

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5697044号  
(P5697044)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月20日(2015.2.20)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z N A H
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	

請求項の数 10 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-549046 (P2011-549046)	(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(86) (22) 出願日	平成23年1月11日(2011.1.11)	(73) 特許権者	301032942 独立行政法人放射線医学総合研究所 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/050616	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02011/083881	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開日	平成23年7月14日(2011.7.14)	(72) 発明者	井上 治久 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 i P S細胞研究所内
審査請求日	平成26年1月7日(2014.1.7)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-3424 (P2010-3424)		
(32) 優先日	平成22年1月8日(2010.1.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(出願人による申告)平成21年度、文部科学省、科学技術試験研究委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タウオパチー治療用ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分泌シグナル配列に連結された変異型タウ蛋白質をコードする核酸を含むベクターを有効成分として含むタウオパチー型認知症の予防または治療用ワクチンであって、該変異型タウ蛋白質が、タウ蛋白質のアミノ酸配列において、配列番号1の257位、260位、266位、272位、279位、280位、284位、296位、301位、303位、305位、315位、317位、320位、335位、336位、337位、342位、352位、369位、389位および406位からなる群から選択される少なくとも1つの位置に相当する位置のアミノ酸残基の変異を含むものであり、および、該ベクターが被験者において変異型タウ蛋白質の直接投与と比べてより持続的にタウ蛋白質に対する抗体を誘導することができる、前記ワクチン。

【請求項2】

前記変異が、K257T、I260V、L266V、G272V、N279K、K280、L284L、N296、N296H、P301L、P301S、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389RおよびR406W(ここで は欠失である。)からなる群から選択される少なくとも1つの変異である、請求項1記載のワクチン。

【請求項3】

前記変異が、少なくともP301L、P301SまたはP301Tの変異を含む、請求項1または2記載のワクチン。

【請求項4】

前記分泌シグナル配列が、アミロイド前駆蛋白質シグナル配列またはCD59シグナル配列

である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 5】

前記ベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 6】

前記ベクターがプラスミドベクターである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 7】

鼻腔内投与用に製剤化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 8】

被験者において社会的行動異常、不安様行動異常および記憶障害の少なくとも 1 つの症状の改善作用を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 9】

ワクチンが被験者の脳内のミクログリアを活性化し、これによって変異型タウ蛋白質の蓄積を抑制する作用を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【請求項 10】

タウ蛋白質はリン酸化されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タウオパチー ( t a u o p a t h y ) の予防または治療のために用いることが可能な変異型タウ蛋白質を発現するベクターおよびその医薬品としての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

タウ ( t a u ) 蛋白質は正常脳内では細胞内の微小管に結合した状態で存在する可溶性のリン酸化蛋白質で、微小管の重合促進と安定化に寄与し、微小管との結合と乖離を繰り返しながら平衡状態を保っている。この平衡状態がリン酸化・脱リン酸化酵素異常などにより崩れると、細胞質中の遊離タウ蛋白質が増加し、凝集や線維化がみられるようになる。アルツハイマー病や前頭側頭型認知症をはじめとする高齢者の認知症の大多数において、アミロイドの蓄積を必ずしも伴わず、タウ蛋白質凝集体の蓄積が特徴的病変として認められる神経変性疾患については、タウオパチーと総称されている ( 非特許文献 1 ) 。

わが国では 65 歳以上の高齢者の約 7 % に認知症がみられ、軽度認知症を加えると約 10 % に達する。その 7 割がタウオパチー型認知症といわれており、患者数は約 200 万人である。認知症に関する研究開発はこれまでアミロイド ( A ) 蛋白質に対する研究が先行しており、アミロイド のペプチド免疫による臨床治験が行われているが、治験の途中で接種患者の 6 % に髄膜脳炎が発生したため治験中止となっている ( 非特許文献 2 ) 。この治験は中止になったが、ワクチン接種後脳炎を起こし快復した後、別の疾患で死亡した患者についての症例報告により、ワクチン接種により老人斑や神経変性突起の消失効果があったことが確認された ( 非特許文献 3 ) 。また、ワクチン接種患者のその後の f o l l o w - u p 調査により、このワクチン投与により、剖検で老人斑の消失が確認された患者も病気は進行することが確認され、このワクチンは病気の進行予防効果がないことが示唆された ( 非特許文献 4 ) 。

また、アミロイド に対する抗体による受動免疫が有効であることもこれまでの研究で明らかになっているが、病気の進行を抑える効果については明らかになっていない ( 非特許文献 5 ) 。

さらにアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターにアミロイド を搭載した経口ワクチンの効果も検証されている。マウスの実験において、この A A V ベクターの経口投与により腸管粘膜を介するアミロイド に対する抗体産生効果、学習機能改善効果が認められたが ( 非特許文献 6 ) 、その後のサルの実験では老人斑の減少は認められたものの、明確な病状進行抑制効果は確認できていない。

10

20

30

40

50

これに対して、タウ蛋白質については、これまでアルツハイマー病などの治療の標的としてあまり重視されていなかったが、近年、タウ蛋白質はアミロイド に代わるアルツハイマーの治療薬の標的として、タウ蛋白質過剰蓄積を伴うタウオパチーの治療およびワクチンの標的となりつつある（非特許文献7）。

本発明と関連する治療剤として、アミロイド をコードする遺伝子をアデノ随伴ウイルスに搭載したアルツハイマー治療剤（特許文献1、2、非特許文献8）、タウ蛋白質の接種によるアルツハイマーおよびタウオパチーの治療法（特許文献3、非特許文献9）などが報告されているが、タウ蛋白質接種タウオパチーモデルマウスにおいて協調運動・運動学習の改善効果は認められたものの社交性の欠如、記憶力低下という認知症患者において特徴的に見られる症状の改善効果は認められていない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特表2008-536476

【特許文献2】特開2005-021149

【特許文献3】US2008/0050383A

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】斉藤裕子，臨床検査，Vol.50，No.10，p.1121-1129（2006）（日本）

20

【非特許文献2】Orgogozo, J.M. et al., Neurology, 61: 46-54（2003）

【非特許文献3】Nicoll, J.A. et al., Nature Medicine, 9: 448-452（2003）

【非特許文献4】Holmes, C. et al., Lancet, 372: 216-223（2008）

【非特許文献5】松岡康治，実験医学，Vol.26，No.16，p.2572-2576（2008）（日本）

【非特許文献6】田平武，老年精神医学雑誌第20巻増刊号，p.68-74（2009）（日本）

30

【非特許文献7】Martin-Jones, Z and Lasagna-Reeves, C., Alzheimer Disease Associate Disorder, 22(2): 111（2008）

【非特許文献8】Mouri, A. et al., The FASEB Journal, 21: 2135-2148（2007）

【非特許文献9】Asuni, A.A. et al., J. Neurosci., 27: 9115-9129（2007）

【発明の概要】

【0005】

本発明の目的は、タウオパチー、とりわけタウオパチー型認知症、の予防または治療用ワクチンを提供することである。

40

本発明者らは、タウオパチーモデルマウスを用いた試験で、変異型タウ蛋白質をコードする核酸を含むベクターが、該蛋白質と比べて長い持続的抗体誘導作用を有することを確認し、さらに該ベクターがタウオパチー、とりわけタウオパチー型認知症の有意な改善作用を有することを見出し、本発明を完成させた。

したがって、本発明は、要約すると、以下の特徴を包含する。

本発明は、その第1の態様において、分泌シグナル配列に連結された変異型タウ蛋白質をコードする核酸を含むベクターを有効成分として含むタウオパチーの予防または治療用ワクチンであって、該変異型タウ蛋白質が、タウ蛋白質のアミノ酸配列において、配列番号1の257位、260位、266位、272位、279位、280位、284位、29

50

6位、301位、303位、305位、315位、317位、320位、335位、336位、337位、342位、352位、369位、389位および406位からなる群から選択される少なくとも1つの位置に相当する位置のアミノ酸残基の変異を含むものであり、および、該ベクターが被験者において変異型タウ蛋白質の直接投与と比べてより持続的にタウ蛋白質（リン酸化されていてもよい。）に対する抗体を誘導することができる、前記ワクチンを提供する。

その実施形態において、前記変異が、K257T、I260V、L266V、G272V、N279K、K280、L284L、N296、N296H、P301L、P301S、P301T、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389RおよびR406W（ここで は欠失である。）からなる群から選択される少なくとも1つの変異である。

別の実施形態において、前記変異が、少なくともP301L、P301SまたはP301Tの変異を含む変異である。

別の実施形態において、前記分泌シグナル配列が、アミロイド前駆蛋白質シグナル配列またはCD59分泌シグナル配列である。

別の実施形態において、前記ベクターがセンダイウイルスベクターである。

別の実施形態において、前記ベクターがプラスミドベクターである。

別の実施形態において、前記ワクチンが鼻腔内投与用に製剤化されている。

別の実施形態において、前記ワクチンがタウオパチー型認知症の改善作用を有する。

別の実施形態において、前記ワクチンが被験者において記憶力低下および/または社会的行動異常、不安様行動異常および記憶障害の少なくとも1つの症状の改善作用を有する。

別の実施形態において、前記ワクチンが被験者の脳内のミクログリアを活性化し、これによって変異型タウ蛋白質の蓄積を抑制する作用を有するものである。

別の実施形態において、タウ蛋白質（変異型タウ蛋白質を含む。）はリン酸化されていてもよい。

本発明のワクチンは、タウオパチーをもつ被験者において、認知症の記憶力低下および/または社会的行動異常および/または不安様行動異常および/または記憶障害の有意な改善効果を有し、とりわけ従来のワクチンでは有効でなかった、タウオパチーの症状の進行を抑制する（若しくは遅延させる）作用を有する。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-3424号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0006】

図1は、GFP搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（Sev-GFP）の経鼻投与によるタウオパチーモデルマウス（P301S Tau トランスジェニックマウス）における感染効率の検討結果を示す。Sev-GFP接種マウスの脳のGFPの発現を多目的顕微鏡（BZ-9000, Keyence）にて蛍光像（A）と明視野像（B）の撮影を行って解析した。

図2は、タウオパチーモデルマウスにタウ蛋白質搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（Sev-TauP301S）を接種しリン酸化タウ蛋白質発現抑制効果に関する解析を行った結果を示す。コントロールとしてSev-GFP（ここで、GFPは緑色蛍光蛋白質をコードする核酸を表す。）を用いた。接種後5カ月目にマウス海馬冠状断面において抗リン酸化タウタンパク抗体（AT8, Innogenetics）による免疫染色を行った。矢頭はタウ病変を示す。免疫染色後、海馬CA3領域において蓄積した領域の面積を多目的顕微鏡（BZ-9000, Keyence）付属解析ソフトで測定した。Sev-GFP接種群、Sev-TauP301S接種群について、それぞれ平均値±標準誤差、統計学的解析はStudentのt検定で行った。

図3は、（A）に、Sev-TauP301SまたはSev-GFPを野生型マウス（

10

20

30

40

50

Non - Tg) またはタウオパチーモデルマウス (Tg) に経鼻接種し、接種5か月後の海馬全体におけるリン酸化タウタンパク質 (pTAU) の蓄積をウエスタンブロット法にて評価した結果を示す。さらにタンパク量は、バンドの信号強度を画像解析ソフト (NIH Image, Ver. 1.63, NIH, US) で測定し、内部コントロールタンパクである *-actin* と信号強度の比をとって定量化した結果を (B) に示す。Sev - GFP 接種群、Sev - TauP301S 接種群について、それぞれ平均値 ± 標準誤差、統計学的解析は Student の t 検定で行った。試験に用いたマウス群及び対照は次のとおりである。

Non - Tg / Sev - GFP : 野生型マウスに Sev - GFP を経鼻接種したグループ、Non - Tg / Sev - TauP301S : 野生型マウスに Sev - TauP301S を経鼻接種したグループ、Tg / Sev - GFP : タウオパチーモデルマウスに Sev - GFP を経鼻接種したグループ、Tg / Sev - TauP301S : タウオパチーモデルマウスに Sev - tauP301S を経鼻接種したグループ、- : 陰性対照 (野生型マウスから抽出したタンパク)、+ : 陽性対照 (なにも投与していないタウオパチーモデルマウス海馬から抽出したタンパク)。

図4は、(a) : Sev - TauP301S をタウオパチーモデルマウスまたは野生型マウスに接種後、血清を採取し組織のタウに反応する血清中抗体価を、それぞれのマウスの海馬組織 (白いボックス部分) における反応性で評価した結果を示す。

Sev - TauP301S を投与したマウスの血清をそれぞれ30倍、100倍、300倍、1000倍、3000倍に希釈し、4 で一晩反応させ、2次抗体として Alexa 546 標識抗マウス IgG 抗体を室温、1時間反応させた。

(b) : コントロールとしてタウオパチーモデルマウスに抗体を反応せずに免疫染色を行った結果を示す。

(c) : Sev - GFP、または Sev - TauP301S を接種したタウオパチーモデルマウスの血清中抗体価を、組織との反応がみられた最大希釈倍率で評価した結果を示す。

Sev - GFP 接種群、Sev - TauP301S 接種群それぞれ平均値 + / - 標準誤差、統計学的解析を Mann - Whitney の U 検定より行った。

図5は、Sev - TauP301S 接種による脳内のミクログリアの活性化を解析した結果を示す。Sev - TauP301S を接種し、投与5か月後接種マウスの海馬の組織における活性化ミクログリアを認識する抗 Iba1 抗体を用いて免疫染色を行った (A) 。コントロールとして Sev - GFP を接種した (B) 。矢印は IgG と共在しないミクログリアを示す。

図6は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへの Sev - GFP または Sev - TauP301S の接種による血清中の抗リン酸化タウ抗体の産生及び脳脊髄液中リン酸化タウ蛋白質の産生について解析した結果を示す。抗体産生の解析については、Sev - GFP または Sev - TauP301S を接種したマウスの血清を用いて、リコンビナント変異型タウ蛋白質 (TAUP301S) を抗原とした ELISA を行った。

リン酸化タウ蛋白質の産生については、Sev - GFP または Sev - TauP301S を接種したマウスの脳脊髄液を用いて、抗リン酸化タウ抗体 (AT8 抗体) との結合による ELISA を行った。

(a) : Sev - GFP または Sev - TauP301S 接種後5か月目の血清中のヒト P301S 変異タウタンパクに対する抗体価を示す。

(b) : Sev - GFP または Sev - TauP301S 接種後5か月目の CSF 中のリン酸化タウの量を示す。

図7は、(A) 野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへ Sev - GFP または Sev - TauP301S を接種し、社会的行動測定テスト (Social interaction test) を行った結果を示す。タウオパチー患者では社会的行動の異常が多く認められることから、社会的行動に関する「Social interaction test (社会的行動測定テスト)」(箱にマウスを2匹入れて、10分間の間の接

10

20

30

40

50

触時間を測定)を行った。(B)さらにCrawley's Social Interaction test(記銘力および社会的行動測定テスト)により、はじめて会ったマウスに対しどれだけ興味をもって近づこうとするか、ケージの近傍付近での滞在時間を測定した。

図8は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへSev-GFPまたはSev-Taup301Sを接種し、高架式十字迷路テスト(不安様行動のテスト)を行った結果を示す。Sev-Taup301Sまたは、Sev-GFP接種マウスにおいて、迷路中心から各4方向への総エントリー回数(A)、柵のない方向へのエントリー回数の割合(B)、マウスの総移動距離(C)、柵のない場所への滞在時間の割合(D)を10分間観察し、Image EPソフトウェアを用いて自動的に計測した。統計学的解析はOne-way ANOVA, post hoc testはFisherのProtected Least Significant Difference(PLSD)法にて行った。

10

図9は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへリコンビナントタウ蛋白質を接種しオープンフィールド試験(活動量や情動性を測定するためのテスト)を行った結果を示す。リコンビナントタウ蛋白質(TAUP301S)を接種し、接種後1カ月目にオープンフィールド試験を行った。接種マウスの移動距離(A)、背伸びの回数(B)、フィールド中央での滞在時間(C)、常同性行動(D)について120分間の自由行動を観察し評価した。

図10は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへリコンビナントタウ蛋白質を接種し高架式十字迷路テスト(不安様行動のテスト)を行った結果を示す。リコンビナントタウ蛋白質(TAUP301S)100 $\mu$ g/匹/回、2週間毎に計3回皮下投与接種したタウオパチーモデルマウス及び野生型マウスを、それぞれ迷路中心の正方形の部分(5 $\times$ 5cm)に、クローズドアームの方を向くように置いて、10分間行動を記録した。コントロールとしては、Sev-GFPを接種した。迷路中央から各4方向への総エントリー回数(A)、柵のない方向へのエントリー回数の割合(B)、マウスの総移動距離(C)、柵のない場所への滞在時間の割合(D)をImage EPソフトウェアを用いて自動的に計測した。統計学的解析はOne-way ANOVA, post hoc testはFisherのProtected Least Significant Difference(PLSD)法にて行った。

20

30

図11は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへpcDNA3.1-CD59-Taup301S(ATG-)(以下cDNA-Taup301S)を接種し、オープンフィールド試験を行った結果を示す。cDNA-Taup301Sを接種し、接種後1カ月目にオープンフィールド試験を行った。接種マウスの移動距離(A)、背伸びの回数(B)、フィールド中央での滞在時間(C)、常同性行動(D)について120分間の自由行動を観察し評価した。

図12は、野生型マウスまたはタウオパチーモデルマウスへcDNA-Taup301Sを接種し社会的行動測定テスト(Social interaction test)の結果を示す。タウオパチー患者では社会的行動の異常が多く認められることから、社会的行動に関する「Social interaction test(社会的行動測定テスト)」(箱にマウスを2匹入れて、10分間の間の接触時間を測定)を行った。

40

図13は、cDNA-Taup301Sの構造と挿入配列(配列番号12)を示す。

図14は、(a):P301Sについてタウタンパクの最長アイソフォームでの配列番号301番目のアミノ酸における変異を示す。Sev/FはセンダイウイルスのF遺伝子が欠損したものを示す。(b):アミロイド前駆蛋白質(APP)シグナル配列はヒト変異型タウ蛋白質(P301S,アイソフォーム1N4R)のN末端からメチオニンを欠失させた部位に接続させた。c:pcDNA3-APP-Taup301Sにおける挿入配列(配列番号13)を示す。ここで用いた、APPシグナル配列はNT\_\_011512.11,NW\_\_001838706.1,NM\_\_201414.1,NM\_\_201413.1,NM\_\_000484.2,NM\_\_001136130.1,NM\_\_0011361

50

29.1のaccession番号でGenBankに登録されている。およびP301S Tauの配列はNM\_001123067.2のaccession番号でGenBankに登録されている配列を基に変異を加えた。

図15は、(A) : Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるバンス迷路試験(空間記憶)の結果を示す。筒に入れてマウスに目隠しをして所定の位置にセット、筒をとって自由に歩かせ、正解の穴に暗箱をとりつけ、暗箱のある場所を覚えさせた(トレーニング)。(B) : トレーニング後、暗箱をはずした穴(ターゲット)の周囲の滞在時間を記録した(プローブ試験)。

トレーニング期間におけるターゲットに到達するまでの時間、プローブ試験におけるターゲットに到達するまでの時間、各穴の周辺で滞在する時間を測定した。

10

図16は、Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおける恐怖条件付け試験(文脈記憶)の結果を示す。箱に音と電気ショックを組み合わせてマウスに提示し、マウスに条件付けを行い、再び同じ箱に入れることにより引き起こされるフリージング(すくみ行動)の出現割合により評価した。

図17は、Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスの身体測定(体重(A)、体温(B)、握力(C)、ワイアハングテスト(D))の結果を示す。

図18は、Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおける社会的行動測定テスト(接触の総持続時間(A)、接触回数(B)、活発な接触の総持続時間(C)、接触の持続時間の平均値(D)、総移動距離(E))の結果を示す。

20

図19は、Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるプレパルス抑制試験(驚愕反応(A)、プレパルスによる驚愕反応の抑制効果(B))の結果を示す。先に弱い音を聞かせることで、その後大きい音を聞かせた際の驚愕反応の抑制効果を比較することで評価した。

図20は、Sev-GFPまたはSev-TauP301Sを接種した野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるオープンフィールドテストの結果を示す。(A)は総移動距離、(B)は垂直方向の活動量、(C)は中心部での滞在時間、(D)は常同行動回数を示す。

30

図21は、野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるオープンフィールドテストの結果を示す。(A)は総移動距離、(B)は垂直方向の活動量、(C)は中心部での滞在時間、(D)は常同行動回数を示す。

図22は、野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおける高架式十字型迷路テストの結果を示したものである。(A)はオープンアームに侵入した数、(B)はオープンアームに侵入した割合、(C)は移動距離、(D)はオープンアームに滞在した時間を示す。

図23は、野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるプレパルス抑制試験の結果を示す。(A) : 音の違いによる驚愕反応の違い、(B) : プレパルス抑制の割合(事前に小さな音をならし、その後大きな音を鳴らした際の驚愕反応の抑制効果の有無の割合)を示す。

40

図24は、(A)~(D) : 4カ月齢のタウオパチーモデルマウス、(E)~(H) : 4カ月齢の野生型マウス、(A), (E) : 外側淡蒼球、(B), (F) : 大脳皮質扁桃核、(C), (G) : 聴覚皮質、(CA3; D, H) : 腹側海馬。行動学的解析後の6カ月齢のマウスにおける解析、(I, L) : 帯状回皮質、(J, M) : 大脳皮質扁桃核、(CA3; K, N) : 海馬。

赤い染色部位はリン酸化タウを示し、青い染色部位は細胞核を示す。

矢頭はリン酸化タウ蛋白質の蓄積を示し、丸印は血管に対する抗マウスIgG抗体の非特異反応を示す。

50

図25は、13週齢の野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおける一般的身体測定の結果を示す。(A)は体重、(B)は直腸温、(C)は握力、(D)はワイアハングテストの結果を示す。

図26は、社会行動測定テストの結果を示す。(A)は接触の継続時間、(B)は接触回数、(C)は活発な接触の持続時間、(D)は接触毎の平均持続時間、(E)はテスト中の総移動距離を示す。

図27は、野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおける恐怖条件付け試験(文脈記憶)の結果を示す。

図28は、野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスにおけるバース迷路試験(空間記憶)の結果を示す。(A)~(C)はトレーニング期間における解析結果を示し、(D)はトレーニング後のプローブ試験の結果を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、タウオパチーの予防または治療の有効成分として変異型タウ蛋白質をコードする核酸を含むベクターをワクチンとして使用することを特徴とする。

本明細書で使用する「タウオパチー」とは、中枢神経系にリン酸化されたタウ蛋白質が異常に蓄積し、神経障害(神経変性、等)と関連する疾患群を指す。

本明細書で使用する「核酸」とは、DNAまたはRNAを意味する。

本明細書で使用する「被験者」とは、哺乳動物、好ましくは霊長類、さらに好ましくはヒトを意味する。

20

<変異型タウ蛋白質>

タウ蛋白質は、微小管関連結合蛋白質の1つであってMAPT(microtubule-associated protein tau)とも称され、タウ遺伝子の選択的スプライシングにより生じる6つのアイソフォームが存在し、C末端側の微小管結合部位の反復回数により、3回リピート型タウと4回リピート型タウに分類される(斉藤裕子, 臨床検査, Vol. 50, No. 10, p. 1121-1129(2006)(日本))。ヒトMAPTは、17番染色体上に存在し(NG\_007398.1)、例えば転写変異体(transcript variant)1~6はそれぞれ、GenBank(米国)に登録番号NM\_016835.3、NM\_005910.4、NM\_016834.3、NM\_016841.3、NM\_001123067.2、NM\_001123066.2として登録されている。タウ蛋白質は、3回リピート型タウ、4回リピート型タウのいずれでもよく、とりわけ4回リピート型タウはヒト脳で最も多く発現するアイソフォームであることが知られている。「タウ蛋白質」は、好ましくはヒトタウ蛋白質である。

30

本発明の変異型タウ蛋白質は、タウ蛋白質のアミノ酸配列において、配列番号1(NM\_005910.4;アイソフォーム2N4R型)の257位、260位、266位、272位、279位、280位、284位、296位、301位、303位、305位、315位、317位、320位、335位、336位、337位、342位、352位、369位、389位および406位からなる群から選択される少なくとも1つの位置に相当する位置のアミノ酸残基の変異を含むものである。好ましい変異位置は、タウ蛋白質のアミノ酸配列において、配列番号1の257位、260位、272位、279位、296位、301位、303位、305位、335位、337位、342位、369位、389位または406位に相当する位置であり、より好ましい変異位置は、タウ蛋白質のアミノ酸配列において、配列番号1の少なくとも301位に相当する位置である。このことは、変異位置が、配列番号1の301位に相当する位置のみであってもよいし、或いは、配列番号1の301位に相当する位置に加えて、上に特定した配列番号1の257位、260位、266位、272位、279位、280位、284位、296位、303位、305位、315位、317位、320位、335位、336位、337位、342位、352位、369位、389位および406位からなる群から選択される少なくとも1つの位置に

40

50



相当する位置のアミノ酸残基の変異を含んでもよいことを意味する。

前記変異は、置換または欠失である。置換の場合、タウ蛋白質の前記位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基、好ましくは自然変異体で認められたアミノ酸残基、に置換された変異であり、そのような置換の例は、配列番号1のアミノ酸配列においてK257T、I260V、L266V、G272V、N279K、L284L、N296H、P301L、P301S、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389RまたはR406Wのアミノ酸置換である。また、欠失の場合、自然変異体で認められたような欠失、例えば配列番号1の280位のKまたは296位のNの欠失である。本発明では、前記変異は、前記位置のうち1個もしくは複数個（例えば、数個（例えば2

10

～10の整数）の変異からなる。

本発明で好ましい変異は、前記301位のアミノ酸残基の置換であり、例えばP301S、P301LまたはP301Tのアミノ酸置換である。

本明細書で使用するアミノ酸置換に関する、例えば「P301S」という記載は、配列番号1のアミノ酸配列の301位のプロリン残基（P）がセリン残基（S）に置換されることを意味する。

301位の変異に関して、前頭側頭型痴呆の患者の発症年齢が比較的若く、発症すると進行が早いこと（Sperfeld AD et al., Ann Neurol. 1999 Nov; 46(5):708-715; Yasuda M et al., Neurology, 55:1224-1227, 2000）などが知られているため、この301位の変異に起因する若年年齢での発症や（一旦発症すると）進行が早いタウオパチーの治療や予防のターゲットとして301位の変異は重要であり、本発明のワクチンはそのようなタウオパチーに対し有効である。

20

<ベクター>

本発明のベクターは、上で説明した変異型タウ蛋白質をコードする核酸を含む。該変異型タウ蛋白質のN末端側には分泌シグナル配列が連結されており、これによって、細胞内に取り込まれたベクターが該核酸を発現し、細胞内の翻訳機構を利用して変異型タウ蛋白質前駆体に翻訳されたのち、細胞膜に移行され、シグナルペプチダーゼによりシグナル配列が切断され、該変異型タウ蛋白質が細胞外に分泌される。

分泌シグナル配列に連結された変異型タウ蛋白質をコードするDNAは、慣用の遺伝子組換え技術を用いて合成することができる。このような技術は、例えば、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、F. M. Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed., John Wiley & Sons (2002)などに記載されている。

30

変異型タウ蛋白質をコードするDNAは、例えば、タウ蛋白質遺伝子によってコードされるmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、該cDNAを適当なプラスミドベクターに組み込み、得られたベクターを鋳型にし、かつ、目的の変異を導入したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行って該変異を含むタウ蛋白質コード配列部分を増幅し、制限酵素処理して該配列部分を含むフラグメントを取得し、同じ制限酵素で処理した該プラスミドベクターに該フラグメントを組み入れたのち、これを鋳型にし、タウ蛋白質コード配列全長の増幅を可能にするプライマーを用いて同様にPCRを行い増幅することによって作製することができる。

40

PCRは、変性、アニーリングおよび増幅からなる3つのステップを1サイクルとし、これを約20～45サイクル行うことを含む。変性は、二本鎖DNAを一本鎖にするステップであり、92～98の温度で約30秒～2分間熱処理する。アニーリングは、一本鎖DNAにプライマーを結合するステップであり、50～65の温度で約10秒～60秒間処理する。増幅は、プライマーが結合した一本鎖DNAを鋳型にして相補鎖を合成するステップであり、約72の温度で約10秒～7分間処理する。サイクルを開始する前

50

に約94℃で約30秒～5分熱処理、またサイクルの終了後に、約72℃で約1分～10分の増幅反応をそれぞれ行うことができる。反応は、PCRバッファー、dNTPs (N = A, T, C, G)、耐熱性DNAポリメラーゼを用いて行う。耐熱性DNAポリメラーゼとしては、Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなどの市販のポリメラーゼを使用できる。PCRを自動で行うためのサーマルサイクラーなどの市販のPCR装置(宝酒造、Applied Biosystems、Perkin-Elmer、Bio-Radなど)を使用すると便利である。

分泌シグナル配列は、ヒト細胞内に存在するシグナルペプチダーゼによって切断可能な任意のシグナル配列である。そのようなシグナル配列には、細胞特異的なものも含まれる。分泌シグナル配列の例は、非限定的に、アミロイド前駆蛋白質 (APP) のシグナル配列をコードするDNA (NT\_011512.11、NW\_001838706.1、NM\_201414.1、NM\_201413.1、NM\_000484.2、NM\_001136130.1、NM\_001136129.1) : 5' - ggctctagaa tgctgcccggtttggcactgctcctgctggccgccctggacggctcggcgctt - 3' (配列番号2) (ここで、実際のAPPシグナル配列は開始コドンatg(下線)から始まる。また、その5'側のtctaga配列は制限酵素サイトである。)、CD59のシグナル配列をコードするDNA (NM\_001127227.1、NM\_001127226.1、NM\_000611.5、NM\_203331.2、NM\_001127225.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2、NM\_001127223.1) : 5' - atgggaatccaaggagg tctgtcctgttcgggctgctgctcgtcctggctgtctctgccattcagggtcatagc - 3' (配列番号3) などである。

分泌シグナル配列をコードするDNAと変異型タウ蛋白質をコードするDNAを5'側からこの順に連結し、この連結体を鋳型にしてPCR増幅し、適当な制限酵素で消化したのちプラスミドベクターにサブクローニングする。

上記手法で使用可能なプラスミドベクターは、クローニング用ベクターのいずれでもよい。そのようなベクターの例は、非限定的にpBluescript系、pUC系、pBR系、pET系などである。

上記のようにして得られた分泌シグナルが連結された変異型タウ蛋白質をコードする核酸を搭載するためのベクターは、ヒト細胞等の哺乳動物細胞内で該核酸の発現を可能にするものであればいずれのものでもよく、例えば遺伝子治療用のプラスミド、ウイルスベクターなどが含まれる。

遺伝子治療用プラスミドには、非限定的に、例えばpBK-CMV、pcDNA3.1、pZeoSV (インビトロジェン社、ストラタジーン社)、pCAGGS (ジーンブリッジ社)などが含まれる。

遺伝子治療用ウイルスベクターには、非限定的に、例えばセンダイウイルス (SeV) ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、複製欠損レトロウイルスベクター、麻疹ウイルスベクター、狂犬病ウイルスベクター、インフルエンザウイルスベクター、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) ベクター、水疱性口内炎ウイルス (VSV) ベクター、ワクシニアウイルスベクター、シンドビスウイルスベクターなどが含まれる。それらの複製欠陥型などの安全性の高いベクターが好ましい。

本発明では、上記のいずれのベクターも使用できるが、好ましく使用しうるベクターは、プラスミドベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターであり、そのうち特に好ましいウイルスベクターは、センダイウイルスベクターである。

ベクターには、外来DNAの発現に必要な真核生物細胞内で作動可能なプロモーター、例えばCMV IE、デクチン-1、デクチン-2、ヒトCD11c、F4/80、MHCクラスIIなどの各プロモーターが挿入されてもよい。このエレメントの他に、エンハンサー、複製開始点、リボソーム結合部位、ターミネーター、ポリアデニル化部位などの

10

20

30

40

50

調節配列、薬剤耐性遺伝子などの選択マーカーなどが、ベクターに含まれる。

また、前記ベクターは、目的核酸が恒常的に、自律的に、または誘導的に発現可能であるいずれのベクターでもよいが、安全性の面で核酸が自律的に発現されるベクターが好ましい。

センダイウイルスベクターは、遺伝子発現率が比較的高いうえに、染色体挿入変異による発癌リスクがないという高い安全性を有している。このベクターは、細胞核内に入らず細胞質内で複製し外来蛋白質の高いレベルでの発現を可能にする。

センダイウイルスにおいて自律的複製に關与する遺伝子は、NP、P/CおよびL遺伝子であり、また伝播性に關与する遺伝子は、M、FおよびHN遺伝子であることが知られている。このウイルスをベクターとして利用する場合には、前記の遺伝子類が備わっていてもよいし、その一部の遺伝子、例えばF遺伝子、M遺伝子、HN遺伝子などが欠損していてもよい(蛋白質・核酸・酵素 Vol. 51, 27-37, 2006)。特に宿主細胞への侵入に關与する膜融合蛋白質であるF蛋白質の遺伝子を欠損することによって高い安全性が確保される(特開2009-268471、特表2008-536476、WO 00/70070)。

センダイウイルスの前記遺伝子のヌクレオチド配列は、以下のとおりGenBank等に登録されている(特表2008-536476)。

NP遺伝子について、M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218など。

P遺伝子について、M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008など。

L遺伝子について、D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886など。

M遺伝子について、D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056など。

F遺伝子について、D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131など。

HN遺伝子について、D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131など。

また、センダイウイルスゲノムcDNAは、例えばYu, D. et al., *Gene Cells* 2: 457-466, 1997、Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997などに記載の方法に従って構築することができる。さらに、該cDNAからのウイルスの再構成は、WO 97/16539; WO 97/16538; WO 00/70055; WO 00/70070; WO 01/18223; WO 03/025570; 特表2008-536476; Tokusumi, T. et al., *Virus Res.* 86: 33-38 (2002); Li, H. et al., *J. Virol.* 74: 6564-6569 (2000)などに記載された方法に従って行うことができる。ウイルスベクターを再構成するために使用できる宿主細胞として、例えばサル腎臓由来のLLC-MK2細胞(ATCC CCL-7)およびCV-1細胞(例えばATCC CCL-70)、ハムスター腎臓由来のBHK細胞(例えばATCC CCL-10)などの培養細胞、ヒト由来の293T細胞などが知られており、さらに大量のウイルスベクターを得るために、上記の宿主細胞から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させて増幅し、精製することができる(特表2008-536476、WO 00/70055、WO 00/70070)。回収されたウイルスの力価は、例えばCIU(Cell-Infectious Unit)または赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる(WO 00/70070)。

F遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの再構成についても、WO 00/70055、WO 00/70070、特表2008-536476などに記載された方法に従っ

10

20

30

40

50

て行うことができる。このとき、センダイウイルスF蛋白質を発現するヘルパー細胞株を樹立し、これを用いてF遺伝子欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収する。

後述の実施例によれば、上記の方法を参考にしながら、F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（Z株）のcDNAを制限酵素NotIで消化し、分泌シグナル配列（例えば、APPシグナル配列またはCD59シグナル配列）と変異型タウ蛋白質（TAU（P301S））の結合フラグメントをセンダイウイルスヌクレオカプシド（NP）蛋白質遺伝子の転写開始配列と翻訳領域（ORF）の間の非翻訳領域に挿入することで、変異型タウ遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（Sev-TauP301S）を構築する。実際に構築したセンダイウイルスベクター再構成用プラスミドは、pcDNA3-APP-TauP301S（図14）であり、分泌シグナル配列の5'末端には開始コドン（atg）を結合し、さらに開始コドンの前にコザック（kozak）のコンセンサス配列（例えばgccaccまたはccacc）を連結してもよい。ベクターの再構成のために、センダイウイルスF蛋白質を発現するヘルパー細胞株を使用する（WO 00/70070）。

アデノウイルスベクターの場合には、E1領域欠失型アデノウイルスベクターを使用することができる。E1領域に加えてE3領域も欠損されてよいが、E3領域の欠損はかならずしも必須ではない。アデノウイルスベクターに関しては、特開2008-017849、特開2000-166581、特表2003-518915、Hitt, M.ら, 「Construction and propagation of human adenovirus vectors」In Cell Biology: A Laboratory Handbook (Celis, J. E. ed.), Third Ed., Vol. 1, Academic Press (2005)、Hitt, M.ら, 「Techniques for human adenovirus vector construction and characterization」In Methods in Molecular Genetics (Adolph, K. W. ed.), Vol. 7, Academic Press (1995)などに記載されている。

その他のウイルスベクターについても、遺伝子治療用に改良されたベクターが文献に記載されているので、本発明のために利用しうる。

#### <ワクチン>

本発明のワクチンは、タウオパチーの予防または治療のために使用することができる。該ワクチンは、被験者において変異型タウ蛋白質の直接投与と比べてより持続的にタウ蛋白質（リン酸化されていてもよい。）に対する抗体を誘導することができる（図4、図6参照）。

本発明のワクチンは、被験者の脳内のミクログリアを活性化し、これによって変異型タウ蛋白質を貪食する。タウオパチーの原因物質である変異型タウ蛋白質がミクログリアによってクリアランスされることによって、該蛋白質の蓄積が阻害され、タウオパチーの症状の進行が抑制される。

本発明のワクチンは、タウオパチーモデルマウス（P301S Tauトランスジェニックマウス）でのin vivo試験によって、タウオパチー、とりわけタウオパチー型認知症の改善作用を有することが明らかになった。すなわち、認知症で認められる記憶力低下や社交性の欠如が、本発明のワクチンを接種することによって改善されたが、この改善効果は組換え変異型タウ蛋白質を接種したときには認められなかったため、本発明のワクチンの優位性が確認された。また、本発明のワクチンは、組換え変異型タウ蛋白質と同様に、認知症でよく見られる多動（落ち着きのなさ）に対する改善効果が認められた。このように、本発明のワクチンは、認知症で認められる記憶力低下および/または社会的行動異常および/または不安様行動異常および/または記憶障害の改善効果を有する。

本発明のワクチンは、上記の効能を有するために、タウオパチー、とりわけアルツハイマー病、FTDP-17（第17番染色体に関連したパーキンソン症を伴う前頭側頭型認知症）、ダウン症候群、ピック病、パーキンソン認知症複合、神経原線維変化優位型認知症、ボクサー認知症、進行性核上性麻痺、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、

10

20

30

40

50

脳炎後パーキンソニズム、亜急性硬化性全脳炎、筋緊張性ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、グアム島筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム複合、紀伊半島の神経原線維変化を伴う筋萎縮性側索硬化症などの疾患の予防または治療のために使用できる。

本発明のワクチンは、必要に応じて、薬学上許容される担体および添加剤、例えば生理食塩水、リンゲル液、緩衝液、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、保存剤などを含むことができる。また、免疫原性を高めるためのアジュバントをワクチンに添加してもよい。アジュバントとして、例えばアルミニウム塩 ( a l u m )、サポニン類、ムラミル ( ジ ) ペプチド、サイトカイン類 ( I L - 2 , 4 , 6 , 等 )、コレラ毒素、サルモネラ毒素などの免疫促進剤が含まれる。

本発明のワクチンの接種は、皮下、皮内、鼻腔内、筋内、静脈内、腹腔内などの投与経路で行うことができる。好ましい製剤は、注射剤、吸入剤などである。吸入剤は、用量を量りとして吸入可能にする吸入装置内に封入されうる。投与量は、被験者 ( 哺乳動物、好ましくは、ヒト ) の症状、重症度、年齢、性別、体重などに応じて臨床医が適宜判断すべきであるが、ワクチンの形態や投与方法などにより変動し得るが、非限定的に、ウイルスベクターの場合、例えば  $10^4 \sim 10^{14}$  p f u ( プラーク形成単位 )、好ましくは  $10^5 \sim 10^{13}$  p f u、より好ましくは  $10^6 \sim 10^{11}$  p f u であるか、あるいは、 $10^5 \sim 10^9$  C I U ( 細胞感染単位 ) であるし、また、プラスミドベクターの場合、例えば約  $1 \mu g \sim 500 \mu g$  であり、いずれにしてもワクチン効果が発揮されるのであれば上記の範囲外であってもよい。

また、細胞膜の透過を促進するためにリポソームを利用することも可能である。リポソームとして好ましいものがカチオン性リポソームである。カチオン性リポソームは、プラスミド DNA の細胞内送達を媒介することが示されている ( Nature 337 : 387 ( 1989 ) )。カチオン性リポソームはまた、膜透過性ペプチドを結合することによって細胞内送達を容易にすることができる。リポソームについては、例えば Brigham, Am. J. Med. Sci., 298 : 278 ( 1989 )、Osaka, J. Pharm. Sci., 85 ( 6 ) : 612 - 618 ( 1996 )、San, Human Gene Therapy, 4 : 781 - 788 ( 1993 )、Senior, Biochemica et Biophysica Acta, 1070 : 173 - 179 ( 1991 )、Kabanov and Kabanov, Bioconjugate Chem. 1995 ; 6 : 7 - 20、Remy, Bioconjugate Chem., 5 : 647 - 654 ( 1994 ) ; Behr, J - P., Bioconjugate Chem., 5 : 382 - 389 ( 1994 )、Wyman, Biochem., 36 : 3008 - 3017 ( 1997 ) などの文献を参照することができる。

【実施例】

【0008】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらの実施例によって制限されないものとする。

[実施例1]

変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの構築

1) 分泌シグナルシーケンスとタウ蛋白を発現するセンダイウイルスベクターの構築  
分泌型シグナルシーケンスはアミロイド前駆蛋白 ( A P P , Genbank accession number : NT\_011512.11, NW\_001838706.1, NM\_201414.1, NM\_201413.1, NM\_000484.2, NM\_001136130.1, NM\_001136129.1 ) を基に、以下の配列を用いた。

5' -ggctctagaatgctgcccggtttggcactgctcctgctggccgctggacggctcgggcgctt-3 ( 配列番号 2 )

変異型タウ蛋白 ( T a u P 3 0 1 S ) の c D N A はヒト 1 N 4 R 型タウ蛋白 ( G e n b

10

20

30

40

50

ank accession number: NM\_001123067.2) の塩基配列に変異が入ったもの [ NM\_001123067.2 に記載のアミノ酸配列の 272 位 (配列番号 1 の 301 位に相当する位置) のプロリン (P) のコドンからセリン (S) のコドンへの変異; 配列番号 13 の 884 ~ 886 位のセリンコドン (tcg) ] を鋳型とし、以下のプライマーを用い PCR にて増幅した。

5' 側 Forward primer: gctgagccccgccaggag (配列番号 4)

3' 側 Reverse primer: tcacaaaccctgcttgccag (配列番号 5)

A P P 分泌シグナルと PCR で増幅したタウ蛋白の c D N A を結合し、これを鋳型として以下のプライマーを用いて PCR を行った。

5' 側 Forward primer: aaagaattcggcttggtctagaatgctgcccggtttggcac (配列番号 6)

3' 側 Reverse primer: aaagaattctcacaaaccctgcttgccag (配列番号 7)

得られた PCR 産物を制限酵素 E c o R I で消化し、次いで p c D N A 3 ( I n v i t r o g e n ) にサブクローニングした。

変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの構築は、Li らの報告 ( L i H e t a l . J . V i r o l o g y . 7 4 . 6 5 6 4 - 6 5 6 9 ( 2 0 0 0 ) ; W O 0 0 / 7 0 0 7 0 ) に記載の方法に準じて行った。F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクター ( Z 株 ) の c D N A を制限酵素 N o t I で消化し、分泌シグナルシークエンスと変異型タウ蛋白の結合フラグメントをセンダイウイルスヌクレオカプシド ( N P ) 蛋白遺伝子の転写開始配列と翻訳領域の間の非翻訳領域に挿入することで、変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターを構築した。

なおコントロールとして用いる、E G F P を発現する F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターも p T R E S 2 - E G F P v e c t o r ( C l o n e t e c h ) の E G F P 部分を用いて構築した。

2) 変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの再構成と増幅

F 遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの再構成は前出の Li らの報告 ( L i H e t a l . J . V i r o l o g y . 7 4 . 6 5 6 4 - 6 5 6 9 ( 2 0 0 0 ) ; W O 0 0 / 7 0 0 7 0 ) を参考に実施した。該センダイウイルスベクターは F 遺伝子欠失型であるため、F 蛋白を発現するパッケージング細胞を使用し、変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクター (以下、「S e v - T a u P 3 0 1 S」という。) 及び E G F P 遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクター (以下、「S e v - G F P」という。) を作製した。

[ 実施例 2 ]

変異型タウ遺伝子を搭載したプラスミドベクターの構築

1) 分泌シグナルシークエンスとタウ蛋白を発現するプラスミドベクターの構築

分泌シグナルシークエンスは C D 5 9 蛋白 ( G e n b a n k a c c e s s i o n n u m b e r : N M \_ 0 0 1 1 2 7 2 2 7 . 1 、 N M \_ 0 0 1 1 2 7 2 2 6 . 1 、 N M \_ 0 0 0 6 1 1 . 5 、 N M \_ 2 0 3 3 3 1 . 2 、 N M \_ 0 0 1 1 2 7 2 2 5 . 1 、 N M \_ 2 0 3 3 2 9 . 2 、 N M \_ 2 0 3 3 3 0 . 2 、 N M \_ 0 0 1 1 2 7 2 2 3 . 1 ) の塩基配列のうち、以下の配列を用いた。

5' -atgggaatccaaggagggtctgtcctgttcgggctgctgctcgtcctggctgtcttctgccattcagg  
tcatagc-3' (配列番号 3)

変異型タウ蛋白 ( T a u P 3 0 1 S ) の c D N A はヒト 1 N 4 R 型タウ蛋白 ( G e n b a n k a c c e s s i o n n u m b e r : N M \_ 0 0 1 1 2 3 0 6 7 . 2 ) の配列に

10

20

30

40

50

変異が入ったもの [ NM\_001123067.2 に記載のアミノ酸配列の 272 位 ( 配列番号 1 の 301 位に相当する位置 ) のプロリン ( P ) のコドンからセリン ( S ) のコドンへの変異 ; 配列番号 12 の 898 ~ 900 位のセリンコドン ( a g t ) ] を鋳型とし、以下のプライマーを用い PCR にて増幅した。なお、本プラスミドベクターに搭載した変異型タウは、センダイウイルスベクターに搭載した変異型タウと区別するために、異なったセリンコドンの配列を有するようにした。

5' 側 Forward primer: gctgagccccgccaggag ( 配列番号 8 )

3' 側 Reverse primer: tcacaaaccctgcttgccag ( 配列番号 9 )

CD59 分泌シグナルと PCR で増幅したとタウ蛋白の cDNA を結合し、これを鋳型として以下のプライマーを用いて PCR を行った。

5' 側 Forward primer: ttgaattgccaccatgggaatccaaggag ( 配列番号 10 )

3' 側 Reverse primer: aattctcgagtcacaaaccctgcttgcc ( 配列番号 11 )

得られた PCR 産物を制限酵素 *EcoRI* と *XhoI* で消化し、次いで p cDNA 3.1 (+) プラスミドベクター ( Invitrogen ) のマルチプルクローニングサイトを制限酵素 *EcoRI* と *XhoI* で消化し、それぞれの切断部位間に挿入した。

#### 2) 変異型タウ遺伝子搭載プラスミドベクターの増幅

プラスミドベクターの増幅は Invitrogen 社発行の p cDNA 3.1 製品取り扱い説明書を基に以下の要領で行った。大腸菌 DH5 株をプラスミドベクターでトランスフォーメーションした。次に LB - アンピシリン培地に播種し、単クローン毎に少量培養を行って純粋化した。Nucleobond プラスミド精製キット ( MACHERY Y - NAGEL ) にてプラスミドを抽出し、シークエンスを行い正しく複製されているかを確認し、有効なクローンを選択した。マウスに接種するプラスミドベクターの増幅は、選択したクローンの大量培養にて行い、プラスミドの抽出にはエンドトキシンフリーグレードの Nucleobond プラスミド精製キットを用いた。

#### [ 実施例 3 ]

#### 変異型タウ遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターによるインビボ試験

##### 1) GFP 発現 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターのマウスへの経鼻投与

3 か月齢のタウオパチーモデルマウス ( P301S Tautransジェニックマウス ) ( Yoshiyama, Y, et al. Neuron 53, 337 - 351 ( 2007 ) ; University of Pennsylvania Dr. Trojanowski より供与 ) を用い、本発明の GFP 搭載 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクター ( 以下、 「 Sev - GFP 」 という。 ) の経鼻投与を行い、感染効率の検討を行った。

マウス 1 匹あたり、Sev - GFP  $5 \times 10^6$  CIU を投与し、1 週間後鼻粘膜における GFP の発現を多目的顕微鏡 ( BZ - 9000, Keyence ) にて蛍光像と明視野像の撮影を行って解析した。

解析の結果、鼻粘膜の広い範囲に GFP の発現が認められ、センダイウイルスベクターの経鼻投与が有効であることが確認された ( 図 1 ) 。

##### 2) Sev - Tau P301S 接種によるリン酸化タウ蛋白発現抑制効果 ( その 1 )

Sev - Tau P301S  $5 \times 10^6$  CIU / 匹を 3 か月齢のタウオパチーモデルマウスに経鼻 ( 鼻腔内 ) 投与し、投与 5 カ月後で解剖し、海馬冠状の組織切片を調製した。コントロールワクチンとして Sev - GFP を用いた。なお上記 2 つのグループでは、それぞれ 13 頭、11 頭のタウオパチーモデルマウスへの接種を行った。

リン酸化タウの発現レベルを測定するために、海馬の組織切片において免疫染色を行った。マウス海馬冠状断面において抗リン酸化タウタンパク抗体 ( AT8, Innogen

10

20

30

40

50

etics)を反応させ、洗浄後、2次抗体としてビオチン標識ウマ抗マウスIgG抗体(Vector)を用いた免疫染色を行った。免疫染色後、海馬CA3領域において蓄積した領域の面積を多目的顕微鏡(BZ-9000, Keyence)付属解析ソフトで測定した。Sev-GFP群、Sev-TauP301S群それぞれ平均値±標準誤差、統計学的解析はStudentのt検定で行った。その結果、Sev-GFP投与群に比べ、Sev-TauP301S投与群では、海馬におけるリン酸化タウの発現の抑制が示唆された(図2)。

### 3) Sev-TauP301S接種によるリン酸化タウ蛋白発現抑制効果(その2)

Sev-TauP301S、もしくはSev-GFP接種によるタウ蛋白の発現抑制効果を、海馬由来の蛋白質を用いてウエスタンブロット法により解析を行った。

ウエスタンブロット法の方法は以下の通りである。RAB-HSバッファにて海馬組織をホモジナイズ後、4℃、50,000×g、40分で遠心し、上清をSDS処理し、1サンプルあたり15μgをSDS-PAGEにて泳動した。泳動後PVDF膜に転写し、抗リン酸化タウタンパク抗体(AT8, Innogenetics)を反応させ、洗浄後2次抗体としてHRP標識ヒツジ抗マウスIgG抗体(GE Healthcare)を用い、ECL(GE Healthcare)による化学発光にて検出した。リン酸化タウ蛋白の評価後、Stripping solution(Nakalai)で抗体を剥離後、抗-actin抗体(SIGMA)を用いて再度同様の方法で検出した。

蓄積したリン酸化タウタンパク量は、バンドの信号強度を画像解析ソフト(NIH Image, Ver. 1.63, NIH, US)で測定し、内部コントロールタンパクである-actinと信号強度の比をとって定量化した。コントロールワクチン(Sev-GFP)接種群、タウワクチン(Sev-TauP301S)接種群それぞれ平均値±標準誤差、統計学的解析はStudentのt検定で行った。その結果、Sev-GFP接種群に比べ、Sev-TauP301S接種群では、海馬におけるリン酸化タウの発現が抑制されていることが明らかになった(図3)。

### 4) 海馬におけるリン酸化タウに反応する抗体の誘導

組織のタウに反応する血清中抗体価はSev-TauP301Sを投与していないタウオパチーモデルマウス海馬組織に対する反応性で評価した。Sev-TauP301SまたはSev-GFP(各 $5 \times 10^6$  CIU/匹)を投与したマウスの血清をそれぞれ30倍、100倍、300倍、1000倍、3000倍に希釈して4℃で一晩、タウオパチーモデルマウス海馬組織切片に反応させた後、Alexa546標識抗マウスIgG抗体(Invitrogen)を室温、1時間で反応させて検出した。各マウスの抗体価は組織との反応が見られた最大希釈倍率で評価した。Sev-GFP接種群、Sev-TauP301S接種群それぞれ平均値±標準誤差、統計学的解析はMann-WhitneyのU検定で行った。

その結果、Sev-TauP301S接種マウス由来の血清を反応させた場合、Sev-GFPを投与したマウス由来の血清と比べて海馬で反応する抗体価は有意に高かった。以上の結果から、Sev-TauP301Sを接種することにより血清中に産生される抗体がリン酸化タウを発現する海馬に反応することが確認された(図4a, 4c)。

### 5) Sev-TauP301S接種による脳内のミクログリアの活性化

Sev-TauP301S接種による脳内の神経免疫担当細胞であるミクログリアの変化について確認するために実験を行った。

Sev-TauP301S  $5 \times 10^6$  CIU/匹を3カ月齢のタウオパチーモデルマウスに接種し、接種5カ月後脳組織を取り出し、海馬の組織切片を作成し、免疫染色を以下のように行った。

マウス海馬冠状断面において抗Iba1抗体(WAKO)を4℃、一晩反応させ、洗浄後、二次抗体としてAlexa488標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Invitrogen)、また組織中マウスIgG検出のため、Alexa546標識抗マウスIgG抗体(Invitrogen)を合わせて室温、1時間で反応させ、蛍光2重免疫染色で検出した。免疫染色後、海馬CA3領域を多目的顕微鏡(BZ-9000, Keyence)に

10

20

30

40

50



て蛍光像を撮影した。その結果、コントロールである *Sev* - *GFP* 投与群に比べ *Sev* - *TauP301S* 投与群では、海馬において *Iba1* 陽性細胞が数多く認められ、それらの陽性細胞の多くは抗マウス *IgG* 抗体と共染色されていた。この *Iba1* (*Ionized calcium binding adapter molecule 1*) はミクログリアの活性化に伴いその発現量が増加することから、*Iba1* はミクログリアの活性化に係る分子であることが報告されており (*Itō D. et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 57. 1 - 9, 1998*)、さらにマウス *IgG* が組織中の *TauP301S* を認識していると考えられることから、*Sev* - *TauP301S* の接種にてミクログリアの *TauP301S* に対する反応が活性化したものと考えられた (図5)。

10

タウワクチン接種によるミクログリアの活性化上昇については、1) 末梢血中においてマクロファージが抗原提示を受けて活性化し、血液脳関門を通過して脳に集まり活性化ミクログリアとなり、変異タウタンパク質を貪食している、あるいは2) 変異タウタンパク質が血液脳関門を通過し、脳においてミクログリアが直接抗原提示を受けて活性化し、変異タウタンパク質を貪食している、可能性が示唆された。

#### 6) リコンビナントリン酸化タウ蛋白を抗原とした ELISA

*Sev* - *TauP301S* を接種した結果、血清中に産生される抗体がリン酸化タウ特異的な抗体であるかを確認するために、リコンビナント変異型タウタンパク (*TAUP301S*) を抗原とした ELISA を行った。

リコンビナント変異型タウタンパクの作製は、坂上ら (*Sakaue F et al. J. Biol. Chem. 280. 31522 - 31529, 2005*) の方法に基づき行った。具体的には、*TauP301S* (*1N4R* 型) を組み込んだ *pRK172* ベクターを大腸菌 (*BL21-DE3* 株) に発現させ、菌体からホスホセルロースカラム (*P11*)、50% 硫酸アンモニウム沈殿、熱処理、さらに逆相 HPLC により精製し、凍結乾燥し 4 で保存した。

20

血清中の抗リン酸化タウ抗体の産生については、以下の ELISA 法により解析した。前述の方法で作製したリコンビナント *TAUP301S* タンパク ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{well}$ ) を  $96 \text{ well}$  プレートに 4 、一晩で固相化させた。

血清は、*Sev* - *TauP301S*、または *Sev* - *GFP* を接種する直前、及び接種後 1 ヶ月目において、接種マウスから採取したものを 50 倍希釈したものをを用い、室温で 2 時間プレートに入れて反応させた。反応後、洗浄を経て、HRP 標識ヒツジ抗マウス *IgG* 抗体 (*GE Healthcare*) を、室温で 1 時間反応させた。反応後洗浄し、*Opti-EIATMB Substrate Reagent Set* (*BD*) で発色させ、450 nm の波長での吸光度測定により定量化した。測定の陽性対照血清にはリコンビナント *TAUP301S* タンパクを皮下接種したマウス血清を用いて段階希釈し、血清原液での抗体価を 1,000 単位として作成した吸光度 - 単位間での検量線を用いて吸光度を単位へと変換した。このようにして求めたそれぞれのマウスの接種後の単位量により抗体価の上昇を評価した。この ELISA の結果、*Sev* - *TauP301S* を接種することにより血清中に抗リン酸化タウ抗体が多く産生されることが確認できた (図6a)。

30

40

リコンビナントタンパクを接種したマウスにおいてタウ特異的な抗体産生が顕著なのは接種してから間もない時期における血中に存在する変異型タウタンパク質の量が多く、変異型タウタンパク質に曝露される抗原提示細胞の数が多いためと考えられた。

また脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白の量は、以下の方法により測定した。

$96 \text{ well}$  プレートは、あらかじめ  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  抗リン酸化抗体 (*AT8* 抗体) にて 4 で一晩コーティング処理しておく。*Sev* - *TauP301S*、または *Sev* - *GFP* を接種したマウスから採取した脳脊髄液 (*CSF*) を 50 倍希釈し、各  $\text{well}$  に加え反応させた。陽性対照として、14 カ月齢のタウオパチーモデルマウスの脳をホモジナイズし得られた液を 100 ~ 102400 倍に段階希釈したものをを用いた。2 次抗体として、ウサギ抗ヒトタウタンパク抗体、その後ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ *IgG* F

50

( a b ' )<sub>2</sub> 抗体を反応させ、T e t r a m e t h y l B e n z i d o n e 液を用いて発色させた。

450nmの吸光度は自動プレートリーダー ( M o d e l 353 ; T h e r m o S c i e n t i f i c , J a p a n ) により計測した。その結果、S e v - T a u P 3 0 1 S 接種したタウオパチーモデルマウスの脳脊髄液中にリン酸化タウタンパクが高濃度に認められた ( 図 6 b ) 。

#### 7) マウス行動解析

すべての行動実験は京都大学医学研究科動物実験委員会 ( 京都、日本 ) より承認を受けた上で行った。本実験で使用したタウオパチーモデルマウス ( P 3 0 1 S T a u トランスジェニックマウス ) にタウワクチンを投与することにより、認知症患者で認められる行動学的異常 ( 記銘力低下、社交性の欠如、不安様行動、多動、活動量、空間学習、参照記憶、感覚中枢、聴力等 ) の改善効果を以下の方法にて評価した。

( 1 ) タウオパチーモデルマウスへの S e v - T a u P 3 0 1 S 接種による新奇環境下での社会的行動テスト ( S o c i a l i n t e r a c t i o n t e s t )

S o c i a l i n t e r a c t i o n t e s t は新奇場面での行動評価に用いられるテストである。

S e v - T a u P 3 0 1 S を接種 (  $5 \times 10^6$  C I U / 匹 ) したタウオパチーモデルマウス、または S e v - G F P を接種 (  $5 \times 10^6$  C I U / 匹 ) したタウオパチーモデルマウスを接種後3カ月目に、これまで同じケージにいたことのないマウスと1匹ずつ1つの箱 (  $40 \times 40 \times 30$  c m ) の中に入れて、10分間自由に探索させた。社会的行動は C C D カメラ ( S o n y D X C - 151A ) を通じてモニターされ、画像をコンピューターに取り込み I m a g e S I ソフトウェアを用いて自動的に、接触回数、1接触あたりの平均時間、移動距離を測定した。解析を行ったところ、S e v - T a u P 3 0 1 S を接種したタウオパチーモデルマウスは、S e v - G F P が投与されたタウオパチーモデルマウスに比べ、見知らぬマウスに対し接触した時間が長かった。この解析により、社会的行動、また新たなマウスの出現に対する対応能力の改善効果が認められた ( 図 7 A ) 。

( 2 ) タウオパチーモデルマウスへの S e v - T a u P 3 0 1 S 接種による社会的行動測定テスト ( C r a w l e y v e r s i o n )

社会的行動測定テスト ( C r a w l e y ' s s o c i a l i n t e r a c t i o n t e s t ) は別々のマウスに対する記銘力、社会的関係の形成、社交性の評価に用いられるテストである。

装置は、パネルにより3つの空間に仕切られており、両端の空間の一隅には小さなかごがそれぞれ1つずつ設定されている。これまで同じケージにいたことのないマウスをかごの中に入れ、その後 S e v - T a u P 3 0 1 S (  $5 \times 10^6$  C I U / 匹 ) または S e v - G F P を (  $5 \times 10^6$  C I U / 匹 ) タウオパチーモデルマウスに接種し、接種後3カ月目のマウスをかごの外におき、10分間の間そのまま放置した。10分後、他方のかごに別のこれまで同じケージにいたことのないマウスを入れた後、S e v - T a u P 3 0 1 S 接種、あるいは S e v - G F P 接種タウオパチーモデルマウスが既に10分間いたマウス ( F a m i l i a r S i d e ) 、新しくきた見知らぬマウス ( S t r a n g e r S i d e ) のどちらのマウスの近傍に長く滞在するか、滞在時間を測定することで社会的行動の評価を行った。

その結果、S e v - G F P 接種タウオパチーモデルマウスでは、F a m i l i a r S i d e での滞在時間が長かったのに比べ、S e v - T a u P 3 0 1 S を接種したタウオパチーモデルマウスは、S t r a n g e r S i d e での滞在時間が長く、社会的行動、また別々のマウスに対する記銘力の改善効果が認められた ( 図 7 B ) 。

( 3 ) タウオパチーモデルマウスへの S e v - T a u P 3 0 1 S 接種による高架式十字型迷路テスト

高架式十字型迷路は不安様行動を評価するための装置であり、同じ大きさの2つのオープンアームと高さ15cmの透明な壁がついた2つのクローズドアームで構成されている。クローズドアームには高さ15cmの透明な壁が付けられている。

10

20

30

40

50

アームおよび中心の正方形の部分は白いプラスチック板で出来ており、床から50cmの高さに位置している。Sev-TauP301S(5×10<sup>7</sup>CIU/匹, 1週間毎に計3回)を接種したタウオパチーモデルマウスまたは同力価のSev-GFPをタウオパチーモデルマウスに接種し、接種後3カ月目のマウスをそれぞれ迷路中心の正方形の部分(5×5cm)に、クローズドアームの方を向くように置いて、10分間行動を記録した。迷路中心から各4方向へのすべての出入り回数(A)、柵のない方向への出入りの回数の割合(B)、マウスの総移動距離(C)、柵のない場所への滞在時間の割合(D)をImage EPソフトウェアを用いて自動的に計測した。Sev-TauP301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは、柵のない場所への滞在時間が有意に少なくなっており、不安様行動、また落下の危険に対する判断力の改善が認められた(図8D)。

10

(4) タウオパチーモデルマウスへのリコンビナントタウ蛋白接種によるオープンフィールド試験

オープンフィールド試験は、活動量や情動性を測定するためのテストである。

リコンビナントタウ蛋白(TAUP301S)100μg/匹/回、2週間毎に計3回Adj-Phosアジュバント(Gentaur社)とともにタウオパチーモデルマウスに皮下接種し、接種後1カ月目にオープンフィールド試験を行った。接種マウスを高さ30cmの柵がついた40cm四方のオープンフィールド試験用装置(Accuscan Instruments)にマウスを入れ、120分間の自由行動を5分間毎に区切って移動距離(A)、背伸びの回数(B)、フィールド中央での滞在時間(C)、常同性行動(D)を評価した。TAUP301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは有意に移動距離が短くなっており、多動(落ち着きのなさ)の改善効果が認められた(図9A)。

20

(5) タウオパチーモデルマウスへのリコンビナントタウ蛋白接種による高架式十字型迷路テスト

リコンビナントタウ蛋白(TAUP301S)100μg/匹/回、2週間毎に計3回Adj-Phosアジュバント(Gentaur社)とともにタウオパチーモデルマウスに皮下接種し、接種後1カ月目に高架式十字型迷路の解析を行った。接種マウスを、それぞれ迷路中心の正方形の部分(5×5cm)に、クローズドアームのほうを向くように置いて、10分間行動を記録した。中央から各4方向へのすべての出入り回数(A)、柵のない方向への出入りの回数の割合(B)、マウスの総移動距離(C)、柵のない場所への滞在時間の割合(D)をImage EPソフトウェアを用いて自動的に計測した。TAUP301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは、コントロール(アジュバント投与)のマウスの結果にくらべて、高架式十字型迷路解析においては大きな違いは認められなかった(図10)。

30

(6) タウオパチーモデルマウスへのDNA-Tau P301S接種によるオープンフィールド試験

cDNA-Tau P301Sを100μg/匹/回、毎週計6回、次いで2週間毎に計3回、合計9回、開始の時点で5ヶ月齢のタウオパチーモデルマウス左後肢大腿筋に筋肉内接種し、接種後1カ月目にオープンフィールド試験を行った。接種マウスを高さ30cmの柵がついた40cm四方のオープンフィールド試験用装置(Accuscan Instruments)にマウスを入れ、120分間の自由行動を5分間毎に区切って移動距離(A)、背伸びの回数(B)、フィールド中央での滞在時間(C)、常同性行動(D)を評価した。cDNA-Tau P301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは移動距離が短くなっていることが明らかになり、多動(落ち着きのなさ)の改善効果が認められた(図11A)。

40

(7) タウオパチーモデルマウスへのcDNA-Tau P301S接種による新奇環境下での社会的行動テスト

cDNA-Tau P301Sを100μg/頭/回、毎週計6回、次いで2週間毎に計3回、合計9回、開始の時点で5ヶ月齢のタウオパチーモデルマウス左後肢大腿筋に筋肉内接種し、接種後1カ月目にこれまで同じケージにいたことのないマウスと1匹ずつ1つの箱(40×40×30cm)の中に入れて、10分間自由に探索させた。社会的行動

50

はCCDカメラ(Sony DXC-151A)を通じてモニターされ、画像をコンピューターに取り込みImage S Iソフトウェアを用いて自動的に、接触回数、1接触あたりの平均時間、移動距離を測定した。解析を行ったところ、cDNA-Tau P301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは、コントロールであるpcDNA3.1(ATG-) (以下cDNA-Empty)を接種したタウオパチーモデルマウスに比べ、見知らぬマウスに対し接触した時間が有意に短く( $p = 0.0164$ , Studentのt検定)になっていた(図12A)。また、cDNA-Tau P301Sを接種したタウオパチーモデルマウスは、cDNA-Emptyを接種したタウオパチーモデルマウスに比べ、移動距離も短くなっていた。(図12B)。結果として、オープンフィールド試験と同様にcDNA-Tau P301S接種により多動に対する改善が認められた。

10

(8) タウオパチーモデルマウスへのSev-Tau P301S接種によるバーズ迷路試験

バーズ迷路試験は、空間学習や参照記憶を調べるためのテストである。1枚の円状の板の上に12個の穴があいており、そのうちの1個のみの穴の下に暗箱がおいてある。Sev-Tau P301S( $5 \times 10^6$  CIU/匹)またはSev-GFPを( $5 \times 10^6$  CIU/匹)タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスに接種し、接種後4カ月目において本テストを行った。まず一定期間マウスに暗箱の空間的位置を記憶させるよう訓練し(トレーニング期間)、トレーニング終了後24時間経過後、(暗箱がおいてあった)ターゲットの穴の周辺に滞在する時間により空間学習や参照記憶を評価(プローブ試験)した。Sev-Tau P301S接種により、タウオパチーモデルマウスにおいて、ターゲットにたどりつくまでの時間が減少し(図15B)、さらにターゲットの穴の周辺に滞在する時間が長くなった(図15C)ことから、改善効果が確認された。

20

(9) タウオパチーモデルマウスへのSev-Tau P301S接種による恐怖条件付け試験

恐怖条件付け試験は文脈記憶や注意能力を測定するためのテストである。Sev-Tau P301S( $5 \times 10^6$  CIU/匹)またはSev-GFPを( $5 \times 10^6$  CIU/匹)タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスに接種し、接種後4カ月目においてテストを行った。箱に入れたマウスに対し電気ショックを加え、その電気ショックを体験した同じ箱で別の刺激(例えば音)を与え、一定の時間経過後、同じ箱にマウスをいれること、あるいは別の箱に入れて同じ音による刺激を行うことによりフリージング(すくみ行動)という現象がマウスに起きることがある。このフリージングの出現率により文脈記憶や注意能力を評価した。Sev-Tau P301S接種により、タウオパチーモデルマウスにおいて、フリージングの出現率が減少し、改善効果が認められた(図16C)。

30

(10) タウオパチーモデルマウスへのSev-Tau P301S接種による身体測定

Sev-Tau P301S( $5 \times 10^6$  CIU/匹)またはSev-GFPを( $5 \times 10^6$  CIU/匹)タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスに接種し、接種後1カ月目において体重、体温、握力、ワイヤに掴まっている時間に関する測定を行った結果を図17に示す。各グループにおける優位差は認められなかった。

(11) タウオパチーモデルマウスへのSev-Tau P301S接種による社会的行動測定試験

社会的行動測定試験は被験マウス2匹を箱の中に入れて、10分間の接触回数や接触持続時間、マウスの移動距離などを測定社会的行動を測定するテストである。Sev-Tau P301S( $5 \times 10^6$  CIU/匹)またはSev-GFPを( $5 \times 10^6$  CIU/匹)タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスに接種し、接種後2カ月目において本テストを行った。その結果、Sev-Tau P301S接種タウオパチーモデルマウスにおいて、接触回数の増加(図18B)、活発な接触の持続時間の延長(図18C)、及び総移動距離の増加(図18E)において改善効果が認められた。

40

(12) タウオパチーモデルマウスへのSev-Tau P301S接種によるプレパルス抑制テスト

プレパルス抑制テストは感覚中枢や聴力、(刺激に対して)跳びあがる反応などの評価を行うテストである。Sev-Tau P301Sを接種( $5 \times 10^6$  CIU/匹)したタ

50

ウオパチーモデルマウス及び野生型マウス、または  $Sev - GFP (5 \times 10^6 C I U / 匹)$  を接種したウオパチーモデルマウス及び野生型マウスについて、接種後3カ月目にプレパルス抑制テストを行った。

その結果、 $Sev - Tau P 3 0 1 S$  接種によるフリージング抑制効果も認められず、各グループ間で優位な差は認められなかった(図19)。

(13) ウオパチーモデルマウスへの  $Sev - Tau P 3 0 1 S$  接種によるオープンフィールド試験

$Sev - Tau P 3 0 1 S (5 \times 10^6 C I U / 匹)$  または  $Sev - GFP (5 \times 10^6 C I U / 匹)$  タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスに接種し、接種後1カ月目にオープンフィールド試験を行った。(A)は総移動距離、(B)は垂直方向の活動量、(C)は中心部での滞在時間、(D)常同行動回数を示す。

各グループ間で優位な差は認められなかった(図20)。

(14) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおけるオープンフィールド試験

野生型マウス及びウオパチーモデルマウスに対し、オープンフィールドテストを行った。(A)は総移動距離、(B)は垂直方向の活動量、(C)は中心部での滞在時間、(D)は常同行動回数を示す。

ウオパチーモデルマウスは、野生型マウスと比較し総移動距離が長く(A)、垂直方向の運動量が多く(B)、中心部に滞在する時間(C)が長かった。常同行動回数(D)は優位な差は認められなかった(図21)。

(15) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおける高架式十字迷路テスト

ウオパチーマウス、または野生型マウスに高架式十字迷路テストを行った。

その結果、ウオパチーマウスにおいて、柵のないオープンアームに侵入した割合(B)と柵のないオープンアームに滞在する時間(D)が野生型マウスに比べ優位に高い値を示した(図22)。

(16) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおけるプレパルス抑制テスト

ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおけるプレパルス抑制テストを行った。ウオパチーモデルマウスは、野生型マウスに比べ、音に対する驚愕反応が低かったが(図23A)、事前に小さな音をならした後大きな音を鳴らすことで驚愕反応の抑制の割合が高い値を示した(図23B)。

(17) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスの脳組織におけるタウ蛋白の発現

ウオパチーモデルマウスと野生型マウスの脳組織におけるタウタンパク質の発現レベルの比較を病理組織学的に検討した。

タウの凝集像や封入は認められなかったものの、ウオパチーマウスの脳組織において野生型マウスに比べ、リン酸化タウタンパク質が顕著に認められた(図24)。リン酸化タウが多く認められた帯状回皮質、大脳皮質扁桃核、海馬などは不安障害に関連し、海馬は記憶障害に関連するとされていることから、これらの組織にリン酸化タウが蓄積することにより、行動異常を呈するのではないかと示唆された。

(18) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおける身体測定

13週齢のウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおける一般的身体測定を行った。

(A)は体重、(B)は直腸温、(C)は握力、(D)はワイアハングテストの結果を示す。

ウオパチーモデルマウスと野生型マウスの間に優位な差は認められなかった(図25)。

(19) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおける社会行動測定テスト(新奇場面)

ウオパチーマウス、または野生型マウスに社会行動測定テストを行った。

社会行動測定テストの結果、ウオパチーモデルマウスと野生型マウスとの間に優位な差は認められなかった(図26)。

(20) ウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおける恐怖条件付け試験

野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスに対し、恐怖条件付け試験を行った。タウオパチーモデルマウスにおいてフリージングの出現率が野生型マウスに比べ低い値を示したが、全体的には大きな優位差はなかった(図27)。

(21) タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスにおけるバーンズ迷路試験

野生型マウス及びタウオパチーモデルマウスに対し、バーンズ迷路試験を行った。図28の(A)~(C)は訓練期間での結果を示す。図28の(D)は訓練後24時間経過後のプローブテストを示す。

訓練期間中では、タウオパチーモデルマウスと野生型マウスの間に優位な差は認められなかった(図28A-C)。

Probeテストにおいて、タウオパチーモデルマウスと野生型マウスとの間にターゲットの隣の穴周辺及びターゲットの穴周辺での滞在時間がタウオパチーモデルマウスのほうが短かった(図28D)。

(22) タウオパチーモデルマウス及び野生型マウスの脳組織におけるタウタンパク質の発現

タウオパチーモデルマウスと野生型マウスの脳組織におけるタウタンパク質の発現レベルの比較を病理組織学的に検討した。

タウタンパク質の凝集像や封入体は認められなかったものの、野生型マウスに比べタウオパチーマウスの脳組織においてリン酸化タウタンパクが顕著に認められた(図24)。リン酸化タウが多く認められた帯状回皮質、大脳皮質扁桃核、海馬などは不安障害に関連し、海馬は記憶障害に関連するとされていることから、これらの組織にリン酸化タウタンパク質が蓄積することにより、行動異常を呈するのではないかと示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0009】

本発明のワクチンは、タウ蛋白質が中枢神経系に異常に蓄積して起こる疾患(タウオパチー)の症状のなかで、とりわけタウオパチー型認知症の改善に有効であることから、医療上有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0010】

配列番号4~11 プライマー

配列番号12, 13 合成DNA

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[配列表]

10

20

30

## SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University  
 National Institute of Radiological Sciences

<120> Vaccines for treatment of tauopathy

<130> PH-4623-PCT 10

<150> JP 2010-3424  
 <151> 2010-01-08

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
 <211> 441 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
                    85                            90                            95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
                    100                            105                            110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
                    115                            120                            125

10

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
                    130                            135                            140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
145                            150                            155                            160

20

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
                    165                            170                            175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
                    180                            185                            190

30

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
                    195                            200                            205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys  
210                            215                            220

40

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
225                            230                            235                            240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val



245

250

255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly  
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln  
 275 280 285

10

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly  
 290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser  
 305 310 315 320

20

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln  
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser  
 340 345 350

30

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn  
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala  
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 385 390 395 400

40

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser  
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val  
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 435 440

<210> 2			10
<211> 62			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 2			
ggctctagaat gctgcccggt ttggcactgc tctgtctggc cgcctggacg gctcgggocg	60		
tt	62		20
<210> 3			
<211> 75			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 3			
atgggaatcc aaggagggtc tgtctgttc gggctgctgc tcgtcctggc tgtcttctgc	60		30
cattcaggtc atagc	75		
<210> 4			
<211> 18			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			40
<223> primer			
<400> 4			
gctgagcccc gccaggag	18		

<210> 5		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 5		10
tcacaaacc tgcttgcca g	21	
<210> 6		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		20
<223> primer		
<400> 6		
aaagaattcg gcttggctta gaatgctgcc cggtttggca c	41	
<210> 7		
<211> 30		
<212> DNA		30
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 7		
aaagaattct cacaaaccct gcttggccag	30	
<210> 8		40
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		

<220>			
<223>	primer		
<400>	8		
	gctgagcccc gccaggag	18	
<210>	9		10
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	primer		
<400>	9		
	tcacaaaccc tgcttgcca g	21	20
<210>	10		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	primer		
<400>	10		30
	ttgaattcgc caccatggga atccaaggag	30	
<210>	11		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			40
<223>	primer		
<400>	11		
	aattctcgag tcacaaaccc tgcttggc	28	

<210> 12  
 <211> 1323  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic DNA

<220>  
 <221> CD59 signal sequence  
 <222> (13).. (87)

10

<400> 12  
 gaattcgcca ccatgggaat ccaaggaggg tctgtcctgt tgggctgct gctcgtcctg 60  
 gctgtcttct gccattcagg tcatagcgct gagccccgcc aggagttcga agtgatggaa 120  
 gatcaegctg ggacgtacgg gttgggggac aggaaagatc aggggggcta caccatgcac 180 20  
 caagaccaag aggggtgacac ggacgctggc ctgaaagaat cteccctgca gacccccact 240  
 gaggacggat ctgaggaacc ggctctgaa acctctgatg ctaagagcac tccaacagcg 300  
 gaagctgaag aagcaggcat tggagacacc cccagcctgg aagacgaagc tgctggtcac 360  
 gtgaccaag ctgcgatgt cagtaaaagc aaagacggga ctggaagcga tgacaaaaaa 420  
 gccaaagggg ctgatggtaa aacgaagatc gccacaccgc ggggagcagc ccctccaggc 480 30  
 cagaagggcc aggccaacgc caccaggatt ccagcaaaaa ccccgcccgc tccaagaca 540  
 ccaccagct ctggtgaacc tcaaaaatca ggggatcgca gcggtacag cagccccggc 600  
 tccccaggca ctcccggcag ccgctcccgc acccgtccc ttccaacccc acccaccgg 660  
 gagcccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccaccaagt cgccgtette cgccaagagc 720 40  
 cgctgcaga cagccccgt gccatgcca gacctgaaga atgtcaagtc caagatcggc 780  
 tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggcgggaagg tgcagataat taataagaag 840

ctggatctta gcaacgtcca gtccaagtgt ggctcaaagg ataatatcaa acacgtcagt 900  
 ggaggcggca gtgtgcaaat agtctacaaa ccagttgacc tgagcaaggt gacctccaag 960  
 tgtggctcat taggcaacat ccatacaaaa ccaggagggtg gccagggtgga agtaaaatct 1020  
 gagaagcttg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgga caatatcacc 1080  
 cacgtccctg gcggaggaaa taaaaagatt gaaaccaca agctgacctt ccgcgagaac 1140  
 gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca agtcgccagt ggtgtctggg 1200  
 gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tcctccaccg gcagcatcga catggtagac 1260  
 tegccccagc tegccacgct agctgacgag gtgtctgect ccctggccaa gcagggtttg 1320  
 tga 1323

10

20

<210> 13  
 <211> 1315  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic DNA

30

<220>  
 <221> APP signal sequence  
 <222> (20).. (73)

<400> 13  
 gaattcggtt tggtctagaa tgctgccggg tttggcaactg ctctgtctgg ccgctggac 60  
 ggctcggggc cttgctgagc cccgccagga gttcgaagtg atggaagatc acgctgggac 120  
 gtacgggttg ggggacagga aagatcaggg gggctacacc atgcaccaag accaagaggg 180  
 tgacacggac gctggcctga aagaatctcc cctgcagacc cccactgagg acggatctga 240  
 ggaaccgggc tctgaaacct ctgatgctaa gagcaactcca acagcgggaag ctgaagaagc 300

40

aggcattgga gacaccccca gcctggaaga cgaagctgct ggtcacgtga cccaagctcg 360  
 catggtcagt aaaagcaaag acgggactgg aagcgatgac aaaaaagcca agggggctga 420  
 tggtaaaacg aagatcgcca caccgcgggg agcagcccct ccaggccaga agggccaggc 480  
 caacgecacc aggattccag caaaaacccc gcccgctcca aagacaccac ccagctctgg 540  
 tgaacctcca aatcagggg atgcagcgg ctacagcage cccggctccc caggcactcc 600 10  
 cggcagccgc tcccgcacc cgtcccctcc aaccccaccc acccgggagc ccaagaaggt 660  
 ggcagtggtc cgtactccac ccaagtcgcc gtcttcgcc aagagccgcc tgcagacagc 720  
 ccccgtgccc atgccagacc tgaagaatgt caagtccaag atcggctcca ctgagaacct 780  
 gaagcaccag ccgggaggcg ggaaggtgca gataattaat aagaagctgg atcttagcaa 840 20  
 cgtccagtc aagtgtgget caaaggataa tatcaaacac gtctcgggag gcggcagtgt 900  
 gcaaatagtc taaaaccag ttgacctgag caaggtgacc tccaagtgtg gctcattagg 960  
 caacatccat cataaaccag gaggtggcca ggtggaagta aatctgaga agcttgactt 1020  
 caaggacaga gtccagtcga agattgggtc cctggacaat atcaccacg tccttgcg 1080  
 aggaataaaa aagattgaaa cccacaagct gaccttcgc gagaacgcca aagccaagac 1140 30  
 agaccacggg gcggagatcg tgtacaagtc gccagtgggt tctggggaca cgtctccacg 1200  
 gcatctcagc aatgtctcct ccaccggcag catcgacatg gtagactcgc ccagctcgc 1260  
 cacgctagct gacgaggtgt ctgcctccct ggccaagcag ggtttgtgag aattc 1315

【 図 6 】

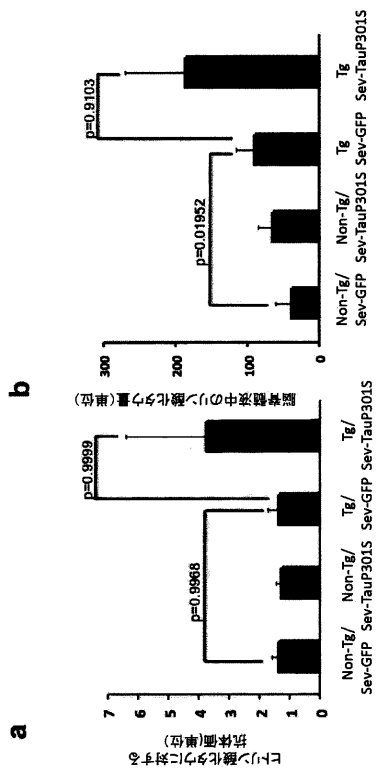


図 6

【 図 8 】

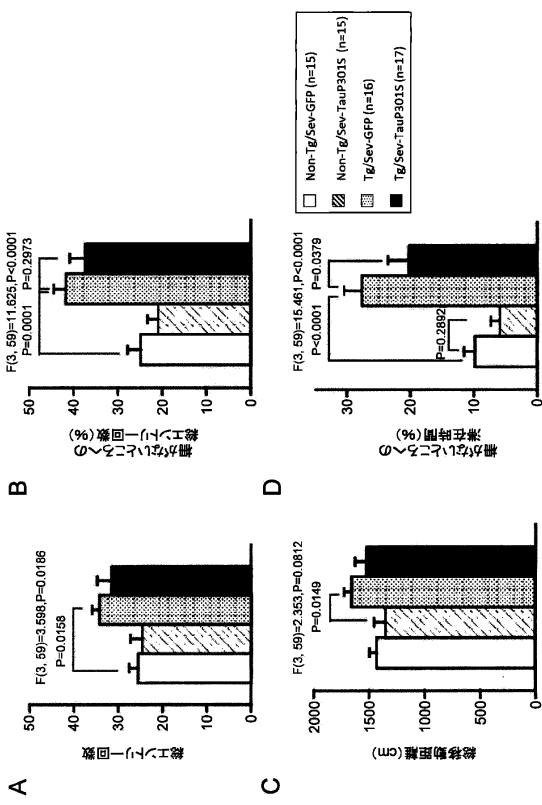


図 8

【 図 7 】

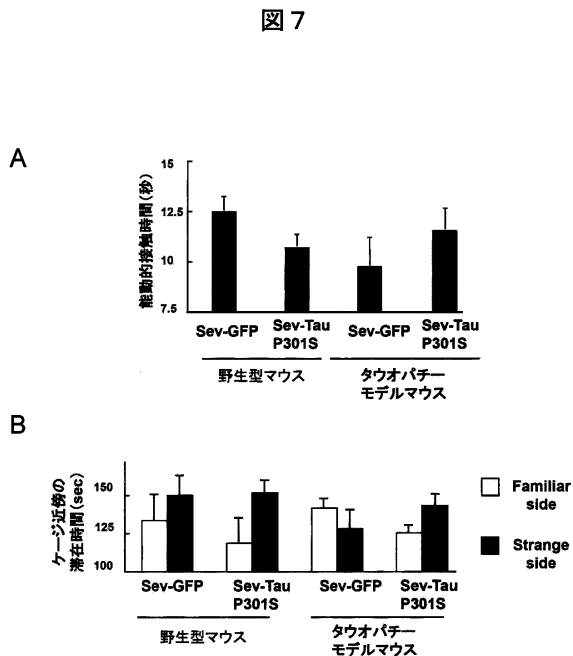


図 7

【 図 9 】

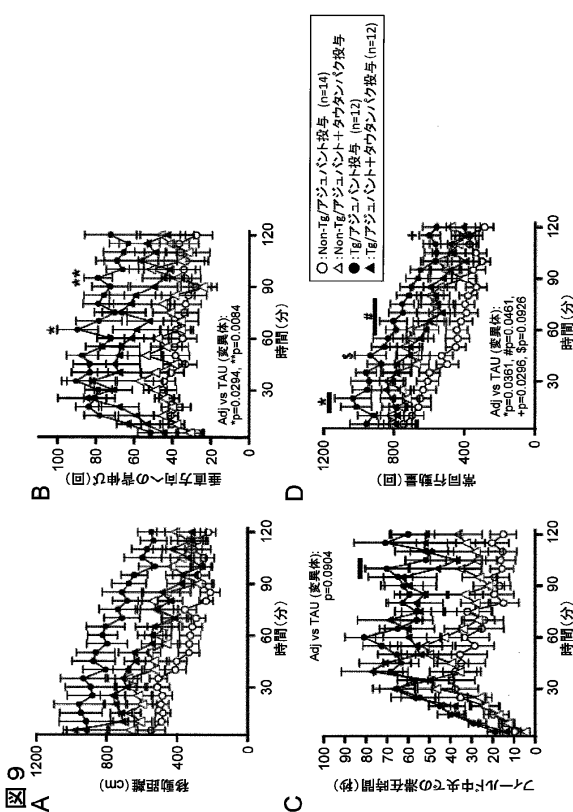
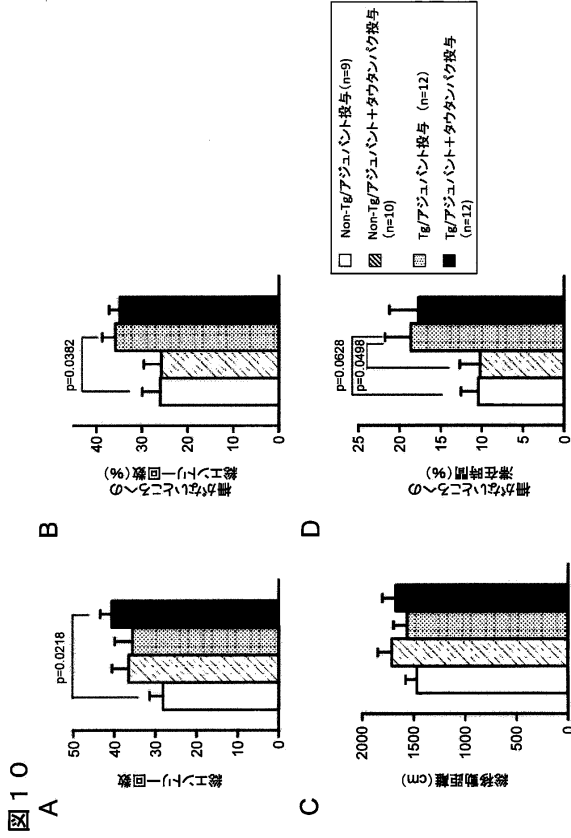


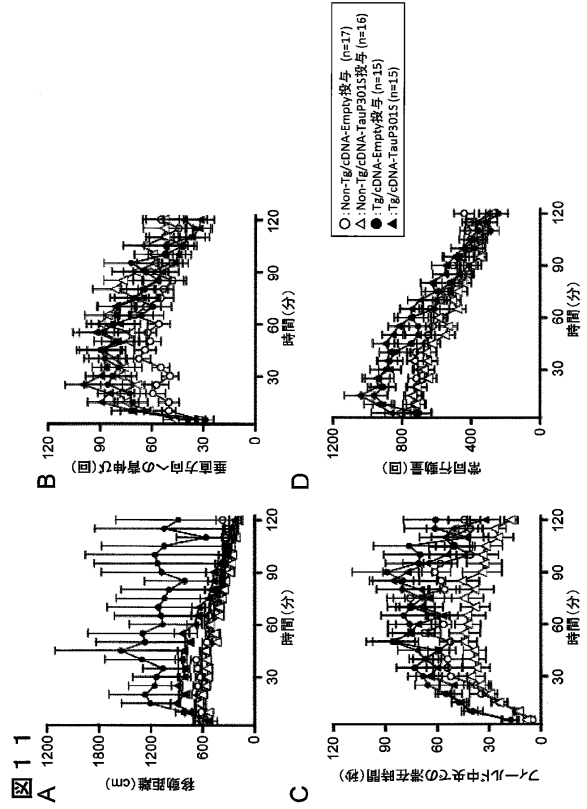
図 9



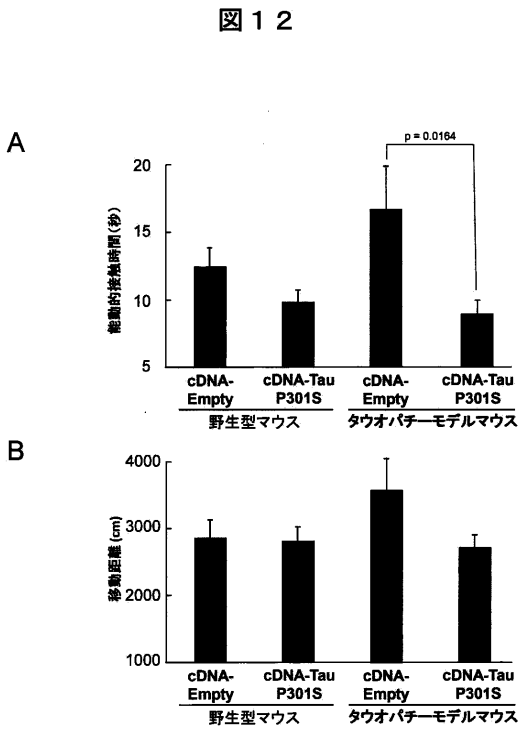
【 図 1 0 】



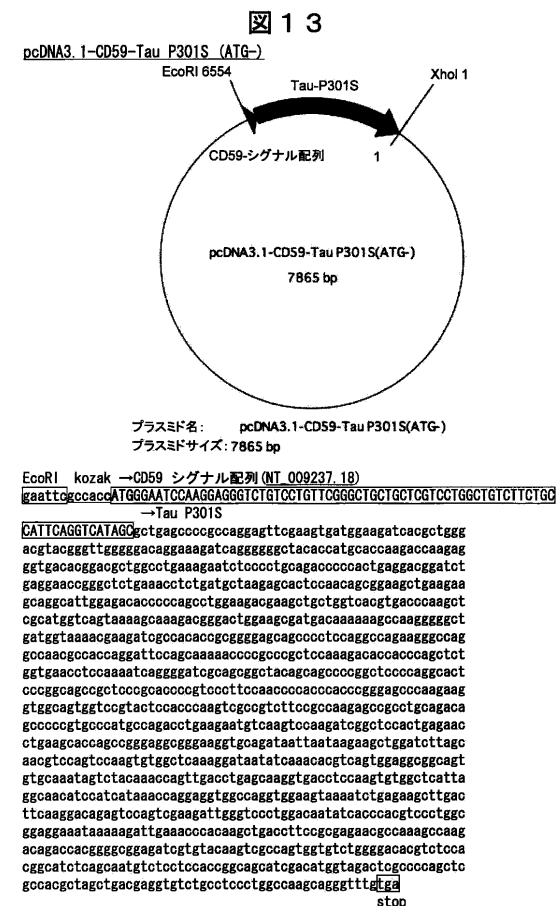
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 15 】

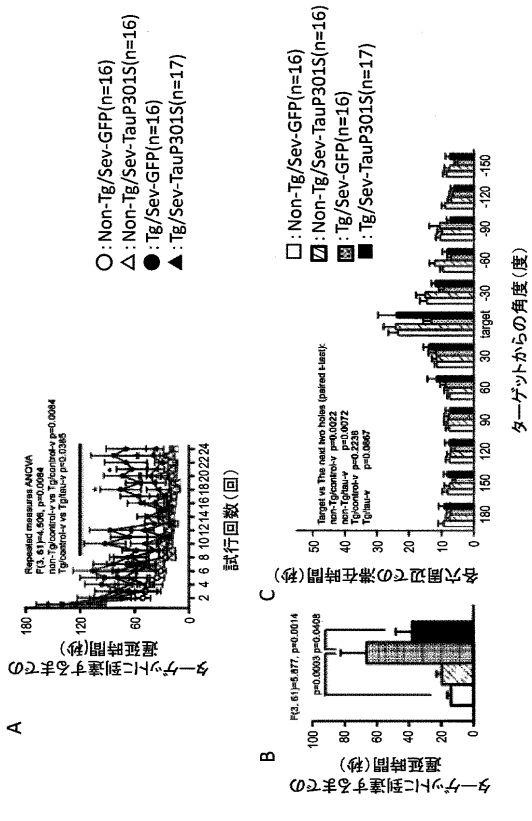


図 15

【 図 17 】

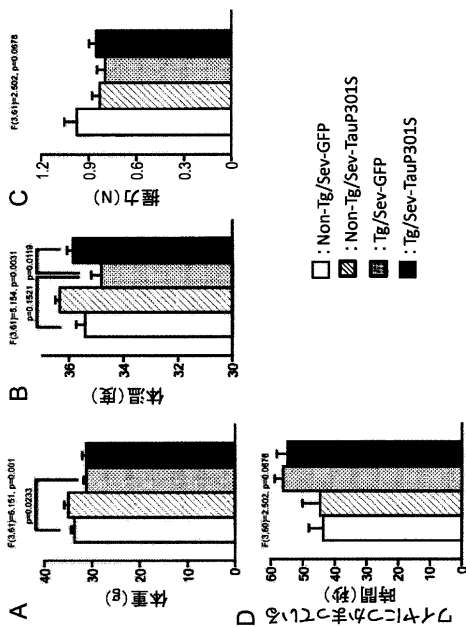


図 17

【 図 16 】

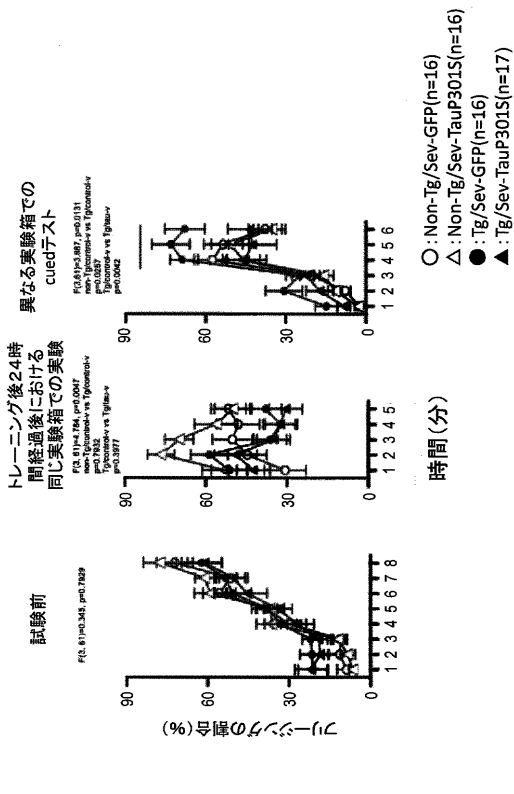


図 16

【 図 18 】

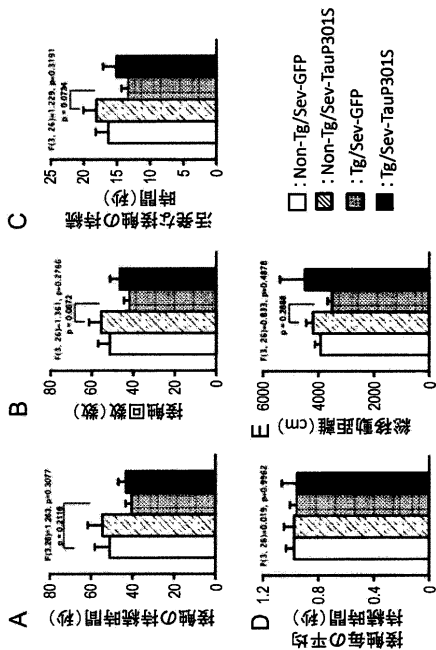


図 18

【 図 19 】

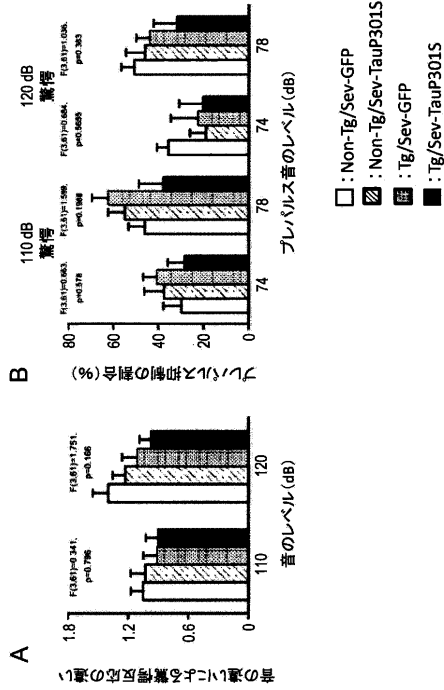


図 19

【 図 20 】

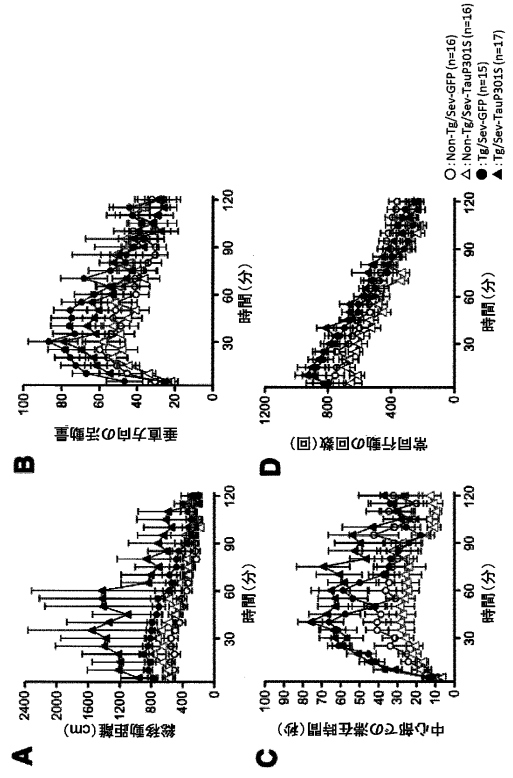


図 20

【 図 21 】

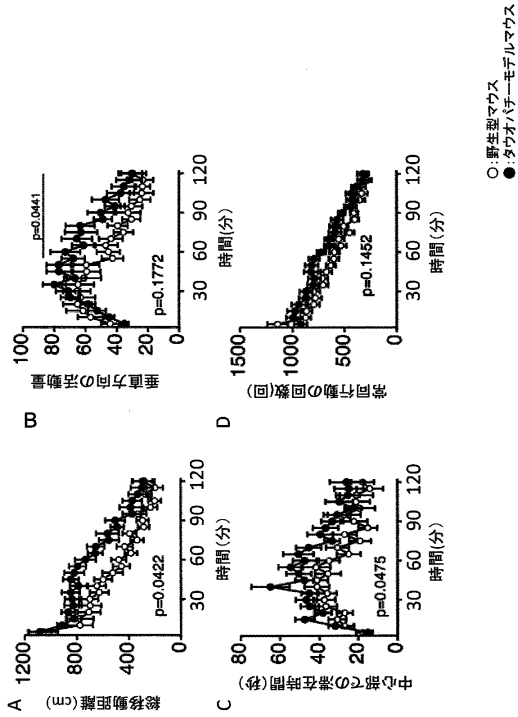


図 21

【 図 22 】

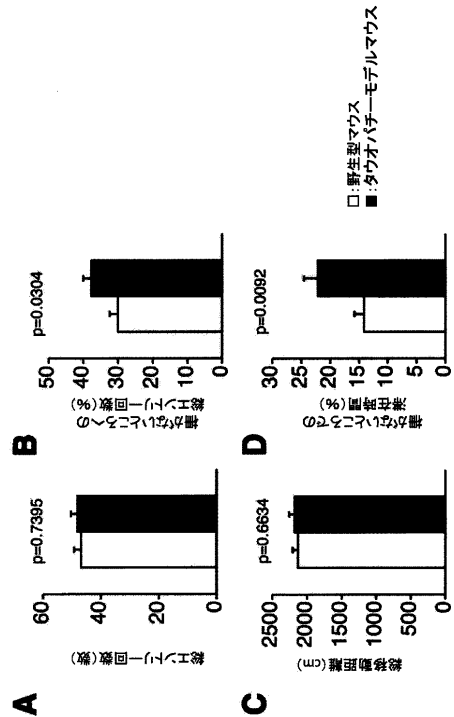


図 22

【 図 2 3 】

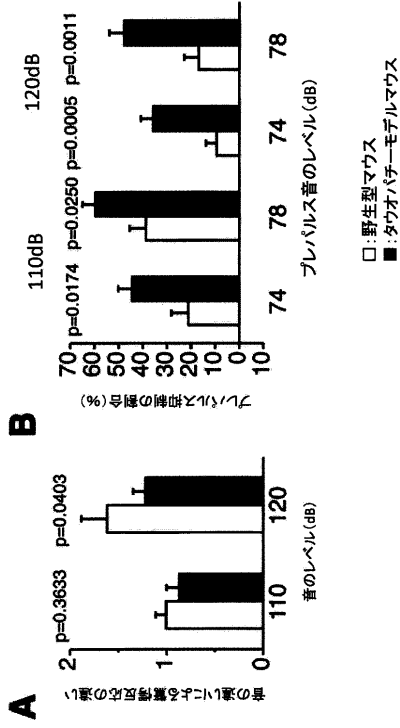


図 2 3

【 図 2 6 】

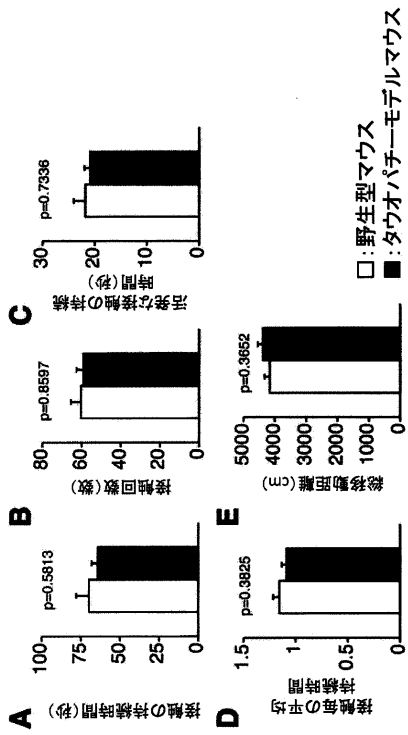


図 2 6

【 図 2 5 】

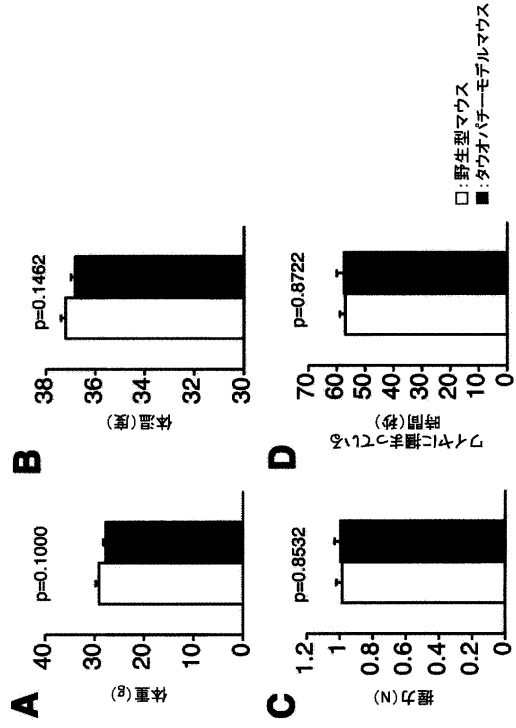


図 2 5

【 図 2 7 】

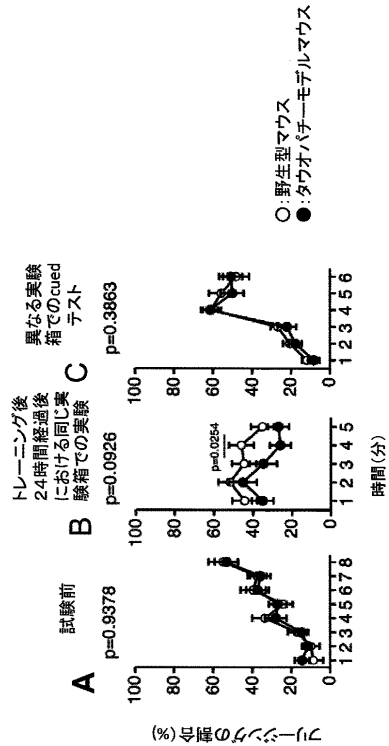
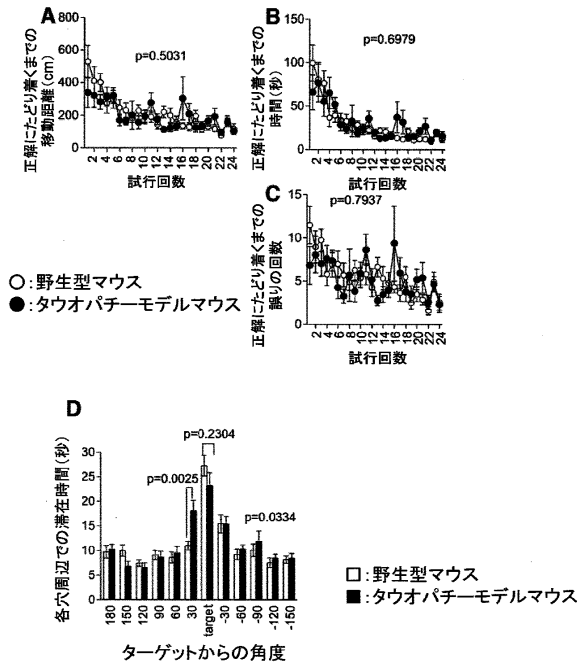


図 2 7

【 図 2 8 】

図 2 8



【 図 1 】

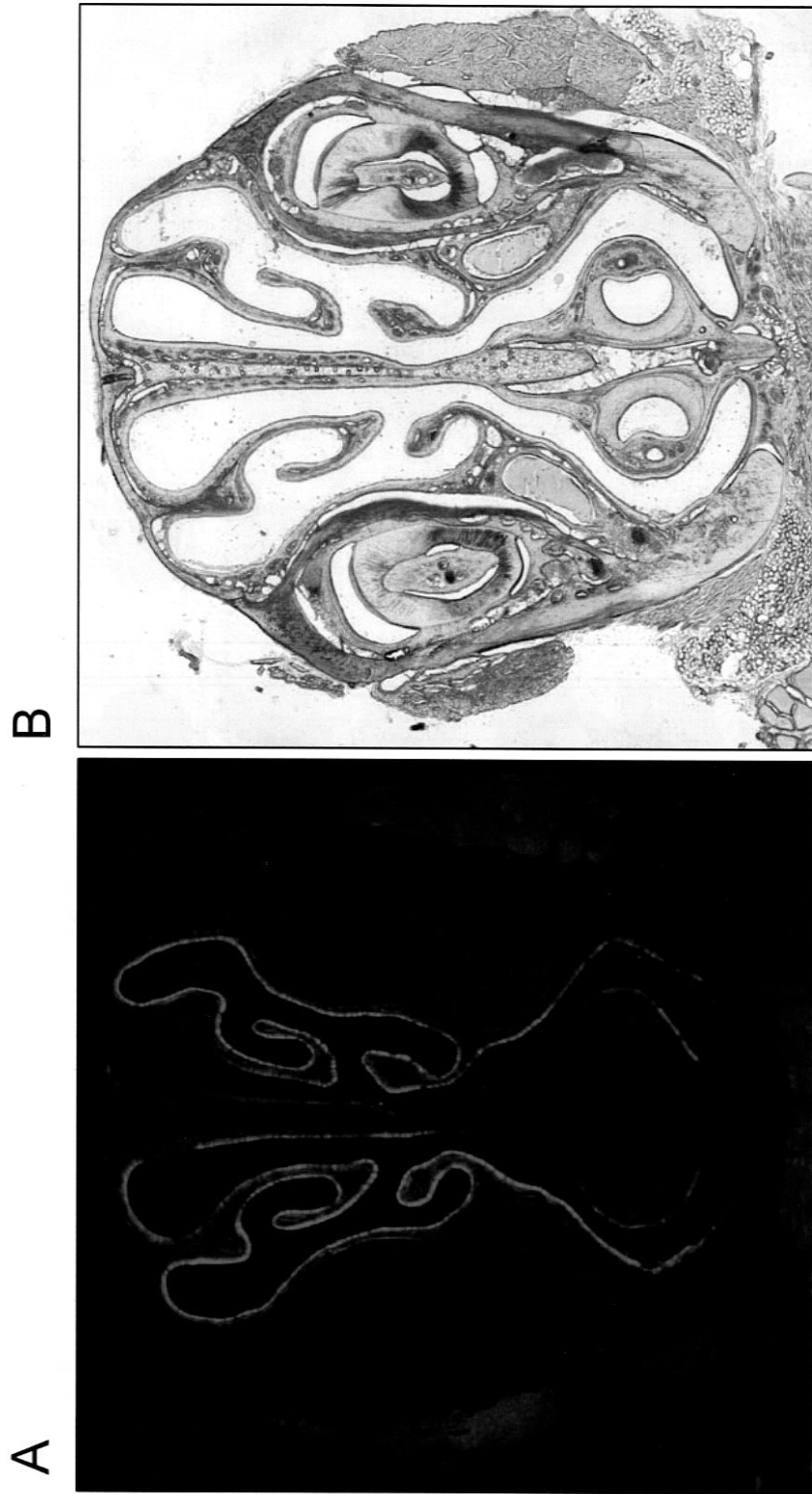
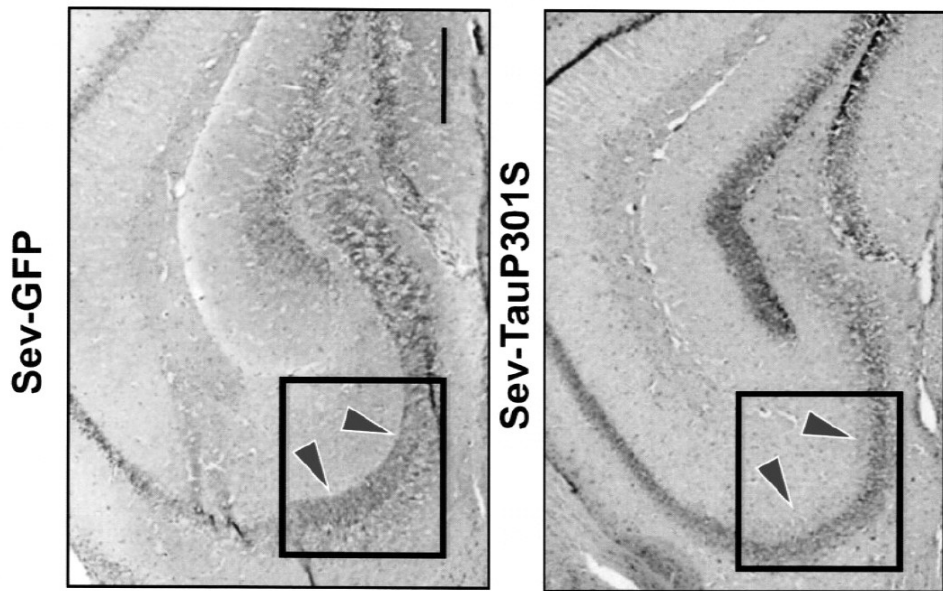


図 1

【 図 2 】

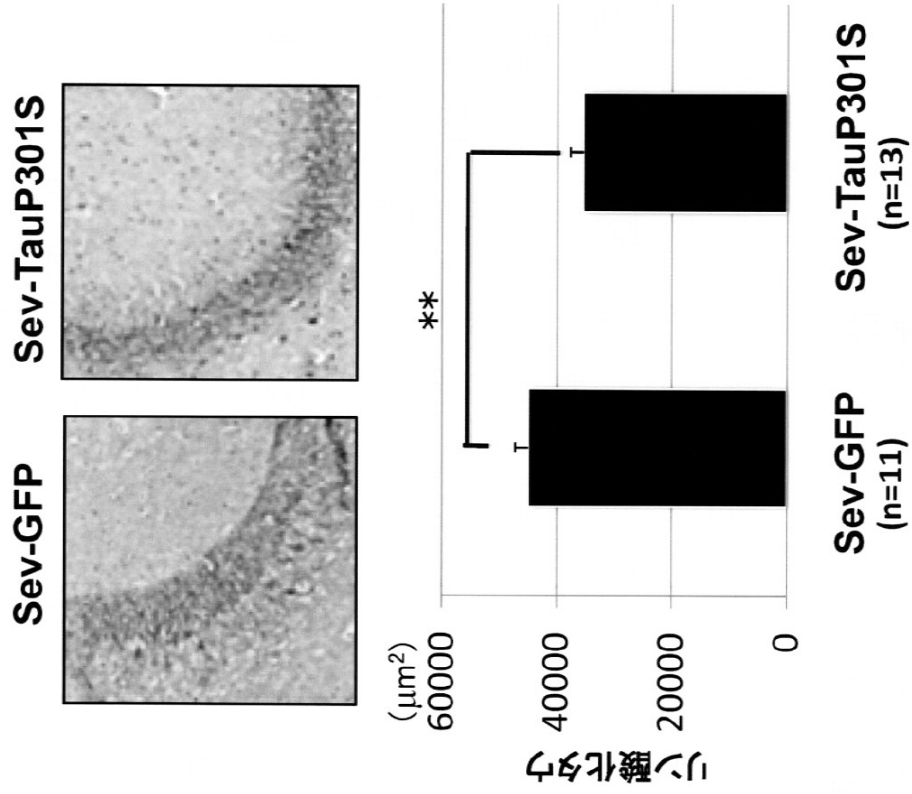
図 2

A



Scale bar: 500  $\mu$  m    ◀ タウ病変

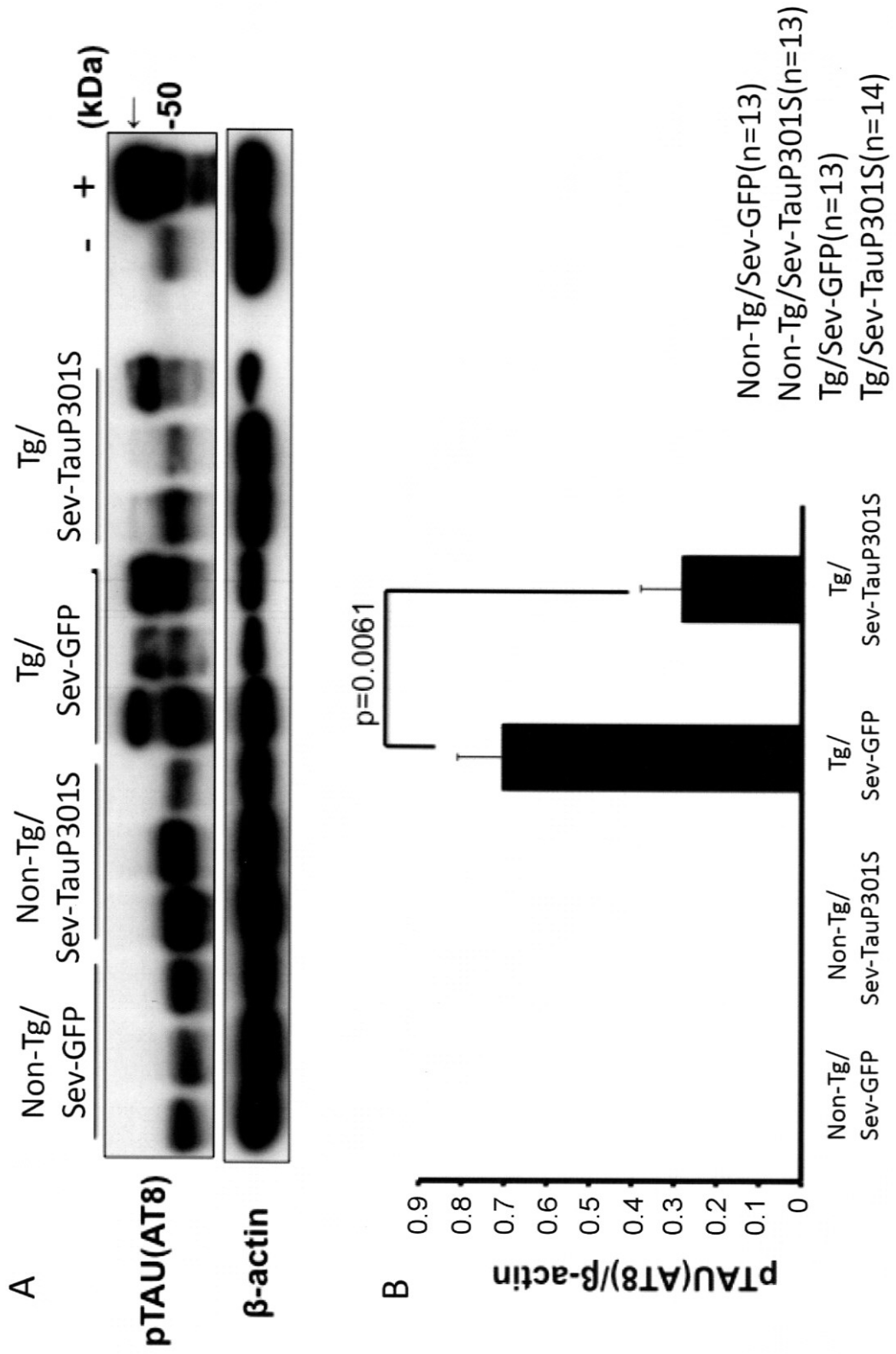
B



\*\*Student's t-test,  $p = 0.005873$

【 図 3 】

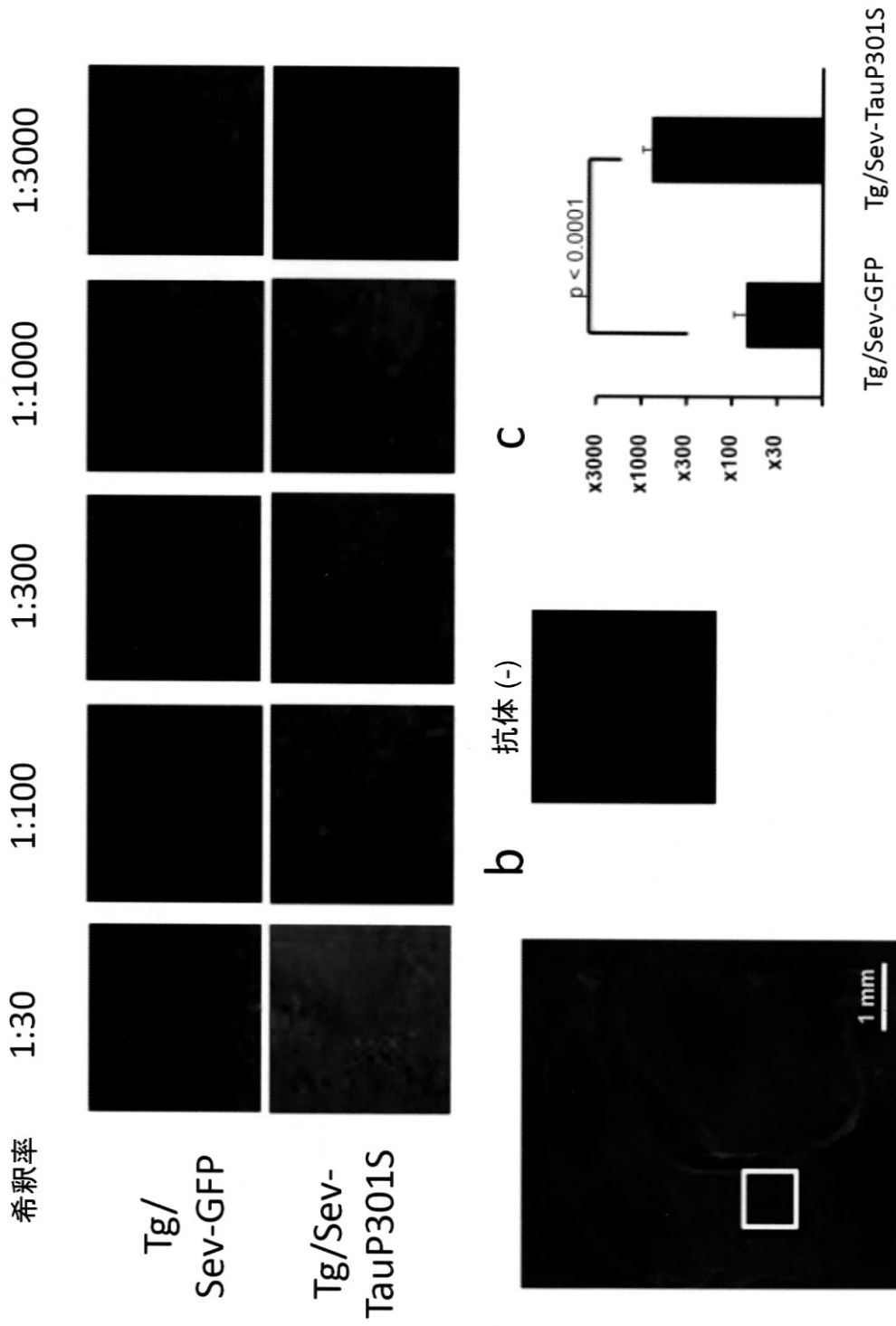
図 3





【 図 4 】

图 4 a



【 図 5 】

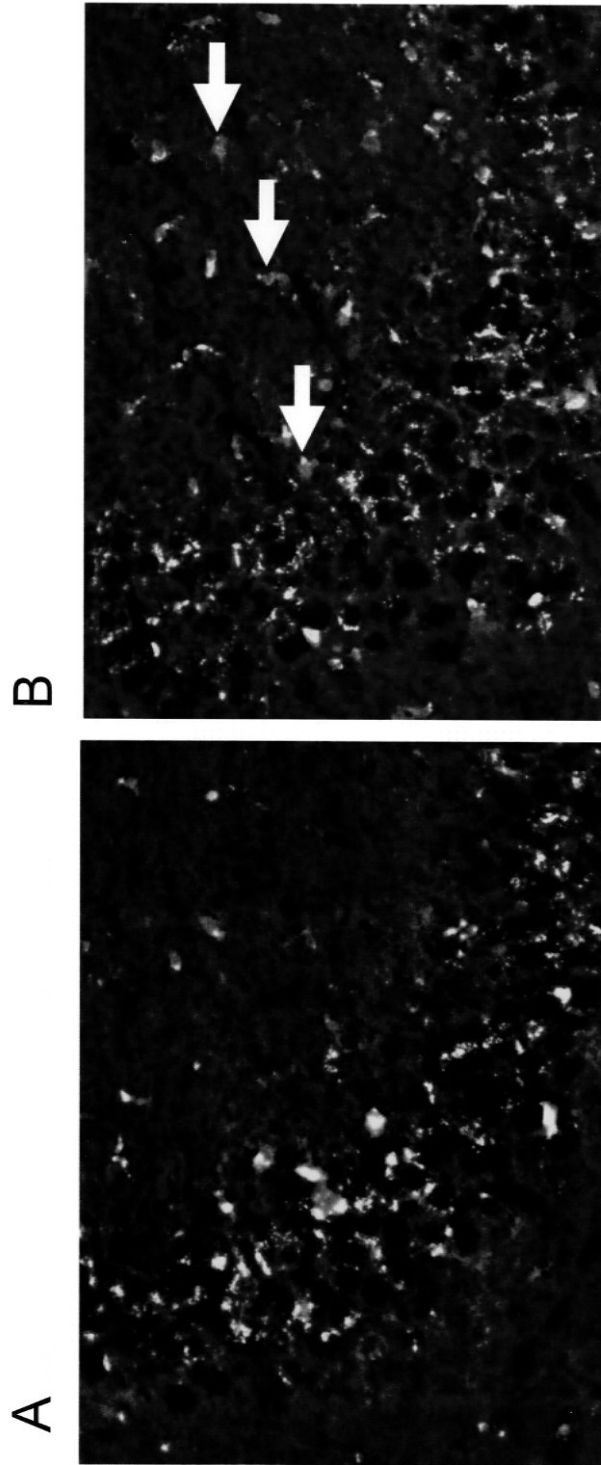
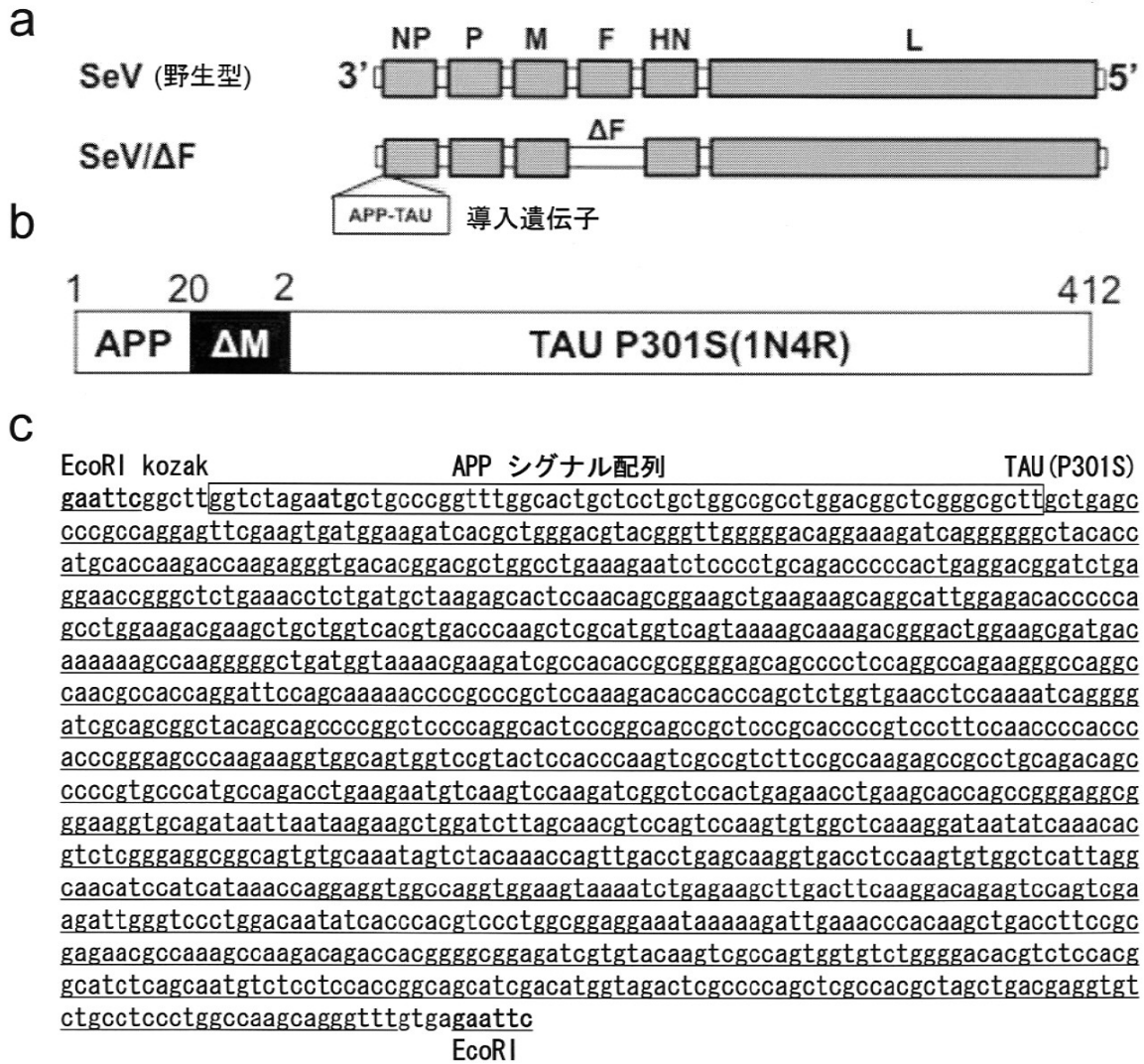


図 5

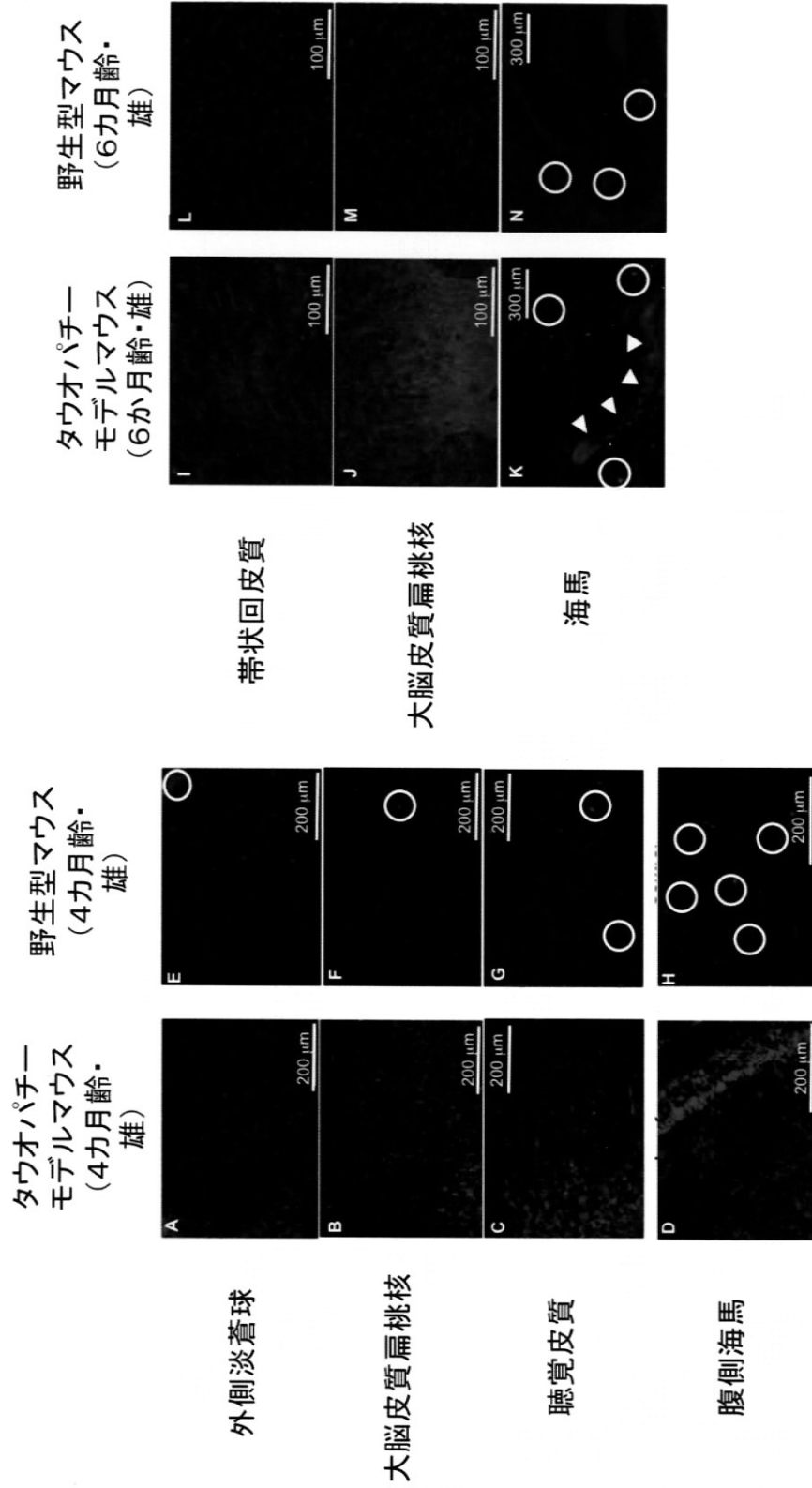
【 図 1 4 】

図 1 4



【 図 2 4 】

図 2 4



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	

(72)発明者 竹内 啓喜  
京都府京都市左京区聖護院川原町5-3 国立大学法人京都大学 iPS細胞研究所内

(72)発明者 高橋 良輔  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72)発明者 樋口 真人  
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 季 斌  
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 須原 哲也  
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/050383(US, A1)  
特表2008-536476(JP, A)  
特開2005-021149(JP, A)  
Human Vaccines, 2009年, Vol.5, p.373-380  
BMC Neuroscience, 2008年, Vol.9, Suppl.2, S10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 9 / 0 0  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )