

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04803

研究課題名(和文) 高血圧ワクチン実用化による降圧の質的改善を目指した新規治療

研究課題名(英文) Translational research of therapeutic vaccine to improve the quality of anti-hypertensive therapy

研究代表者

中神 啓徳 (Hironori, Nakagami)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20325369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：年々増大する社会保障費の中で医療費を削減するため治療法の選択肢としての治療ワクチンを開発し、我が国のみならず発展途上で役立つ医薬品開発を目指して日本発の新規イノベーションとなるべくトランスレーショナルリサーチを遂行する。ペプチドワクチンとDNAワクチンの両者を用いたワクチンの製剤検討、アジュバント製剤の検討を行った。さらに協力企業のアンジェスMGとの共同研究で、治験薬GMPでの製造検討、ヒト臨床試験に向けた非臨床試験や血中の抗体価測定法のバリデーションを行った。現在、アンジェス主導の企業治験として、海外(オーストラリア)での企業治験に向けた準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：Vaccines are commonly used as preventive methods, primarily against infectious diseases. The goal of our study is to develop the therapeutic vaccine for hypertension. Increasing the effectiveness of drug adherence interventions in the clinical setting may have a large impact on the health of the population. We and others recently reported that an angiotensin II (AngII) vaccine for hypertension successfully attenuated elevated blood pressures in an animal model without any immunogenic side effects. In this system, an immunogenic molecule (i.e., KLH) with adjuvants provides an antigen that supports the activation of helper T cells. In addition, pretreatment with the AngII vaccine exerts neuroprotective effects in a cerebral ischemia model and cardioprotective effects in a myocardial infarction model. We developed the DNA and peptide vaccine with GMP grade and evaluated the efficiency of these vaccines in animal model (SHR). We have almost set up the preparation of clinical trials.

研究分野：高血圧

キーワード：ワクチン

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の高血圧の有病率は非常に高く国民の約 40%が「血圧高め」に属する。降圧剤は国内医療用医薬品市場の約 20%を占めており、患者数の増加に伴い 2018 年には 1 兆 400 億円に達すると予測されていることから、医療費削減のためには高血圧を筆頭とした生活習慣病に対する方策が急務であると考えられる。高血圧・脂質異常症・糖尿病といった薬物治療が主流の生活習慣病治療にワクチン治療を導入することができれば、薬剤に費やす医療費の削減・薬剤の多剤併用を減らすことによる副作用の軽減・経口投与困難な高齢者・服薬コンプライアンスの悪い患者へのサポートなどの社会貢献が期待できると考える。また、被災地や発展途上国などの降圧剤が充分に行き届かないケースにおいても、年に数回のワクチン治療は社会的な需要は高いと考えられ、日本発の可能性を秘めている。

すでに薬物治療が確立されている生活習慣病分野においてはワクチン治療法のより高い有効性と安全性が求められる。有用性に関しては一定値・一定期間の降圧ターゲット達成の費用 - 便益分析 (CBA)、服薬コンプライアンス向上や二次イベント予防等の利点を考慮した費用 - 効果分析 (CEA) などにより疾患毎の戦略構想が可能であり、高血圧ワクチンについても十分に期待できる。安全性に関しては、アルツハイマー病に対するアミロイドベータワクチン治療において、T 細胞の活性化による細胞性免疫が活性化されて脳炎という重篤な有害事象が発生したことから、T 細胞の活性化を可能な限り回避したワクチンシステムを構築した。この基盤技術を応用することで今後様々な疾患へのワクチン応用の波及効果が期待できる。

先行研究では高血圧ワクチンとして、アンジオテンシン I (*Reade R, Arch Mal Coeur Vaiss, 1989*) および II (*Nakagami F, et al. PLoS ONE 2013, Ambuhl PM, J Hypertens, 2007*)、1 型アンジオテンシン受容体などを標的分子とした研究が報告されており、さらに我々はラットで無針注射器を用いてアンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチンの開発にも成功している。また、2008 年には世界で初めての高血圧に対するワクチン治療の臨床試験で血圧の有意な低下が報告され (*Lancet 2008*)、その将来的な可能性に期待が集まっている。

### 2. 研究の目的

アンジオテンシン II を標的とした液性免疫主導のペプチド・DNA ワクチンを作製し、実用化を目指した・製剤化・薬効評価・デバイス開発を行う。投与方法として株式会社ダイセルと共同開発中の無針注射器などを用いる。

### 3. 研究の方法

アンジオテンシン II を標的とした液性免疫主導のペプチド・DNA ワクチンを作製し、実用化を目指した・製剤化・薬効評価・デバイス開発を行う。

- 1) 製剤化検討: ペプチド・DNA 併用ワクチンにより 1 回投与で抗体価の 3 - 4 ヶ月持続が可能となった。実用化に向けて、ペプチド・DNA それぞれの最適化を行い、非臨床試験・治験薬製造に向けた製剤化作業を一部外部委託しながら行う。
- 2) 薬効評価: 持続的なレニン・アンジオテンシン系抑制による血圧変動性・交感神経系への影響を大阪大学・自治医大共同でラットの高血圧モデルでの評価をテレメトリーを用いて行う。
- 3) デバイス開発: ワクチンの更なる効率化を図るため、無針注射器を用いる。免疫担当細胞が豊富な皮内にワクチンを局所注入することによって高効率な抗体産生を実現し、投与後の薬効持続期間と抗体価の持続期間を確認する。

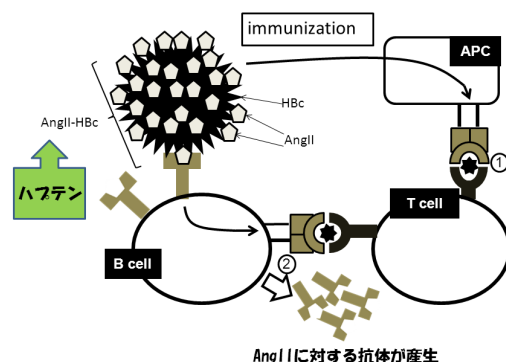
### 4. 研究成果

#### 1) 製剤化検討

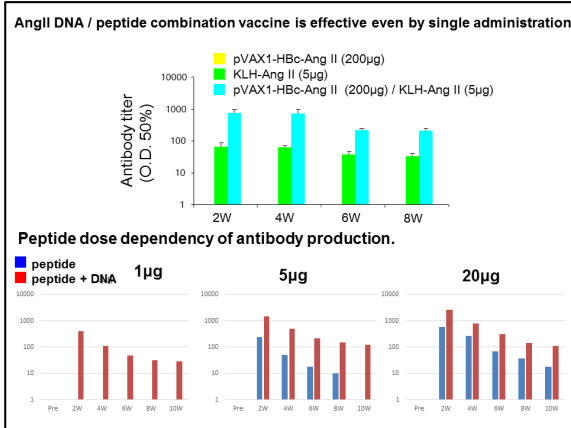
先行研究でマウス・ラットでのアンジオテンシン II ワクチンを確立している。これは抗体産生誘導を主導するもので、従来の感染症や癌を標的としたワクチンとは異なる仕組みを用いている。

アンジオテンシン II (AngII) は 8 アミノ酸からなるペプチドで一般に免疫応答がおこりにくいため (ハプテン) それに対するワクチン治療を行うときには通常 KLH などの免疫原性の高いものと融合させたものを抗原として用い、アジュバントとともに投与する。アジュバントは動物実験ではフロイントアジュバントを用いるが、ヒト臨床試験用にアラムを用いた。同様のコンセプトで DNA ワクチンの確立も行った。既報にあるように、B 型肝炎コア蛋白 (HBc) の配列の一部 (B cell エピトープ) に AngII の遺伝子配列を挿入した融合プラスミドを合成することにより DNA ワクチンとしている (下図参照)。

アンジオテンシンIIに対するDNAワクチン

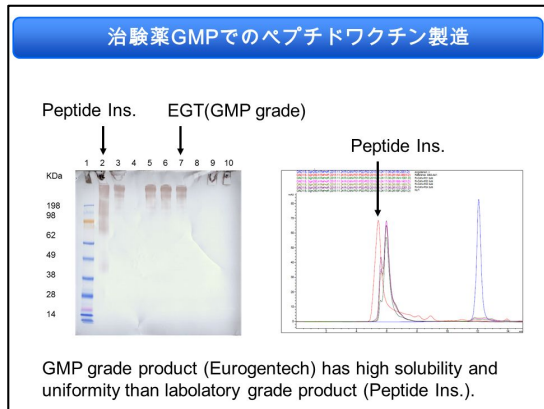


高血圧ワクチンの臨床応用に向けて、ペプチドワクチンと DNA ワクチンの両者を用いたワクチンの製剤検討、アジュバント製剤の検討を行った。これまで感染症ワクチンなどでは、初回投与(プライム)を DNA ワクチン、2 回目以降の投与(ブースター)をペプチドワクチンとすることによって、抗体価の高効率な上昇が得られることが報告されている。そこで、我々はこの両者の長所を考慮して同時に投与する検討を実施した。結果、DNA ワクチン単回投与では抗体価の上昇はほぼ認められなかったが、ペプチドワクチンと DNA ワクチンを併用した群ではペプチドワクチン単独よりもより高い抗体価が得られた。また、その抗体価上昇の効果はペプチドワクチンの用量依存的に上昇していた。



(上図が DNA ワクチン(pVAX1 +HBc-AngII)、ペプチドワクチン(KLH-AngII)、DNA ワクチン+ペプチドワクチンの単回投与後の抗体価の比較、下図がペプチドワクチンの投与量を 1, 5, 20 µg としたときのペプチドワクチンおよび DNA ワクチン+ペプチドワクチン投与下での抗体価)

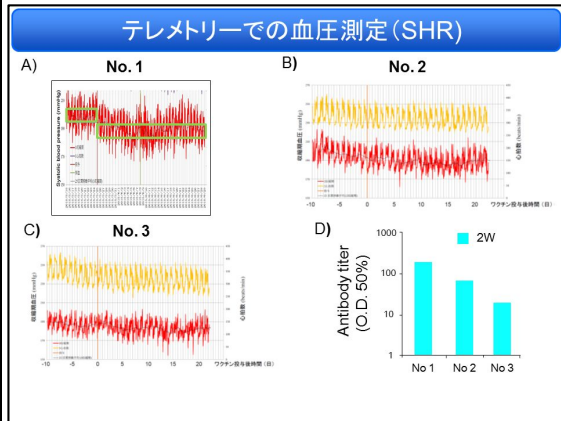
次に治験薬製剤の開発として、治験薬 GMP での製造を念頭におき、パイロット製剤の合成を行った。抗体価の上昇を指標に同等性試験を行った結果、これまで用いていた実験用のワクチンと治験薬 GMP 製剤との同等性が確認できた。



(左が治験薬 GMP 製剤、右が薬効試験に用いていたペプチドワクチン)

## 2) 薬効評価

ラットモデルでその効果を検証した。ペプチドワクチンと DNA ワクチンを併用することでより初回投与時から抗体価の上昇が認められることが分かったが さらにアジュバントとしてアラムを添加することで更なる抗体価の上昇が確認された。また、自然高血圧発症ラットにこのペプチド・DNA 併用ワクチンを 2 回投与したところ、降圧効果が確認された。

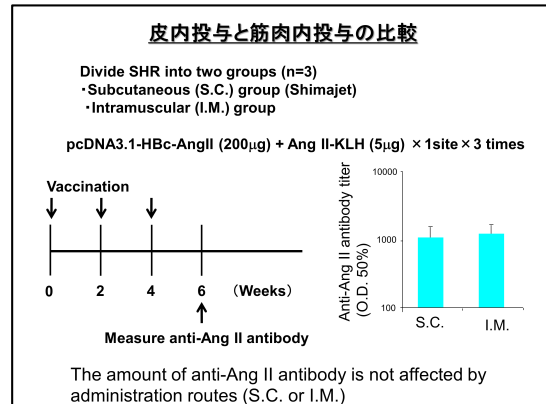


(SHR に治療ワクチンを投与したときのテレメトリーでの血圧値の推移)

## 4) デバイス開発

一般に抗原提示細胞である樹状細胞は皮内に多く存在するため、筋肉内投与あるいは皮下投与よりもペプチドワクチンに適しているといわれている。一方で、DNA ワクチンは遺伝子を発現させる必要があることから筋肉内投与の方が遺伝子導入効率が良いということで筋肉内投与が優先されることが多い。そこで、無針注射器(シマジレット)を用いた皮内投与と有針の注射器での筋肉内投与とで抗体価を比較した。

結果、両者には大きな変わりはない。筋肉内投与の方がより多くの薬剤を投与できるメリットがあることから、今後の見当では筋肉内投与で薦めることとした。



これまでヒトで DNA ワクチンの臨床試験があまり上手く進んでいないことなども考慮

し、ヒト臨床試験で用いる製剤としてペプチドワクチンやアジュバントと併用などに挑戦している。年々増大する社会保障費の中で医療費を削減するため治療法の選択肢としての治療ワクチンを開発し、我が国のみならず発展途上で役立つ医薬品開発を目指して日本発の新規イノベーションとなるべくトランスレーショナルリサーチを遂行する。

協力企業のアンジェス MG との共同研究で、ヒト臨床試験に向けた非臨床試験や血中の抗体価測定法のバリデーションを行った。現在、アンジェス主導の企業治験として、ヒト臨床試験に向けた準備を進め、海外（オーストラリア）での企業治験が開始されている。

#### 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 5 件)

1. Wakayama K, Shimamura M, Suzuki JI, Watanabe R, Koriyama H, Akazawa H, Nakagami H, Mochizuki H, Isobe M, Morishita R. Angiotensin II Peptide Vaccine Protects Ischemic Brain Through Reducing Oxidative Stress. *Stroke*. 2017 May;48(5):1362-1368.
2. Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017 Mar 7;7:43920.
3. Koriyama H, Nakagami H, Nakagami F, Osako MK, Kyutoku M, Shimamura M, Kurinami H, Katsuya T, Rakugi H, Morishita R. Long-Term Reduction of High Blood Pressure by Angiotensin II DNA Vaccine in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2015 Jul;66(1):167-74.
4. Nakagami H, Morishita R. Therapeutic Vaccines for Hypertension: a New Option for Clinical Practice. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Mar 19;20(3):22.
5. Nakagami H. Design of therapeutic vaccines as a novel antibody therapy for cardiovascular diseases. *J Cardiol*. 2017 Sep;70(3):201-205

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 中神 啓徳 「高血圧ワクチン開発への挑戦」第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2017.11.25、福岡<口演>
2. Hironori Nakagami 「Session2: Immunological Approach for Non-communicable Diseases」The 14<sup>th</sup>

Nikko International Symposium 2017、2017.10.27、栃木<シンポジウム>

3. 中神 啓徳 「高血圧治療を目指したワクチン開発」第 40 回日本高血圧学会総会、2017.10.22、愛媛<口演>
4. Hironori Nakagami 「Development of therapeutic vaccines as an antibody therapy」KVSMO 2017 and the 15th Japan-Korea Joint Symposium of Vascular Biology、2017.8.25、韓国<シンポジウム>
5. Hironori Nakagami 「Development of therapeutic vaccines for cardiovascular diseases」第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017.7.21、岡山<Symposium>
6. 中神 啓徳 「生活習慣病を標的としたワクチン開発」第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017.7.7、京都<シンポジウム>
7. 中神 啓徳 「臨床試験に向けたアンジオテンシン ワクチンの開発」第 6 回臨床高血圧フォーラム、2017.5.13、岡山<シンポジウム>
8. 中神 啓徳 「生活習慣病を標的とした治療ワクチンの開発」第 46 回日本心臓血管作動物質学会、2017.2.11、沖縄<シンポジウム>
9. Hironori Nakagami 「Development of Angiotensin II Vaccine for hypertension」第 24 回日本血管生物学会学術集会、2016.12.8、長崎<口演>
10. 中神 啓徳 「アンジオテンシン を標的とした高血圧・心不全ワクチンの開発」第 39 回日本高血圧学会総会、2016.10.2、仙台<シンポジウム>
11. Hironori Nakagami 「Develop a therapeutic vaccine for angiotensin II」26th International Society of Hypertension、2016.9.27、Korea<Oral>
12. 中神 啓徳 「次世代バイオロジクスとしての高血圧ワクチンの臨床応用」第 5 回臨床高血圧フォーラム、2016.5.14、東京<シンポジウム>
13. 中神 啓徳 「Challenge to develop a therapeutic vaccine for the patients with high blood pressure」第 80 回日本循環器学会、2016.3.17、仙台<シンポジウム>
14. Hironori Nakagami 「Development of Angiotensin II vaccine」Gordon Research Conference on Angiotensin、2016. 2. 22. Renaissance Tuscany II Ciocco in Lucca (Barga) Italy<Poster>
15. 中神 啓徳 「Angiotensin II Vaccine May One Day Help Lower Blood Pressure」第 38 回日本高血圧学会、2015.10.10、愛媛<会長特別企画・口演>

16. 中神 啓徳「高血圧・動脈硬化における免疫応答の解析と新規治療法の開発」第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015.7.10、仙台<シンポジウム>

〔図書〕(計5件)

1. 中神啓徳「生活習慣病に対するワクチンの開発」医学のあゆみ Vol.264, No.5, 469-474, 2018.2.3
2. 中神啓徳「生活習慣病に対するワクチン療法の可能性」日本医事新報 No.4876, 53, 2017.10
3. 中神啓徳「高血圧 DNA ワクチンの開発」CARDIAC PRACTICE メディカルレビュー社 Vol.28, No.3, 29-32, 2017.7
4. 中神啓徳「高血圧ワクチンから薬物予防まで」医学のあゆみ 医歯薬出版 Vol.260, No.5, 486-487, 2017.2
5. 中神啓徳「DNA ワクチン」TOTAL VASCULAR MANAGEMENT メディカルレビュー社 ISSUE3, 42-46, 2016.7

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中神 啓徳 (NAKAGAMI HIRONORI)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：20325369

### (2) 研究分担者

樂木 宏実 (RAKUGI HIROMI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20252679

苅尾 七臣 (KARIO KAZUOMI)

自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60285773

新保 昌久 (SHIMPO MASAHISA)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70406049