 3 月末までに新型ワクチンの特許出願を終了する予定である。

A. 研究目的

作用機序の解析から DNA ワクチン療法における A β 蓄積の削減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貪食が主体である事が明らかとなった。この事実はミクログリアの活性化をより強く刺激する構造を DNA ワクチンに付加すれば、さらにワクチンの効果を増強することが期待できる。

本研究では以下の方法により 2 種の新型ワクチンを作製し、その効果を検討しつつある。

B. 研究方法

マウス脾臓由来の cDNA より、X 配列
或いは Y 配列のコード領域をはさむプライマ

ーを用いて各遺伝子を増幅し、クローニングした。作製済みの pTarget-IgL (Ig leader)-A β 1-42-Fc (IgG の Fc 領域)の Fc 遺伝子を制限酵素切断によって切り出し、この部分に同じ制限酵素サイト (及びスパーサー配列) を付加した X 配列遺伝子をライゲーションして、A β 1-42 と X 配列をタンデムに発現する pTarget-IgL-A β 1-42-X 配列 (以降 A β -X 配列) を作製した。同様の手法で、以前作製した pIRES2-IgL-A β 1-42-EGFP を用い、pIRES2-IgL-A β 1-42-Y 配列(以降 A β -Y 配列)を作製した。Y 配列はホモダイマーを形成して活性を発現するサイトカインであるため、IRES (mRNA 内部のリボソーム結合サイト)を保有する pIRES ベクターの使用によって、A β と Y 配列を独立に発現させることを目的と

した。

2種の新型ワクチンによる目的蛋白発現を検討するため、各ワクチンプラスミドをトランスフェクション試薬により HEK293 細胞に導入し、48 時間後に培養上清及び細胞を回収して、ウェスタンブロッティングを行った。培養上清は 10 倍濃縮、細胞は蟻酸処理後に電気泳動用サンプルバッファーに溶解し、市販の 12%アクリルアミド Bis-Tris ゲル及び MES ランニングバッファーを用いて低分子蛋白(約 2 kDa 以上)のバンドを分離し、メンブレンにトランスファーした。5% スキムミルクでブロッティング後、抗ヒト A β 1-16 抗体 (6E10, x100)で一晩、HRP 標識抗マウス IgG (x1000)で 1 時間反応し、ケミルミ試薬によってシグナルを検出した。

(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

ウェスタンブロッティングの結果、A β -X 配列は、培養上清、細胞ともに、A β 1-42 と X 配列をタンデムに繋げた分子量である約 20 kDa の位置にバンドを検出した。A β 1-42 単独(約 3.5 kDa)のバンドは検出されなかった。

一方、A β -Y 配列は、抗 A β 抗体により A β 1-42 単独のバンドが検出されることを期待したが、ここまでの実験結果では培養上清、細胞ともバンド自体が検出されず、A β 発現量は本検索による検出感度以下であることが示唆された。

動物投与と実験では、両者ともに顕著な A β 削減効果を示した。ミクログリアの活性化は必ずしも抗体を介したものだけではなく、別の機序の存在が示唆された。

D. 考察

今回開発した 2 種の新型ワクチンは DNA ワクチンとしての特性を持ち、アルツハイマー病の治療薬として有効であることが期待できる。今後、第 3 の入れるを持つワクチンの開発も計画中である。

E. 結論

DNA ワクチン療法の発症機序に基づく新型ワクチン開発はより有効なワクチンを見いだす上で重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiraki K., Park, I., Kohyama, K., Matsumoto, Y. (2009) Characterization of CD8-positive macrophages infiltrating the central nervous

system of rats with chronic autoimmune encephalomyelitis, *J Neurosci Res*, 87, 1175-1184

Okura, Y., Kohyama K., Park, I., Matsumoto, Y. (2008) Non-viral DNA vaccination augments microglial phagocytosis of A β deposits as a major A β clearance pathway in an Alzheimer disease model mice, *J Neuropathol Exp Neurol*, 67,1063-1071

Matsumoto Y., Park, I., Hiraki, K., Ohtani, S., Kohyama, K. (2008) Role of pathogenic T cells and autoantibodies in relapse and progression of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in LEW.1AV1 rats, *Immunology*, in press

Park, I., Hiraki, K., Kohyama, K., Matsumoto, Y. (2008) Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: Implication for pathomechanisms of lesion formation., *J Neuroimmunol*, 194, 34-43

Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Harada, T. (2008) Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization, *Mol Cell Biol.*, 28, 3273-3280

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

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

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

Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K. (2006) B cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy, *Am. J. Pathol.*, 170,

43-51.

2. 学会発表

松本陽、神山邦子、平木啓子、MOG 誘発自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の再発と進行に関わる T 細胞と自己抗体の役割, 第 20 回日本神経免疫学会学術集会, 新潟, (2008)

神山邦子、平木啓子、松本陽, ラット心筋炎・拡張型心筋症の発症と進行における MMP-2、MMP-9 の異なる作用機序, 第 20 回日本神経免疫学会学術集会, 新潟, (2008)

神山邦子、平木啓子、松本陽, in situ zymography 及び蛍光免疫染色によるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生細胞同定法の開発, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

松本陽、神山邦子、アルツハイマー病に対する非ウイルス性 DNA ワクチンの効果と作用機序に関する解析, 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

大谷真、平木啓子、神山邦子、松本陽、MOG 誘発自己免疫性脳脊髄炎の病勢に関わる自己抗体の分析, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, (2008)

神山邦子、松本陽, ラット急性及び慢性再発型自己免疫性脳脊髄炎におけるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現解析, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, (2008)

Lu, J., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Different functions of MMP-2 and MMP-9 on C protein fragment 2-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, (2008)

Matsumoto, Y., Kohyama, K., Hiraki, K., The role of pathogenic T cells and autoantibodies in relapse and progression of myelin oligodendrocyte-induced autoimmune encephalomyelitis., 9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, TX, USA, (2008)

神山邦子、平木啓子、松本陽, ラット心筋炎・拡張型心筋症の発症と進行における MMP-2、

MMP-9の異なる作用機序, 第20回日本神経免疫学会学術集会, 新潟, (2008)

神山邦子, 平木啓子, 松本陽, *in situ* zymography 及び蛍光免疫染色によるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生細胞同定法の開発, 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

松本陽, 神山邦子, アルツハイマー病に対する非ウイルス性DNAワクチンの効果と作用機序に関する解析, 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, (2008)

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)

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)

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)

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)

郭 曉麗, 中村和昭, 原田知加子, 神山邦子, Behanna, H. A., Watterson, D., 松本陽, 原田高幸, Inhibition of glial cell activation ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis., *Neuroscience 2007*, San Diego, CA, USA, (2007)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

Park, I. K., 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)

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)

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)

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)

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成 21 年 3 月末までに新型ワクチンの特許出願を終了。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okura, Y., Matsumoto, Y.	Recent advance in immunotherapies for Alzheimer's disease, with special reference to DNA vaccination	Human Vaccine	5	3-10	2009
Hiraki K., Park, I., Kohyama, K., Matsumoto, Y.	Characterization of CD8-positive macrophages infiltrating the central nervous system of rats with chronic autoimmune encephalomyelitis,	J Neurosci Res,	87	1175-1184	2009
Matsumoto Y., Park, I., Hiraki, K., Ohtani, S., Kohyama, K.	Role of pathogenic T cells and autoantibodies in relapse and progression of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in LEW.1AV1 rats	Immunology		in press	2009
Okura, Y., Kohyama, K., Hiraki, K., Park, I., Staufenberg, M., Matsumoto, Y.	Non-viral DNA vaccination augments phagocytosis of A β deposits by microglia as a major A β clearance pathway in Alzheimer model mice	J Neuropathol Exp Neurol	67	1063-1071	2008
Okura, Y., Matsumoto, Y.	DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease-the present status and future direction	Rejuv Res		in press	2008
大倉良夫、松本陽	アルツハイマー病の新ワクチン療法－現状と我々の試み	BRAIN and NERVE	60,	931-940	2008
Park, I., Kohyama, K., Matsumoto, Y	Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: Implication for pathomechanisms of lesion formation	J Neuroimmunol	20	in press	2008
Okura, Y., Matsumoto, Y.	Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease	Drug News Perspect	20	379-386	2007

Matsumoto, Y., Kohyama, K., Park, I., Nakajima, M., Hiraki, K	Characterization of pathogenic T cells and autoantibodies in C-protein-induced autoimmune polymyositis	J Neuroimmunol	190	90-100	2007
Warabi, Y., Matsumoto, Y., Hayashi, H.	Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination	J Neurol Sci	252	57-61	2007
Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K.	B cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy	Am J Pathol	170	43-51	2007
Okura, Y., Matsumoto, Y	Anti-Abeta vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease	Current Topics in Neuroimmunology		139-145	2007
Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., Kohsaka, H.	A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis	Arthritis and Rheumatism	56,	1304-1314	2007
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.	Brain Res	1162	113-120	2007
Matsumoto, Y., Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I.	Paralysis of CD4+CD25+ regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis.	J Neuroimmunol	187	44-54	2007
Katsumata, Y., Harigai, M., Sugiura, T., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Matsumoto, Y., Kohyama, K., Soejima, M., Kamatani, N., Hara, M.	Attenuation of experimental autoimmune myositis by blocking ICOS-ICOS ligand interaction	J Immunol	179	3772-3779	2007
Okura, Y., Miyakoshi, A., Kohyama, K., Staufenbiel, M., Matsumoto, Y.	Non-viral A beta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long term-effects and safety	Proc Natl Acad Sci USA	103	9619-9624	2006
大倉良夫, 松本陽	Alzheimer 病の新ワクチン療法	医学のあゆみ	219	164-165	2006
Matsumoto, Y., Matsuo, H., Sakuma, H., Park, I., Tsukada, Y., Kohyama, K., Kondo, T., Kotorii, S., Shibuya, N.	CDR3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in myasthenia gravis	J Immunol	176	5100-5107	2006

Kim, H., Ahn, M., Lee J., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T.	Increased phosphorylation of caveolin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis	Neurosci Lett,	402	76-80	2006
Sakuma, H., Park, I., Kohyama, K., Feng, D., Matsumoto, Y.	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	2006
Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., Matsumoto, Y.	Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis	Acta Neuropathol	112	195-204	2006
Kim, H., Ahn, M., Moon, C., Matsumoto, Y., Koh, C., Shin, T.	Immunohistochemical study of flotillin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis	Brain Res,	1114	204-211	2006
Ahn, M., Kim, H., Matsumoto, Y., Shin, T	Increased expression of caveolin-1 and -2 in the heart of Lewis rats with experimental autoimmune myocarditis	Autoimmunity	39	489-495	2006
Warabi, Y., Yagi, K., Hayashi, H., Matsumoto, Y.	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	2006

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Review

Recent advance in immunotherapies for alzheimer's disease

With special reference to DNA vaccination

Yoshio Okura and Yoh Matsumoto*

Department of Molecular Neuropathology; Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience; Fuchu, Tokyo, Japan

Key words: immunotherapy, alzheimer's disease, DNA vaccine, non-viral vector, clinical application

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia characterized by progressive neurodegeneration. Based on the amyloid cascade hypothesis, several immunotherapies for AD have been developed as curative treatment. In 1999, Schenk et al. reported for the first time that amyloid beta (A β) deposits in AD model mice could be reduced by active vaccination with A β peptide. Although clinical trials with the A β peptide were halted due to the development of meningoencephalitis in some treated patients, the vaccine therapy was judged to be effective on the basis of clinical and pathological analyses. Passive immunization using humanized anti-A β monoclonal antibodies is also under clinical trials; however they have some problems to be solved. As other strategies, DNA vaccines have been developed as immunotherapies for AD, which is simple, easily modified and can be administered without adjuvant. DNA vaccines were developed by several groups including our laboratory, which induced A β reduction in AD model mice without side effects. DNA vaccination may be open up new avenue of vaccine therapies for AD in the near future.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of age-related cognitive decline, affecting more than 12 million people in worldwide. The disease is characterized by progressive memory impairment, cognitive decline, altered behavior and language deficit. Later, patients show global amnesia and slowing of motor function, and finally died.¹ Therefore, development of therapies against AD is extremely important from medical, social and economical points of view.

It is generally believed that accumulation of amyloid beta (A β) is the first event in the pathogenesis of AD. In other words, A β deposition is an upstream event of tau phosphorylation, tangle formation and neuronal death (amyloid cascade hypothesis).^{2,3} Therefore, already deposited or depositing A β should be the first target of AD. Recently, several immunotherapies have been developed as curative

treatments of AD by targeting the underlying cause. In this article, we review conventional vaccine therapies and further introduce DNA vaccines which are now promising as an alternative therapy for human AD.

Development of Anti-A β Immunotherapy and Human Clinical Trials

In 1999, Schenk and his colleagues demonstrated that monthly inoculation with synthetic A β in adjuvants (complete Freund adjuvant for the first time and incomplete Freund adjuvant thereafter) could lead to high anti-A β antibody titers and dramatic reductions of A β deposition in PDAPP transgenic mice.⁴ The vaccine was able to slow or reverse amyloid deposit formation, even if administered after A β deposition occurred. Subsequent studies demonstrated that clearance of A β deposits following immunization protected APP-transgenic (Tg) mice from developing memory deficits.^{5,6} Approximately 50% reduction in dense-cored A β plaques is sufficient to ameliorate cognition.⁷ Based on the promising results using model mice, clinical trials were started for AD patients. Phase I trial showed that active immunization to mild-to-moderate AD patients with Betabloc (AN-1792; Elan Pharmaceuticals, Dublin, Ireland), synthetic A β 1-42 in adjuvant (QS-21) was safe and well-tolerated.⁸ However, subsequent phase II-A study was halted in January 2002 due to the development of meningoencephalitis in 18 of 298 patients (6%) who received the vaccine.⁹ Later, autopsy revealed T cell infiltration mainly comprising CD4⁺ (CD3⁺ and CD45RO⁺) T cells.¹⁰ CD8⁺ T cells were very few were and B lymphocytes were not present. Since examinations of viruses that may cause encephalitis were negative, the pathogenesis of this encephalitis was thought to be similar to autoimmune encephalomyelitis. Although the precise mechanisms remain to be obscure, the addition of new emulsifier, polysorbate 80, to the formulation used in phase II study might induce a different T-cell response.¹¹

Lessons from Clinical Studies with an A β Peptide Vaccine

Although the clinical trial was halted due to the presence of the adverse effect, histological examinations of autopsied brains of treated patients revealed benefits of the vaccine. The first autopsy case of human AD after the trial was reported in 2003.¹⁰ A 72 years-old woman with a 5-year history of Alzheimer's disease was immunized of AN-1792. After fifth injection, she was suffered from meningoencephalitis and died of pulmonary embolism 20 months after the first

*Correspondence to: Yoh Matsumoto; Department of Molecular Neuropathology; Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience; Musashidai 2-6; Fuchu, Tokyo 183-8526 Japan; Tel.: +81.423.25.3881 ext.4719; Fax: +81.423.21.8678; Email:matsumoto-yo@igakuken.or.jp

Submitted: 10/13/08; Revised: 01/05/09; Accepted: 01/12/09

Previously published online as a *Human Vaccines* E-publication:
<http://www.landesbioscience.com/journals/vaccines/article/7815>