

＜シンポジウム 2—3＞ALS 治療法開発の将来

ALS の免疫療法の展望

漆谷 真

(臨床神経, 49 : 818—820, 2009)

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, クロモグラニン, スーパーオキシドジスムターゼ1, 能動免疫, 他動免疫

1. はじめに

アルツハイマー病, パーキンソン病, トリプレットリピート病や ALS に共通する分子病理はタンパクミスフォールディングである。1999 年 Shcenk らはアルツハイマー病モデルマウスに対して凝集アミロイドペプチドを免疫することにより脳内の老人斑を劇的に減少させることに成功した¹⁾。続いてハンチントン病モデルマウス, プリオン接種マウスやパーキンソンモデルマウスにおいてもワクチン療法が一定の成功を取めた (Table 1)。興味深いことに, これら原因タンパクの細胞内局在が細胞質や分泌系まで多種である点でありワクチンの作用機序については様々な考察がなされている。たとえばパーキンソンモデルマウスにおいては, 抗体が細胞質内に取り込まれ intrabody として原因タンパクを吸着消化する, と報告されているが²⁾, 変異シヌクレインはシナプトゾームに存在し, 細胞外分泌されるという報告もあり免疫療法の作用機序は不明な点が多い。

2. ALS における非細胞自律性運動ニューロン死と変異 SOD1 の細胞外分泌

SOD1 は 153 アミノ酸からなる 2 量体タンパクで, 実に 110 種類以上のアミノ酸置換をとまなう突然変異が報告されている。現在では変異 SOD1 による運動ニューロン毒性は抗酸化酵素としての機能喪失ではなく, 構造異常タンパクつまりミスフォールドタンパクとしての何らかの異常機能が原因と考えられている (gain of toxic function 仮説)。そして, この異常機能としては活性酸素の産生, ミトコンドリア障害, 小胞体ストレス, プロテアソーム分解系の障害など様々なカスケードが報告されている。実際に培養運動ニューロンや神経系の不死化細胞に変異 SOD1 を過剰発現させると細胞死を誘発できるという報告もある。しかしながら, 変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおいては, 運動ニューロンは自らが発現する変異タンパクに対する脆弱性は持たず, 周囲を取りかこむ細胞が変異タンパクを有するか否かに規定されるという非細胞自律性運動ニューロン死 (Non-cell-autonomous motor neuron death) という概念が提唱され³⁾ 広く受け入れら

れている。この非細胞自律性運動ニューロン死のメカニズムを巡っては様々な研究がなされ, 多因子カスケードであることが判明してきたが, われわれは酵母 two hybrid 法をもちいて, 変異 SOD1 結合タンパクとしてクロモグラニンを同定し, 変異 SOD1 タンパクの細胞外分泌にいたる一経路を明らかとした⁴⁾。さらに, 細胞外の変異 SOD1 のミクログリアを活性化し, 運動ニューロン毒性を有することを明らかにした。この知見は変異 SOD1 が danger molecule に成りうることを示しており, われわれは変異 SOD1 をターゲットとした免疫療法を試みた⁵⁾。

3. ALS モデルマウスの免疫療法と作用機序

まず低発現型 (G37R 型) と高発現型 (G93A high copy 型) SOD1 トランスジェニックマウスに対して G93A 型 SOD1 タンパクをもちいてワクチン接種をおこなった。その結果,

(1) 低発現型マウスでは, 発症時期が 4 週間遅延し, 罹病期間も 1 週間延長した。

(2) しかし高発現型マウスでは発症時期の軽度遅延傾向は示したものの有意ではなく, 寿命の延長効果はまったくみとめなかった。

(3) 一方高発現型マウスでは, 変異 SOD1 由来の抗血清から精製した IgG を直接髄腔内投与したところ寿命を有意に延長した。

ワクチンの作用機序についてはまず, 末梢で産生された抗体が中神経系に移行するか否かが常に議論となるところである。しかし寿命延長効果は抗体価に正相関しており, ワクチン接種個体の脊髄の免疫染色において活性化ミクログリアがむしろ増加していたことから, 脊髄前角における細胞外変異 SOD1 を抗体が攻撃しミクログリアが捕食した可能性がある。抗血清の髄腔内投与の有効性も中枢神経系における抗体作用を強く支持する。しかしながら高発現型の G93A トランスジェニックマウスにワクチンが無効であった理由は, 発現量以外にワクチン接種個体の免疫反応性や抗原にもちいられ SOD1 の変異型の問題などが関与している可能性がある。そこで現在われわれは, 変異 SOD1 の発現レベルが中等度レベルの G93A 型トランスジェニックマウスをもちい, 同じ変異型である G93A SOD1 組換えタンパクによるワクチンの効

Table 1

| 神経変性疾患 | ワクチン | 標的タンパクの細胞内局在 | 効果 |
|----------|---------------------------------|-------------------|---|
| アルツハイマー病 | アミロイドβタンパク リン酸化タウ γセクレターゼ | 細胞外 細胞質 細胞膜 | Tgマウス 老人斑, tangle 除去効果 Aβワクチンは臨床治験でも 老人斑除去効果 |
| パーキンソン病 | 変異αシヌクレイン ペプチド | 細胞質 シナプス小胞 | Tgマウス Lewy小体を減少させ、運動 機能も改善 |
| ハンチントン病 | DNA ワクチン (ハンチンチン部分配列) | 核 | Tgマウス 表現型の一部として糖尿病 症状改善 |
| プリオン病 | プリオンタンパク, ペプチド | 細胞膜 細胞質 | Dietary infection による Scrapie 動物発症予防効果 |

果をしらべている。同時に、特定の変異型に限定されないワクチンとして野生型の非金属配位型(アポ型)SOD1の有効性を検討している。現時点ではG93A, 野生型アポの両者とも発症を優位な発症遅延と寿命延長効果をもとめている。しかしながら発症後の進行に対する効果は乏しい。さらにこれらの効果は免疫グロブリンのサブクラスによって効果がこととなり、ワクチンによって誘発される免疫反応との関連を検討中である。

4. 変異SOD1関連SOD1に対する免疫療法の問題点と今後の展開

ワクチンによる能動免疫は、簡便性と非侵襲性という点において非常に魅力的であるが、抗原曝露後の宿主の免疫反応は疾患に不利に働く可能性は否定できない。そこでアルツハイマー病と同様、変異タンパクを特異的に認識する抗体をもちいた他動免疫が有望な治療戦略として考えられる。われわれはカナダ・ラバル大学Jean-Pierre Julien教授との共同研究で抗体療法の開発を進めている。現在有望なモノクローナル抗体数種類の開発に成功しており、高発現G93Aマウスの発症直前に投与したところ、優位な進行抑制効果をもとめている。抗体療法の作用機序の解明とともに、効果持続的な投与方法の開発研究を進めている。

5. 孤発性ALSに対する免疫療法の可能性について

免疫療法は、病原タンパクを標的とした治療である。孤発性ALSで最近発見されたTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)は孤発性ALSにおいて、異所性局在や凝集体形成、断片化を示すことから、ワクチン・抗体療法の標的として非常に有望である。しかしながら、TDP-43の病的意義については解明途上であり、遺伝子改変動物の作出をふくめた今後の研究の進展が期待される。また、孤発性ALSにおいて野生型

SOD1の関与を示唆する報告もあり、ALSの病態において積極的に関与するという証左がえられたばあいは有望な治療候補として期待される。

6. おわりに

われわれは変異SOD1トランスジェニックマウスをもちいて、一定の成功を収めた。しかしながら、免疫療法効果のメカニズムについては未だ不明な点が多く、近年ではALSにおける中枢神経系の炎症反応はリンパ球系を中心とする獲得免疫系に制御されているということが明らかとなり、より特異性の高い抗体による他動免疫と免疫調節療法の組み合わせが重要と考えられる。

文 献

- 1) Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-177
- 2) Masliah E, Rockenstein E, Adame A, et al: Effects of alpha-Synuclein Immunization in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuron* 2005; 46: 857-868
- 3) Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, et al: Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003; 302: 113-117
- 4) Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al: Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2006; 9: 108-118
- 5) Urushitani M, Ezzi SA, Julien JP: Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2495-2500

Abstract**Future perspectives of immunotherapy against ALS**

Makoto Urushitani

Unit for Neurobiology and Therapeutics Molecular Neuroscience Research Center Shiga University of Medical Science

Emerging evidence suggests that misfolded proteins in the various neurodegenerative diseases can be targets for immunotherapy including vaccination antibody therapy. To date, vaccination strategies have been shown to be effective in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and Prion disease. Interestingly, the subcellular localization of the target proteins varies, including cytosol, synaptosomes and extracellular spaces. We have documented that mutant SOD1 is secreted together with a neurosecretory protein chromogranin, and that vaccination against the SOD1 mutant is beneficial in delaying the onset and prolonging the lifespan. However, the mechanism of vaccination on the mutant SOD1 mice remains unclear. Moreover, vaccination induces diverse inflammatory reactions, which are reported to modify both the onset and the progression of ALS. Therefore, it is important to clarify the role of innate or acquired immunity in the pathogenesis of ALS to avoid the adverse reactions of the vaccination, and rather to apply it for amelioration. Passive immunization is also promising since only aberrant proteins can be targeted using a specific monoclonal antibody. The development of the current immunization techniques is very important for the future application, since key molecules for the sporadic ALS have emerged and are intensively investigated such as TDP-43.

(Clin Neurol, 49: 818—820, 2009)

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, chromogranin, superoxide dismutase 1, active immunization, passive immunization
