

*Review article***New vaccine therapy for Alzheimer's disease.**Shoichi Ishiura¹⁾, Kurara Takagane²⁾, Yuichiro Watanabe³⁾, Taiji Yoshida⁴⁾

1) Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

2) Faculty of Medicine, Akita University, Akita, Japan

3) Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

4) Mediherb, Co. Ltd., Morioka, Iwate, Japan

Glycative Stress Research 2019; 6 (1): 001-006

(c) Society for Glycative Stress Research

(総説論文：日本語翻訳版)

アルツハイマー病に対する新規ワクチン療法石浦章一¹⁾、高金くらら²⁾、渡辺雄一郎³⁾、吉田泰二⁴⁾

1) 同志社大学 生命医科学部、京都

2) 秋田大学医学部、秋田

3) 東京大学大学院 総合文化研究科、東京

4) メディハーブ、岩手

抄録

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は脳内に蓄積する老人斑が特徴の疾患で、老人斑の主成分であるアミロイドβ蛋白質 (amyloid β protein; Aβ) の蓄積を防ぐ方法が第一選択として模索されている。これは、若年性アルツハイマー病の原因遺伝子が三つとも Aβ 生成にかかわる経路に関係しているからである。また蓄積は、神経細胞死のかなり前から起こることが知られていることから、ワクチン療法が最良の予防・治療になると期待されている。本論文では、抗原に用いる Aβ を植物に発現させるという新しい方法を用いて老人斑を軽減することに成功したので、その詳細を報告するとともに、経口投与と皮下投与での副作用の違いも報告する。

KEY WORDS: アルツハイマー病、経口ワクチン療法、アミロイドβ蛋白質 (Aβ)、植物での発現

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) はアミロイド β 蛋白質 (amyloid β protein; A β) の蓄積により神経細胞が死んでいく病気で、現在のところ抜本的な治療法はない。アルツハイマー病のリスクとして知られているものの中には、糖尿病、高血圧などの生活習慣病が最初に挙げられており、これらの治療薬がアルツハイマー病を予防するという結果も数多く存在する。アルツハイマー病に対して多くの対症療法が知られているが、いったん神経が死んでしまうと、新しい神経が作られない限り、症状の良化は望めない。症状の急激な悪化を防ぐ一番良いといわれている薬も、単に悪化を遅延するのみであって、原因を除いて治療するものではない¹⁾。

そこで近年では、治療ではなく予防を主体とする取り組みに力が注がれており、A β の蓄積を防ぐ方法としてワクチンに注目が集まっている。すでに抗体医薬として Aducanumab の治験が行われており、中間発表では A β 沈着が可逆的に阻止されたという報告がなされた²⁾。私たちは能動免疫を用いて A β を排除する方法を模索し、農作物に A β を発現させて、経口免疫で A β を除くことを試みている。現在までに、ピーマン^{3,4)}、米⁵⁻⁷⁾ に A β を作らせ、家族性アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 に食べさせることで、脳内 A β を減らすことに成功した。今回は、薬草に A β を発現させる実験を行った結果も併せて紹介する。

アルツハイマー病とワクチン療法

アルツハイマー病は、脳に老人斑が蓄積して神経細胞が次第に消失する病気で、認知機能の低下が特徴の神経変性疾患である。いったん神経が死ぬと、神経の新生はヒトでは珍しいため、坂を転げ落ちるように症状が悪化し、人間の尊厳すら保つことができなくなる。我が国では、2050年には65歳以上の人々が40%を超えると予測されており、そのため、健康の維持や介護に要する費用の大幅な上昇が見込まれている。このような状況で私たちには、食事療法や運動によって健康寿命を延ばすことが奨励されている¹⁾。

一方、A β 沈着を抑える薬剤の開発も行われているものの、著効のあるものは報告されておらず、ワクチンが経済的にも安価で効果的な唯一の予防法ではないかと考えられている。一般に抗体医薬は経費が大幅に上昇するのが問題で、安価でしかも安全に抗体価を上昇させるには、経口ワクチンが最適である⁸⁾。ところが経口ワクチンは抗体価を上げるのが難しく、動物実験的には抗体価を上げるものを同時投与する経口アジュバントの使用が欠かせない。今回のレビューでは、私どもが行っている食物ワクチンの現状について報告し、経口アジュバントなしで抗体価を上げる新しい方法を開発したので、その点も報告する。

分子レベルでのアルツハイマー病発症機構

認知症とアルツハイマー病の相違を Fig. 1 にまとめた。アルツハイマー病は認知症の大きな部分を占める変性疾患であり、脳の萎縮と脳内に老人斑 (主成分は A β) ならびに神経原線維変化 (主成分はリン酸化されたタウ) を認めるもの、と定義される。若年性アルツハイマー病は、老人斑の主成分である A β を生成する経路に遺伝子変異があるものであり、変異はプレセニリン 1 (presenilin 1)、プレセニリン 2 (presenilin 2)、アミロイド前駆体のどれかの遺伝子に存在する。前二者は A β 産生酵素 γ セクレターゼのサブユニットであり、後者はその基質である。一方、神経原線維変化の主成分であるタウをリン酸化して繊維化させる経路に変異があっても、結果的に認知症になる。

一方、65歳あたりで発症する遅発性アルツハイマー病の責任遺伝子として1980年代初めに発見されたのがアポリipoprotein E (アポE) である。アポEには3つのアイソフォームがあり、そのE4を一つでももつと認知症になりやすい。もちろんE4のホモは、E3のホモより11.6倍アルツハイマー病になりやすいことが発見され、遅発性アルツハイマー病の遺伝的素因とされている。これがあるとアルツハイマー病になるのではなく「アルツハイマー病になりやすい」因子である。Fig. 2には、逆にアルツハイマー病になりにくい遺伝子変異も加えた。

アルツハイマーワクチンの歴史

ワクチンには抗原を投与する能動免疫と抗体そのものを投与する受動免疫がある。後者には、副作用が出ないようなヒト化抗体やヒトモノクローン抗体があり、すでにがんなどの治療に用いられている。受動免疫は一般的に短期間しか効果が続かないので、毎月投与が必要になったり、吐き気、血栓、出血、臓器ダメージなどの副作用も大きいことがある。また、何よりも高価なのが問題である。これとは別に、抗体ではなく抗原特異的 T 細胞移植という手段もあるが、まだ病気を発症していない人に予防的に用いることはできない。

この点から、やはり経済的に見て、慢性的な疾患治療には能動免疫によるワクチン療法が必要である。また、安価で安全であるという点から多くの人に対する効果も期待できる。加えて、病気が予防可能であることも大きい。

これまでに、ヒトに対するアルツハイマー病の治験は何度も行われてきたが、そのほとんどが中止におわっている。いくつかは治験中であるが、なかなかよい結果は得られていない (現在、フェーズ3に入っているものもある)。その理由としていくつか問題点が挙げられている。

第一はアジュバントの問題である。最初のトライアルである凝集した A β 42 を抗原とする AN1792 治験では、アジュバントに精製サポニン QS21 を用いたために強い炎症性反応が起り、300人の被験者のうち6%に髄膜脳炎を引き

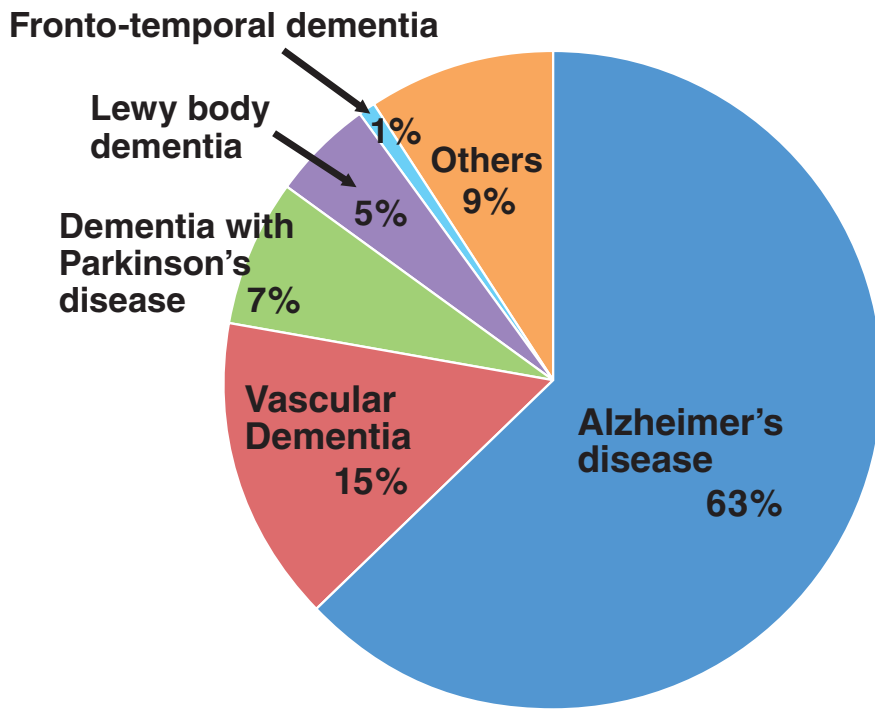


Fig. 1. Alzheimer's disease and dementia.

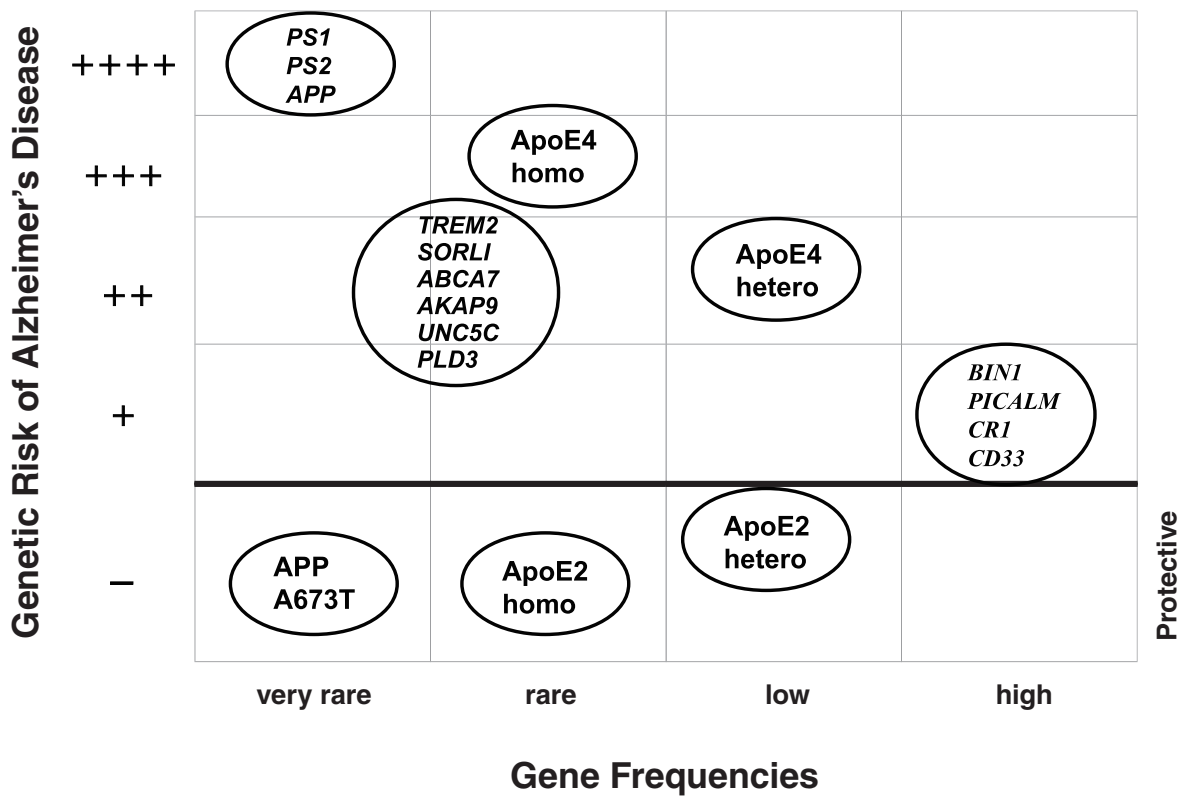


Fig. 2. Genetic mutation of Alzheimer's disease.

起こしたことが問題になった。またアジュバント効果を高める界面活性剤ポリソルビン酸にも問題があった可能性が指摘されている。

第二は抗原の問題である。治験のほとんどが、エピトープとして A β の N 末端を選んでいた。これは、A β の N 末端 1-14 に A β オリゴマーに対する B 細胞エピトープが存在するためであったが、結果として炎症性の Th1 反応が出現したり、微小出血が認められたりして、途中で失敗に終わっている。

第三はモデル動物の問題である。動物実験のほとんどが、A β 蓄積が顕著に見られるトランスジェニックマウスを使っていたが、長寿に伴ってゆっくり A β が蓄積するモデルを使って効果を見てからヒトに適用すべきだ、という意見も多い。

これ以外にも、一般に老人は抗原に対して抗体を作りにくいことも、治験成功が難しい原因と考えられている。また一般的に、直接免疫と DNA ワクチンを同時に施行する方がよいが、そのような治験はない。また、A β とタウワクチンとの併用も行われていないのが現状である。

一方、注射免疫や抗体投与では、抗体価と治療効果が比例する結果が得られている。しかし、抗体価を高めるには必然的に T 細胞応答を高めることが必要となる。これは両刃の剣である。この解決には、投与方法の再検討が必要となる。

アルツハイマーワクチンがうまくいかなかった大きな理由とその改善案

最初のアルツハイマーワクチン AN1792 は副作用の髄膜脳炎のために失敗と言われているが、結果的に抗体価が上昇した人では認知機能の低下があまりなく、副作用を軽減できれば有効な治療手段であると考えられている⁹⁾。またここでの大きな問題は、人間では誰が認知症になるか予測できなかったという点である。ワクチン投与の効果は、神経細胞が消失する前の段階に始めないと効果が期待できないのは、誰が見ても明らかである。そのため、せいぜい認知症になる危険が大きいと言われているアポ E4 遺伝子をホモにもつ人を対象にすることだが、これにも個人差があって効果の検証がしづらい。そこでアミロイド PET を用いて、脳内の A β 蓄積量をバイオマーカーにするという提案がなされている。ここで示すアミロイド PET とは、陽電子放射断層撮影 (positron emission tomography; PET) 画像を用いてヒト脳内の A β 蓄積量を調べる手法で、老人斑に結合する化合物 PIB を放射標識し、静脈内投与した後に、PET を用いて撮影するものである。この検査法により、脳内の A β 蓄積量を定量化することが可能になっている。

治験を行うにあたり、脳内 A β 量と認知機能との両面を検査する必要がある。そこで今後求められるのは、抗体を作りやすい抗原を用いること、老人斑から有害な可溶性 A β オリゴマーを可溶化しないような条件をみつけること、炎症性の Th1 ではなく非炎症性の Th2 応答を引き起こす

ものであること (これにはアジュバントに注意しなければならない!)、などであり、すでに沈着した不溶性 A β を標的にするのではなく、沈着する前に蓄積を抑える予防的ワクチンが成功の鍵を握っているのである。また、抗原として A β とインフルエンザ抗原などの融合蛋白質がいいのではないとも言われている。なぜかという、過去に免疫した経験がある B 型肝炎の表面抗原、破傷風毒素、ジフテリア毒素など T 細胞エピトープを持つものと A β の融合蛋白質を作れば B 細胞エピトープを持つ A β 断片に対して抗体ができやすいという理由である。

食物による経口ワクチンの試み

私たちは、これらのヒトに対する治験が始まった 2000 年あたりから、全く異なる方法でのワクチン開発を企画した。それが経口ワクチンである。結果的には、注射ではなく食べるワクチンが炎症性の Th1 応答をほぼ完全に抑制することがわかった^{4,7)}。

私たちの実験では、2 種類の米ワクチンを使用した。一つは、A β 42 に GFP を結合させた米であり (この場合は、アジュバントとして市販のコレラトキシン B サブユニットを用いた)、もう一つは農水省の高岩が作成した A β 42 にコレラトキシン B サブユニットを連結させたアジュバント不要の米である^{10,11)}。ここでは主に前者の結果を述べる。

米に A β 42 は十分量の発現を見た (1 粒当たり 8 μ g)。これを Tg2576 トランスジェニックマウスに 10 μ g ずつ 1 週間おきに 4 回投与した。最後の投与後 3 週目に、0.5 μ g の A β 42 をフロイントの不完全アジュバントとともにブースター注射した。私たちは、比較のために投与方法を 2 通り行った。一つは経口投与 (この場合は、コレラトキシン B サブユニットを経口アジュバントに用いた)、もう一つは皮下投与 (この場合はフロイントの完全アジュバントを用いた) である。

また、米蛋白質に対する経口寛容を導くために、妊娠マウスに米を食べさせ授乳を通して子マウスに免疫寛容を起こさせた後、子マウスに A β 42 を投与する実験も行った。ヒトにおいても米蛋白質に対して抗体ができては、食物アレルギーを起こすことになり、何を行っているかわからないからである。その結果、免疫寛容を誘導しないマウスでは分子量 15~19kDa の蛋白質 (同定していないが、グルテリン塩基性サブユニットかプロラミン [prolamine]) に対する抗体価が上昇したが、処理した子マウスではこの蛋白質に対する抗体はできておらず、免疫寛容が誘導されたと結論した (Fig. 3)⁶⁾。しかし行動実験においては、Y 字迷路では有意な効果が見られなかったが、自発行動では差が見られた。A β 42 が蓄積する Tg2576 マウスでは自発行動量が上昇し、それが脳内 A β 42 量に比例するという結果がある。今回の経口投与実験では、A β 42 量の低下と自発行動量の低下が見られた。皮下注射群では、差がなかった。

もう一つ大切なことは、経口投与と皮下投与では、T 細胞の応答が全く異なったことであった。Fig. 4 は米ワクチン

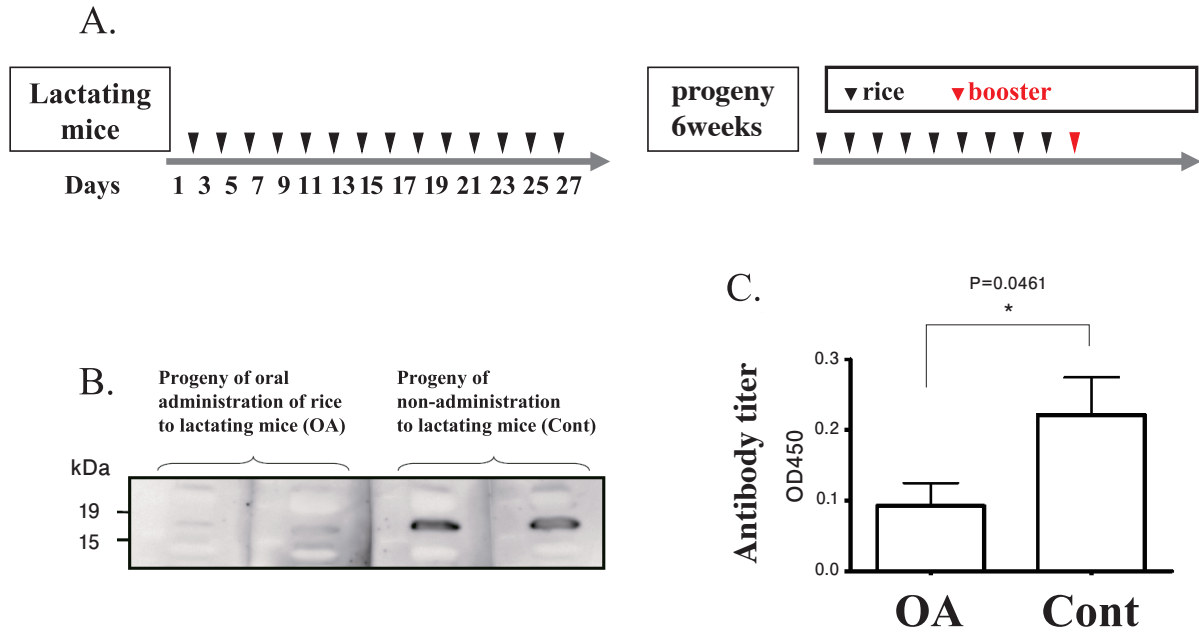
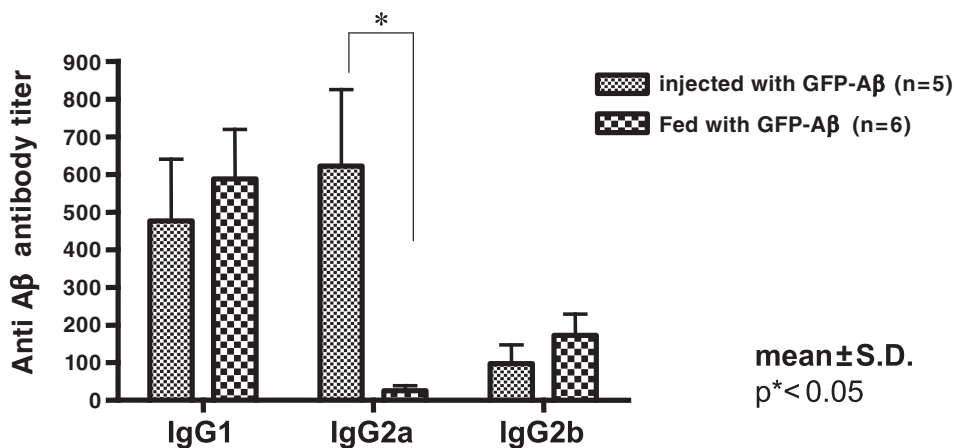


Fig. 3. Production of anti-rice storage protein antibodies in mice.

A. Experimental protocol: lactating mothers were orally administered wild rice (0.2 g/day) from delivery until weaning.

B. Western blot of rice storage protein. C. Amount of anti-body against rice whole protein. OA, oral administration of rice; Cont, control.



IgG1, IgG2b : Non-inflammatory Th2 isotype immunoglobulin
IgG2a : Inflammatory Th1 isotype immunoglobulin

Fig. 4. IgG isotyping of anti-A β antibodies in wild-type immunized mice.

A β , β -amyloid; SD, standard deviation.

の前段階として行ったピーマンワクチン (A β 42-GFP をピーマン葉に発現させ、経口投与ならびに皮下投与した結果) を用いたときの結果であるが、経口投与の有効性がはっきり示されている。経口投与では Th1 応答がほとんど抑えられ Th2 応答優位になったのに対し、皮下投与では高い Th1 応答が見られたことである⁴⁾。考えてみれば当然で、食べたものに対して抗体が作られ炎症反応が起こっては困る。この結果から、経口投与で少しずつ抗体が作られるのが良い結果につながった、という結論になった。

高岩から提供されたコレラトキシン B サブユニットと A β 42 がタンデムに連結されたコンストラクトでは、A β 蛋白質は蛋白質構造体 (protein body) に発現される。この米を用いると、A β は胃でペプシンに分解されずに腸まで届き、腸管免疫によって抗体が作られる。この米を使って老化促進マウス (SAMP8) においても A β 42 減少効果が認められた。3ヶ月齢から隔週にワクチンを 10ヶ月齢まで経口投与したところ、A β 42 抗体価の上昇と脳内可溶性 A β 42 の量の低下を見た¹¹⁾。

薬草に発現させた A β と 将来のアルツハイマーワクチン

コヘンルーダ (*Ruta chalepensis* L.) は、沖縄に自生する別名「医者泣かし草」といわれる薬草である。原産地は地中海地方である¹²⁾。薬効としては、消炎・鎮静・解毒作用が知られており、神経痛、リウマチなどに効果があるといわれている^{13,14)}。私たちは、このアンチエイジング効果と薬効のあるコヘンルーダに A β 42 を発現させ、マウスに経口投与したところ、アジュバントなしで半数のマウスに抗 A β 42 抗体価の上昇を確認した。これは、コヘンルーダ自体が何らかのアジュバント効果を持つ化合物を含んでいることを示しており、今後の食物ワクチン作用に新しい希望を持たせるものであった。また、薬草に A β 42 を発現させることができたことは世界で初めての結果であり、今後の発展も期待できる（吉田、渡辺、石浦、Proc. Japan Acad. 印刷中）。

まとめ

アルツハイマー病の患者数の増加と長期的な介護の必要性、そして治療よりも予防が重要という点を考慮する¹⁵⁾と、もはや高価な薬の出番はないと考えられる。薬価が厚生労

働行政を圧迫しているのは周知の事実であり、安価で簡便な予防法が求められているのは事実である。特に経口ワクチンの効果はすぐにはあらわれないが、有望なしかも安全な予防法としてもう一度考えてみるのもいいのではないか⁸⁾。

私たちの何年もの経口投与実験で奇妙に感じたことがある。それは、少なくともマウスにおいて抗体価と老人斑除去効果が比例していないことである。ほんの少しの抗体価の上昇でも、老人斑の除去に効果がある例が多かった。もともと経口投与では抗体価の上昇の程度は少ない。しかし、その利点を生かすのも大切なのではないだろうか。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、Human Frontier Science Program の支援を受けた。

利益相反申告

本研究を遂行するにあたり、利益相反に該当する事項はない。

参考文献

- Marciani DJ. A retrospective analysis of the Alzheimer's disease vaccine progress: The critical need for new development strategies. *J Neurochem.* 2016; 137: 687-700.
- Sevigny J, Chiao P, Bussi re T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer disease. *Nature.* 2016; 537: 50-56.
- Szabo B, Hori K, Nakajima A, et al. Expression of amyloid A β 1-40 and 1-42 peptides in *Capsicum annuum* var. *angulosum* for oral immunization. *Assay Drug Dev Technol.* 2004; 2: 383-388.
- Ishii-Katsuno R, Nakajima A, Katsuno T, et al. Reduction of amyloid β peptide accumulation in Tg2576 transgenic mice by oral vaccination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 399: 593-599.
- Yoshida T, Kimura E, Koike S, et al. Transgenic rice expressing amyloid β peptide for oral immunization. *Int J Biol Sci.* 2011; 7: 301-307.
- Nojima J, Ishii-Katsuno R, Futai E, et al. Production of the antibody against A β in mice with rice plant expressing A β . *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011; 75: 396-400.
- Nojima J, Maeda A, Aoki S, et al. Effect of rice-expressed amyloid β in the Tg2576 Alzheimer's disease transgenic mice. *Vaccine.* 2011; 29: 6252-6258.
- Rosales-Mendoza S, Rubio-Infante N, Zarazua S, et al. Plant-based vaccines for Alzheimer's disease: An overview. *Expert Reviews of Vaccine.* 2015; 13: 429-441.
- Nicoll JAR, Wilkinson D, Holmes C, et al. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: A case report. *Nat Med.* 2015; 9: 448-452.
- Takaiwa F. Seed-based oral vaccines as allergen-specific immunotherapies. *Human Vaccines.* 2011; 7: 357-366.
- Takagane K, Nojima J, Mitsuhashi H, et al. A β induces oxidative stress in senescence-accelerated (SAMP8) mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 79: 912-918.
- Guenaydin K, Savci S. Phytochemical studies on *Ruta chalepensis* (Lam.) Lamarck. *Nat Prod Res.* 2005; 19: 203-209.
- Al-Said MS, Tariq M, al-Yahya MA et al. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1990; 28: 305-312.
- Gonzalez-Trujano ME, Carrera D, Ventura-Martinez R et al. Neuropathological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *J Ethnopharmacol.* 2006; 106: 129-135.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer disease. *New Engl J Med.* 2010; 362: 329-344.