

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790154

研究課題名(和文)アルツハイマー型認知症に対する経皮ワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of transcutaneous immunization system for Alzheimer's disease

研究代表者

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：70615921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)に対する新たな治療法としてワクチン療法が注目されている。これまでにアミロイドペプチド(A β)を注射免疫する臨床試験が行われたが、A β 反応性Th1細胞の過剰な活性化に起因する重篤な副作用を誘発したために頓挫した。申請者は、経皮免疫はTh2反応を優位に誘導するという知見から、自己溶解型マイクロニードルを応用した経皮免疫療法の開発を試みた。ADモデルマウスに経皮免疫を行うと、抗A β IgG抗体の誘導が確認された。しかし認知機能の改善効果は弱く、誘導された免疫応答は注射免疫と同じくTh1優位であることが判明し、副作用抑制を達成するには、本法の改良の必要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Vaccine therapy for Alzheimer's disease (AD) based on the amyloid cascade hypothesis has recently attracted attention for treatment of AD. Injectable immunization of amyloid beta peptide (A β) as antigens showed therapeutic efficacy; therefore, a clinical trial was conducted. However, the clinical trial was stopped due to the incidence of meningoencephalitis caused by excess activation of Th1 cells infiltrating the brain as a serious adverse reaction. Because recent studies have suggested that transcutaneous immunization (TCI) is likely to elicit Th2-dominant immune responses, in this study, we investigated the vaccine efficacy of TCI against AD using a novel dissolving microneedle array (MicroHyal; MH). Our TCI induced anti-A β 1-42 immune responses by simple and low-invasive application of A β -containing MH to the skin. Unfortunately, this TCI resulted in little significant improvement in cognitive function and Th2-dominant immune responses, suggesting the need for further modification.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アルツハイマー型認知症 経皮ワクチン 自己溶解型マイクロニードル

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease; AD) に対する治療法は主に脳内シナプスの機能を亢進させるコリンエステラーゼ阻害剤が使用されている。しかしながら、これらは AD 症状を緩和させるだけの対症療法に過ぎず、AD 進行を抑制しうる治療法の確立が待望されている。近年、AD 病態分子メカニズムに関する基礎研究が進み、神経細胞上の 1 回膜貫通蛋白質であるアミロイド前駆蛋白質から切り出された 40 あるいは 42 アミノ酸からなるアミロイドβペプチド (Aβ1-40、Aβ1-42) が老化あるいは遺伝的要因から凝集する過程で Aβオリゴマーが生じ、それが神経毒性を発揮するというアミロイドカスケード仮説が提唱された。これより、Aβの凝集を抑制するアプローチが AD に対するより有効な治療法になりうるものと期待されている。

近年、このアミロイドカスケード仮説に基づき、Aβを注射投与することで抗 Aβ抗体を誘導し、Aβ凝集体、Aβオリゴマーの形成阻害、除去を図る AD ワクチン療法が新規 AD 治療戦略として期待されたが、臨床試験において Aβ反応性 Th1 細胞の過剰な活性化に起因する重篤な副作用 (髄膜脳炎) を誘発したために頓挫した。しかしながら、ワクチン接種により脳内 Aβ凝集体が除去されることも判明したために、Th1 反応を抑制すれば、ワクチン療法は非常に有用な治療法となりうるものと考えられている。

2. 研究の目的

近年、ワクチン投与経路を変更することで、免疫応答を制御しうるということが報告され、皮膚特有の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC) は Th2 免疫応答を誘導する特性を有すると考えられている。そこで本申請課題では、副作用を回避しうる AD ワクチン療法の開発を目的に、LC を標的とする皮膚内溶解型マイクロニードルを応用した経皮ワクチンを AD ワクチン療法へと適用し、そのワクチン効果について検証した。

3. 研究の方法

ワクチンプロトコール

本申請課題は experiment 1 と experiment 2 に分けて実施した。

(i) Experiment 1

Aβ1-42 (10 μg) とアジュバントとしてコレラトキシン (CT; 0.1 μg) を装填した MH800 (針長 800 μm) を AD 病態モデルマウス (APPPS1 マウス; 遺伝的背景 C57BL/6) の背部皮膚に 6 時間貼付した。対照群には Aβ1-42 (10 μg) と CT (0.1 μg) を皮内注射した。これらの免疫操作を 1 週間隔で 5 回行った後、さらに 2 週間隔で 5 回繰り返した。

(ii) Experiment 2

Aβ1-42 (10 μg) と CT (0.25 μg) を装填し

た MH300 (針長 300 μm)、Aβ1-35-Cys (10 μg) と CT (0.25 μg) を装填した MH300 を AD 病態モデルマウス (APPPS1 マウス) の背部皮膚に 6 時間貼付した。対照群には Aβ1-42 (10 μg) と CT (0.25 μg)、あるいは Aβ1-35-Cys (10 μg) と CT (0.25 μg) を皮内注射した。これらの免疫操作を 1 週間隔で 5 回行った後、さらに 2 週間隔で 5 回繰り返した。

血清中抗 Aβ1-42 IgG 抗体の定量

経日的に回収した血清中抗 Aβ1-42 IgG 抗体濃度は ELISA 法により測定した。

認知機能評価

モリス水迷路試験 :

最終免疫から 1 あるいは 2 週間後のマウスについて、モリスの水迷路試験による学習・記憶能力の改善効果を評価した。まず 1 日目は、水槽内でマウスを 60 秒間泳がせて水に慣れさせた。2 日目以降は水槽を四分割した一区画にプラットフォームを設置し、マウスを水槽の壁側を向かせて静かに放ち、プラットフォームの位置を学習させた。マウスが 60 秒以内にプラットフォームに到達した場合は、プラットフォーム上で 10 秒間休憩させてから水槽より引き上げた。マウスが 60 秒以内にプラットフォームに辿り着かなかった場合は、プラットフォームに誘導し、プラットフォーム上で 10 秒間休憩させてから水槽より引き上げた。このトレーニングを 1 日 2 回、5 日間連続で行い、プラットフォームに到達するまでの時間と移動距離を測定することで学習能力を評価した。また、5 日目のトレーニングから 1 時間後にプラットフォームを除いた水槽にマウスを 60 秒間泳がせ、プラットフォームの設置してあった区域 (target quadrant; TQ) に滞在していた時間ならびに横切った回数を測定することで記憶能力を評価した (プローブテスト)。なお、水槽内の水温は 25°C で行った。

新奇物体認識試験 :

室内照度 30 Lux に設定した実験室内に、ガラス製のオープンフィールドボックス (30 cm × 30 cm × 30 cm) を設置しボックス内に少量の床じきを敷いた。ボックスの壁面に沿わずようにしてマウスを静かに放ち、1 時間自由に行動させた (馴化試行)。24 時間後に、異なる形状の 2 つのオブジェクト A および B をボックス内に設置し、馴化の終了したマウスをボックス内に静かに放ち、オブジェクトを 20 分間自由に探索させた (訓練試行)。なお、オブジェクトはボックスの壁面から約 8 cm 離れた場所に置き、メンディングテープを用いて固定した。訓練試行から 1 時間後に、オブジェクト A および B のうち A を形状の異なるオブジェクト C に変更したボックス内にマウスを放ち、オブジェクトを 10 分間自由に探索させた (保持試行)。ビデオ撮影した訓練試行および訓練試行の動画解

析から、物体から 1 cm 以内でマウスの頭部が物体に向かっている場合を探索行動として計測した。片方への物体の探索時間を二つの物体への探索時間の合計で除することで、オブジェクト A, B および C への探索嗜好性 (%) を算出した。なお、実験開始 3 日前からハンドリングを行い、ボックス、オブジェクトともにマウスの臭いが残らないよう、70% エタノールで消毒した。

脳内 A β 量の測定 脳組織標本の作製：

行動試験を実施した後に各マウスから回収した脳の凍結組織切片を作製し、Congo red stain kit を用いてアミロイド繊維を染色した。

脳内 A β 量の測定：

行動試験を実施した後に各マウスから脳を摘出し、帯状皮質 (cingulate cortex; CC)、海馬 (hippocampus; HIPP)、および嗅内皮質 (entorhinal cortex; EC) を分離した。それらを lysis buffer 中でホモジネートし、15000 rpm、15 分間遠心分離して得られた上清を可溶性 A β 含有抽出液とした。残渣に 5 M guanidine buffer を添加して再度ホモジネートし、15000 rpm、15 分間遠心分離して得られた上清を不溶性 A β 含有抽出液とした。これらの抽出液に含まれる A β 1-40、A β 1-42、A β オリゴマー量を ELISA により測定した。

抗体サブクラス解析

最終免疫から 1 週間後の血清を用いて、抗 A β 1-42 IgG 抗体のサブクラス (IgG1、IgG2c) を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

血清中抗 A β 1-42 IgG 抗体の定量

MH800 あるいは MH300 を用いて経皮免疫したマウスの血清中抗 A β 1-42 IgG 抗体は免疫開始 2 週間後には上昇し、4 週目にピークを迎えた (図 1)。その後免疫間隔を 2 週にする

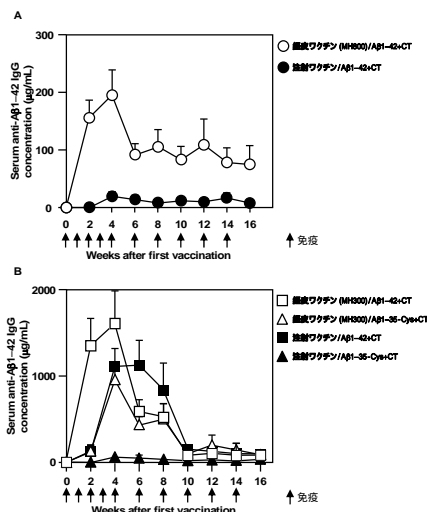


図1. 血清中抗A β 1-42 IgG抗体濃度の測定

と徐々に血清中抗 A β 1-42 IgG 抗体濃度は減少したが、免疫期間中は 100 ~ 150 μ g/ml の値を維持した。抗原として A β 1-35-Cys を用いた経皮免疫群は A β 1-42 を用いた経皮免疫群よりも高い抗体濃度を示した。また、いずれの経皮免疫群の血清中抗 A β 1-42 IgG 抗体濃度も注射免疫群よりも高かった。この結果から、MH を用いた経皮免疫は針長が 300、800 μ m のどちらであっても血中に抗 A β 1-42 IgG 抗体を誘導でき、その効果は従来の注射免疫よりも高いことが明らかとなった。

認知機能評価

モリス水迷路試験：

そこで次に、各マウスの認知機能を評価するために行動試験としてモリス水迷路試験を実施した。

MH800 あるいは MH300 を用いた検討どちらにおいても、トレーニング期間中のプラットフォームに到達する時間推移はどの群も同様の傾向を示した (data not shown)。プロベテストにおいて、MH800/(A β 1-42 + CT) を用いて経皮免疫したマウスはプラセボ処置群に比べてプラットフォームが設置されていた地点を通る回数が多く、その回数は野生型マウスと同程度であった (図 2C)。しかしながら、その他の項目については両者にほとんど差は見られなかった (図 2A, B)。また、皮内注射群の成績はプラセボ処置マウスと同程度であった。

また、MH300/(A β 1-35-Cys + CT) を用いた経皮免疫群と注射免疫 (A β 1-35-Cys + CT) 群はプラセボ処置群に比べるとプラットフォームが設置されていた区域 (TQ) 内により長く滞在する傾向を示したが (図 2D, E)、それは有意な差ではなかった。一方、MH300/(A β 1-42 + CT) を用いた経皮免疫群と注射免疫 (A β 1-42 + CT) 群はプラセボ処置群と同程度であった。

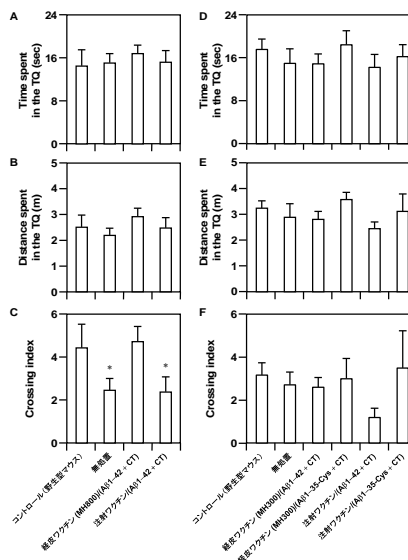


図2. モリス水迷路試験

新奇物体認識試験：

MH300 を用いた検討については行動試験として新奇物体認識試験も実施した。まず、オブジェクト A と B に対する嗜好性を確認すると、全てのマウスはどちらに対しても同程度の興味を示した (図 3A)。その後、1 つを形状の異なる新しいオブジェクト C に置換すると、野生型マウスと同様に、MH300/(Aβ1-35-Cys + CT) を用いた経皮免疫群ならびに MH300/(Aβ1-42 + CT) を用いた経皮免疫群は既存オブジェクト B よりも新奇オブジェクト C に対して 20%程度多く嗜好性を示した (図 3B)。一方、プラセボ処置マウスは既存オブジェクト B と新奇オブジェクト C に対する嗜好性の差は 5%以下であった。

以上の行動試験の結果から、MH を用いた経皮免疫によって認知機能の改善効果が得られる可能性が示されたが、その効果はわずかなものであった。それゆえにより認知機能改善効果を得るためにはさらなる改良の必要性が示唆された。

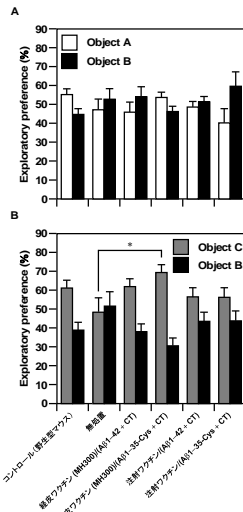


図3. 新奇物体認識試験

脳内 Aβ量の測定

AD 患者の脳内には Aβ1-40 ならびに Aβ1-42 の凝集体である老人斑が形成される。そこで免疫したマウスの脳組織における老人斑について解析した。脳組織切片を congo red を用いた染色を行ったところ、MH300 あるいは MH800 を用いた経皮免疫群はプラセボ処置群に比べて、染色スポット数は減少した (図 4A, B, D, E)。また、各マウスの脳組織切片全体に対する染色スポット面積の比率においても経皮免疫群はプラセボ処置群よりも小さかった (図 4C, F)。

次に、AD 患者で Aβの蓄積が顕著に観察される帯状皮質、海馬、内嗅皮質における可溶性 Aβ1-40、Aβ1-42、不溶性 Aβ1-40、Aβ1-42、ならびに Aβオリゴマーを定量した。経皮免疫群の脳内におけるいずれの Aβ分子種もプラセボ処置群、皮内注射免疫群と同量であった (図 5)。

これらの結果から、Aβを用いた経皮免疫に

より誘導された抗 Aβ1-42 IgG 抗体は Aβ凝集体の形成阻害あるいは Aβ凝集体の分解促進に寄与したものと考えられるが、脳内の Aβ分子種を完全に排除できたわけではないことが示唆された。

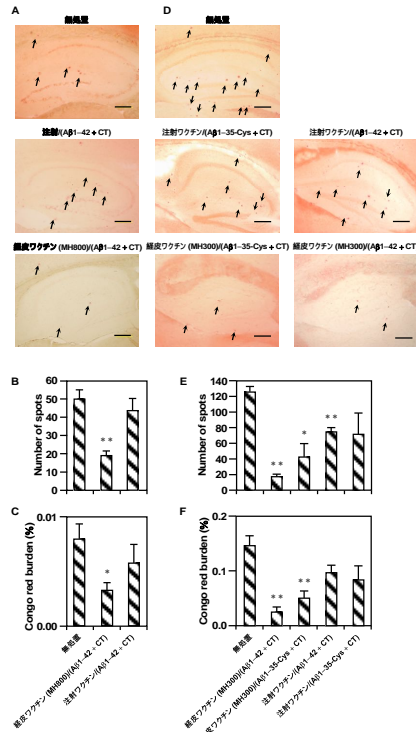


図4. 脳内におけるアミロイド凝集体量の測定

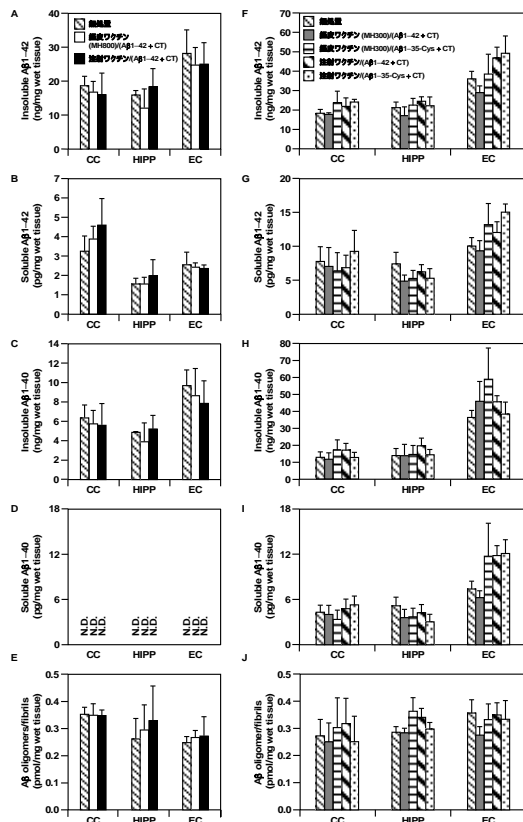


図5. 脳内 Aβ分子種の定量

抗体サブクラス解析

次に MH を用いた経皮免疫により誘導される免疫応答の特性を評価するために、各マウスの血中に誘導された抗 $A\beta_{1-42}$ IgG 抗体のサブクラスを解析した。C57BL/6 マウスの IgG 抗体サブクラスのうち IgG1 は Th2 タイプサイトカインである IL-4 により、IgG2c は Th1 タイプサイトカインである IFN- γ によりクラススイッチされることが知られている。

MH800/($A\beta_{1-42}$ + CT) を用いた経皮免疫群の IgG1、IgG2c 抗体価は皮内注射免疫群と同様のパターンを示した (図 6A)。MH300/($A\beta_{1-42}$ + CT) を用いた経皮免疫群についても皮内注射免疫群と同様のパターンであった (図 6C)。MH300/($A\beta_{1-35}$ -Cys + CT) を用いた経皮免疫群については IgG1/IgG2c 比が皮内注射免疫群の方が高く、皮内注射免疫群よりも Th1 型免疫応答を誘導しやすいことが示唆された (図 6D)。

これらの結果は MH300 ならびに MH800 を用いた経皮免疫は注射免疫と同等あるいは Th1 型免疫応答を誘導しやすいことを示唆しており、MH を用いた経皮免疫は従来の注射免疫と同様に重篤な副作用として髄膜脳炎を誘発する可能性が示された。

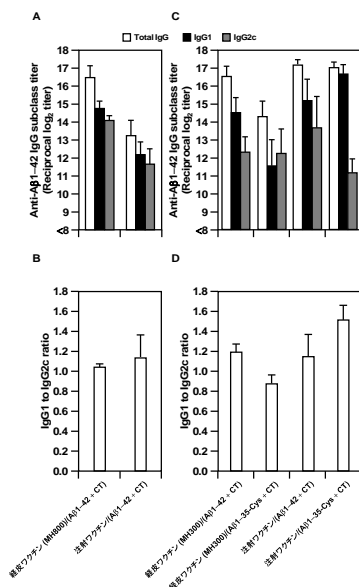


図 6. 血清中抗 $A\beta_{1-42}$ IgG抗体サブクラスの解析

まとめ

本申請課題では、MH を用いた経皮免疫を AD ワクチン療法に応用することにより簡便かつ非侵襲な方法で $A\beta_{1-42}$ に対する免疫応答を効率よく誘導できることを示した。しかしながら、本来の目的であった Th1 型免疫応答の抑制を達成することはできなかったために、この問題を克服するための改良が必要であることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsuo K, Okamoto H, Kawai Y, Quan YS, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Vaccine efficacy of transcutaneous immunization with amyloid β using a dissolving microneedle array in a mouse model of Alzheimer's disease. J. Neuroimmunol. 266 (2014) 1-11.

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：70615921