

3ヶ月時点から変化が無かった。また、ワクチンを投与しなかったサルで1年後に PIB-PET を繰り返したが、ベースラインスキャンと変わらなかった。以上より Aβ ワクチンの有効性が確認され、PIB-PET でワクチン投与3ヵ月後に評価できることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
総合研究報告書に記載
2. 学会発表  
総合研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1. Noda A, Murakami Y, Nishiyama S, Fukumoto D, Miyoshi S, Tsukada H, Nishimura S. Amyloid Imaging in Aged and Young Macaques With [11C]PIB and [18F]FDDNP. *Synapse* 2008;62:472-475.
2. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004;55:306-319.

図3 ワクチン投与前後の PIB 画像

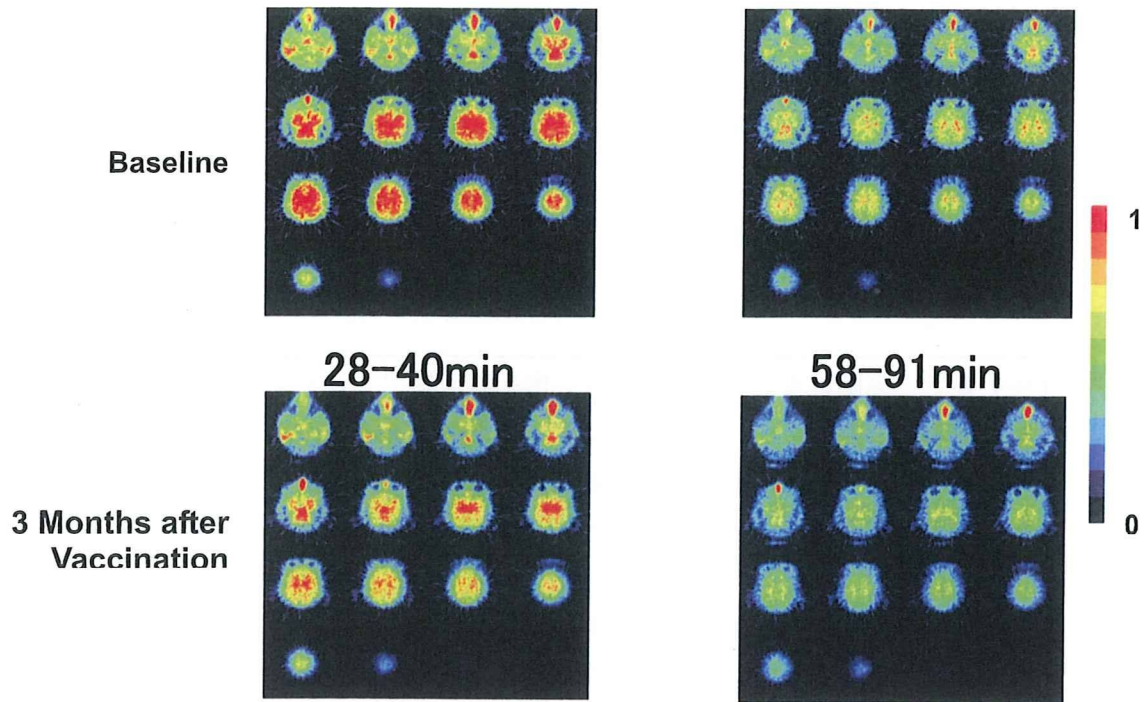
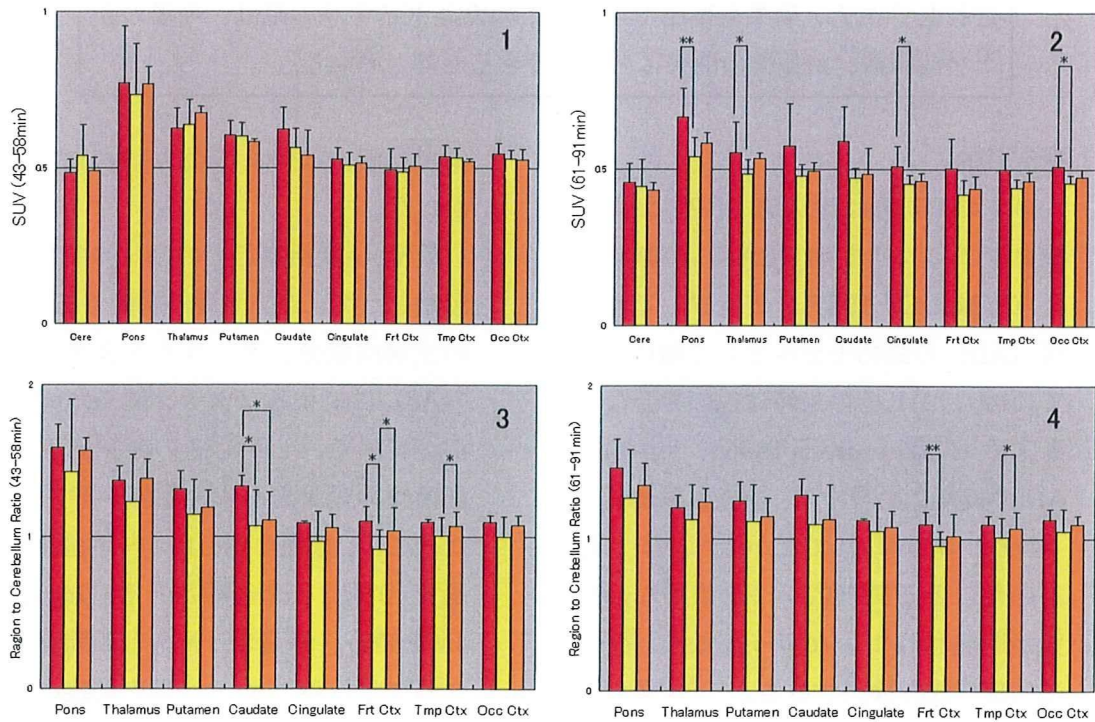


図4 ワクチン投与による PIB 取り込みの変化



Each bar shows mean and SD of four animals. \* p < 0.1, \*\* p < 0.05

■ Baseline, ■ 3 months after vaccination, ■ 6 months after vaccination

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  
(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)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授 中村紳一郎

研究要旨：高齢のカニクイザルは老人斑や脳血管アミロイド症が高い頻度で出現し、アルツハイマー病 (AD) の動物モデルとしての高い可能性を持っている。その価値をさらに高くするため、1) 生前に AD 関連病変の出現を脳脊髄液に現れるアミロイドβタンパク (Aβ) で予測できるか否かを解析、2) また超高齢カニクイザルで後期 AD に出現する神経原線維変化の有無を確認した。これらによって、カニクイザルが AD 新規療法の評価系として耐えうるものであることを確認の上、3) センダイウイルスベクターに Aβ を組換えた AD ワクチンを高齢カニクイザルに投与した。その結果、4 例中 3 例が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。以上のことから、カニクイザルを用いた AD ワクチンの安全性評価系は有効で、今回使用されたワクチン効果も確認できた。このカニクイザルの系は、今後の新たな治療法、治療薬の開発にも応用できるものとする。

A. 研究目的

多くのサル類に老人斑 (SP) および脳血管アミロイド症 (CAA) が確認され (Selkoe DJ 1987)、アルツハイマー病 (AD) の動物モデルとして期待されていた。しかしその当時は他の報告なども含め (Nakamura S 1996)、サル類で AD の後期に出現する、神経原線維変化 (NFT) は知られてなかった。また臨床応用に至る画期的かつ効果的な治療薬が開発されていなかったため、生前に病変形成を検出すること、サル類の持つ高次機能に対する加齢に伴う行動学

的な評価、などは、あまり行われてこなかった。

近年、AD 治療のためのひとつの有効な戦略として、AD の責任病変である 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を含めたトランスレーショナルリサー

チが必要となってきた。

そのために、この研究では1) 生前にAD 関連病変の出現を評価するために、脳脊髄液に現れるA $\beta$ による予測可能かどうか、2) カニクイザルがヒトの後期AD に相応した病変を標榜する完璧な動物モデルとなりうるか評価するため、超高齢カニクイザルに出現するNFTの有無、について確認した。さらに、3) 本研究班の田平らによって開発された、センダイウイルスベクターにA $\beta$ を組み換えた経口投与ワクチンの安全性とその効果について評価した。

## B. 研究方法

### 実験 1 :

5 歳から 36 歳のカニクイザル 14 頭の脳脊髄液 (CSF) および血清中の 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。またこれら動物のパラフィン切片を用い、A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 の免疫染色を行い、CSF 中の A $\beta$ 量と病変との関係を検索した。

### 実験 2 :

メス・36 歳とメス・推定 30 歳以上のカニクイザル、オス・推定 26 歳以上のニホンザル 2 例を用いて、病理組織学的検索 (HE 染色、ガリアス染色) と免疫組織化学的検索 (PHF-tau、A $\beta$  40、A $\beta$  42) を行った。

### 実験 3 :

動物 : 4 例のメス・高齢カニクイザルを用いて (22 歳 2 ヶ月 ~ 27 歳 10 ヶ月)、ディナベック社のセンダイウイルスベクターに A $\beta$ 1-43 を組換えたワクチンを

経口投与した。1 回目投与の 6 ヶ月後に 2 回目投与を行い、さらにその約 1 年後に病理解剖を行った。投与に用いたカプセルは耐酸性で、胃は通過し、小腸で融解、ワクチン効果が発揮されることになる。4 個体の脳は 4% パラホルムアルデヒドで固定、パラフィンブロックを作製し、HE 染色と A $\beta$  に対する免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験 1 と 3 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

### 実験 1 :

CSF の A $\beta$ 量と年齢との間に相関関係は見られなかった (表、図 1)。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 (表、図 1) 血清の A $\beta$ 量と年齢との間には負の相関関係が見られた。CSF と血清の A $\beta$ 42 の間には正の相関が見られた (表、図 1)。CSF ならびに血清の A $\beta$ 量と病変形成には明確な関係は見られなかった (表)。

### 実験 2 :

超高齢カニクイザルは 2 例とも A $\beta$  40 と A $\beta$  42 の SP が認められた。ともに A $\beta$  40 陽性の SP の方が多く観察された。前頭葉から側頭葉新皮質の少数の神経細胞にはガリアス染色陽性の糸くずないしは釣り針状の NFT が認められた (図 2)。この構造物は PHF-tau

の免疫染色にも陽性だった。PHF-tau の免疫染色では、前頭葉および側頭葉新皮質の SP に巻き込まれた腫大神経突起が陽性だったが、他の領域の SP では陽性像が見られなかった。

老齢ニホンザル 2 例も A $\beta$  40 と A $\beta$  42 陽性の SP が認められ、A $\beta$  40 陽性 SP の方が多く観察された。ガリアス染色の陽性像は見られなかったが、PHF-tau の免疫染色で前頭葉と側頭葉皮質の少数の神経細胞と腫大神経突起が塊状に陽性となる像を少数認めた。

#### 実験 3 :

検索した 4 例のうち 2 例は、相当年齢の他個体に比べ (Nakamura S 1998)、前頭葉および側頭葉新皮質といった SP の必発部位で、neuritic SP が見られたが非常に少数だった (図 3-a, e)。その 2 例のうち 1 例では SP の好発部位ではない被殻のやや多くの SP を認めた (図 3-b, f)。他の 1 例ではまったく SP が見られなかった (図 3-c, d)。

さらに他の 1 例ではすべての領域の新皮質に neuritic SP を多数認めた (図 3-g)。また被殻でも少数の neuritic SP を認めた (図 3-h)。

いずれの動物にも diffuse SP は認められず、また小脳への A $\beta$  沈着は認められなかった。

#### D. 考察

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 は生体から比較的容易に回収できる A $\beta$  を含む数少ない材料

である。これが脳内の A $\beta$  沈着量を反映していれば、特定の設備を持たなくとも、CSF 値から脳内 A $\beta$  沈着量を予測することができるが、少なくとも年齢と A $\beta$  沈着量には差がなく、病変形成との明確な関係も示せなかった。

AD のモデル動物として、変異型の A $\beta$  前駆体タンパク遺伝子改変マウスがよく知られている (Eriksen JL 2007)。病態解析とともに、AD 関連の創薬にも用いられる。しかしワクチン開発でマウスでの結果を元にヒトの臨床応用を図ったところ、副作用による問題が起こった (Orgogozo JM 2003)。このことから、遺伝子改変マウスによる評価のみならず、サル類を用いた評価系が見直されてきている。

多量の A $\beta$  沈着の見られる領域に、少数ではあるが嗜銀性と PHF-tau が陽性の神経原線維変化、老人斑の腫大神経突起の PHF-tau を認め、ヒトと同様な性状の tau のリン酸化が生じることが推測された。加齢に伴う病変の推移はヒトと同様であることが明らかとなり、この事実はモデルとしての一つの優位性を示している。

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。

今回使用した動物は SP を形成するのに十分な年齢の動物であり、必発部位にわずかな SP しか認めないのはワクチンの効果を考慮すべきである。ワクチン接種動物の中で、通常ではほとんど SP を認めない被殻にも SP を認めた。被殻に SP を認めるときには新皮質にはさらに多量の SP が形成されていると考えて良い。すなわちこの結果から、新皮質の SP のみがワクチンの除去にあずかり、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。

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。

#### E. 結論

カニクイザルは AD に関わる創薬研究に対し、動物モデルとしての高いポテンシャルと可能性を持っていることが

明らかになった。このモデルを用いた AD ワクチンの安全性評価で、センダイウイルスベクターを用いた AD ワクチンは、副作用は示さず、かつその効果が推測された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, Koie H, Sankai T, Ono F, Fujimoto K, Terao K. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. *Vet Pathol.* 45(1):67-72, 2008.
2. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol Ther.* 16(4):726-733, 2008.
3. Suzuki T, Sakurai F, Nakamura S, Kouyama E, Kawabata K, Kondoh M, Yagi K, Mizuguchi H. miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol Ther.* 16(10):1719-1726, 2008.
4. 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.

5. 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

1. Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, Koie H, Sankai T, Ono F, Fujimoto K, Terao K. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. 1<sup>st</sup> meeting of Asian Society of Veterinary Pathologist. Taipei, Taiwan. Aug, 2007.
2. Nakamura S, Kimura N, Nishimura M, Torii R, Terao K. Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged cynomolgus monkeys. 3<sup>rd</sup> meeting of Asian Federation of Laboratory Animal Science. Beijing, China. Sep, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。



表 AH concentration in CSF and sera, and densities of AH immunoreactivities in the brain tis

	Sex	Age	CSF (pmol/L)		Sera (pmol/L)		SPs (IR/mm <sup>2</sup> )		CAA (IR/mm <sup>2</sup> )	
			A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
1	F	9.25	250.5	26.1	55.7	5.4	-	-	-	-
2	M	5.83	197.6	26.2	53.4	6.3	-	-	-	-
3	M	6.08	227.8	14.7	65.2	3.8	-	-	-	-
4	F	17.5	27.3	3.9	24.9	1.2	-	-	-	-
5	M	6.5	295.8	1.4	60.5	4.6	-	-	-	-
6	F	23.25	60.5	16.5	43.9	3.1	-	-	-	-
7	F	22.58	24.9	3.1	51	2.5	+	+	-	-
8	F	18.92	46.3	2.1	41.5	1.9	-	-	-	-
9	F	5.92	27.3	1.2	53.4	3.5	-	-	-	-
10	F	19.75	122.1	8.2	34.4	1.5	-	-	-	-
11	M	6.25	356.1	52.5	NT	NT	-	-	-	-
12	F	24.75	114.6	26.3	86.6	5.6	+	+	+	+
13	F	36.25	265.6	35.9	36.8	0.8	+++	++	++	++
14	F	29.75	250	8.2	39.1	1.6	+	+	+	+

F; Female  
M; Male  
SPs; senile plaques  
CAA; Cerebral amyloid angiopathy  
-; not found  
+; slight  
++; moderate  
+++; severe

図1 CSF、血清、年齢と A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 との相関関係

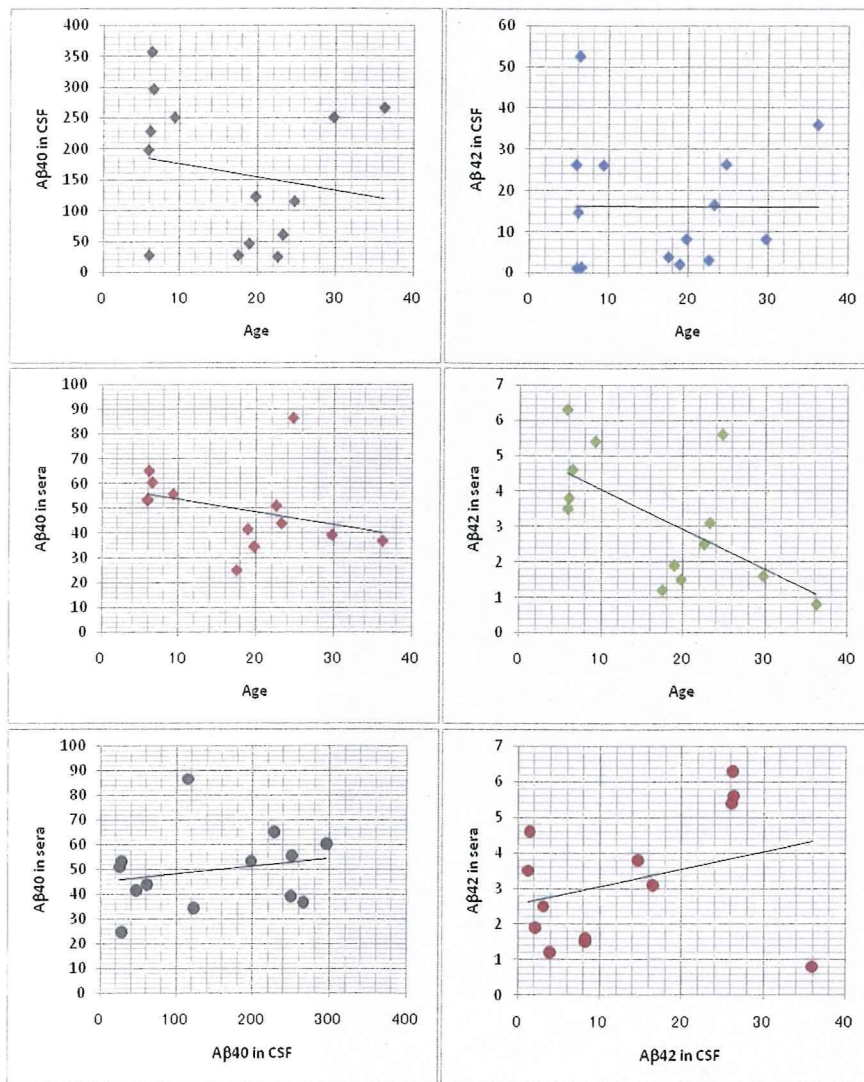




図2 カニクイザルに形成された NFT

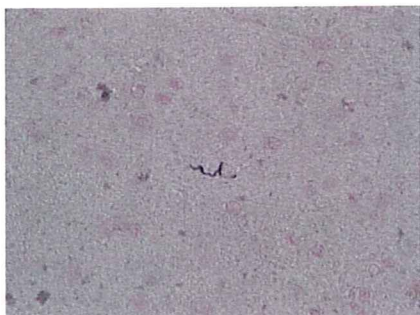
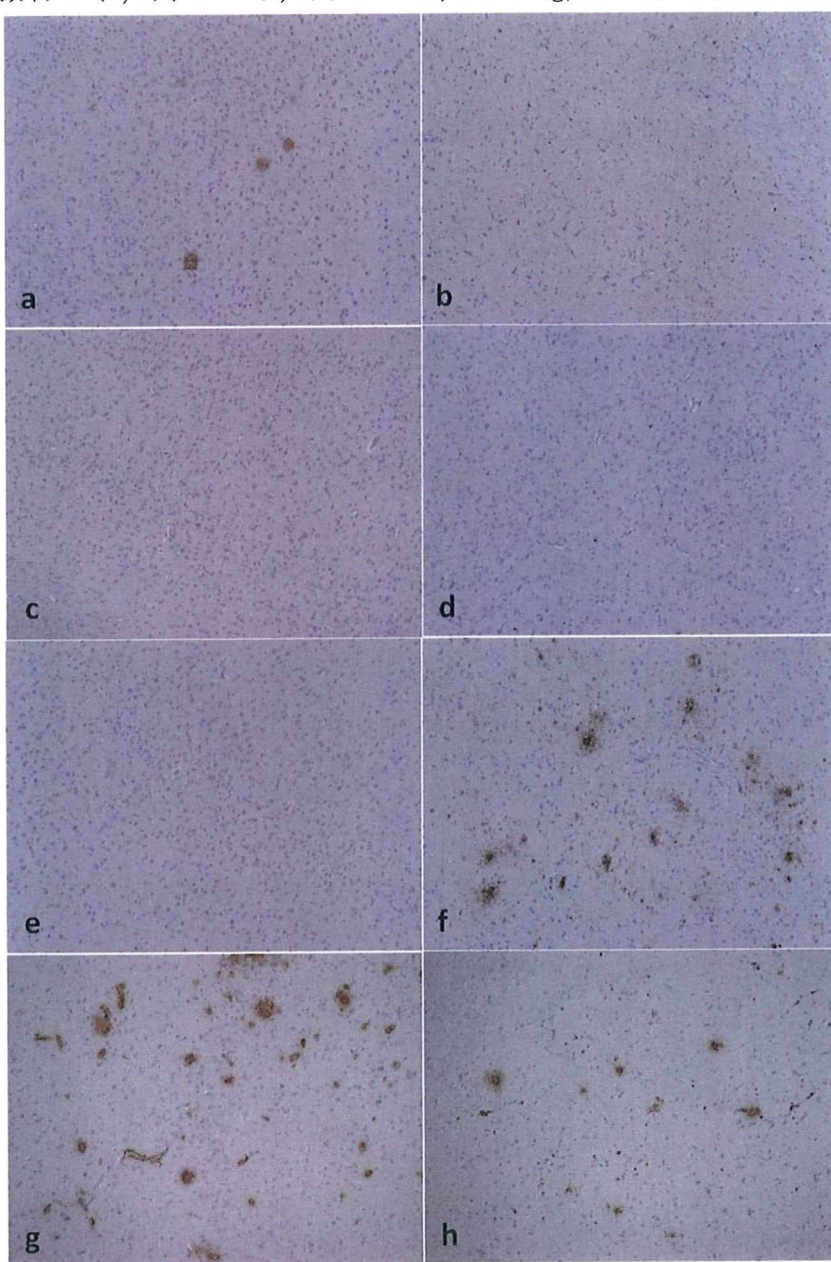


図3 ワクチン接種動物の A $\beta$ による免疫染色。新皮質 (a, c, e, g) と被殻 (b, d, f, h) が動物 1 (a, b)、2 (c, d)、3 (e, f)、4 (g, h) で、年齢順で動物 4 が最も高齢。



血管性認知症のワクチン開発

国立長寿医療センター研究所 血管性認知症研究部 室長 脇田英明

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

血管性認知症の原因病変は多様であるが、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。

B. 研究方法

霊長類血管性認知症モデル動物の開発にはカニクイザルを用いた。マイクロビーズを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、記憶機能と病理像を検討した。一側内頸動脈あたり330個(両側で合計660個)、660個(両側合計1320個)、1400個(両側合計2800個)、2250個(両側合計4500個)、2800個(両側合計5600個)のマイクロビーズを1か月間隔で2回投与するモデル動物を各1頭ずつ作製し、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、モデル動物作製のための至適投与量を検討した。対照群として2頭の動物にマイクロビーズの代わりに生理食塩水の投与を行った。各動物のデータから決定された至適条件(一側内頸動脈あたり2250個の直径50 $\mu$ mマイクロビーズを1か月間隔で2回、それぞれ両側内頸動脈に投与する。)で、さらに2頭モデル動物を追加作製し、MRI画像病変、記憶機能検査(食物回収試験)の変化の再現性を確認した。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、MRI画像で、2250個投与群と2800個投与群にて、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認められたが、対照群では病変や脳萎縮は認められなかった。このMRI画像変化を示す動物の記憶機能では、食物回収試験による評価で、2250個以上のマイクロビーズの投与量において、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。しかし、2800個投与群では、急性期に意識障害や摂食障害が合併し、脳浮腫の治療や輸液による栄養補給を必要とし、薬物治療の評価には2250個投与群が最適と考えられた。病理検討にてMRI上の病変が微小脳梗塞であることを確認し、慢性期病変部においても炎症反応を認めた。以上の成果より、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。また、2頭の追加実験から、MRI病変や記憶機能障害は、全てに共通した変化であることが確認され、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、この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

血管性認知症のワクチン開発

三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学 教授 富本秀和

研究要旨

カニクイザルの両側内頸動脈にマイクロビーズを注入し、頭部MRIの経時的観察を行った。脳梗塞の恒常的作成には一側で2250個が必要であり、梗塞巣は血管の境界領域に分布した。これらの病巣は10週間後には退縮したが、脳萎縮を残した。この霊長類血管性認知症モデルを用いて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、今後のデータの蓄積が必要と考えられた。

A. 研究目的

血管性認知症は本邦に多く、人口の高齢化とともに患者数は増加傾向にある。また、早期から歩行障害や偽性球麻痺を呈するため寝たきりになりやすく、医療施策面からも早急な対策が求められている。治療としては、血管因子の管理や抗血小板療法などが一般的であるが、現状では症状の進行抑制は困難であり、新規治療法の開発が急務である。

本分担研究者は平成22年度2月まで研究協力者(眞木崇州、京都大学・大学院)と共同して、Magnetic resonance imaging (MRI)でサル脳の虚血病巣を解析し、霊長類血管性認知症モデル動物を確立することを目的とした。この結果、多発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。

B. 研究方法

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行った。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。

全身麻酔を施したカニクイザルを、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。ガイディングカテーテルを総頸動脈に留置し、その中のマイクロカテーテルを通して先端を内頸動脈サイフォン部の手前に置き、滅菌された50 micronのマイクロビーズを投与した。注入は1か月間隔で注入側を変えて2回行った。

各動物について、処置前、1目のマイクロビーズ注入3時間後、10日後、1ヶ月後、2回目マイクロビーズ注入3時間後、10日後、1ヶ月後にMRIを撮影した。その後、脳を固定後取り出し、MRIで認められた虚血病巣を病理学的検討に確認した。作成した



動物は以下の如くである。

- # 1 : 一側330 (計660)
- # 2 : 一側660 (計1320)
- # 3 : 一側1400 (計2800)
- # 4 : 一側2250 (計4500)
- # 5 : 一側2800 (計5600)
- # 6 : 生理食塩水 (偽手術)
- # 7 : 生理食塩水 (偽手術)
- # 9、# 11 : 一側2250 (計4500)
- # 12—15 : 一側2250 (計4500) +E selectin 皮下注射 (マイクロビーズ投与直後にそれぞれ400 µg)

### 結果

偽手術群 (# 6、7) ではいずれの撮像時点でもT2高輝度病変、脳萎縮を認めなかった。

手術群ではマイクロビーズの数に相関して微小梗塞、微小出血が急性期から境界領域を中心に観察され、慢性期に脳萎縮を認めた。# 1—3ではMRI画像での梗塞巣の検出は不十分であった。いっぽう、2250個以上を注入した# 4、5、9、11では大脳半球に多発脳梗塞を恒常的に認めた。しかし、2800個を注入した# 5では意識レベルの低下、摂食障害を伴い、脳浮腫治療薬の投与が必要であった。以上の結果より、至適注入量は2250個と考えられ、その# 9、11の結果は以下のごとくであった。

【# 9】初回手術後10日後、右優位に前大脳動脈 (ACA) / 中大脳動脈 (MCA) 境界領域、前頭皮質、半卵円中心、放線冠で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、脳萎縮がその後も進行した。T1低輝度域は2.5ヶ月の時点でも残存した。T2\*低輝度の微小病変は、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 (図1)。

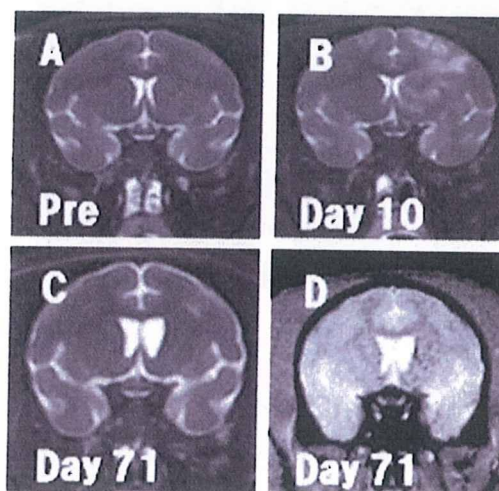


図1 : 頭部MRI T2強調画像 (A-C)、ADC画像 (D)

【# 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、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したが、左ACA/MCA境界領域のT2高輝度、T1低輝度域は2.5ヶ月の時点でも残存した。2.5ヶ月後に脳萎縮を認めたが、# 9と比較するとごく軽度であった。T2\*低輝度の微小病変は、初回手術後10日から1ヶ月まで左ACA/MCA境界領域に認めたが、1.5ヶ月の時点では消失した (図2)。

抗原蛋白 (E-selectin) をアジュバントとともに、1 か月間隔で2回、皮下に投与

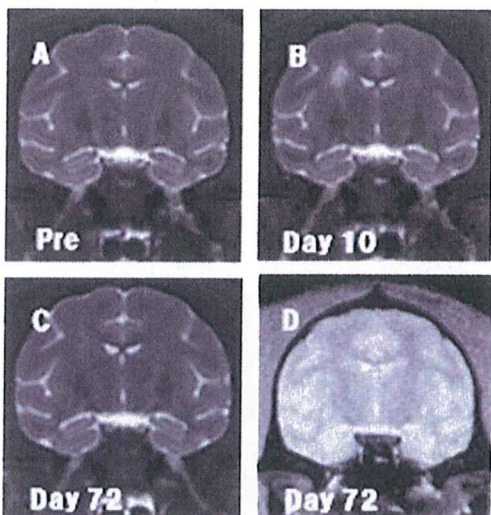


図2：頭部MRI T2強調画像 (A-C)、ADC画像 (D)

して免疫するワクチン療法が、血中抗E-selectin 抗体を3か月間維持できることを確認した。#12-15ではワクチンの投与を行ったが、2頭が1回目のビーズ投与後の脳梗で、1頭が腎機能障害で死亡した。生存した動物 (#14) では明らかな梗塞巣の縮小を認めなかった。

## 考察

本研究では一側2250 (計4500) のマイクロビーズ投与・非治療群 (n=3) において、急性期から広汎かつ高度な微小梗塞、微小出血が血管境界領域を中心に脳皮質、穿通枝領域などに観察された。微小梗塞、微小出血は慢性期には目立たなくなるが、脳萎縮を進行性に認めた。以上の変化は再現性があり、病理・行動評価の結果と併せて判断する必要があるものの、霊長類の血管

性認知症モデルとしての可能性を示すものであった。

境界領域梗塞は、1) ACA、MCA、PCA (posterior cerebral artery) の境界領域に生じるcortical watershed (CWS) infarcts、2) MCAの深部穿通枝と浅在性穿通枝 (髄質動脈) の間、またはMCAとACAの浅在性穿通枝の間に生じるinternal watershed (IWS) infarctsに分類される。

近年、境界領域梗塞の発生機序として従来の血行動態性のみではなく、塞栓性機序の関与が剖検脳の組織学的検討から指摘されている。本研究では、50 micronのマイクロビーズ投与により、ACA/MCA境界領域、半卵円中心、放線冠などCWS、IWS領域のいずれにも梗塞巣を認めた。霊長類で塞栓性機序による境界領域梗塞を直接証明した報告はなく、この点においても意義深いと考えられた。

## 研究発表

### 論文発表

1. Fujita Y, Lin Jin-Xi, Takahashi R, Tomimoto H. Cilostazol alleviates cerebral small vessel changes and white matter lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Brain Research, Brain Res* 1203: 170-176, 2008
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. Okamoto Y, Ihara M, Tomimoto H. Silent ischemic infarcts are associated with hemorrhage burden in cerebral amyloid angiopathy. Neurology, 74: 93, 2010
6. 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, in press

学会発表

なし

知的所有権の取得状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

研究協力者

眞木崇州（京都大学脳統御医学系脳病態生  
理学講座 大学院生）

## Immunization Therapy for Alzheimer Disease: A Comprehensive Review of Active Immunization Strategies

Takeshi Tabira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Diagnosis, Prevention and Treatment of Dementia, Graduate School of Juntendo University, Tokyo, Japan

Based on the amyloid cascade hypothesis, various strategies targeting amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) have been invented for prevention and treatment of Alzheimer disease (AD). Active and passive immunizations with  $A\beta$  and  $A\beta$  antibodies successfully reduced AD pathology and improved cognitive functions in an AD mouse model. However, active immunization with AN-1792, a mixture of  $A\beta$ 1-42 peptide and adjuvant QS21 induced autoimmune encephalitis in humans. Surprisingly, although AN-1792 cleared senile plaque amyloid, it showed no benefit in humans. It is speculated that AN-1792 failed in deleting more toxic forms of  $A\beta$  such as oligomers and intracellular  $A\beta$ , suggesting that newly developing vaccines should delete these toxic molecules. Since T cell epitopes exist mainly in the C-terminal portion of  $A\beta$ , vaccines using shorter N-terminal peptides are under development. In addition, since T helper 1 (Th1) immune responses activate encephalitogenic T cells and induce continuous inflammation in the central nervous system, vaccines inducing Th2 immune responses seem to be more promising. These are N-terminal short  $A\beta$  peptides with Th2 adjuvant or Th2-stimulating molecules, DNA vaccines, recombinant viral vector vaccines, recombinant vegetables and others. Improvement of vaccines will be also achieved by the administration method, because Th2 immune responses are mainly induced by mucosal or trans-cutaneous immunizations. Here I review recent progress in active immunization strategies for AD.

**Keywords:** Alzheimer/vaccine/immunotherapy/autoimmune/T helper 1/T helper 2

Tohoku J. Exp. Med., 2010, 220 (2), 95-106. © 2010 Tohoku University Medical Press

The elderly population defined as 65 years old or older is now a little over 22% of the whole population in Japan (from the report of Ministry of Health, Welfare and Labor, Japan), and a recent report says that 11% of the elderly people suffer from dementia (Wada-Isoe et al. 2009). A variety of diseases cause dementia in the elderly, and approximately 55% of dementia patients are caused by Alzheimer disease (AD) including mixed types (Matsui et al. 2009). The quality of life of AD patients has been slightly but significantly improved by the use of Donepezil<sup>®</sup> and other acetylcholine esterase inhibitors or Memantin<sup>®</sup>, an antagonist of NMDA receptor, we are far from prevention and cure of this devastating disease.

Neuropathological findings of AD are characterized macroscopically by diffuse brain atrophy, and microscopically by senile plaques (SPs), neurofibrillary tangles (NFTs) and neuronal loss in the brain. SPs are formed initially by extracellular deposits of  $\beta$  amyloid, and at a later stage SPs are accompanied by microglia and astrocyte responses with inflammatory and neuritic changes.  $\beta$  amyloid is a glycosylated fibrillar protein mainly composed of aggregated am-

ylod  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) which derives from amyloid precursor protein (APP). A large body of knowledge regarding to the pathological mechanism established the amyloid cascade hypothesis (Hardy and Selkoe, 2002), which is illustrated in Fig. 1. Based on the hypothesis, novel preventive and therapeutic strategies targeting the amyloid cascade are being established. Among, immuno-therapies targeting  $A\beta$  are expected to be highly promising (Weiner and Frenkel, 2006). Here I review active immunization (vaccination) strategies for prevention and treatment of AD.

### Amyloid $\beta$ is a key molecule in the pathological mechanism of AD

$\beta$  amyloid is composed mainly of aggregated  $A\beta$  which derives from its precursor protein APP by the cleavage with  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase.  $A\beta$  is a small peptide composed mainly of 40 amino acids,  $A\beta$ 40 and 42 amino acids,  $A\beta$ 42. The latter has additional two hydrophobic amino acids in its carboxyl terminal, and thus it is easily aggregated.

SPs are seen in non-demented elderly, otherwise SPs

Received November 30, 2009; revision accepted for publication January 7, 2010. doi:10.1620/tjem.220.95

Correspondence: Takeshi Tabira, M.D., Ph.D., Department of Diagnosis, Prevention, and Treatment of Dementia, 2<sup>nd</sup> Yaguchi Bldg,

2-11-5 Hongo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan.

e-mail: spfe6he9@mild.ocn.ne.jp

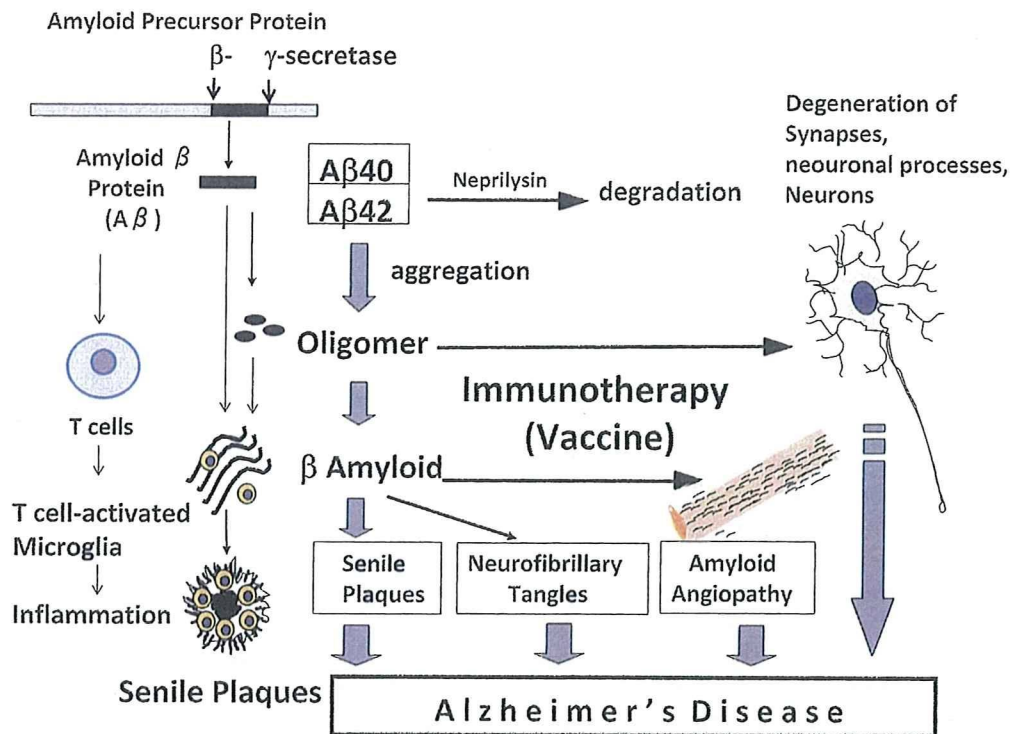


Fig. 1. Alzheimer Disease and Amyloid Cascade.

A large body of knowledge supports the amyloid cascade hypothesis, which is illustrated in this figure.  $A\beta$  is cleaved out from amyloid precursor protein by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase. In the brain of younger people,  $A\beta$  is quickly degraded by degrading enzymes such as neprilysin or deleted by certain clearance mechanisms. In the brain of the elderly or in the environment inducing Alzheimer disease (AD),  $A\beta$  starts to aggregate and forms oligomers which are toxic enough to injure synapses, neuronal processes and neurons. Further aggregated  $A\beta$  forms amyloid fibrils which are deposited in the brain parenchyma as senile plaques, where microglia are activated and inflammation is induced. The amyloid cascade triggers neurofibrillary tangle formation in neurons by unknown mechanisms. Amyloid is also deposited in the vessel wall and induces vascular pathology. Thus, intervention of the amyloid cascade is thought to be beneficial in prevention or cure in AD. Immunotherapy ( $A\beta$  vaccine) is expected as one of the most feasible and promising way of intervention of the cascade.

are specific for AD in dementing disorders. Although  $A\beta$  monomer is not toxic, aggregated forms, particularly oligomers are toxic to synapses and neurons (Noguchi et al. 2009). Thus, it is widely accepted that AD is one of so called conformational diseases. NFTs are mainly composed of phosphorylated tau and deposited in neural processes and neurons. It is speculated that NFTs contribute partly to degeneration of neurons and neuronal processes (Gómez-Isla et al. 1997). However, amyloid deposition appears about 10 years prior to NFT formation in human brains (Wisniewski et al. 1985). Injection of  $A\beta$  into the brain of APP transgenic (tg) mice (Götz et al. 2001) and APP tg  $\times$  Tau tg mice shows acceleration of phosphorylated tau deposition (Ribé et al. 2005).

Thus, tau pathology exists in the downstream of  $A\beta$ . Moreover, mutations of familial AD genes such as APP, presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) enhance amyloid formation by enhancing production of total  $A\beta$  or  $A\beta_{42}$ . Genetic risk factor gene apolipoprotein E (ApoE)  $\epsilon_4$  also enhances amyloid formation. Thus, all these findings suggest that  $A\beta$  has the central role in the pathological mechanism of AD (Tabira, 2004). Indeed, reduction of  $A\beta$  pathology by vaccination induced reduction of tau pathology

(Wilcock et al. 2009).

### Invention of vaccination therapy for AD

The vaccination therapy for AD was invented by Dale Schenk and his colleagues in 1999. They immunized young APP tg mice with  $A\beta$  with adjuvant and found that amyloid deposits were significantly reduced in the immunized mice when examined at a later time. They also found that immunization of APP tg mice with  $A\beta$  at the age when amyloid deposits had started in the brain reduced amyloid plaques and prevented further amyloid deposition (Schenk et al. 1999). The similar effect was obtained by injection of certain monoclonal and polyclonal antibodies to  $A\beta$  (passive immunization), and immunized mice showed improvement of cognitive functions (Bard et al. 2000; Janus et al. 2000; Morgan et al. 2000).

### Clinical trial of $A\beta$ vaccination in AD patients

The phase I clinical trial of AN-1792 vaccine composed of synthetic  $A\beta_{1-42}$  and adjuvant QS21 was started in April, 2000 using moderately severe AD patients in UK. Since it was found safe, the phase IIa clinical trial was started in September, 2001 using mild to moderate AD in

Europe and USA. However, 6% of the patients developed subacute meningoencephalitis after one to three intramuscular injections of the vaccine, the trial was halted in February 2002 (Orgogozo et al. 2003). It is speculated that appearance of the adverse effect is due to an addition of Polysorbate-80, a detergent to enhance exposure of the antigenic epitope in the phase II study.

### Subacute meningoencephalitis induced by AN-1792

Patients who developed subacute meningoencephalitis after injection of AN-1792 vaccine showed slight to moderate increase of lymphocytes and total protein in the cerebrospinal fluid, but no specific pathogens were identified. MRI scans showed diffuse and multifocal high intensity lesions in the white matter, gray matter and meninges in T2 weighted and FLAIR images. This condition mimics so called post-vaccinal or post-infectious encephalitis.

$A\beta$  is a self antigen, and most of self-reactive T cells are deleted in the thymus during an embryonic developmental period. However, T cells reactive to  $A\beta$  are not the case, and they exist in peripheral blood under the control of regulatory T cells in humans. The frequency of  $A\beta$ -reactive T cells in the peripheral blood is higher in the elderly than the youth, and it is slightly more in AD patients (Monsonogo et al. 2003). Immunization of wild type mice with  $A\beta$  and Freund complete adjuvant (CFA) hardly induced encephalitis in mice and rats, because most of the tested animals were tolerant to  $A\beta$ . However, immunization of T helper 1 (Th1)-prone APP tg mice crossed with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tg mice could reproduce similar encephalitis (Monsonogo et al. 2006). Thus, the meningoencephalitis induced by AN-1792 is probably mediated by an autoimmune mechanism. This is compatible with that QS21 is an adjuvant that strongly activates Th1 T cells.

### Autopsy cases who had received AN-1792 vaccine

Although AN-1792 trial was halted, it gave us extremely important information. It was our surprise to see that an autopsy case who had received a total 5 immunizations of AN-1792 and died of pulmonary embolism 1 year after the last immunization showed reduced numbers of SPs and infiltration of phagocytes containing  $\beta$  amyloid, suggesting that  $A\beta$  immunization cleared amyloid deposits in the patient (Nicoll et al. 2003). It is also of interest to note that plaque-associated dystrophic neurites containing phosphorylated tau also disappeared. However, intra-neuronal NFTs and vascular amyloid were not cleared. Since the patient had developed meningoencephalitis, the brain showed remnant inflammatory foci where CD4+ T cells were infiltrated.

Similar autopsy cases were also reported by others (Ferrer et al. 2004; Masliah et al. 2005). The case reported by Masliah et al. did not have encephalitis, suggesting that amyloid plaques can be cleared in the absence of encephalitis. However, none of the cases showed improvement of cognitive functions in spite of significant plaque clearance.

### Clinical course of vaccinated patients

Although the trial was halted, the clinical follow-up was continued. Hock et al. at University of Zurich reported results of one year follow-up after the cessation of the phase II trial (Hock et al. 2003). The patients who had developed antibodies reactive to SPs showed significantly slower decline of cognitive functions assessed by mini-mental state examination (MMSE) and disability assessment scale of dementia (DAD) than those who did not have developed such antibodies. The antibodies were designated as tissue amyloid plaque immuno-reactive (TAPIR) antibodies, which were examined immuno-histochemically by staining of AD brain using patients' sera.

Gilman et al. reported a follow-up study of all patients who joined the AN-1792 trial (Gilman et al. 2005). Antibody responders who had developed high titers of antibodies examined by enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) showed slight but significant better scores in a certain memory functions of the neuropsychological test battery (NTB), but there was no difference in MMSE and Alzheimer disease assessment scale (ADAS-cog), and the responders showed a significant reduction in CSF tau levels. The responders were only 20% of patients who received AN-1792 vaccine. This is because the vaccine was given only 1 to three times, and immune functions are deteriorated in the elderly. Vellas et al. also reported that antibody responders tended to show significantly better scores in DAD ( $p = 0.015$ ) in their 4.7-year follow-up study in France (Vellas et al. 2009).

Recently, results of a 6-year follow-up study were reported from UK (Holmes et al. 2008). Although the trial was started with 80 cases, only 26 cases (20 vaccine, 6 placebo) agreed and completed the follow-up study. Therefore, we must be careful in interpretation of the results, but there was no difference in the rate and time course of becoming severe AD (MMSE scores below 10) and the survival rate between vaccine and placebo groups. Autopsy was done in 9 patients during the follow-up period and 8 cases were diagnosed as AD. Six of the 8 cases showed moderate or outstanding clearance of SPs, yet all became severe AD and their MMSE scores were 0 before death. Thus, it is definitely clear that SPs have little or no contribution to cognitive dysfunctions in AD. It is highly possible that AN-1792 cleared SP amyloid, but might not have cleared toxic  $A\beta$  oligomers or intracellular  $A\beta$  (Tabira et al. 2002). It might be also said that  $A\beta$  vaccine may be too late, once a progressive mechanism has started in AD. Further, we must consider that AN-1792 activated  $A\beta$ -reactive Th1 T cells. As some patients developed autoimmune encephalitis by activation of  $A\beta$ -reactive Th1 T cells, it is highly probable that  $A\beta$ -reactive Th1 T cells were continuously activated and entered into the brain for immune surveillance, where they contributed to continuous inflammatory processes in the central nervous system (CNS) tissues.



### Development of future A $\beta$ vaccines

From above findings, A $\beta$  vaccines of the next generation require following conditions.

- It should not induce autoimmune encephalitis, in other words, vaccines activate Th2 T cells rather than Th1 T cells.
- It is useful for prevention, if given at an early stage.
- It modifies the disease course and hopefully improves cognitive functions, if given after the disease progression mechanism has started.
- It is efficient in the elderly whose immune functions are deteriorated.
- It is not painful and has a good compliance.
- It is inexpensive.

It is now well known that Th1 T cells are activated by interleukin (IL)-12, produce pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and help cellular immunity. Th1 T cells are involved in the effector mechanism of autoimmune encephalitis. On the other hand, Th2 T cells are activated by IL-4, produce IL-4 and IL-10, and help humoral immunity. Th1 T cells and Th2 T cells regulate each other. Therefore, vaccines that activate Th2 T cells would help antibody production and suppress autoimmune encephalitis (Fig. 2). T helper cells also influence on the immunoglobulin (Ig) class switch. Th1 T cells enhance IgG2a antibodies, while Th2 T cells enhance IgG1 and IgG2b antibodies.

Here I summarize active immunization strategies for AD (Table 1 to 4) and briefly explain those.

### Peptide vaccines

*A short N-terminal A $\beta$  peptide with a non-encephalito-genic T cell epitope of carrier protein:* Since T cell epitopes exist in the C-terminal portion of A $\beta$  (A $\beta$ 16-30) in mice (Monsonogo et al. 2001) and humans (Monsonogo et al. 2003), N-terminal peptide of A $\beta$  is relatively safe. To get good antibody responses to a short N-terminal peptide of A $\beta$ , A $\beta$ 1-15 was conjugated with a T cell epitope of bovine serum albumin (BSAT) and injected in animals subcutaneously with CFA (Monsonogo et al. 2001).

It is possible to elicit better antibody responses if multiple antigenic peptides are used. To this end lysine cores are used; a two-lysine core has two arms and a three-lysine core has 4 arms. For instance, A $\beta$ 1-5 peptide was conjugated to the 3 arms of a three-lysine core and ovalbumin T cell epitope (OVAT) to the remaining arm, and injected intraperitoneally in mice with CFA (Bard et al. 2003).

To enhance Th2 immune responses, A $\beta$ 1-15 is conjugated to the 3 arms of a lysine core and pan HLA DR-binding peptide (PADRE) to the remaining arm, and injected subcutaneously in mice with Alum, a Th2 adjuvant (Agadjanyan et al. 2005). Alternatively, repeated subcutaneous injections of A $\beta$ 1-28 conjugated with Mannan elicited Th2 immune responses predominantly (Ghochikyan et al.

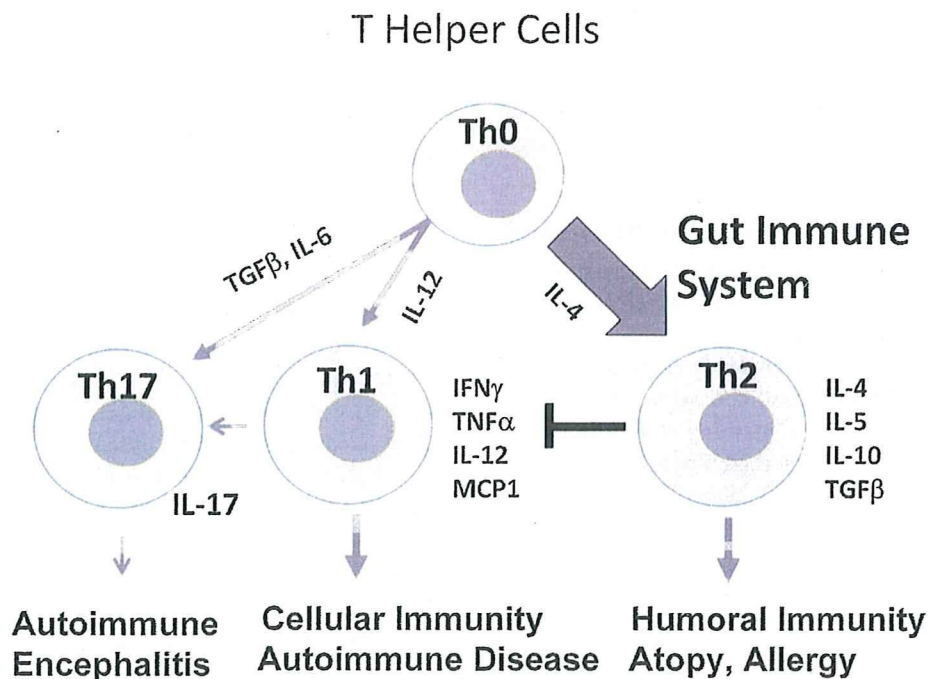


Fig. 2. Subtypes of T Helper Cells.

T helper (Th) cells are largely divided to Th1 and Th2 cells. Th1 cells are activated by interleukin (IL)-12, produce pro-inflammatory cytokines such as interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , and help cellular immunity. Th1 T cells *per se* become effector cells in certain autoimmune diseases. Recently, it is suggested that autoimmune encephalitis is mediated by Th17 cells in mice, but it is uncertain yet in humans. On the other hand, Th2 cells are activated by IL-4, produce cytokines such as IL-4 and IL-10, and help humoral immunity. Since the gut immune system is markedly shifted to Th2, Th2-type antibodies are easily elevated and Th1-mediated autoimmune encephalitis is suppressed, because Th1 and Th2 cells suppress each other.