

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21310144

研究課題名（和文）：アルツハイマー認知症のワクチン分子設計に関する基礎研究

研究課題名（英文）：Amyloid beta-42-mimotope displaying M13 bacteriophage for vaccine vehicle of Alzheimer's disease

研究代表者：杉村 和久 (SUGIMURA KAZUHISA)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80127240

研究成果の概要（和文）：

本研究で確立したアミロイドベーター42 繊維特異ヒト抗体、B6 と B7 のエピトープ解析から明らかになったアミロイドベーター42 繊維のミミックペプチド、B6-C15 を提示する M13 ファージをワクチンとして用い、能動免疫によるアルツハイマー認知症の病態マウスモデル(J20)について解析した。その結果、ファージ1匹あたり5分子しか提示されていない状況下（g3p提示）でも、C57BL/Jマウスの皮下検疫により、アミロイドベーター42の繊維および可溶性オリゴマーに反応する特異的抗体が誘導される事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Bacteriophage evokes strong antibody production by means of innate immunity. Recently, we have established B6 mimotope peptide (B6-C15) which mimics the structure of amyloid · 42 (A·) fibril using human single-chain Fv (B6) specific to A·42 fibril. This mimotope peptide binds to A·42 oligomers and inhibits formation of A·42 fibril *in vitro*. We investigated whether M13 bacteriophage displaying B6-mimotope peptide (B6-C15-phage) could produce A·42 fibril specific antibody response in mice. When mice were immunized i.p. with B6-C15-phage in PBS solution, they produced anti-A·42 fibril specific IgG response in two weeks. This finding suggested a promising vaccination strategy for immunotherapy of Alzheimer's disease without the involvement of A·42-specific T cell immunity (BBRC 402: 19-22, 2010, and J. Neuroimmunol. 236: 27-38, 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物活性分子の設計・合成

キーワード：アルツハイマー認知症、M13 ファージ、ワクチン、自然免疫、ミミックペプチド、アミロイドベーター

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー認知症の発症の予防に、アミロイドベーター42 に結合する抗体が有用であることが、多くの動物モデル実験及び本年の7月にシカゴで開催されたアルツハイマー国際会議で明確になった。(1)受動免疫法では、Elan 社 (アイスランド) を初めとする数社で治験が進行中であるが、これらの抗体はA β 42のアミノ酸1次配列を識別する抗体であり、この配列は自己分子であるアミロイド前駆タンパク質にもある点は無視できない。

(2)能動免疫では、動物実験の好成績を踏まえ、2000年にAN1782 ワクチンの治験が開始されたが、髄膜脳炎の発症で中止。本年のLancet (372: 216-223) およびシカゴ会議でその後の経過報告があり「発症後の患者では、脳のアミロイドベーターの沈着物(プラーク)を除去する効果は認められるが、症状の改善を促すことが出来ない」と発表された。これは、いったん脳細胞がA β 42 oligomer で障害を受ければ、A β 42 の沈着に続くTau のリン酸化等が進行、その後にプラークを除去しても、脳細胞に生じた障害を回復させることができないと理解される。また産生された抗体がA β 42 ファイバーを除去したことは観察できたが、病態に最も関与しているA β 42 oligomer の除去を行ったかどうかの証拠は得られていない。したがって、発症前、あるいは非常に初期の段階からA β 42 に対する抗体が存在すれば、予防出来る可能性が強いと理解されるに至っている。これを達成するのはワクチン療法ということになる。A β 42 遺伝子を組み込んだDNA ワクチンやウイルスワクチンがシカゴ会議でも報告されたが、いず

れも正常のA β 42 遺伝子であるため、T 細胞免疫の起こる可能性、さらには自己免疫の誘導の可能性は否定出来ない。また、投与の手法と管理も通常の施設で可能とはいかない。T 細胞エピトープを含まない抗原を用いるというのは一つの方法ではあるが、A β 42 に対する抗体は誘導出来るが、T 細胞免疫を誘導しないワクチン抗原も有力な戦略である。応募者のこれまでの成果：ファージライブラリに関する基礎研究を1995年より行っており、最近、ファージライブラリに特徴的な性質を利用して、スナップショットという手法により、A β 42 の構造変異体(コンフォーマー)に特異的なヒト抗体の確立に成功し、B6, B7 クロンはA β 42 の線維化を阻止することを明らかにした。続いて、私どもの分子鑄型法のコンセプトに基づいて、B6, B7抗体のエピトープを決定した。両端にシステインを有する7mer のペプチドで、A β 42 のC 末の β 1 と β 2 シートを作るループ部分にホモロジーを有する(ICAD, 日本認知症学会2008)。このエピトープペプチド(B6-C15)自体も、A β 42 線維生成の中間体と考えられるオリゴマーに結合し、A β 42 線維形成を阻止することを明らかにし、A β 42 のアセンブリーの分子機序について、本年7月のアルツハイマー国際会議(シカゴ)、および日本認知症学会(群馬)で報告した。

2. 研究の目的

以上の背景から、A β 42 線維のミミックであるB6-C15 を抗原として免疫するワクチンをデザインできれば、A β 42 のオリゴマー化、および線維化を阻止する抗体を誘導することが可能となる一方、このミミック分子はアミノ酸1次配列がA β 42 とは全く異なるため、A

β 42 に特異的なT 細胞を活性化しない。既に、正常Balb/c マウスでA β 42 線維に結合する抗体産生の誘導が認められることが明らかとなっている。したがって、本研究の内容は、最新の国内外の動向に基づき、我々がこれまで積み上げて来た独創的手法が、国際的に新規のアルツハイマーの治療法の確立に貢献する。本研究の目的は

アルツハイマー認知症の治療と診断に利用出来る完全ヒト抗体（受動免疫法）とワクチン抗原（能動免疫法）の確立を目指す。すなわち

- (1) 受動免疫に使用出来るヒト抗体の抗体エンジニアリング
- (2) 能動免疫で利用できるワクチン抗原のデザイン、ワクチンのデザイン
- (3) アルツハイマーの病態モデルの遺伝子組み換えマウス(J20)を用いた、予防と治療実験

3. 研究の方法
ファージディスプレイ法を用いた。

4. 研究成果

- (1) ヒト抗体ファージライブラリを用いて、治療に有用であるアミロイドベーター42 に特異的なヒト抗体の確立を行った。
- (2) 確立したヒト抗体のエピトープの決定を行い、その配列を化学合成し、その免疫生化学的性状を解析した。このペプチドはアミロイドベーター42 の配列とは全く異なるため、アミロイドベーター42 のミミック分子と呼ばれる。
- (3) この解析から、このエピトープを提示するファージは、これをワクチンとして免疫するだけで、強力なアミロイドベーター42 分子特異的な自然免疫応答を惹起出来る事を明らかにした。
- (4) 免疫原であるペプチド配列は、本来のアミロイドベーター分子とは異なるため、T 細胞免疫を誘導しないため、安全なワクチンに

なる可能性が明らかとなった。

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 2 件)

1. Toshiya Kubota, Yuta Hamazoe, Shuhei Hashiguchi, Daisuke Ishibashi, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Suehiro Sakaguchi, Ryota Kuroki, Toshihiro Nakashima, and Kazuhisa Sugimura, Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with a human IgG1 antibody specific for the b-form prion protein, J. Biol. Chem. 287: 14023-14039, 2012, 査読有
<http://www.jbc.org/content/287/17/14023.full>

2. Koichi Tanaka, Masaaki Nishimura, Yuya Yamaguchi, Shuhei Hashiguchi, Sho Takiguchi, Makoto Yamaguchi, Haruna Tahara, Takuma Gotanda, Risa Abe, Yuji Ito, Kazuhisa Sugimura, A mimotope peptide of A β 42 fibril-specific antibodies with A β 42 fibrillation inhibitory activity induces anti-A β 42 conformer antibody response by a displayed form on an M13 phage in mice, J. Neuroimmunology 236 (2011) 27-38, 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641049>

[学会発表] (計 6 件)

1. 大迫哲平、安部梨沙、川畑壮大朗、田中孝一、五反田卓摩、橋口周平、中河志朗、杉村和久、 “Amyloid beta 42-mimotope-displaying M13 phage induce anti-amyloid beta 42 antibody without adjuvant.” , 第 40 回日本免疫学会学術集会記録, 11 月 27-29 日, 2011, 千葉, 幕張メッセ

2. Shuhei Hashiguchi, Takuma Gotanda, Yuta Hamazoe, Kazuhisa Sugimura, “Strong innate immunity to M13 bacteriophage: Implication for vaccine development” , 第 40 回日本免疫学会学術集会記録, 11 月 27-29 日, 2011, 千葉, 幕張メッセ

3. Shuhei Hashiguchi, Takuma Gotanda, Yuta Hamazoe, Tsuyoshi Tsurumaru, Kazuhisa Sugimura,

“Strong Innate Immunity to M13 Bacteriophage: Implication for Vaccine Development” 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, October 2-4, Seattle

4. Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, Teppei Osako, Sotaro Kawabata, Risa Abe, Shiro Nakagawa,

“Amyloid Beta-42-Mimotope Displaying M13 Bacteriophage for Vaccine Vehicle of Alzheimer’s Disease” 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle October 4, 2011.

5. 川畑壮大朗、安部梨沙、田中孝一、大迫哲平、橋口周平、鈴木賢太郎、山田源、中島敏博、中河志朗、杉村和久，“アルツハイマー病モデルマウス（J20）脳内での、線維状アミロイド β ($A\beta$) に特異的な抗体 (B7) による

$A\beta$ プラークの免疫組織学的解析”，第84回日本生化学会大会，9月21-24日，2011，兵庫，神戸ポートアイランド

6. Kazuhisa Sugimura, Risa Abe, Sotaro Kawabata, Teppei Osako, Takuma Gotanda, Shuhei Hashiguchi, Shiro Nakagawa

“Amyloid beta 42-mimotope-displaying M13 phage induce anti-amyloid beta 42 antibody without adjuvant” Alzheimer’s Association International Conference on Alzheimer’s Disease 2010, July 16-21, Paris, France

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：アミロイド β 線維化阻害ペプチド

発明者：杉村 和久

権利者：鹿児島大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2007/059350

出願年月日：2008.10.22

国内外の別：米国、EP（ドイツ、英国、フランス）

名称：アミロイド β ペプチドのミミック分子を用いたペプチドワクチン

発明者：杉村 和久

権利者：鹿児島大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2008/069586

出願年月日：2008.10.22

国内外の別：米国、EP（ドイツ、英国、フランス）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉村 和久 (SUGIMURA KAZUHISA)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80127240

(2) 研究分担者

橋口 周平 (HASHIGUCHI SYUHEI)

鹿児島大学・理工学研究科・助教

研究者番号：40295275