

# ラット脳血管認知症モデルを用いた、アンギオテンシンII ペプチドワクチンによる認知症の新規治療法の開発

研究代表者 東京大学先端臨床医学開発講座 特任助教 若山幸示

## まとめ

AngiotensinII(AngII)ペプチドワクチンの脳血管認知症動物モデル(2V0ラット)での白質保護作用を検討した。ワクチンを3回接種後、血清中の抗AngII抗体産生を認めた。2V0ラットの脳梁ではマイクログリア、アストロサイトの増加と、オリゴデンドロサイトの減少がみられたが、ワクチン接種ラットでは、これらの変化は抑制され、認知機能障害も改善し、ワクチン治療の有効性が示された。

## 目的

脳血管認知症(vascular dementia:VD)は日本人に多くみられる型の認知症であるが、臨床の場では、薬剤飲み忘れ、過量摂取などが常に問題となる。近年、新しい慢性疾患治療法として自己抗原を標的としたワクチン療法が注目され、レニンアンギオテンシン系(RAS)をターゲットとしたワクチンによる高血圧治療<sup>1</sup>が試みられているが、慢性疾患として患者数の多いVDに対するワクチン療法の研究はAngIIワクチンを含め存在しない。RASは炎症、酸化ストレスなどを介して様々な疾患の病態に関与する。この点に着目し、既存のRAS阻害薬の脳血管障害治療への有効性を示した研究は少ないが<sup>2</sup>、同様の機序からAngII

ワクチンのVD治療効果も期待される。ワクチン治療は、外来での少数回接種で長期にわたる効果持続が期待されるため、内服薬の摂取回数が減り、自己管理も不要となる可能性もある。そのためVD患者など内服アドヒランス低下を伴う患者の治療に高いアドバンテージを有し、介護者による薬剤管理の負担を軽減できる点も魅力的である。本研究の目的はVD疾患モデルの2V0ラットを用い、病態の主座である脳白質障害に対する、AngIIペプチドワクチン治療の有効性を病理学的、行動学的に検討し、VD治療法としてのAngIIペプチドワクチンの有効性を示すことにある。

## 方法

### AngIIペプチドワクチンの合成

AngIIペプチドワクチンはAngIIペプチドN末端にキャリアタンパクのKeyhole Limpet Hemocyanin(KLH)を付加し免疫原性を高めるよう合成されている。

### AngIIペプチドワクチンの接種

Wistarラット(オス)を6週齢で初回接種、その後14日目、28日目で、計3回接種を行う。ワクチン治療群ではAngII-KLH 20 $\mu$ g/100 $\mu$ lに等量のFreund's adjuvantを混合乳化処理した溶液を、コントロール群は200 $\mu$ lの生理食塩水を皮下接種する。

### 抗AngII抗体の血清抗体価の測定

3回目のワクチン接種から2週目の時点

(初回接種後 42 日目) の血清を採取する。AngII-BSA conjugate を ELISA プレートにコーティングし、 $10\sim 10^6$  倍に段階希釈した血清を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  オーバーナイトで置く。PBS で洗浄後、抗ラット IgG-HRP を加え、室温で静置。洗浄後 TMB 溶液で発色、マイクロプレートリーダーで吸光度測定を行う。 $50\%$  阻止血清希釈倍率 (OD  $50\%$ ) を抗体価とし、定量比較する。

### 両側総頸動脈結紮モデルの作成

Wistar ラットを 12 週齢 (ワクチン初回接種後 42 日目) で両側総頸動脈結紮を行い 2V0 ラットを作成する。術後 4 週目の時点で脳組織を採取し、病理標本用に凍結切片を作成する。

### 両側総頸動脈結紮ラットでの AngII ペプチドワクチン接種と血圧への影響

Sham 手術群、2V0+生食群、2V0+AngII ワクチン群の 3 群を設定し、術後 4 週目の時点での収縮期血圧を測定、AngII ペプチドワクチン接種による血圧への影響を調べる。

### 脳白質障害の評価

脳梁中央部での成熟オリゴデンドロサイト (GST- $\Pi$  陽性細胞) とともに炎症の指標としてマイクログリア (Iba1 陽性細胞)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) の細胞数を免疫染色で定量化。上記の項目を Sham 手術群、2V0+生食群、2V0+AngII ワクチン群の 3 群間で定量比較し、AngII ペプチドワクチンの白質病変への影響を調べる。

### 行動試験による認知機能障害の定量化

Sham 手術群、2V0+生食群、2V0+AngII ワクチン群の 3 群を設定。術後 4 週目の時点で新規物体試験を行い 2V0 ラットの認知機能障害に対する AngII ペプチドワクチンの治療効果を調べた。試験前 2 日間連日、

オープンフィールドボックスに 15 分間ずつ馴化させた。試験当日、同一形状の物体をボックスに入れ、10 分間自由に探索させ学習させる。その 1 時間後に学習済み物体の一つを新たな形状の物体 (新規物体) に交換、5 分間自由に探索させた。新規物体、学習済み物体の探索時間をそれぞれ N、F とし、 $\text{Exploration time} = N + F$ 、

$\text{Discrimination Index} = (N - F) / (N + F)$

を算出する。なお、N、F いずれかが 5 秒以下であった個体は検討対象から除外した。

## 研究の成果

### AngII ペプチドワクチン接種による血清抗体価の変化

AngII ペプチドワクチン接種群 (n=20)、コントロール (生理食塩水) 群 (n=5) で検討を行った。初回接種後 42 日目に採取した血清で ELISA を施行、コントロール群では抗 AngII 抗体は検出されなかったが、AngII ワクチン群では OD  $50\%$  表記による血清抗体価で  $2183.15 \pm 9070$  と非常に強い抗 AngII 抗体の産生が確認された (図 1)。

### 2V0 モデルにおける AngII ペプチドワクチン接種と血圧への影響

sham 手術群 (n=9)、2V0 群 (n=8)、2V0+AngII ペプチドワクチン接種群 (n=16) の 3 群間で手術 28 日目の収縮期血圧を比較 (図 2)。両側総頸動脈結紮術により収縮期血圧が上昇する傾向がみられたが、3 群間に統計学的有意差は認めなかった。(sham 群  $129.22 \pm 3.5\text{mmHg}$ 、2V0 群  $141 \pm 5.9\text{mmHg}$ 、2V0+vaccine 群  $137.84 \pm 2.4\text{mmHg}$ )

### 2V0 モデルにおける AngII ペプチドワクチン接種と脳白質保護作用の検討

術後 28 日目の時点で sham 手術群 (n=4)、

2V0 群(n=4)、2V0+AngII ペプチドワクチン接種群(n=8)における Iba1 陽性細胞(マイクログリア)、GFAP 陽性細胞(アストロサイト)、GST-II 陽性細胞(成熟マイクログリア)の免疫染色による定量を行った(図 3A, 3B)。Iba1 陽性細胞、GFAP 陽性細胞は sham 群に比べ 2V0 群で有意な増加がみられたが 2V0+vaccine 群では増加は抑えられた。(Iba1 陽性細胞数; sham 群  $56.03 \pm 3.63/\text{mm}^2$ , 2V0 群  $85.03 \pm 1.21/\text{mm}^2$ , 2V0+vaccine 群  $65.26 \pm 2.5/\text{mm}^2$ , \* $p < 0.05$  vs. sham, GFAP 陽性細胞数; sham 群  $36.25 \pm 6.75/\text{mm}^2$ , 2V0 群  $75.81 \pm 5.68/\text{mm}^2$ , 2V0+vaccine 群  $45.2 \pm 8.08/\text{mm}^2$ , \* $p < 0.05$  vs. sham) また GST-II 陽性細胞は sham 群とくらべ 2V0 群で有意な減少を認めたが、2V0+vaccine 群では減少が抑えられた。(sham 群  $993.38 \pm 21.94/\text{mm}^2$ , 2V0 群  $800.53 \pm 54.51/\text{mm}^2$ , 2V0+vaccine 群  $939.99 \pm 35.6/\text{mm}^2$ , \* $p < 0.05$  vs. sham)

#### 2V0 ラットの認知機能障害に対する AngII ペプチドワクチン接種の治療効果

術後 28 日目に sham 手術群(n=4)、2V0 群(n=3)、2V0+AngII ペプチドワクチン接種群(n=10)で新規物体認識試験を実施した。Exploration time(図 4A)は 3 群間で統計学的有意差は認めなかった。(sham 群  $31.82 \pm 11.6\text{sec}$ , 2V0 群  $39.59 \pm 15.39\text{sec}$ , 2V0+vaccine  $29.56 \pm 4.8\text{sec}$ ) Discrimination index(図 4B)は sham 群-2V0 群間、2V0 群-2V0+vaccine 群間で有意差を認めた。(sham 群  $0.25 \pm 0.16$ , 2V0 群  $-0.25 \pm 0.16$ , 2V0+vaccine  $0.18 \pm 0.05$ , \* $p < 0.01$ ) 以上より 2V0 ラットにみられる

認知機能障害は AngII ワクチン接種により改善することが示された。

#### 今後の課題

脳白質病変での髄鞘タンパク発現レベルに関して、AngII ペプチドワクチン接種の影響は、今回の実験データのみでは不明であり、今後、ウエスタンブロットやリアルタイム PCR などによる検討を加える必要がある。また AngII ワクチンによる白質保護の作用機序については、全身循環系に存在する特異抗体の作用がワクチン治療の本質であり、第一の作用点としての脳血管系の重要性を鑑み、VD における血液脳関門障害、Neurovascular Unit 機能不全と白質病変の相互連関に対する AngII ペプチドワクチンの影響といった新たな側面からの検討も求められる。

#### 公表方法

日本神経学会総会で発表予定である。また今後英文国際雑誌への投稿に向けて、データを追加し、早期の論文化を目指す。

#### 文献

1. Tissot AC, Maurer P, Nussberger J, et al. Effect of immunization against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: a double-blind, 2 Mogi M, Horiuchi M. Effects of angiotensin II receptor blockers on dementia. *Hypertens Res.* 2009; 32(9):738-40.

Figure 1

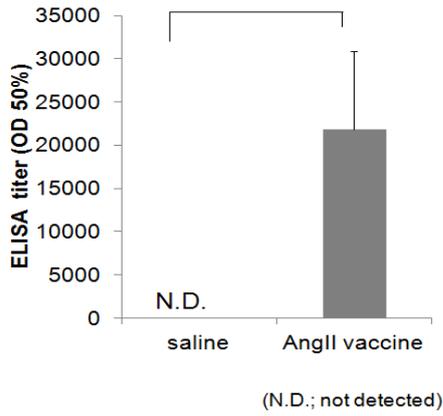


Figure 2

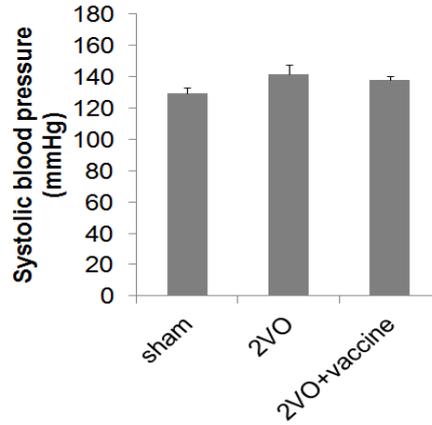


Figure 3A

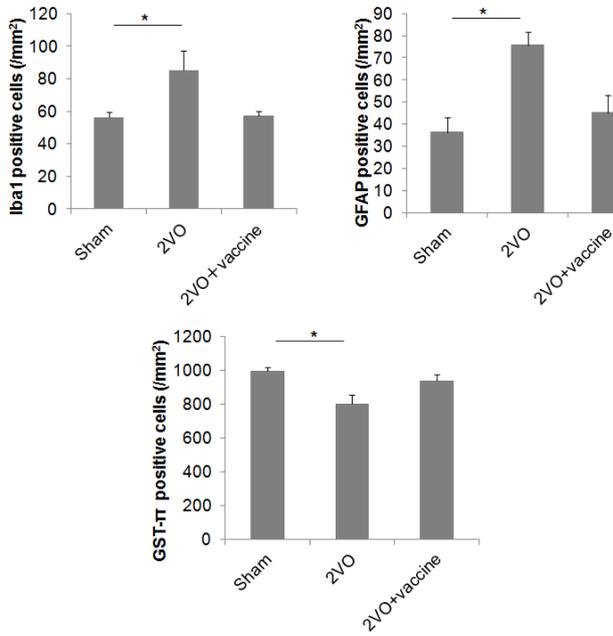


Figure 3B

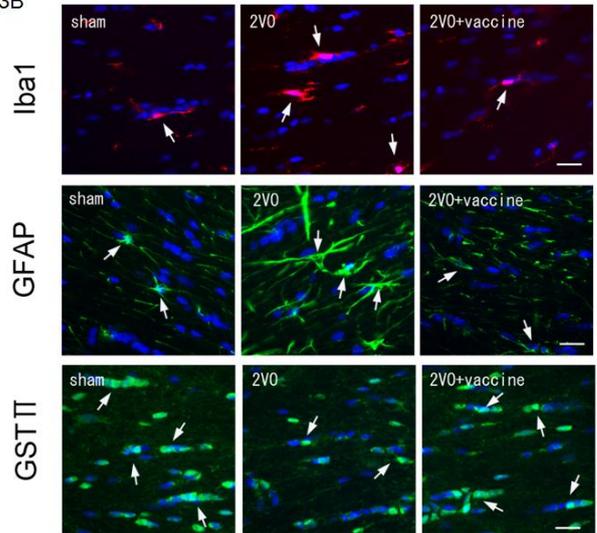


Figure 4

