

植物性経口 A β ワクチンによる安全で安価な抗アルツハイマー病薬の開発

東海林幹夫

弘前大学大学院医学研究科 脳神経内科学

【研究の背景】

現在のアルツハイマー病 (AD) 研究の焦点は、新たに開発された病態修飾薬によって、常染色体優性遺伝性 AD (DIAN-trial unit; Mills et al., 2013) などの確実な治験対象コホートに抗 A β モノクローナル抗体による超早期予防介入することによって、軽度認知障害 (MCI) から AD dementia 発症の予防の検討に移っている。しかし、これらの抗体療法は極めて高価で副作用も高い。経口ワクチンは簡便で非侵襲的で安全なため理想的な免疫療法である。この方法は regulatory T cells を誘導して T-cell 反応を抑制し、免疫抑制性 cytokines を増加させるためより安全である。植物リコンビナントワクチンは安価に工場規模で産生可能で、トキシンや病原因子混入の可能性は細菌やイーストで作成したワクチンに比べると認められない。ポテトやトマト、緑色胡椒葉やコメで A β ワクチンが試みられているが効果は不明で、A β peptide による皮下投与追加免疫も必要である。また、免疫に十分な量の植物性 A β の生成も従来は困難であった。以上の植物性 A β ワクチンの有用性とこれまでに述べた多くの問題点を根本的に解決するため、我々は新たなリコンビナント A β 大豆を開発し、大豆中に A β 4-10 を発現するリコンビナント A β ワクチン (A β +) を 870 mg/g レベルで大量生成することに成功した。この A β 4-10 は T-cell 反応を惹起させない A β 配列で、大量に生成されるため A β peptide のブースター注射も必要とはされない (Maruyama N, Shoji M, J Biosci Bioeng 2014)。本研究では AD の根本的な治療のために安全・安価で効果のある A β ワクチンの開発を目的としている。

【目 的】

本研究では我々の開発した A β 4-10 の経口免疫の効果を標準的な AD モデルマウス TgCRND8 (Janus et al., 2000; Chishti et al., 2001) を用いて検証し、惹起された免疫機序、認知機能障害予防効果、APP から A β 生成過程への変化、A β oligomer 抑制効果、A β amyloidosis や tauopathy 改善効果、炎症や出血などの副作用や炎症を解明して、新たな戦略に基づいた病態修飾薬としての有用性を確立する。

【方 法】

A β 4-10 あるいは対照大豆蛋白 11S グロブリン A1aB1b サブユニット (A β -) 1mg を CRND8 マウスに 2 月齢から cholera toxin subunit B 10 μ g と共に週 1 回ゾンデで経口投与し、経口免疫を行い、14 ヶ月齢まで継続した。拡張 Morris 水迷路試験による空間学習障害抑制、腸管免疫成立機序の解析、A β 免疫染色、A β 42, A β 40 monomer の従来の ELISA による TBS, SDS, ギ酸抽出分画を用いて全脳の A β 蓄積量と A β 分子種を同定する。A β oligomer ELISA および A β oligomer 抗体による Western blot を用いた A β oligomer の定量、高分子 A β oligomer の測定、APP, CTF β -/ α -, sAPP β -/ α - の各分画の Western blot, ELISA による定量を 3 ヶ月齢から 14 ヶ月齢まで経時的におこなった。A β amyloid 沈着、二次性リン酸化 tau 蓄積、microgliosis, astrogliosis や炎症・出血反応などの副作用などの病理学的検索を行い、副作用の出現を病理学的に検索した。A β oligomer のシナプス障害における役割をシナプス関連蛋白の定量的解析でおこなった。拡張性 Morris 水迷路試験: 我々の CRND8 マウスの基礎的検討では 5 日間連続検査よりもさらに 10 日間連続検討の方が有意に異常を検出できるため、本研究では統計処理に十分な数のマウスで経口免疫による認知機能低下抑制効果を評価した。各月齢のマ

ウスで連続 10 日間の水迷路試験を毎月初めに行い、統計的な有意差を評価する。各群 10 匹以上で、遊泳距離、潜時による探索行動の検討を 14 ヶ月齢まで毎月連続しておこなった。腸管免疫成立の検証のために A β +経口免疫を行った CRND8 マウスの腸管リンパ節、脾臓、血液から得られた培養リンパ球に A β +抗原刺激を行い、上清に増加するサイトカイン種を測定した。A β +抗原、A β oligomer を抗原とした ELISA で CRND8 マウス血液中の産生された抗体力価を検討した。

【結 果】

組み換えダイズ蛋白 A β +による経口免疫では、凝集 A β と A β +に対する IgG 抗体が産生された。A β +投与マウス血清は、AD 脳の A β 蓄積を認識した。抗 A β +免疫は抗 A β oligomer 抗体を誘発し、A β +免疫は細胞性免疫を誘発した。A β +投与マウスの脾臓細胞は A β +投与で thymidine 取り込みを亢進し、A β +投与マウスの脾臓細胞は A β +投与で IL-2、IL-10、IL-12 の分泌亢進が見られた。拡張性 Morris 水迷路試験では、21 週目から A β +経口免疫マウスで有意なゴールまでの到達時間と距離の増加を抑制し、抑制効果は 57 週まで A β +経口免疫マウスで認められた。対照の A β -マウス群では空間学習能力の有意な低下が 21 週から最終の 57 週まで認められた。したがって、脳アミロイドモデルマウスの spatial reference memory の低下の予防が可能であった。A β +投与マウス脳では A β -投与マウス脳に比べて A β 40、A β 42 は変化がなかったが、TBS 可溶性分画の A β oligomer が減少した。TgCRND8 脳の TBS、2%SDS、70%ギ酸による連続抽出では、さまざまな可溶性とタイプの A β および A β oligomer 種が抽出された。A β N 末抗体 82E1 による A β +経口免疫マウス脳の western blot 解析では、A β +免疫は TBS 可溶性 A β monomer を減少させ、高分子量の A β oligomer を増加させた。TBS 分画中の A β oligomer は SDS western blot では容易に脱重合されるため、ELISA による可溶性 A β oligomer 減少は Western blot の A β monomer の減少に関連すると考えられた。A β +免疫で SDS 分画の高分子量 A β oligomer は 23 月例から増加し、59 週の A β +免疫マウス脳のギ酸分画の Mass Spectrometry 解析では、N 末の processing の少ない A β が蓄積していた。A β +免疫は組織学的に脳 A β アミロイドを減少させ、主に diffuse plaque を減少させた。A β +免疫は APP の processing に影響せず、APP と C 末 fragment、分泌型 APP 定量では変化が見られなかった。A β +免疫は microglia 発現を減少させ、髄膜脳炎や出血は認めなかった。

【考 察】

A β +内の A β 4-10 構造を認識する IgG 抗体が産生され、A β oligomer 除去への関与が考えられた。細胞性免疫では抗炎症作用をもつ IL-10 の産生増加が主であり、Th1 介在細胞免疫の抑制が考えられた。学習障害の悪化は 21 週から最終の 51 週にわたって抑制され、認知機能低下の予防効果が示された。可溶性 A β oligomer の減少と不溶性の高分子量 A β の増加から、可溶性 A β が不溶性分画へ隔離された可能性がある。脳 A β の減少は不溶性の core plaque よりも非線維性の diffuse plaque に主に認められ、A β の不溶性分画への隔離を支持する所見であった。A β +経口免疫は安全で有効な AD の疾患修飾療法になりうると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

以上の基礎的検討で A β +ワクチンの有効性と安全性が検証された。今後は、日本発の新たな AD 病態修飾薬の開発と臨床応用を目指して病態修飾薬開発の手順に移行し、AD 予防の第 I 相臨床試験へ展開を考えている。

【参考・引用文献】

1. Nakamura T, Kawarabayashi T, Seino Y, Hirohata M, Nakahata N, Narita S, Itoh K, Nakaji S, Shoji M, Aging and APOE- ϵ 4 are determinative factors of plasma A β 42 levels. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 Sep 7;5(10):1184-1191
2. McLaurin J, et al. Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 2002 8, 1263-1269.

3. Maruyama N, et al., Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *J Biosci Bioeng* 2014 118, 441-447.
4. Janus C, et al., A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000 408, 979-982.
5. Chishti MA, et al., Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 2001 276, 21562-21570.