

200935016A

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 陽

平成22（2010）年 5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 ワクチン療法の確立を目指して・・・4
松本 陽

II. 分担研究報告

1. A ベータ亜種、及びアミロイド原性脳内蛋白に対応する

非ウイルス性 DNA ワクチンの開発 松本 陽・・・・・・・・・・・・・・18

2. DNA ワクチンの作用機序に関する研究・・・・・・・・・・・・・・24

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・・・・・・・・・・28

蕨 陽子

4. DNA ワクチンの作製に関する研究・・・・・・・・・・・・・・30

神山邦子

5. アルツハイマー病に出現する神経原線維変化の超微形態的研究・・・37

加藤信介

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・41

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・46

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 沈着物の貪食が主体である事が明らかとなった。さらに、老齡サルを用いて、A β -DNA ワクチンの安全性と A β 削減効果を確認した。これらの知見に基づいて新型ワクチンを開発し、特許出願をするとともに、前 (非) 臨床試験を開始した。

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 加藤信介
国立大学法人 鳥取大学医学部
准教授

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

A. 研究の背景と目的
アルツハイマー病は 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。数年の経過を経て徐々に症状は進行し、発症後数年から十数年で寝たきりになり死に至る。経過中に被害妄

分担研究者 神山邦子
東京都神経科学総合研究所
研究員

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。

アルツハイマー病は、肉眼病的に高次機能をつかさどる前頭葉、前頭葉連合野や側頭葉、海馬領域の中等度から高度の脳萎縮によって特徴付けられ、大脳皮質や海馬の萎縮を反映して脳室は拡大する。顕微鏡レベルでは、老人斑、神経原線維変化(neurofibrillary tangle)、神経細胞脱落の3つの特徴がある。アミロイドの蓄積がタウや神経細胞の変化に先行することは多くの研究により報告され、非認知症老人やダウン症の剖検脳でも観察されている。近年、アミロイドの沈着がこの病態の最上流に位置しアミロイドの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、神経細胞の脱落などがある程度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た。

アミロイド仮説を基に、1999年 Schenkらによりアルツハイマー病の根治的治療法としてA β ペプチド・ワクチン療法が提唱された。彼らは、体外からA β ペプチドを免疫賦活剤と共に投与し、体内で抗A β 抗体の産生を誘導し、脳内のA β 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、脳内の病理学的所見のみならず学習記憶能力もワクチン投与により改善されることが明らかになり、欧米においてA β ワクチン(A β 1-42 アジュバンド)のヒト臨床試験が開始されることとなった。Elan社にて製造された合成A β 42製剤であるBetabloc (AN-1792)を用いた第I相試験(安全性

試験)では、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。この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A β 抗体が生体内で合成されたことが確認された。第I相試験に引き続きアメリカとヨーロッパの30の施設において軽度から中等度のアルツハイマー患者に対して第II相試験(2重盲検試験)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。ワクチンの免疫活性化作用によりTリンパ球などの組織障害性細胞性免疫が惹起され、一部の患者でA β に反応するTh1型CD4陽性細胞が脳に浸潤し、アレルギー性脳脊髄炎のような髄膜炎を引き起こしたのではないかと推察された。

臨床試験は不満足な結果に終わったものの、その後の検索によってワクチン治療が有益であるという重要な所見が示された。2003年、ワクチン投与を受けた患者の最初の剖検例が報告された。症例は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り、AN-1792 (pre-aggregated A β 42; 50 μ g)を5回投与された後、2001年5月から脳炎症状が出現した。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20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。しかしその一方、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A β 分解産物を貪食したミクログリアの像も認められ、この所見から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らは臨床試験の抗A β 抗体の抗体価と高次機能の改善について最終報告を行った。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)で有意の改善を認めた。これらの事実は、能動免疫療法により一部患者に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り、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唆している。

臨床治験後、脳炎を惹起しないようなワクチン薬剤を作ること为目标として薬剤開発が行われている。A β ペプチドはそのC(カルボキシル)末端側フラグメントが主としてTh1反応を誘導し、N(アミノ)末端側フラグメントがTh2反応を誘導することがわかっている。そこで、エラン社はA β のN末端側フラグメントをキャリア蛋白質に結合させたワクチンを開発し、このワクチンを用いた治験を開始している。その他、キャリア蛋白質を使用しないN末端フラグメントワクチンとしてA β 1-15ペプチド2本をリジン残基でつないだものが作られアルツハイマー病モデルマウスでその有効性が確認されている。Th1反応を起こしにくいとされる粘膜免疫反応を使って抗体産生を誘導するワクチンも開発されている。しかし、能

動免疫療法はアジュバントを必要とするために脳炎等の副作用を完全に克服することは、現時点で難しいと考えられる。

抗A β 抗体を直接体内に投与する受動免疫療法は、能動免疫療法に代わりうる方法であり、早い段階から能動免疫療法と並行して開発が進められている。末梢から抗A β 抗体を投与することにより、アミロイド斑の減少が認められており、さほど高濃度でなくとも脳内に入りアミロイド斑の減少効果があることがわかっている。最近の研究ではA β 蛋白のN末端が抗体認識部位として重要であることが示され、これは凝集したA β のN末端が突出し、抗体が認識しやすいからであると考えられている。受動免疫療法の最大の利点は免疫賦活剤を使用しないことであり、そのため能動免疫療法のヒト臨床試験で問題となった過剰な細胞免疫が誘発されにくい。既に欧米においてワイエス・エラン社のヒト化モノクローナル抗体(AAB-001)のヒト臨床試験が第III相試験まで進行している。

しかし受動免疫療法には、投与された抗A β 抗体はアミロイド斑のみならずアミロイドが沈着している血管にも結合して血管壁の脆弱化を促進し、出血をきたすことが報告されていること、投与された抗体に対して抗体が産生され(抗イディオタイプ抗体)複数回の投与により効果が現弱、ないしは消失する可能性があることなどクリアしなければならない課題も多い。更に、受動免疫療法は抗ヒト型抗体の製作費用が高いため、治療費が莫大な額になることが予想されており、それにより治療が不可能となるケースが出るであろうと考えられて

いる。

これらに代わるアルツハイマー病の新ワクチン治療として、開発されたのが DNA ワクチン療法である。DNA ワクチンは遺伝子を運ぶベクター（プラスミドやウイルス）に A β 蛋白を作らせる遺伝子を組み込んで投与し、ワクチンを取り込んだ細胞に A β 蛋白を作らせる。産生された A β は免疫系を刺激し、抗 A β 抗体を誘導する。DNA ワクチンは、投与後で長時間体内にとどまりコードされたペプチドを緩徐に作り続けるために過剰な免疫反応を避けることが可能で、単純な構造であるため簡単に改良することができる。更に、宿主に誘導される免疫反応は Th2 型であるという利点がある。

いくつかのグループから、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) などのウイルス性ベクターを用いてワクチンを開発した報告がなされた。Zhang らは AAV ワクチンを 1 回のみ投与することにより長期間抗 A β 抗体がアルツハイマーモデルマウスに誘導され、脳内の A β 沈着が減少し、記憶認知能力が改善することを報告した²²。更に Kim らはアデノウイルスベクターに組み込んだ GM-CSF 及び 11 tandem repeats of A β 1-6 を同時投与することにより高い抗体価がえられたことを報告した。しかしながら、アデノウイルスやアデノ随伴ウイルスは悪性腫瘍を誘発する可能性が完全に否定することができない。また、AAV ベクターを患者治療に用いる量までにスケールアップするのは非常に困難で、商業利用できるレベルではないことなどから、ウイルス性ベクターを用いた DNA ワクチンを臨床応用することは、現在のところ障害が大きい。

一方、非ウイルス性のプラスミドベクターを用いて DNA ワクチンを作製した報告も認められる。プラスミドベクターによる非ウイルス性 DNA ワクチンは低いコストにより大量生産が可能であり、ウイルス感染や形質転換の危険性がないなどの利点がある。Ghochikyan らは非ウイルス性プラスミドベクター中に A β 1-42 と Th-2 cytokine である IL-4 sequence を導入し wild type B6 マウスに抗 A β 抗体を誘導した。Schulz らは分泌シグナルである組織プラスミノーゲンアクチベーターの遺伝子を含む DNA ワクチンを低用量の A β 蛋白と同時投与することにより、アルツハイマーモデルマウスの脳内 A β の減少に成功した。しかし DNA ワクチン単独で脳内 A β の減少を誘導することはできなかった。

我々の研究室では、哺乳類細胞発現ベクターに A β -protein(1-42)及び付属のシークエンسを挿入して 3 種類の非ウイルス性 DNA ワクチンを製作した。(1) A β 1-42 のみを挿入したものの (K-A β ワクチン)、(2) 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)、(3) 分泌したタンパク質の安定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) の 3 種類である。3 種類のベクターを HEK293T 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 ペプチドが分泌されていた。A β 1-42 のみを挿入した K-A β ワクチンは A β 1-42 ペプチドの分泌がみとめられなかった。その後、K-A β

ワクチンは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ったので、詳細な検討から除外した。

作製した DNA ワクチンをアルツハイマー病のモデルマウス(APP23 Tg mouse)に2週間に1回投与することにより治療を試みた。このモデルマウスはスウェーデンの家族性アルツハイマー病家系にみられる遺伝子変異をもつアミロイド前駆蛋白が遺伝子導入されており、6ヶ月齢から老人斑が出現し、加齢と共に増加することがわかっている。ワクチン投与後、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。A β 沈着がまだ出現していない3-4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有意に減少していた。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免疫組織化学的に詳細に検索したがA β ペプチド・ワクチンを投与したときに見られるT細胞や炎症細胞の浸潤などの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。

アルツハイマー病は、数年から十数年の

経過でゆっくり進行する。このため、患者の治療を行う場合、長期に投与する必要性が高く、薬剤の安全性が強く求められる。能動免疫療法においては、脳炎などの過剰な免疫反応を惹起しないような薬剤を作製することが、今後のワクチン開発の課題になるであろう。また、受動免疫療法では、抗体投与後に脳出血が起こる可能性があること、抗イディオタイプ抗体が産生され複数回の投与により効果が現弱する可能性があること、治療費が莫大になることなどに注意する必要がある。

DNA ワクチンは、脳内の過剰な細胞免疫反応が誘導されにくく、能動免疫療法、受動免疫療法の欠点を克服できる可能性が高いが、遺伝子の導入に伴うベクターの安全性に留意する必要がある。遺伝子治療は、1990年に米国で先天性免疫不全であるADA欠損症の患者を対象にしてレトロウイルスベクターで実施されて以来、その有効性を拡大し、がん、HIVなどを対象に、世界で約4000例が行われ、治療として確立した感があった。しかし1999年にペンシルバニア大学のWilsonらにより実施されていた先天性代謝疾患(OTC欠損症)の臨床試験で、大量のアデノウイルスを肝動脈から全身投与した18歳の男性患者が肝臓障害で死亡する事故が起こり、遺伝子治療で初の死亡例と報告されて以来、安全性に対する見直しが行われている。その後、レトロウイルスベクターについても、フランスで1999年からX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対して実施された遺伝子治療の患者11人に関して、2002年から2003年にかけて3人に有害事象(白血病の発症)が報告され、X-SCIDの遺伝子治療

が一時凍結状態になった。さらに、非病原性で安全性が高いと考えられていた AAV ベクターに関しても、長期投与した場合の tumorigenicity が報告されている。また、マウスに肝細胞がんを引き起こすという報告も認められる³⁵。極めて確率は低いと考えられるものの、このような深刻な事態の出現は従来安全とされてきたウイルスベクター安全性に関して再度慎重な検討を行う必要性が出てきたことを示している。

これに対して、非ウイルス性ベクターは、特定の細胞に遺伝子を導入できないこと、導入効率が悪いことなどの欠点はあるものの、宿主細胞染色体への integration は 15 万回に 1 回程度で、自然突然変異とほぼ同程度の無視できる割合であり、安全性についてはほぼ確立されている。現時点ではアルツハイマー病の DNA ワクチン療法ベクターとして非ウイルス性プラスミドベクターが最善であると思われる。

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 づつ筋注した。

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。

サル治療実験では、DNA ワクチン(n=3)、および empty vector (n=3)を 16-18 歳齢の老齢アカゲザルに 6 ヶ月間 15 回筋肉注射した。治療前と治療中に経時採血し、血液学検査、及び一般状態の観察を行った。また、血漿中のサイトカイン・ケモカイン濃度を測定し、免疫学的影響を検討した。麻酔下に屠殺後、病理学的観察を行った。脳内小出血の有無を確認するため、ベルリンブルー染色と HE 染色を行った。アミロイド沈着は抗 A ベータ 1-17 抗体を用いた免疫染色を行い、定量解析した。

最近の研究から A ベータ・オリゴマーだけに神経毒性があるのではなく、翻訳後修飾を受けた A ベータやアミノ酸配列の異なるアミロイド原性脳蛋白も発症に関与している可能性が指摘されている。本研究ではアミロイド関連物質に幅広く対応する DNA ワクチンの開発を試みた。

(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、予備の実験で 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、活性化型に変化していた。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、 $A\beta$ 沈着が観察された。三次元解析をすることにより $A\beta$ 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、 $A\beta$ 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 $A\beta$ オリゴマーが減少していた。

活性化型ミクログリアの増加は、 $A\beta$ 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 $TNF-\alpha$ 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。

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。

さらに、ヒトに臨床応用の前段階として、15 歳から 18 歳の老齡アカゲザルに 6 ヶ月間にわたりワクチン投与を行い、その効果と安全性を検定した。ワクチン投与群の脳内のアミロイドベータ沈着は empty vector 投与群に比し、有意の減少を示した (1/2 程度)。試験期間中すべてのサルにおいて、一般状態の変化は見られず、臓器 (心臓・肝臓・腎臓・脾臓) に炎症等の病変は観察されなかった。小出血を示唆するヘモジデリン沈着は認められなかった。血液化学的検査では特記すべき変動が認められなかった。サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ)、及びケモカイン (MIP-1, MCP-1, RANTES, IL-10) の変化からも炎症反応を示唆する所見は認められなかった。1 頭に一過性の白血球増多が認められたが、サイトカイン及びケモカインに大きな変化がないことから、本ワクチン投与による副作用とは考えられなかった。

新規開発 DNA ワクチン (YM3711) は既存ワクチンに比し、A ベータ産生能は 5-6 倍、細胞外放出能は 3-4 倍上昇していた。YM3711 投与により誘導される抗 A ベータ抗体価は既存ワクチンより有意に高く、また抗体誘導の弱いモデルマウスでも野生型マウスと同程度の力価を示した。A ベータ亜種である A ベータ 3(pE)-42 やアミロイド原性脳内蛋白で

ある ABri 1(pE)-34、ADan 1(pE)-34 に対する抗体価でも YM3711 投与群が有意に高値を示した。A ベータ削減効果については現在検討中である。

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。

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。

また老齢サルを用いた治療実験からは、我々が作製した非ウイルス性 A β -DNA ワクチンは、マウスだけでなく大型動物であるサルにおいても有効性と安全性が示され、今後ヒトに対する臨床試験を行ううえでの有用な結果を得ることができた。

E. 結論

YM3711 ワクチンは A ベータ亜種やアミロイド原性脳蛋白など神経毒性を示す物質に幅広く対応することを目的として設計されたが、充分その作用を有しており、非臨床・臨床試験に耐えうると判断した。現在、非臨床試験が進行中である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tokita Y, Kaji K, Lu J, Okura Y, Kohyama K, Matsumoto Y (2010) Assessment of non-viral A β DNA vaccines on A β reduction and safety in rhesus monkeys, *J Alz Dis*, in press

Ahn M, Moon C, Jeong C, Matsumoto Y, Koh CS, Shin T. (2010) Upregulation of erythropoietin in rat peripheral nervous system with experimental autoimmune neuritis, *Brain Res*, in press

Nakamura, K., Guo, X., Harada, C., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Harada, T. (2010) Expression of NG2-positive cells during optic neuritis. *Jpn J Ophthalmol*, 54,100-102

Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K. (2009) Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C-protein-induced myocarditis

and subsequent dilated cardiomyopathy, *J Immunol*, 183, 4773-4781

Kim H, Moon C, Ahn M, Byun J, Lee Y, Kim MD, Matsumoto Y, Koh CS, Shin T. (2009) Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis *Brain Res*. 1304:155-63

Namekata K, Harada C, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matsumoto Y, Tanaka K., Harada T. (2009) Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. *Neuroscience Letters*, 465,160-164

Guo X, Harada C, Namekata K, Kikushima K, Mitamura Y, Yoshida H, Matsumoto Y, Harada T. (2009) Effect of geranylgeranylacetone on optic neuritis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett.*, 462, 281-285.

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

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

Matsumoto Y., Park, I., Hiraki, K., Ohtani, S., Kohyama, K. (2009) Role of pathogenic T cells and autoantibodies in relapse and progression of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in LEW.1AV1 rats, *Immunology*, 128, e250-261

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

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., Matsumoto, Y. (2008) DNA vaccine therapy for Alzheimer's disease: Present status and future direction, *Rejuven 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-Aβ vaccination as a promising therapy for Alzheimer's disease., *Curr Topics Neuroimmunol*, 139-145

松本陽 (2007) 多発性硬化症の実験モデル-自己免疫性脳脊髄炎での最近の知見-, *アニテックス*, 19, 4-11

Okura, Y., Matsumoto, Y. (2007) Anti-Aβ 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 Aβ 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

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., Immunohistochemical study of flotillin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis., *Brain Res*, 1114 (2006), 204-211

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, (2006), 489-495

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.

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

松本陽、大谷真、神山邦子、慢性自己免疫脳脊髄炎における MOG 分子立体構造を認識する自己抗体のバイオマーカーとしての役割, 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, (2010)

加地健太郎、神山邦子、松本陽、自己免疫性脳脊髄炎における Gene Plex を使用したサイトカイン・ケモカイン検索, 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, (2010)

神山邦子、加地健太郎、大谷真、吉田陽子、松本陽、IL-23 特異的 siRNA による遺伝子サイレンシングは自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を抑制する, 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, (2010)

神山邦子、松本陽、C 蛋白誘導ラット心筋炎・拡張型心筋症におけるマトリクスメタロプロテアーゼを主とした分子標的治療の展望, 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, (2010)

松本陽、神山邦子、加地健太郎、A ベータ亜種、及びアミロイド原性脳内蛋白に対応する非ウイルス性 DNA ワクチンの開発, 日本神経病理学会, 東京, (2010)

Matsumoto, Y., Tokita, Y., Kohyama, K., Okura, Y., Effects and safety of non-viral Aβ DNA vaccine therapy in aged rhesus monkeys, International Congress on Alzheimer's disease, Vienna, Austria, (2009)

松本陽、時田偉子、神山邦子、大倉良夫、老齡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 ワクチンの薬効と安全性試験, 第 21 回日本神経免疫学会学術集会, 大阪, (2009)

大谷真、平木啓子、神山邦子、松本陽、MOG 誘発自己免疫脳脊髄炎の重症化および慢性化における MOG 分子立体構造を認識する自己抗体の役割, 第 21 回日本神経免疫学会学術集会, 大阪, (2009)

神山邦子、松本陽、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) の発現局在及び機能解析, 第 21 回日本神経免疫学会学術集会, 大阪, (2009)

松本陽、時田偉子、神山邦子、大倉良夫、老齡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 ワクチンの薬効と安全性試験, 日本神経病理学会, 高松, (2009)

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

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)

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)

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 A β DEPOSITS BY MICROGLIA AS A MAJOR A β 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 A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease -Long-term effects and mechanisms of A β reduction-. , 27th Blankenese Conference, Hamburg, 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)

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)

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 regional 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 polyomyositis., 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)

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2009-075832

アルツハイマー病に対する DNA ワクチン、
平成 21 年 3 月 26 日出願。

国際出願日：2010 年 3 月 26 日

国際出願番号：PCT/JP2010/055308

出願人：東京都医学研究機構

発明者：松本 陽

発明の名称：アルツハイマー病に対する DNA
ワクチン

II. 分担研究報告

分担研究報告書

A ベータ亜種、及びアミロイド原性脳内蛋白に対応する 非ウイルス性 DNA ワクチンの開発

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

A ベータだけでなく、A ベータ亜種やアミロイド原性脳内蛋白に対して幅広く抗体を誘導する新型 DNA ワクチンを開発して、優先権出願と PCT 出願を行った。

A. 研究の目的

アルツハイマー病の病態の中心は凝集した A ベータと過リン酸化したタウ蛋白の沈着である。ただし、A ベータ沈着が先行し、かつ免疫療法によって A ベータが削減されるとタウ病変も軽減することから、A ベータ沈着が上流にあると考えられている (Abeta cascade hypothesis)。しかし、最近の研究から A ベータ・オリゴマーだけに神経毒性があるのではなく、翻訳後修飾を受けた A ベータやアミノ酸配列の異なるアミロイド原性脳蛋白も発症に関与している可能性が指摘されている。本研究ではアミロイド関連物質に幅広く対応する DNA ワクチンの開発を試みた。

B. 研究方法

新たに開発した DNA ワクチン(開発コード、YM3711)を用いて、in vitro、in vivo 検索を行い、その効果を既存のワクチンと比較した。in vitro 検索としては、培養細胞にトランスフェクション後、A ベータ産生能と細胞外放出能を検討した。in vivo 検索では DNA ワクチンをマウス、ウサギ、サルに投与して、抗体価の上昇と A ベータ削減効果を見た。抗体価は A ベータ 1-42、A ベータ 1-42 オリゴ、A ベータ 3(pE)-42、ABri1(pE)-34、ADan1(pE)-34 を抗原として特異抗体の力価を測定した。

(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. 結果

YM3711 は既存ワクチンに比し、A ベータ産生能は5-6倍、細胞外放出能は3-4倍上昇していた。YM3711 投与により誘導される抗A ベータ抗体価は既存ワクチンより有意に高く、また抗体誘導の弱いモデルマウスでも野生型マウスと同程度の力価を示した。A ベータ亜種であるA ベータ 3(pE)-42 やアミロイド原性脳内蛋白であるABri 1(pE)-34、ADan 1(pE)-34 に対する抗体価でも YM3711 投与群が有意に高値を示した。A ベータ削減効果については現在検討中である。

D. 考察

YM3711 ワクチンはA ベータ亜種やアミロイド原性脳蛋白など神経毒性を示す物質に幅広く対応することを目的として設計されたが、充分その作用を有しており、非臨床・臨

床試験に耐えうると判断した。

E. 結論

本研究で得られた結果は、今後ヒトに対する臨床試験を行う上での有用な情報を提供することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tokita Y, Kaji K, Lu J, Okura Y, Kohyama K, Matsumoto Y (2010) Assessment of non-viral A β DNA vaccines on A β reduction and safety in rhesus monkeys, *J Alz Dis*, in press

Ahn M, Moon C, Jeong C, Matsumoto Y, Koh CS, Shin T. (2010) Upregulation of erythropoietin in rat peripheral nervous system with experimental autoimmune neuritis, *Brain Res*, in press

Nakamura, K., Guo, X., Harada, C., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Harada, T. (2010) Expression of NG2-positive cells during optic neuritis. *Jpn J Ophthalmol*, 54,100-102

Matsumoto, Y., Park, I., Kohyama, K. (2009) Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C-protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy, *J Immunol*, 183, 4773-4781

Kim H, Moon C, Ahn M, Byun J, Lee Y, Kim MD, Matsumoto Y, Koh CS, Shin T. (2009) Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis *Brain Res*. 1304:155-63

Namekata K, Harada C, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matsumoto Y, Tanaka K., Harada T. (2009) Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. *Neuroscience Letters*, 465,160-164

Guo X, Harada C, Namekata K, Kikushima K, Mitamura Y, Yoshida H, Matsumoto Y, Harada T. (2009) Effect of geranylgeranylacetone on