

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, *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

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-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

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 Abeta 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 Abeta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease - Long-term effects and mechanisms of Abeta 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., A β 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 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)

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)

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

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 マウスに筋注射し、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
ログリアの食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食食能の変化を検索
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。アミロイドを食食したミ
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に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 ベータ沈着周囲に付着し、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

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

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

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

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

藤 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 メーター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)

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)

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)

G. 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

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思われる 3 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。これらの新型ワクチンの特許出願、PCT 出願を平成 22 年 3 月に完了した。

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 3 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 (及びスペーサー配列) 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。さらに、A ベータ配列の4回繰り返し構造を持つ新型ワクチン(YM3711, IgL-Abeta x 4-Fc-IL4) を作製し、その特性を解析した。

3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キング後、抗ヒト Aβ1-16 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、Aβ-X 配列は、培養上清、細胞ともに、Aβ1-42 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。Aβ1-42 単独(約 3.5 kDa) のバンドは検出されなかった。

一方、Aβ-Y 配列は、抗 Aβ 抗体により Aβ1-42 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、Aβ 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。

YM3711 は前 2 者と同程度の細胞外 Aβ 発現量を示したが、抗体誘導能はさらに数倍上昇していた。

D. 考察

今回開発した 3 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。特に効果の大きい YM3711 を用いて非臨床試験を行いつつある。

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

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

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

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

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

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、加地健太郎、A ベータ重種、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)

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、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)

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、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 ワクチン療法的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

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

分担研究報告書

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

分担研究者 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳病態医科学分野
准教授
加藤 信介

研究要旨

アルツハイマー (Alzheimer) 病で出現する海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体様嗜銀性封入体は、超微形態学的には Pick 病で出現する海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体とは異なり、Alzheimer 病で出現する神経原線維変化の一表現形であると判明した。

A. 研究目的

神経原線維(neurofibrillary tangle: NFT)は主としてアルツハイマー(Alzheimer)型痴呆(dementia of the Alzheimer type: DAT)見られる病理組織学的特徴の一つであり、DAT 以外に30歳以上のDown症候群、進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy: PSP)、amyloid angiopathy (AA)などにも特徴的な所見である。その出現部位は扁桃核、海馬及び大脳皮質の錐体細胞や、脳幹神経核、視床下部、basal forebrainの神経細胞などである。一方、海馬歯状回及び大脳皮質の顆粒神経細胞を始めとする小型神経細胞やPurkinje細胞、外側膝状体の神経細胞ではNFTは殆ど見られない。Pick病での海馬歯状回顆粒神経細胞は例外的で、Pick小体(Pick body)と称される胞体内嗜銀性封入体を形成する。しかしながら、海馬歯状回顆粒神経細胞にもAlzheimer病では嗜銀性封入体が出現してくることがある。本研究の目的は、海馬歯状回嗜銀性封入体に出現する嗜銀性封入体における超微形態的特徴を明らかにすることである。

B. 対象と研究方法

Alzheimer病5例、Pick病3例、Down症候群2例(33歳、35歳)、PSP1例、AA2例につき検討し、これらの疾患に出現する嗜銀性構造物の超微形態像を解析した。

ホルマリン固定パラフィン包埋5 μ m厚切片を用い、光顕的検索に供した。光顕的検索にはHE染色、Klüver-Barrera、Bielschowsky染色を施した。

電顕的検索はホルマリン固定のAlzheimer病、Pick病、Down症候群、AAなどの海馬と、PSPの青斑核について施行した。即ち摘出組織片を洗浄し、緩衝液加グルタルアルデヒド再固定を経て、四酸化オスミウムの後固定、エポン包埋後、超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施して電顕観察に供した。

C. 結果

Alzheimer病、Down症候群、AAにおける海馬錐体細胞のNFTは、Bielschowsky染色

で炎型をした嗜銀性封入体として認められた。電顕的には約 80 nm 間隔のくびれを持つ (paired helical filament: PHF) が束を成していることもあるが、約 15 nm 径の straight tubules (ST) の束のみからなっていて、これに PHF が少数混在する NFT も多数認められた。海馬歯状回顆粒細胞内嗜銀性封入体は 5 例の Alzheimer 病全例に、Bielschowsky 染色で認められた。しかし、Down 症候群、PSP、AA では認められなかった。形態的特徴として、海馬歯状回顆粒細胞内嗜銀性封入体は Pick 病で出現する Pick 小体様の胞体内球状封入体としてみられるものもあったが、核を取りまく形をとり、Pick 小体様に球状封入体という形をとらないものもみられた。光顕的に球状封入体として観察されたものは、電顕的にも他の細胞質部分より区画された球状構造を呈していたが、周囲との間には限界膜を認めなかった。封入体を構成しているものは線維状構造物とオスミウム好性の顆粒状構造物とである。線維状構造物は主として約 15 nm 径の ST が束を成している。所々に約 80 nm 間隔のくびれを有する PHF が混在していた。光顕的に核を取りまく形をとる perinuclear-type の嗜銀性封入体における電顕像は、主として約 15 nm 径の ST と少数の約 80 nm 間隔のくびれをもつ PHF と共に束を成して、核の周囲に存在していた。また、Alzheimer 病の海馬歯状回顆粒細胞内 NFT では、多くの NFT は、炎型の封入体として観察され、電顕的には約 80 nm 径間隔のくびれを有する PHF が主体と成っていた。炎型の NFT 以外に Pick 小体様の球状封入体の形をとる NFT が少数みられ、電顕的には主として約 15 nm 径の ST が束状に存在し、少数の約 80 nm 間隔のくびれを有する PHF を混じて、海馬歯状回顆粒細胞内封入体と同一構築であった。

Pick 病では、海馬歯状回細胞内に Pick 小体が 3 例全例とも同定できた。Pick 病での海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体は光顕的にはすべて胞体内球状封入体の形であり、Alzheimer 病にみられた核を取りまく形での perinuclear-type の NFT はなかった。電顕的には限界膜はないが、周囲より区別される封入体で、線維状構造物とオスミウム好性の顆粒状構造物より成っていた。繊維状構造物は約 15 nm 径の ST が束を成すことなく、無秩序に錯綜していた。極めて少数ではあるが、約 160 nm 間隔のくびれを有し、太い部位が約 30 nm、くびれ部分が約 15 nm で、PHF よりは太いねじれ

を有する線維状構造物もみられた。Pick 病では海馬錐体にも Pick 小体が 5 例全例とも出現していて、海馬錐体細胞内 Pick 小体についても、光顕及び電顕の特徴は海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体と同一であった。Pick 病での帯状回深部小型神経細胞内にも Bielschowsky 染色にて嗜銀性封入体が観察されたが、嗜銀性に関しては海馬歯状回顆粒細胞の嗜銀性よりは高くなかった。電顕的には周囲より区別される限界膜のない球状封入体で、線維状構造物と顆粒状構造物より成っていた。繊維状構造物は約 15 nm 径の ST と、極めて少数の約 160 nm 間隔のくびれを持ち、太い部位が約 30 nm、くびれ部分が約 15 nm の線維状構造物が混在する形で束を成さず、一定方向に配列していた。所によっては約 15 nm 径の ST が約 160 nm 間隔のくびれを有する線維へと移行する像もみられた。

Pick 病の帯状回での Pick 細胞の電顕像は、顆粒成分と線維成分とから成っていたが、神経細胞全体に約 10 nm 径の線維で短い側枝を有する neurofilament が、無秩序に錯綜していた。

PSP における青斑核 NFT は、Bielschowsky 染色で嗜銀性を示した。電顕的には約 15 nm 径の ST が束を成していたが、PHF の混入を認めなかった。

以上、各神経原線維における超微形態的特徴について表 1 に示した。

D. 考察

NFT は電顕的には PHF と ST とから成り、正常神経細胞にはみられない構造物である。

Alzheimer 病でみられた海馬歯状回顆粒神経細胞内 Pick 球様封入体は、光顕的には Pick 病でみられた海馬歯状回顆粒神経細胞内 Pick 小体とは共に嗜銀性を有し、区別出来ない。しかしながら、Alzheimer 病でみられた歯状回顆粒神経細胞内 NFT は確かに Pick 小体様封入体の形をとることもあるが、核を取りまく形で、限局性の封入体構造を作らない perinuclear-type の NFT のものも存在した。また、Alzheimer 病でも海馬錐体細胞内 NFT は炎型の NFT 以外に、少数ではあるが、Pick 小体様球状封入体構造を形成するものもみられた。一方、Pick 病では Pick 小体として海馬歯状回顆粒神経細胞内や海馬錐体神経細胞内に封入体を形成していたが、Alzheimer 病でみられる炎型の NFT の形はとらなかった。超微形態的には Alzheimer 病でみられる海馬歯状回顆粒細

胞内 Pick 小体様球状封入体は、主として約 15 nm 径の ST が束を成して存在する点で、海馬歯状回顆粒細胞の核を取りまく形の perinuclear-type の NFT や海馬錐体細胞内炎型 NFT と同一構築を有している。しかしながら、Pick 小体の超微形態像は、海馬歯状回顆粒細胞でも海馬錐体細胞内でも、ST の存在は束状でなく、無秩序配列であり、通常の PHF より太く、約 160 nm 間隔のくびれを持つ線維状構造物がみられる点で、Alzheimer 病でみられる海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体様嗜銀性球状封入体とは異なっている。即ち、Alzheimer 病でみられる海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体様嗜銀性球状封入体は神経原線維変化の一表現形

胞は、超微形態学的上、Pick 小体とは異なっている。このことは、Pick 細胞と Pick 小体とは相互に独立した神経病理学的変化であると考えられる。

E. 結論

Alzheimer 病で出現する海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体様嗜銀性封入体を解析したところ、超微形態学的には Pick 病で出現する海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体とは異なり、Alzheimer 病で出現する神経原線維変化の一表現形であることを明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

表 1 神経原線維の超微形態的特徴

海馬歯状回顆粒細胞内球状嗜銀性封入体	胞体から区別された球状封入体であり、主として約15 nm径の straight tubulus (ST)が束状に走行していた。約80 nm間隔のくびれをもつpaired helical filament (PHF)が少数混在していた。
神経原線維変化 (海馬錐体細胞)	約80 nm間隔のPHFが束状に配列し、これが主体を成し、約15 nm径のSTが混在することが大半であった。しかし、約15 nm径のSTが束状に走り、これが主体を成すことがあり、PHFは存在するが、必ずしも主体を成すとは限らないものも存在していた。
神経原線維変化 (青斑核 in PSP)	主として約15 nm径のSTが束を成して走行していた。
Pick小体 (海馬顆粒細胞、錐体細胞)	胞体から区別された封入体であり、主として約15 nm径のSTが無秩序に集簇していた。少数の約160 nm間隔のくびれをもつ線維状構造物が混在していた。
Pick小体 (帯状回顆粒細胞)	胞体から区別された封入体であり、主として約15 nm径のSTが束を成さず、一定方向に並行し、約160 nm間隔のくびれをもつ大型なPHF様線維状構造物が混在していた。STが大型なPHF様線維状構造物に移行する像もみられた。
Pick細胞	短い側枝をもつ約10 nm径のneurofilamentが細胞全体に均一に観察され、配列は無秩序であった。

と考えられる。また、海馬歯状回顆粒神経細胞は Alzheimer 病における NFT の発現を含めた病理学的変化に対して抵抗性があると一般に考えられているが、NFT 発現が高度な場合には、海馬歯状回顆粒神経細胞内にも NFT がしばしば生じるものと考えられる。

Pick 病において、帯状回深部小型神経細胞内 Pick 小体は超微形態的に ST が一定方向に並列する点で、海馬歯状回顆粒細胞内 Pick 小体とはやや異なっている。しかし、通常の PHF より太く、約 160 nm 間隔のくびれをもつ線維状構造物が両者に存在する点で、基本的には帯状回深部小型神経細胞内 Pick 小体と海馬歯状回顆粒神経細胞内 Pick 小体とは同一であると考えられる。一方、帯状回でみられた Pick 細

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S. Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68 (1): 37-47, 2009
- Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet* 18(5): 942-955, 2009
- Yoshihara D, Fujiwara N, Ookawara T, Kato S, Sakiyama H, Yokoe S, Eguchi H, Suzuki K.

Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. *Free Radical Biology & Medicine* 47(5): 559-567, 2009

2. 学会発表

- 1) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009
- 2) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009
- 3) 加藤信介, 加藤雅子, 平野朝雄, 青木正志, 糸山泰人, 大谷若菜, 船越 洋, 中村敏一: ALS マウスにおける肝・腎・心における一過性組織障害からの回復機構: HGF/活性型リン酸化 c-Met (phosphor-c-Met) システムの関与. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009
- 4) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009
- 5) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 深田 慶, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009
- 6) 山寺みさき, 隅 寿恵, 別宮豪一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎: 弧発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性グリア封入体. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009
- 7) 島田 (大谷) 若菜, 船越 洋, 加藤信介, 加藤雅子, 中村敏一: HGF のエンドクリン性供給は, 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでおこる肝臓病理学的変化からの回復に寄与する. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009
- 8) 松田一己, 加藤信介: 難治前頭葉てんかん手術例の摘出標本の病理学的検索からリポフスチン封入体を有する神経細胞が確認された皮質形成異常例の臨床・病理学的検討. 第 37 回臨床神経病理懇話会, 姫路, 11 月 7-8 日, 2009

H. 知的財産の出願・登録状況 なし