

200922003A

200922003B

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

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21年度 総括・分担研究報告書

平成19～21年度総合研究報告書

研究代表者 田平 武

平成22(2010)年 3月

目 次

I.	総括研究報告書（H21） 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
II.	分担研究報告書（H21）	
	1. 老齢サルの A β イメージングによる A β ワクチン治療効果の検討 田平 武、籬野健太郎-----	7
	2. センダイウイルスベクター組換えワクチンを投与した高齢カニクイザルの病理組織学的変化 中村紳一郎-----	10
	3. 血管性認知症のワクチン開発 脇田英明-----	15
	4. 血管性認知症のワクチン開発 富本秀和-----	18
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	21
IV.	総合研究報告書（平成19～21年度）-----	24
	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 田平 武、籬野健太郎-----	39
	2. アルツハイマー病（AD）モデル動物としてのカニクイザルの評価と AD ワクチンのカニクイザルを用いた安全性評価 中村紳一郎-----	44
	3. 血管性認知症のワクチン開発 脇田英明-----	51
	4. 血管性認知症のワクチン開発 富本秀和-----	54
V.	研究成果の刊行物・別刷り-----	59

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

研究代表者 田平 武

順天堂大学大学院 認知症診断・予防・治療学講座 教授

研究要旨

アルツハイマー病のワクチン開発

昨年度 SeV/A β ワクチンを4頭の老齢サルに経口投与し3ヵ月後に PIB/PET を施行した。今年度はそのデータを詳しく解析した。ワクチン投与サルでは PIB の脳内集積は減少傾向を示し、後期相では前頭葉で統計学的に有意な減少が見られた。その3ヵ月後に SeV/A β ワクチンを再投与しその4ヵ月後に PIB/PET を繰り返したが、それ以上の PIB 集積の有意な減少は認めなかった。ワクチン非投与サルに1年後 PIB/PET を繰り返し施行したが、有意な変化は認めなかった。その SeV ワクチン投与サル4頭について病理学的に検討したところ、年齢に比し老人斑が少なかった。現在生化学的検討を行っている。以上より SeV/A β ワクチンの経口投与により脳のアミロイド除去効果がみられ、投与3ヵ月後に PIB/PET で評価できることが分かった。さらに本年度は AAV/A β ワクチンを2頭のサルに経口投与し PIB/PET を施行したが、本報告書作成時点ではまだ結果を得ていない。

血管性認知症のワクチン開発

昨年度までの研究成果から得られたカニクイザルを用いた霊長類血管性認知症モデル作製の至適条件で、新たに2頭の動物を用いて再現性を確認した。ここに多発する脳血管障害を基礎とし、脳萎縮、持続する記憶機能障害を呈する霊長類血管性認知症モデルが開発された。本モデルを用いて5頭のサルに血管性認知症を引き起こす操作を行い、直後に E-selectin 阻止能動免疫ワクチン療法を行ったが、急性期死亡例があり、有効性、安全性の評価はできなかった。能動免疫による E-selectin 阻止ワクチン療法は安全性に関するデータの蓄積が必要と考えられた。

研究代表者 田平 武
順天堂大学大学院 認知症診断・予防・治療学講座 教授

分担研究者 簗野健太郎
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

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病態制御研究室長

分担研究者 富本秀和
三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学教授

A. 研究目的

アルツハイマー病のワクチン開発

我々はアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用いたアミロイドワクチンを開発し、マウスで安全性、有効性を示した（1, 2）。これは老齢サルでも確認された（論文見発表）。また、センダイウイルスベクター（SeV）に A β と IL-10 を組換えたワクチンを開発し、マウスで有効性を示した（論文見発表）。抗認知症薬剤の開発はこれまで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ヵ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 Pittsburgh Compound B (PIB) をリガンドとする Positron Emission Tomography (PIB/PET) による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補助診断に用いられるようになった。そこで、老齢サルを用いて A β ワクチンの効果判定に PIB/PET が有用かどうかを調べることで、併せて安全性の更なる検討を加えること、A β

ワクチンの効果発現に必要な期間を明らかにす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ブラは、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 E-selectin を介して脳に侵入する。これまで本研究者らはラット、マウスの脳梗塞モデルを用いて E-selectin を標的とする免疫療法の有用性を示してきた。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10-11月、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。

平成20年1月その4頭にSeV/Aβ-IL-10ワクチン 5×10^8 個を経口投与し、平成20年4月PIB/PET検査を行った。これらのサルに平成20年7月SeV/Aβ-IL-10ワクチンを再投与し、平成20年11月PIB/PET検査を行った。またワクチン非投与サル4頭について2回目のPIB/PETを平成20年11月に施行した。PIB/PET検査はすべて浜松ホトニクスにおいて施行された。SeV/Aβワクチンはディナベック（株）井上誠より提供を受けた。本年度はこれらのデータを詳しく解析するとともにワクチン投与を受けた4頭を解剖し、老人斑の免疫染色をおこない病理学的に検討した。

平成21年12月上記平成19年10-11月にPIB/PETを行ったサル2頭にアデノ随伴ウイルスベクターを用いた組換えワクチンを経口投与し、3ヶ月後にPIB/PETを行いワクチン投与前の画像と比較した。

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、社団法人予防衛生協会の研

究支援を受けて実施した。昨年度得られた実験の至適条件でさらに2頭のカニクイザルについて血管性認知症モデルを作成し、MRIおよび病理学的に評価を行った。記憶機能の評価は食物回収試験により行った。MRI撮影はT1, T2, Proton, DWI, PWI, Tensor, T2*, MRAの項目を撮影した。

E-selectinを標的とするワクチン開発では、5頭の霊長類血管性認知症モデルで、2回実施する各ビーズ投与の直後に、このワクチンの投与を行ない、MRIおよび記憶機能を評価した。

(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及び滋賀医科大学動物生命科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行った。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4頭にSeV/Aβワクチンの経口投与を行い、3ヵ月後にPIB/PETを施行し投与前のPIB/PETと比較した。ワクチン投与サルではPIBの脳内集積が減少傾向を示し、対小脳比で見ると前頭葉で統計学的に有意であった。さらに最初のワクチン投与から6ヵ月後に再度ワクチンを投与し、その4ヵ月後にPIB/PETを施行したが、PIBの脳内集積に有意な変化を見出さなかった。ワクチン非投与老齢サル4頭について1年後にPIB/PETを繰り返したが、PIBの脳内集積に有意な変化を認めなかった。

SeV ワクチン投与サル4頭を解剖して病理学的に調べたところ、4頭中3頭では大脳皮質の老人斑が見られず、年齢に比し老人斑が少ない傾向を示した。定量的画像解析は現在実施中である。

本年度は2頭の老齢カニクイザルに組換えAAVワクチンを経口投与し3ヶ月後にPIB/PETを行った。本報告書作成の時点ではまだ解析結果を得ていない。

血管性認知症のワクチン開発

霊長類血管性認知症モデル動物の開発においては、2,250個のマイクロビーズ投与群

の全ての動物において、MRI 画像上多発微小梗塞、微小出血を示す変化と慢性期の脳萎縮が確認され、食物回収試験による記憶機能の評価では、投与直後に一過性のエラー数の急激な増加が認められるとともに、2回目のマイクロビーズ投与後には中等度のエラー数の増加が長期間持続する記憶機能障害が発症することが明らかとなった。以上の成果より、このモデルは再現性が高く、病態解析のみならず、予防法、治療法の有効性、安全性評価にも利用可能であると考えられ、ここに多発する脳血管障害を基礎とし、脳萎縮、記憶機能障害を呈する血管性認知症霊長類モデルが開発された。

マウスを用いた予備実験で、抗原蛋白 (E-selectin) をアジュバントとともに1ヵ月間隔で2回皮下に投与するワクチンが血中抗 E-selectin 抗体を3ヵ月間維持できることを確認した。霊長類血管性認知症モデル5頭に、このワクチンの投与を開始したが、2頭が1回目のビーズ投与後脳血管障害の急性期に、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物に記憶機能検査を施行したところ、一過性のエラー数の急激な増加に対しては軽減が認められたが、持続する記憶障害に対する明らかな効果は認めなかった。

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 の脳内集積が有意に高いことが分かった。この PIB の脳内集積は SeV ワクチンの経口投与3ヵ月後に低下傾向を示し、前頭葉では有意な減少を示した。nを増やすことにより他の部位でも有意差が得られると考えられる。またワクチン非投与サルでは2回目の PIB/PET に変化がなかったことから、これはワクチンの効果であると考えられる。2回目のワクチンを投与しその4ヵ月後に PIB/PET を施行したが、さらに有意な低下を認めることはなかった。SeV/A β ワクチンの投与を受けた4頭について病理学的に検討した結果、3頭で大脳皮質の老人斑がほとんど認められなかった。本研究

者らの経験からこの年齢(22歳)としては老人斑が少なく、これはワクチンの効果であろうと考えられた。現在生化学的解析を行いこれを確認する作業を行っている。

センダイウイルスは呼吸器系によく感染するので、マウスではワクチンの点鼻により好結果が得られた。そこで老齢アフリカミドリザルを用いて本ワクチンの点鼻による効果を調べたが、十分な効果が得られなかった。これは点鼻した後サルがすぐ立位をとるので、ワクチンが漏れてしまっている可能性が考えられた。今回経口投与により PIB の脳内集積の減少と老人斑の消失と思われる所見を認めたことから、SeV は経口投与によっても効果が得られることが示唆された。

血管性認知症のワクチン開発

昨年の研究でカニクイザルにの血管性認知症のモデル動物として必要な長期間持続する記憶機能の低下を発症させるためには、一側内頸動脈に一回あたりマイクロビーズを2,250個以上注入することが必要であることが分かった。また MRI 画像、病理組織像を比較検討し、MRI 画像でとらえられた虚血性変化は、脳梗塞巣であることが確認され、慢性期には脳萎縮が認められた。このようなサルでは長期間持続する記憶機能障害が認められ、ここに再現性の高い血管性認知症の霊長類モデルが開発された。本モデルは血管性認知症の診断薬、予防・治療薬開発の前臨床試験に有用な世界で初めてモデルであり、精度の高い有効性、安全性の評価が可能になると考えられる。

本モデルを用いて能動免疫による E-selectin 阻止ワクチン療法の有効性、安全性の評価を行った。霊長類血管性認知症モデル5頭にワクチンを投与したが、2頭が急性期の脳血管障害、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物では、一過性のエラー数の急激な増加の軽減が認められたが、持続する記憶障害に対する明らかな効果は認めなかった。マウスの実験では明らかな副作用は認められなかったが、能動免疫によるワクチンの副作用の可能性もあり、死亡動物の病理を検討するとともに、生存動物の病理変化を比較検討し、安全性に関するデータの蓄積が必要と考えられた。

E. 結論

アルツハイマー病のワクチン開発

アミロイドワクチンによる老人斑消失

効果は、老齢カニクイザルにPIB/PETを施行することで評価できることが分かった。効果判定にはワクチン投与3カ月がひとつの目安となる。

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注入することにより、多発脳梗塞による持続する記憶機能障害を発症するモデル動物の作製に成功した。これを用いてペプチド能動免疫によるE-selectinワクチンの効果を見ようとしたが、急性期の死亡が見られ、十分な結果を得ることができなかった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文 (Peer Review のある欧文 review, Editorial を含む)

1. Tabira T. Decorated plaques in Alzheimer's disease. **Ann Neurology** 65(1): 4-6, 2009.

2. Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H. Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. **Neuroreport** 20: 990-996, 2009.

3. Kubo K, Nakao S, Jomura S, Sakamoto S, Miyamoto E, Xu Y, Tomimoto H, Inada T, Shingu K. Edaravone, a free radical scavenger, mitigates both gray and white matter damages after global cerebral ischemia in rats. **Brain Res** 1279: 139-46, 2009.

4. Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R. Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid deposition in APPSwInd transgenic mice. **Brain Res** 1294: 202-210, 2009.

5. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K,

Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. **Gene Ther** 16 (2):297-302, 2009.

6. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: A comprehensive review of active immunization strategies. **Tohoku J Exp Med** 220(2): 95-106, 2010.

7. Hara H, Kataoka S, Anan M, Ueda A, Mutoh T, Tabira T. The therapeutic effects of herbal medicine, Juzen-taiho-to on the reduction of A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheim Dis** 2010 (in press).

8. Okamoto Y, Ihara M, Tomimoto H. Silent ischemic infarcts are associated with hemorrhage burden in cerebral amyloid angiopathy. **Neurology** 74: 93, 2010.

9. Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Makia T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R, Tomimoto H. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. **Stroke** 2010 (in press).

10. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. **J Control Release** 142(3):431-437, 2010.

2) 総説

1. 田平 武 A β ワクチン療法開発の現状と展望 **Geriatric Medicine** 47(1):87-90,

- 2009.
2. 田平 武 近未来の認知症治療の可能性を探る A β ワクチン療法の現状と課題 老年精神医学雑誌 20:68-74, 2009.
 3. 田平 武 特集アルツハイマー病—最近の話題 (特集編輯) 益々近づくアルツハイマー病の根本的予防・治療. Medical Science Digest 35:132-133, 2009.
 4. 田平 武 アルツハイマー病の予防・治療ワクチン. Pharma Stage 8:3-8, 2009.
 5. 田平 武 アルツハイマー病の治療法: 新たなアプローチと新たな治療標的。アルツハイマー病の経口A β ワクチン. Psychiatry Today 21:11, 2009.
 6. 松本信英, 田平 武 アルツハイマー病に対するワクチン療法研究の進展. 日薬理誌(Folia Pharmacol Jpn) 134:57-61, 2009.
 7. 田平 武 アルツハイマー病予防治療の最前線。ほんとうの時代、PHP研究所、2009年9月号、70-74.
 8. 田平 武 アルツハイマー型認知症ワクチンの開発状況 Geriat Med 47:1378-87, 2009.
 9. 田平 武 アルツハイマー病予防のために、今何ができるか まいんど(日本中小企業福祉事業財団発行) 21:9-11, 2009.
 10. 田平 武 私のアンチエイジングライフ アンチエイジング医学—日本抗加齢学会雑誌 5:574-575, 2009.
 11. 田平 武 アルツハイマー病のワクチン療法 臨床神経学 2009 Nov;49(11):848-50.
 12. 田平 武 アミロイド β から脳を守る ANTI-AGING MEDICINE 2010;6:23-27.
 13. 田平 武 A β を標的とする免疫療法 脳 21 2010;13:63-69.
 14. 田平 武 Alzheimer 病 7) 治療
 3. 新規の予防・治療薬開発
田平 武、朝田 隆企画、「認知症診療マニュアル」 科学の評論社、神経内科特別増刊号 72(Suppl 6):303-308, 2010,
- 3) 著書
1. 田平 武 脳神経障害の基礎的背景 浦上克哉編集、大内尉義監修 老年医学の基礎と臨床 II ワールドプランニング 東京 2009 75-78.
 2. 田平 武 アルツハイマー病に克つ 朝日新書 東京 2009
2. 学会発表
- 1) 国内学会等: 特別講演、シンポジウム
 1. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー・ワクチン開発の現状 第560回新潟医学会、平成21年6月20日、新潟大学有壬記念館
 2. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病: 免疫療法の開発状況 第34回多摩核医学技術検討会、平成21年6月23日、立川グランドホテル、立川
 3. 田平 武 アルツハイマー病の予防・治療ワクチンの開発 第46回薬剤学懇談会研究討論会、平成21年6月25日、神戸ポートピアホテル、神戸
 4. 田平 武 アルツハイマー病の予防: ワクチンと生活習慣の改善 順天堂大学脳神経内科市民公開講座「認知症克服への挑戦: 認知症を治す時代の到来を信じて」、平成21年9月5日、順天堂大学有山記念講堂、東京
 5. 田平 武 アルツハイマー病の治療法開発 第1回お茶の水 Neuroimaging Conference 平成21年9月5日 泉ガーデンタワー

一、東京

6. 田平 武 (特別講演) 近未来の認知症治療の可能性を探る: Aβワクチン療法の現状と課題 第16回沖縄認知症研究会、平成21年10月3日、沖縄ハーバービューホテルクラウンプラザ、那覇

7. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病の抗体療法 第4回佐賀県認知症研究会、平成21年10月14日、ホテルニューオータニ佐賀、佐賀

8. 田平 武 生活習慣と認知症: オーバービュー 第6回アルミニウムと健康フォーラム、平成21年10月17日、星陵会館、東京

9. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病の予防: ワクチンと生活習慣 第8回鹿屋肝属地区認知症研究会、平成21年11月2日、ホテルさつき苑、鹿屋

10. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病の免疫療法開発の現状と課題 札幌臨床薬理研究会、平成21年11月5日、JRホテル日航札幌、札幌

11. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病の予防・治療最近の話題、出雲クリニカルカンファレンス、平成21年11月30日、ウエルシティ島根、出雲

12. 田平 武 (イブニングセミナー) アルツハイマー病のワクチン療法について、日本精神病院協会主催 第16回認知症高齢者に関する研修会、平成21年12月3日、JALシティ田町、東京

13. 田平 武 アルツハイマー病のワクチン療法開発と今後の展望、技術情報協会セミナー 臨床ニーズ、標的分子の現状と展望をふまえた「これからのアルツハイマー病治療薬開発戦略」、平成21年12月16日

、中央大学駿河台記念館、東京

14. 田平 武 アルツハイマー病の免疫療法: 現状と展望、科学技術交流財団主催 第3回アルツハイマー病の早期診断・治療・予防法の開発研究会、平成21年12月22日、名城大学名駅サテライト、名古屋

15. 田平 武 (特別講演) アルツハイマー病: 免疫療法の開発状況と展望 第74回石川県神経科精神科医会学術講演会 平成22年2月26日 金沢ニューグランドホテル、金沢

3) 国際学会等: 特別講演、シンポジウム

1. Tabira T. (Invited Speaker) Abeta vaccine for prevention and treatment of Alzheimer's disease: monkey studies. 9th Internat. Conf. ADPD, March 14, 2009, Prague, Czech.

2. Tabira T. (Invited Speaker) Alzheimer's disease vaccine. 2nd German-Japanese Neuro-immunology Symposium. July 11, 2009, Eibsee, Germany.

3. Kato T, Ito K, Hatano K, Nakamura A, Washimi Y, Arahata Y, Suenaga M, Hattori H, Miura H, Okamura N, Yanai K. [C-11]BF-227 PET imaging of amyloid deposition in AD, MCI, and normal subjects. The 56th Annual meeting of Society of Nuclear Medicine. June 17, 2009. Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告書

老齡サルに Aβ イメージングによる Aβ ワクチン治療効果の検討

順天堂大学大学院 認知症診断・予防・治療学 田平 武
国立長寿医療センター研究所 篠野 健太郎

研究要旨

老齡カニクイザルにセンダイウイルスベクター組換え Aβ ワクチンを投与し PIB-PET 画像を得た。関心部位の SUV 値を求め小脳との比を求め、ワクチン投与前の画像と対比した。ワクチン投与サルでは全般的に PIB の脳内集積が低く、後期相において前頭葉で有意の低下を認めた。ワクチン非投与サルで 1 年後に PIB-PET を繰り返したが、有意な変化を認めなかった。

A. 研究目的

老齡サルに Aβ ワクチンを投与しその後で PIB-PET を施行し、ワクチン効果の評価に PIB-PET が有効であるか否かを明らかにする。

B. 研究方法、結果

ワクチン投与前、投与後 3 ヶ月のカニクイザルに炭素-11 標識 PIB を投与し PET スキャンを施行した。PIB 画像はそれぞれの個体の MRI 画像に重ね合わせを行い、MRI 画像上で描いた関心領域を PIB 画像に設定して、投与後 43~58 分および 61~91 分の放射能濃度を読みとった。次式に従い standardized uptake value (SUV) 値をもとめた。(SUV=(組織 1mL 中放射能/投与放射能)X 体重) また、脳移行のファクターを補正するため、それぞれの脳領域の取り込みを小脳との比を取ることによって正規化した。結果を図 1 に示す。

ワクチン投与による PIB 取り込み (SUV 値) の変化は早期像より後期像でより顕

著であった。これは Aβ に結合した PIB の脳からの排出がより遅いため、特異/非特異比が向上したためと考えられる。対小脳比を取ることによってより高い感度で PIB 取り込みの変化が捉えられたのではないかと考える。図 1 では $p < 0.05$ とともに $p < 0.1$ のデータを示したが、前者を有意な変化と考えるべきである。この制限をもうけると、投与後 61~91 分 SUV 値 (図 1 の 2) における橋と、同じく投与後 61~91 分の対小脳比 (図 1 の 4) における前頭葉がワクチン投与後 3 ヶ月の次点で有意に PIB 取り込みが低下していると結論される。しかし、橋における Aβ の生成は考えにくいことから、これは PIB と白質の相互作用による修飾と思われる。対小脳比を取ることにより、この変化が消失したことより、結果がより信頼性におけるものとなったことを示していると考えられる。

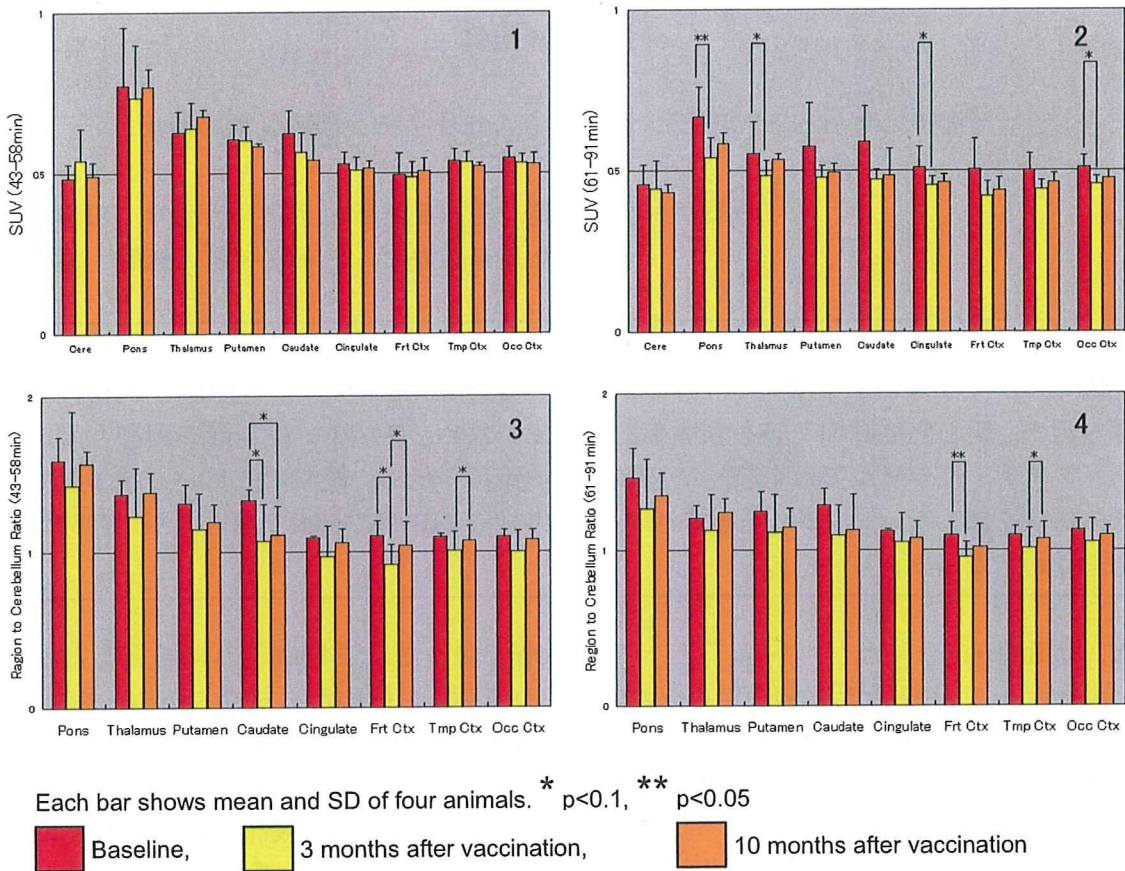


図1 ワクチン投与による炭素-11 標識 PIB の取り込み変化

次に1回目のワクチン投与から6ヵ月後に2回目のワクチンを投与し、その4ヵ月後にPIB-PETを繰り返した(1回目のワクチン投与から10ヵ月後)。しかし、もはやそれ以上の取り込み低下は見られなかった(図1)。

さらに、飼育環境の変化の影響、スキャンによる変動を見るために、ワクチン非投与サルについて1年後にPIB-PETを繰り返した。しかし、有意な変化は認めなかった。

(倫理面への配慮)

本研究で行なう動物実験は、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科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行った。

C. 考察

昨年度、若齢カニクイザルと老齢個体のPIB/PETを行った。視床、帯状回、側頭葉において、老齢サルは若齢サルより有意に高いPIB取り込みを示した($p < 0.05$)。後頭葉を除くその他の脳領域でもPIB取り込み亢進の傾向が認められた。野田らは老齢アカゲザルにおいて、線条体、視床、橋、帯状回におけるPIB取り込みの向上を認めた。今回の結果はこの報告と良く一致していた。

今回の検討は正常加齢によって形成されたA β 蛋白に対する効果を見ており、さらにヒトとカニクイザルの種差もあり、PIB取り込みはアルツハイマー病患者と

は異なる。アルツハイマー病患者の PIB 取り込みは前頭葉、側頭葉、楔前部が先行する。今回の検討から前頭葉の PIB 取り込み低下がより顕著であったことは、A β ワクチンが、未成熟とされる前頭葉の A β 蛋白に対しより高い除去効果を持っていることを示しているのかもしれない。

アルツハイマー病の根本的予防・治療法はまだなく、鋭意研究が行われている。また、その効果を判定する客観的かつ迅速な方法もまだ確立されていない。本研究は老齢サルに PIB/PET を応用することによりアミロイドワクチン療法の有効性を判定する方法を確立し、ワクチン投与後何ヵ月後に判定すればよいかの目安を与えた。これによりワクチン療法の安全性、有効性がさらに確認されるとともに、ヒトでの治験をどのように行えばよいか

明らかにできる。この成果はアミロイドワクチンのヒトでの治験を迅速に進める結果、多くのアルツハイマー型認知症の発症を抑制し、進行を抑えることが可能になり、社会的インパクトは極めて大きい。

5. 本研究に関連した発表論文等

1. Tabira T. Decorated plaques in Alzheimer's disease. **Ann Neurology** 65(1): 4-6, 2009.
2. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: A comprehensive review of active immunization strategies. **Tohoku J Exp Med** 220(2): 95-106, 2010.
3. Hara H, Kataoka S, Anan M, Ueda A, Mutoh T, Tabira T. The therapeutic effects of herbal medicine, Juzen-taiho-to on the reduction of A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheim Dis** 2010 (in press).

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
センダイウイルスベクター組換えワクチンを投与した高齢カニクイザル脳の病理組織学的
変化

分担研究者 中村 紳一郎 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：アルツハイマー病ワクチンを実現するためには、適切な評価系が必要で、サル類を用いた前臨床試験は、それに対する高い可能性を持っている。今年度はセンダイウイルスベクター組換えワクチンを投与した4例の高齢カニクイザルの脳の病理組織学的変化を検索した。ほぼ同年齢のカニクイザルに老人斑が必発する前頭葉皮質や扁桃核で4例中2例は老人斑数が同等年齢の動物よりも少数、1例には認められなかった。出現少数の1例では、元来はあまり出現を見ない被殻にやや多くの老人斑出現を認めた。他の1例は、多量の老人斑形成を認めた。今回の実験では対照群を置けなかったため、直接的な効果を示すことはできないが、4例中3例は同等年齢のカニクイザルの老人斑数よりも出現数が少なく、ワクチンの効果が推測された。今後は生化学的な解析等によって、ワクチン効果の根拠を明確にしていきたい。

A. 研究目的

サル類は老人斑（SP）および神経原線維変化を標榜するため、アルツハイマー病（AD）のモデルとして、適切な動物種と考えられている（Nakamura S 1996、1998、昨年度報告）。また神経系の高次機能を持ち、様々な脳機能評価を行うことにも対応できる。その一方で、高齢のサル類は非常に手に入れづらいという欠点もある。

AD 治療のためのひとつの有効な戦略として、AD の責任病変と考えられる SP の主構成成分、アミロイドβタンパ

ク（Aβ）に対するワクチン開発が脚光を浴びている。しかしその開発過程で、齧歯類の効果をもとに臨床試験を行ったところ、重篤な副作用（肉芽腫性髄膜脳炎）が起こった経緯がある（Orgogozo JM 2003）。齧歯類とヒトとの間を正確につなぐためにはサル類の前臨床試験が必要である。

この研究では、1) ヒトへの投与方法として最も可能性の高い、経口投与ワクチンで、かつ2) 導入効率の改善とベクター自身が核内へ移行しない安全性を考慮した、RNA ウイルスである、セン

ダイウイルスベクターに組換えたワクチン、を高齢カニクイザルに投与し、その効果を組織学的に検索した。

B. 研究方法

動物：医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで飼育されていた 4 例のメス・高齢カニクイザルを、本研究実施のため、滋賀医科大学動物生命科学センターへ移動し、約 3 ヶ月の馴化期間を設けた。使用動物は、CE0749F (22 歳 2 ヶ月)、CE0747F (23 歳 8 ヶ月)、CE0748F (24 歳 2 ヶ月)、CE0819F (27 歳 10 ヶ月) の 4 例。

実験方法：ディナベック社のセンダイウイルスベクターに AB1-43 を組換えたワクチンを作製し、上記のカニクイザルに経口投与した。投与する際に用いたカプセルは耐酸性で、胃を通過の後、小腸で融解、ワクチンが吸収されることになる。馴化期間終了後に 1 回目の投与を行い、その 6 ヶ月後に 2 回目の投与を行い、さらにその約 1 年後に病理解剖を行った。

病理組織学的検索：上記 4 個体の脳は 4%パラホルムアルデヒドで固定、前頭葉、扁桃体を含む側頭葉、海馬を含む側頭葉、後頭葉、小脳の 5 ヶ所を切り出し、パラフィンブロックを作製した。4 μ m 薄切切片で HE 染色を行った。

免疫組織化学的検索：切片の一部を免疫組織化学的検索に供した。一次抗体として AB40 と AB42 に対するポリクローナル抗体を用い、酵素抗体法にて染色した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は滋賀医科大学動物実験委員会および遺伝子組換え安全委員会の承認のもと、実施された。実験に供されたカニクイザルは法令に則った施設内で、動物福祉を考慮の上、飼育、実験が行われた。

C. 研究結果

CE0749F は前頭葉および側頭葉新皮質に AB40 と AB42 とともに陽性の、少数の neurite SP を認め、他の 2 例で SP 形成を認めた被殻には、SP 形成は認められなかった (図 1、2)。血管への AB 沈着は AB40 および AB42 陽性のものがそれぞれ少数認められた。

CE0747F では、いずれの部位にも SP は認めなかった (図 3、4)。血管への AB 沈着も認められなかった。

CE0748F は前頭葉新皮質に AB42 のみ陽性の未熟な neurite SP を非常に少数認めたが、他の新皮質に SP 形成は見られなかった (図 5)。一方、被殻に AB40 または AB42 陽性の neurite SP を認め、それぞれの数は AB42 陽性の neurite SP の方が多かった (図 6)。

CE0819F ではすべての領域の新皮質に AB40 と AB42、ともに陽性の SP を多数認めた (図 7)。またこの個体には AB40 または AB42 陽性の血管 AB 沈着が多数確認でき (図 7)、その量は AB42 陽性の血管の方が多かった。被殻でも AB40 と AB42 とともに陽性の、少数の neuritic SP を認めたが、この部位では血管への AB 沈着はほとんど確認できなかった (図 8)。

いずれの動物にも diffuse SP は認め

られず、また小脳への Aβ 沈着は認められなかった。

D. 考察

カニクイザルの SP は前頭葉から側頭葉の新皮質、扁桃体に現れ始め、多数の出現を認める個体でも、これら部位は SP が最も密発するとされている (Nakamura S 1998)。また 23 歳以上のカニクイザルの解剖例はほとんどの例に SP が確認できる (Nakamura S 1998)。しかし、今回の研究で 4 例中 3 例は、高齢であるにもかかわらず、これら頻発部位の SP は非常に少なかった。

CE0748F では必発部位である、前頭葉および側頭葉皮質、扁桃核にはほとんど SP を認めず、逆に高度に沈着したときでないと SP が出現しない被殻にやや多くの SP を認めた。この結果は、ワクチンによる除去能に、脳内部位による差がある可能性を示唆している。すなわち必発部位と被殻の両方に出現していた SP のうち、除去されやすい新皮質などから消失し、結果的に被殻の SP のみが観察できた、という仮説が考えられた。一方で、必発部位と被殻の両方に SP が観察された CE0819F については、ワクチン投与前の SP の数が、さらに多かったのかもしれない。

このワクチンの効果をさらに明確にするためには、これら病理組織学的な結果と別途進められている画像解析との対比が必要である。またワクチン効果による除去の働きがあると、脳内のミクログリアが活性化することが遺伝子導入げっ歯類の実験系 (Mouri A 2007)、ヒ

トの臨床試験後の死亡例 (Nicoll JAR 2003) などで知られている。カニクイザルの SP ではミクログリアの反応は非常に弱いとされているが (Nakamura S 1996)、ワクチン効果が加われば、投与動物に SP が見られたとしても、ミクログリアが積極的に反応するはずである。一方で、ワクチン投与、除去に伴って脳内の Aβ40 と Aβ42 バランスも変化してくるものと考えられるので、生化学的検索も必要である。今年度で研究班は終了するが、残された課題は多い。

E. 結論

22 歳以上のカニクイザルでは高い確率で SP が形成されるが、今回の研究で 4 例中 3 例には、高頻度に出現する部位での SP は非常に少数だった。センダイウイルスベクターを用いた AD ワクチンの高齢カニクイザルに対する効果が推測された。

G. 研究発表

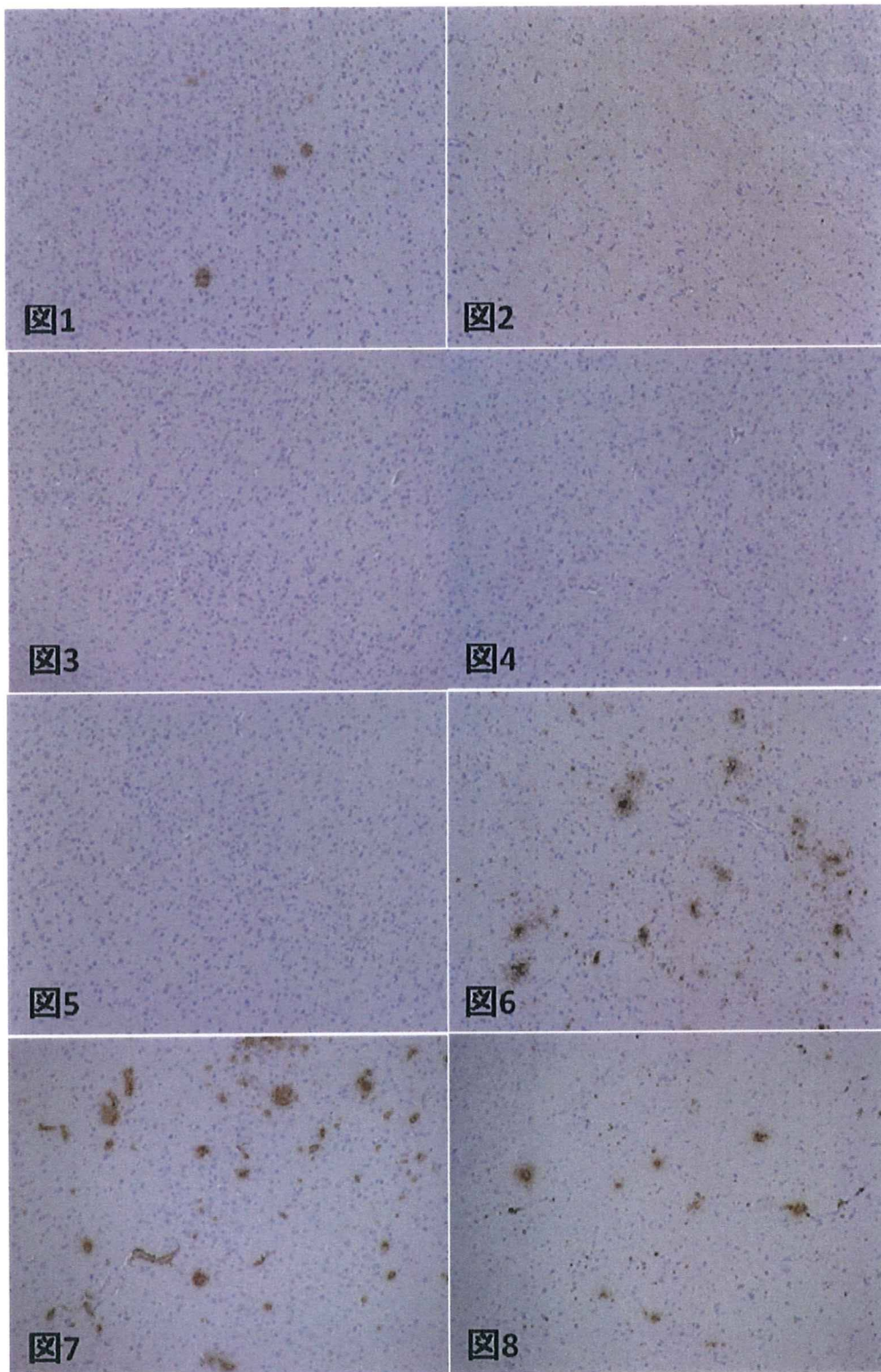
1. 論文発表

1. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.* 16 (2):297-302, 2009
2. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic

ischemia-reperfusion injury by
pre-administration of
catalase-expressing adenovirus
vectors. J Control Release.
142(3):431-437, 2010

2. 学会発表
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。



側頭葉新皮質（図 1,3,5,7）、被殻（図 2,4,6,8）における CE749F（図 1、2）、CE747F（図 3、4）、CE748F（図 5,6）、CE0819F（図 7、8）の Ab42 に対する抗体を用いた免疫染色像。

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

平成21年度分担研究報告書

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 血管性認知症研究部 室長

研究要旨

昨年度までの研究成果から得られたカニクイザルを用いた霊長類血管性認知症モデル作製の至適条件について、MRI病変と記憶機能障害の再現性を2頭の動物を用いて確認し、多発する脳血管障害を基礎とし、脳萎縮、持続する記憶機能障害を呈する霊長類血管性認知症モデルが開発された。また、本モデルを用いてE-selectin阻止ワクチン療法の有効性、安全性の評価を行ったが、死亡例があり、能動免疫によるE-selectin阻止ワクチン療法は安全性に関するデータの蓄積が必要と考えられた。

A. 研究目的

血管性認知症は脳血管障害を原因とする認知症であるため、病型が多種多様であるが、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。これらの血管性認知症の原因となる白質病変や脳梗塞のペナンプラは、炎症・免疫反応により重症化し、炎症・免疫細胞は病巣内の活性化血管内皮細胞に発現する接着分子E-selectinを介して脳に侵入する。本研究はサルを用いた血管性認知症のモデルを開発し、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。本年度は、昨年度までの研究成果から得られた霊長類血管性認知症モデル作製の至適条件について、MRI病変と記憶機能障害の再現性を確認し、本モデルを用いて能動免疫によるE-selectin阻止ワクチン療法の有効性、安全性の評価を行うことを目的として研究を行なった。

B. 研究方法

霊長類血管性認知症モデル動物の作製にはカニクイザルを用いた。一側内頸動脈あたり2,250個(両側合計4,500個)のマイクロビーズ両側内頸動脈から投与する微小塞栓による多発脳梗塞モデルを作製し、MRI画像、記憶機能の再現性を検討した。1か月間隔でマイクロビーズを2回投与するモデル動物を2頭作製し、MRI画像と記憶機能検査(食物回収試験)をマイクロビーズ投与前より、2回目の投与から3か月後まで経時的に実施した。

ワクチンの開発では、マウスを用いた予備実験にて、抗原蛋白(E-selectin)自体をアジュバントとともに、1か月間隔で2回、皮下に投与して免疫する能動免疫によるワクチンが治療に必要な血中抗E-selectin抗体を3か月間維持できることを確認した後、5頭の霊長類血管性認知症モデルで、2回実施する各ビーズ投与の直後に、このワクチンの投与を行ない、有効性、安全性の評価実験を実施した。

(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科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

霊長類血管性認知症モデル動物の開発においては、2250個投与群の全ての動物において、MRI画像で多発する微小梗塞、微小出血を示す変化と慢性期の脳萎縮が確認され、食物回収試験による記憶機能の評価では、投与直後に一過性のエラー数の急激な増加が認められるとともに、2回目のマイクロビーズ投与後には中等度のエラー数の増加が長期間持続する記憶機能障害が発症することが明らかとなった。以上の成果より、このモデルは再現性が高く、病態解析のみならず、予防法、治療法の有効性、安全性評価にも利用可能であると考えられ、多発する脳血管障害を基礎とし、脳萎縮、記憶機能障害を呈する血管性認知症霊長類モデルが開発された。

ワクチン開発については、血管性認知症患者の病理に関する報告やモデル動物の病理像から、病態の核となる細胞接着分子発現や脳内炎症反応が長期間持続していることが判明し、治療には、細胞接着分子を阻止する血中抗E-selectin抗体の長期間の維持が必要であることが明らかとなった。マウスを用いた予備実験から、抗原蛋白(E-selectin)自体をアジュバントとともに、1か月間隔で2回、皮下に投与して免疫する能動免疫によるワクチンが血中抗E-selectin抗体を3か月間維持できることを確認した。霊長類血管性認知症モデル5頭に、このワクチンの投与を開始したが、2頭が1回目の

ビーズ投与後、脳血管障害の急性期に、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物では記憶機能検査にて、一過性のエラー数の急激な増加に対しては軽減が認められたが、持続する記憶障害に対する明らかな効果は認めなかった。

D. 考察

広汎な微小梗塞、微小出血を急性期から境界領域を中心に大脳皮質、穿通枝領域などに多数発症し、慢性期に脳萎縮を認め、かつ、長期間持続する記憶機能障害を発症する再現性の高い霊長類血管性認知症モデルが開発された。本モデルは血管性認知症の診断薬、予防・治療薬開発の前臨床試験に有用な世界で初めてモデルであり、精度の高い有効性、安全性の評価が可能になると考えられる。本モデルを用いて能動免疫によるE-selectin阻止ワクチン療法の有効性、安全性の評価を行った。霊長類血管性認知症モデル5頭にワクチンを投与したが、2頭が急性期の脳血管障害、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物では、一過性のエラー数の急激な増加の軽減が認められたが、持続する記憶障害に対する明らかな効果は認めなかった。マウスの実験では明らかな副作用は認められなかったが、能動免疫によるワクチンの副作用の可能性もあり、死亡動物の病理を検討するとともに、生存動物の病理変化を比較検討し、安全性に関するデータの蓄積が必要と考えられた。

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し、多発する脳血管障害を基礎とし、脳萎縮、持続する記憶機能障害を呈する霊長類血管性認知症モデルが開発され、本モ

デルは血管性認知症の診断薬、予防・治療薬開発の前臨床試験に有用な世界で初めてモデルであり、精度の高い有効性、安全性の評価が可能になると考えられる。また、本モデルを用いて能動免疫によるE-selectin阻止ワクチン療法の有効性、安全性の評価を行ったが、2頭が急性期の脳血管障害、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物では、一過性のエラー数の急激な増加の軽減が認められたが、安全性に関するデータの今後の蓄積が必要と考えられた。

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

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

武田和也
国立長寿医療センター研究所
特任研究員

足立香代
国立長寿医療センター研究所
流動研究員

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

平成21年度分担研究報告書

血管性認知症のワクチン開発

分担研究者：富本秀和 三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学 教授

研究要旨

本年度はカニクイザルの左右の内頸動脈にマイクロビーズ(2250個)を各々注入し、頭部MRIの経時的撮影を行った。梗塞巣は血管の境界領域に分布したが、10週間後には退縮し脳萎縮を残した。この霊長類血管性認知症モデルに対してE-selectin阻止ワクチン療法を行ったが、死亡個体が多く評価困難であった。

研究目的

前年度までのマイクロビーズ投与数では病巣が恒常的に作成できなかった。このため、本年度は研究協力者(眞木崇州、京都大学・大学院)と共同し、より大量のマイクロビーズの投与を行って、Magnetic resonance imaging (MRI)で虚血病巣を検討した。この結果、多発性小梗塞が血管境界領域に集簇して分布することを見出し、塞栓性機序によるヒト血管性認知症の病態モデルとして有用であることを見出した。

研究方法

各動物の処置は以下のごとくである。
#9、#11：一側2,250(計4,500)
#12—15：一側2,250(計4,500)+E-selectin皮下注射(マイクロビーズ投与直後にそれぞれ400µg)

各動物について、処置前、1回目のマイクロビーズ注入3時間後、10日後、1ヶ月

月後、2回目マイクロビーズ注入3時間後、10日後、1ヶ月後に頭部MRIを撮影した。

結果

#9：初回手術後10日後の時点で、右優位にACA/MCA境界領域、前頭皮質、半卵円中心、放線冠においてT2高輝度、T1低輝度域を認めた。T2高輝度域は経過とともに徐々に退縮したが、1ヶ月の時点で、脳室・脳溝の拡大が明らかとなり、脳萎縮はその後進行した。T1低輝度域は2.5ヶ月の時点でも残存した。T2*低輝度点状病変は、初回手術後10日から2.5ヶ月まで右優位に両側基底核に多発していた。

#11：初回手術後3時間後、左ACA/MCA境界領域において、正常構造である皮質深層の高輝度帯の不明瞭化を認めた。10日後の時点で、左優位にACA/MCA境界領域、両側放線冠にT2高輝度、T1低輝度域を認めた。T2高輝度域は経過とともに徐々に退縮