

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15310

研究課題名(和文) ミエロイド由来の未分化細胞群を標的とした慢性炎症制御を目指した新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy for chronic inflammation by MDSC

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：MRP8/14(別名S100A8/A9)はMDSCに高発現し炎症性サイトカイン分泌を促進し、動脈硬化・冠動脈疾患の血中バイオマーカーとして報告されている。そこでMRP8/14に対するワクチンを設計してマウスでの薬効評価を行った。高脂肪食負荷マウスでの耐糖能試験、担癌モデルでの腫瘍サイズでは対照群と有意な差を認めなかった。一方、脳血管閉塞モデルでの検討では、MRP14ワクチンは対照群と比して血管閉塞時間が有意に延長し、またその効果は抗血小板薬クロピドグレルとほぼ同等であった。一方で出血時間の検討では、MRP14は対照群に比べて有意な変化は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：MRP8/14 (S100A8/A9) is highly expressed in MDSC cells and induces inflammatory cytokines. To examine the potential role of MRP8/14, we developed a peptide vaccine which is composed of KLH and a B-cell epitope of MRP8/14. After immunization, anti-MRP8/14 antibody titer was increased and sustained for more than two months after injection of vaccine. Importantly, it could suppress thrombus formation in middle cerebral arteries in mice for at least 2 months without affecting hemostatic parameters. Although S100A9 forms heterodimer with S100A8, the vaccine for S100A8 showed no effects. Thus, S100A9 antithrombotic vaccine might be a novel strategy to prevent recurrent strokes in non-adherent patients.

研究分野：循環器内科、免疫治療

キーワード：ワクチン 免疫治療

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化あるいは糖尿病などの進展には炎症の関与が明らかとなっており、病理学的な解析から、局所へのT細胞の集積、M1マクロファージの活性化、炎症性サイトカインの発現増加が炎症の実態であると考えられる。近年、腫瘍内に存在する Myeloid derived suppressor cells (MDSC)が免疫制御を介して癌の進展に深く関与することが明らかとなっている。MDSCはミエロイド細胞のマーカーとしてマウスではGr-1とCD11b陽性、ヒトではCD11bとCD33が陽性の未熟な細胞集団であり、通常は単球・樹状細胞・顆粒球系細胞に分化するが、癌・炎症・感染といった周辺環境ではMDSCが未分化な状態で増加することが知られている。

MRP8/14 (別名S100A8/A9)はMDSCに高発現する分泌蛋白であり、癌組織ではSTAT3シグナルによってオートクラインに発現増加しRAGEやTLR(Toll Like Receptor)を介して炎症性サイトカインの分泌も促進する。癌組織でMRP8/14を抑制することにより、MDSCの機能を抑制して癌の成育を抑制することも報告されている。興味深いことに、このMRP8/14は動脈硬化・冠動脈疾患の血中バイオマーカーとしての報告もあることから、MRP8/14あるいはMDSCの慢性炎症病態である動脈硬化・メタボリック症候群などへの関与が考えられる。

我々はこれまで液性免疫主導の抗体誘導ワクチンの開発に取り組んできた。抗原としてペプチドを用いたワクチンとしてDPP4を標的とした糖尿病ワクチン(PNAS 2014)、VEGFを標的とした癌ワクチン(Sci Rep 2013)、アンジオテンシンIIを標的とした高血圧ワクチン(Hypertension 2015、Stroke 2017、Sci Rep 2017)、これらはいずれも内因性分子に対する免疫応答を惹起するものであり、感染症ワクチンや癌ワクチンと全く異なるコンセプトであり、有効性のみならず高い安全性が求められる。我々はこの課題に対し、短い抗原を選択することによって抗原による直接的なT細胞活性化作用を回避し、細胞障害性免疫活性化による自己免疫疾患とならないような工夫を施した。この抗体誘導を主眼とした治療ワクチンの開発は抗体医薬と治療薬開発コンセプトが重複するところが多く、抗体医薬と同等の有効性と安全性を安価に確保できるオプションを提供できる可能性がある。近年様々な疾患に対する抗体医薬の奏効例が増えているが、もしこれらの疾患治療にもワクチン治療を導入することがで

ければ、薬剤に費やす医療費の削減のみならず、将来的には長期作動薬の導入により頻回な通院の回避・自己投与可能なワクチン導入による在宅医療の充実などの社会貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

近年、腫瘍内に存在する Myeloid derived suppressor cells (MDSC)と呼ばれる未分化な細胞集団が免疫制御を介して癌の進展に寄与していることが明らかとなっている。その制御分子の一つである Myeloid related protein(MRP)8/14はこのMyeloid系細胞に多く存在する蛋白であるが、腫瘍内で発現が高いのみならず、心血管イベントのバイオマーカーあるいは肥満患者での脂肪組織でその発現が亢進することが知られている。そこで、本研究ではメタボリック症候群・動脈硬化などの慢性炎症におけるMyeloid由来細胞の関与をマウス肥満モデル・動脈硬化モデルで検討し、さらにMRP8/14を標的とした治療として治療ワクチンを構築してその治療効果を検証することで、慢性炎症病態におけるMyeloid由来細胞を介した免疫応答から病態治療の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

慢性炎症病態(動脈硬化・糖尿病・血管障害)でのMDSCの役割・機能評価をMRP8/14を中心にして解析する。

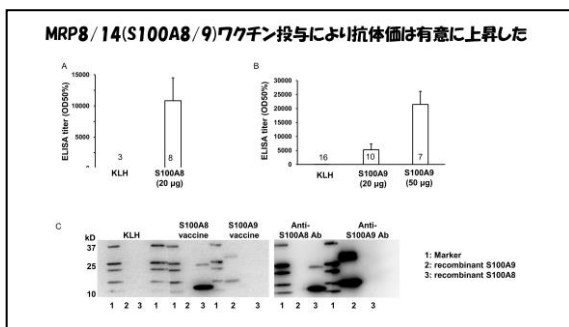
- 1) 病態モデルマウスにおけるMDSCの解析  
マウスモデルにおけるMDSCの発現を免疫染色・FACSで解析し、局在および定量評価からT細胞やM1/2マクロファージの発現と比較検討する。
- 2) MRP8/14を標的としたワクチンによるMDSC機能制御と薬効評価  
MRP8あるいはMRP14に対する抗体産生を誘導するワクチンを設計し、抗体価の上昇を確認した後に担癌モデルでの腫瘍に対する薬効試験と糖尿病モデルでの糖代謝・能虚血モデルでの評価を行い検討する。

## 4. 研究成果

糖尿病マウス、脳梗塞モデルでのMDSCの評価を行った。いずれのモデルにおいても脾臓由来細胞でMDSC(Gr-1およびCD11b陽性)を確認し、さらに好中球由来のPMN-MDSC(CD11bおよびLy6G陽性、Ly6C<sup>low</sup>)と単球由来のM-MDSC(CD11b陽性、Ly6C<sup>high</sup>、Ly6G陰性)に分けて詳細な解析を行った。糖尿病マウス

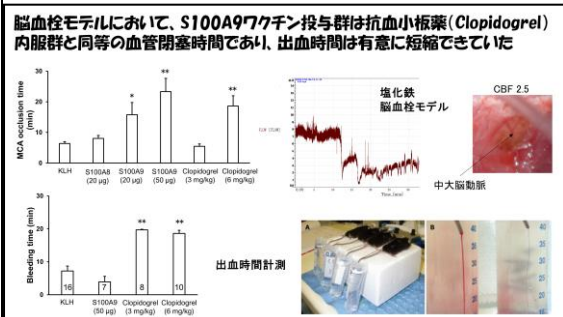
での脾臓の MDCS の発現は野生型と変わりなかったが、脳梗塞急性期で PMN-MDSC の割合が増える傾向にあった。さらに、梗塞脳での発現を調べたところ、同様に PMN-MDSC が増える傾向にあった。臨床的には、脳梗塞後には肺炎の増加などの感染症が多く認められるが、活動性の低下以外に MDSC を介した免疫機能への関与が考察される。

本研究では治療的な見地から、この MDSC で高発現しかつ機能調節分子である MRP8/14 を治療標的とした治療ワクチンを開発することとした。MRP8 あるいは 14 の配列から最適な抗原部位をそれぞれ 2 種類設計し、それをキャリア蛋白である KLH と conjugate することでワクチンを設計した。なお、この治療ワクチンは MRP8 あるいは 14 に対する抗体を高効率に産生させる液性免疫ワクチンであり、一方で MRP8/14 は内在性蛋白のために自己免疫性疾患にならないようにするため、MRP8/14 の抗原配列には T 細胞活性化配列を含まないようにして、細胞障害 T 細胞の活性化を回避する工夫をした。このワクチンを 2 週間毎に 3 回、フロイントアジュバント（1 回目は complete、2 回目は incomplete）とともにマウスに投与したところ、それぞれ MRP8 および MRP14 に対する抗体価の有意な上昇を認め、より高い抗体価を示したそれぞれ 1 種類のワクチンを選択した。そこでそのワクチンを用いてモデル動物での薬効試験を行った。

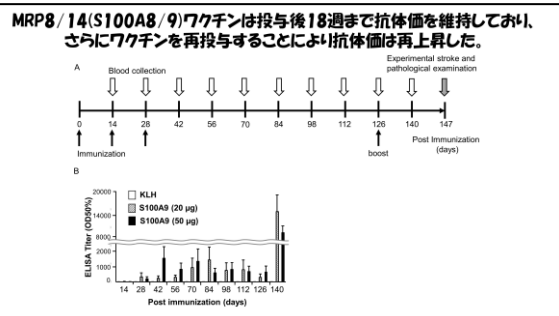


高脂肪食負荷をかけた C57B1/6 マウスに MRP8 および MRP14 に対するワクチンを投与し、高脂肪食負荷 2 ヶ月後から 3 ヶ月後にかけて耐糖能試験（糖負荷試験及びインスリン負荷試験）を行った。結果は、両方のワクチン投与による体重の増減はなく、耐糖能試験でも対照群と比較して有意な差は認められなかった。また、マウス F10 メラノマ細胞を用いた担癌モデルでの検討も行った。MRP8 および MRP14 に対するワクチンを投与しその後癌を接種して経時的に腫瘍サイズを測定したが、有意な変化を認めなかった。

その他の病態モデルとして、脳梗塞モデルでの検討を行った。中大脳動脈を塩化鉄で処理することにより酸化ストレスが発生し血管内皮障害が生じ血小板の活性化から血管閉塞に至るモデルを用いた。同様に C57B1/6 マウスに MRP8 および MRP14 ワクチンをアジュバントとともに 2 週間毎に 3 回投与し、塩化鉄による血管閉塞モデルを施した。結果、MRP14 ワクチンは対照群と比して血管閉塞時間が有意に延長し、またその効果はワクチンの抗原量に用量依存性に延長していた。陽性コントロールとして用いた抗血小板薬であるクロピドグレル（6 mg/kg）とほぼ同様の効果であった。一方で出血時間の検討では、MRP14 は対照群に比べて有意な変化は認めず。陽性対照のクロピドグレルは低用量（3 mg/kg）においても有意に出血時間が延長していた。一方、MRP8 ワクチンでは抗体価の上昇は得られたものの、血管閉塞時間の延長は認められなかった。



長期的な観察では、この MRP14 ワクチンの評価を行った。ワクチン投与後 18 週においても抗体価は維持されていた。また、その時点で MRP14 ワクチンを再投与したところ再度抗体価の上昇が認められた。そのマウスにおいて再度血管閉塞時間を測定したところ、有意な延長が認められた。すなわち、MRP14 ワクチンの効果は長期持続しており、再投与によるブースター効果も確認できた。



MRP14 は CD36 を介した血小板活性化作用を有することから、MRP14 ワクチンは抗血小板作用を有する新しい長期作動型治療薬として期待される。

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：S100A9 を標的とする免疫原性組成物

発明者：中神啓徳、島村宗尚他

権利者：大阪大学 (中神啓徳、島村宗尚他)

および株式会社ファンペップ

種類：用途特許

番号：特願 2017-30327

出願年月日：2017年2月21日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大阪大学大学院医学系研究科健康発達  
医学講座寄附講座教授 中神 啓徳  
(NAKAGAMI, HIRONORI)

研究者番号：20325369

### (2) 研究分担者

大阪大学医学部附属病院総合診療部  
助教 中神 太志 (NAKAGAMI, FUTOSHI)

研究者番号：60739176