

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17569

研究課題名（和文）sEH阻害ワクチンによる循環器病の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of sEH inhibitory vaccine for the treatment of cardiovascular diseases

研究代表者

白木 綾 (Shiraki, Aya)

佐賀大学・医学部・寄附講座教授

研究者番号：50638252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：血管拡張作用、抗炎症作用のあるEETsという体内で産生される機能性脂質の活性を上げるためにsEH蛋白の機能を抑制するsEHワクチンを開発しました。sEH蛋白はEETsを分解する蛋白です。このワクチンを打つことでマウス、ラット、ハムスターの体内にsEH阻害を担う抗体が産生されることを確認しました。また、このワクチンを投与したラットが心筋梗塞になった場合、ワクチンを投与していないラットと比べて、軽く済むことがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管や心臓にとって保護的に働くEETsの作用を生かし、安価なワクチンで製剤化する試みは世界でも初めてのことです。ラットにおいて、心筋梗塞を軽くできる効果は期待できるものです。しかしながら、現在は動物実験の段階でありますので、今後ヒトに使用できるようになるまでには、ワクチンの配列の問題、アジュバント選択の問題、局所の腫れ、何回投与が必要なのか、などの問題や実際ヒトで効果があるのか確かめることなど乗り越えるべきハードルもあります。

研究成果の概要（英文）：We have developed an sEH vaccine that suppresses the function of the sEH protein in order to increase EETs in the body, a functional lipid produced by the body that has vasodilatory and anti-inflammatory effects. sEH protein is a protein that degrades EETs. We have confirmed that this vaccine causes the production of antibodies responsible for sEH inhibition in the bodies of mice, rats, and hamsters. We also found that when rats administered this vaccine suffered a myocardial infarction, it was less severe than in rats not administered the vaccine.

研究分野：循環器内科

キーワード：EETs sEH ワクチン 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患や心不全などの慢性に進行する疾患に対しては、永年にわたる毎日の定期的な薬物内服療法、もしくは冠動脈ステントや両室再同期療法(CRT-D)などの高価で大掛かりなデバイスの埋め込み手術などが主流であり、服薬のアドヒアランス管理も容易ではなく、医療費は高騰し続けている。

心不全に対するワクチンができれば、長期間治療効果の持続が期待でき、毎日の服薬、毎月の通院が不要となり患者の QOL(生活の質)は向上し、現在の医療を一変させる可能性がある。医療費の抑制も期待できる。共同研究者である中神教授は高血圧治療の一環としてアンギオテンシン に対するワクチンの効果を実証し、臨床実証段階に入っている。我々は高血圧だけではなく、冠動脈疾患や、心不全などにも効果が期待できる蛋白として、以前より研究を重ねてきた内皮細胞などより分泌される epoxyeicosatrienoic acids (EETs)に注目した。EETs は循環器領域において、有益な心・血管保護作用、血圧低下作用などが報告されてきた魅力的なターゲット蛋白であり、細胞実験及び動物実験においては有効性が示されているものの、現時点では臨床応用されていない。そこで EETs を不活化して DHET にする蛋白、soluble epoxide hydrolase (sEH) に対するワクチンの開発を計画した。

2. 研究の目的

この研究の目的は、抗 soluble epoxide hydrolase (sEH)ワクチンを開発することである。ワクチン接種により慢性心不全、心筋梗塞後リモデリングの抑制、動脈硬化性疾患などに対し簡便で安価な長期の治療効果が期待できる

3. 研究の方法

共同研究者である大阪大学、中神啓徳教授はアンギオテンシン や DPP4 に対するワクチン治療の有効性を動物実験において報告してきた。今回中神教授の協力を得て、中和抗体を産生可能な部分を解析し、ペプチド化した後、T細胞活性化を促す KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させ、フロイントのアジュバントと混和して投与する。投与対象となるのは、心不全モデルマウス・ハムスターと心筋梗塞モデルラットである。

ワクチンの製造

まずは sEH の構造解析を行い、酵素活性部分、構造保持部分、結合部などの重要部分に位置する場所の候補ペプチドを製造した。BL6 マウス(4 匹、8~9 週齢雄マウス, n=4)に投与し、中和抗体が産生されるペプチドを探索した。その後抗体価が上昇する有力ペプチドを絞り込み、その後別の配列も抗体が上昇するか、またその抗体は sEH 阻害作用を有するのかを質量分析と重水素結合標準物質を使用して確かめた。

ワクチンの効果の探索

1) 慢性心不全モデル(マウス) n=16 (図 3)

心不全モデルマウスに対し、ペプチド 1 をワクチンとして 2 週間毎に 4 回投与する。効果判定については、生存曲線による予後改善効果、心臓/体重比、超音波、心内圧カテーテルによる心機能計測、病的検索、蛋白発現解析などで行う。心不全モデルに関しては、MnSOD-KO マウスを用いた。この系統は、心臓・骨格筋特異的に MnSOD が欠損しており、心筋内で酸化ストレス過剰状態となり自然に拡張型心筋症を呈する。完全に慢性の経過をたどり、17 週齢で半数が死亡するため、 Kaplan-Meier による解析にてワクチンの効果を検証した。しかしながら、ワクチンによる抗体の上昇より先にこのマウス特異的な自然経過による心不全死をきたす個体が多く出現したことから、このモデルではワクチンの効果は判定できないと判断し、心不全ハムスターモデルに変更することにした。

心不全ハムスターモデル (J2N-k) でもワクチンの投与を行って、ワクチンによる抗体産生の効果の確認、生命予後、心機能について確認した。

2) 心筋梗塞モデルラット

ワクチンの投与を行い、その後 LAD 結紮により心筋梗塞モデルを作成した。心機能は LAD 結紮後 7 日目に心臓エコー検査にて確認した。組織学的検討により虚血領域減少効果を確認した。組織染色により血管関連蛋白の染色により血管数を計測し、また心臓全体をサンプルとした蛋白発現の検討をウエスタンブロッティングにて行った。平行して、当大学にある LC/MS/MS 機器にて EETs の検出を検討した。sEH 阻害率は d - 11EET/d - 11DHET の比で計算した。

4. 研究成果

1) 慢性心不全モデルに関して

マウスにおいては、抗体産生に 2 週間毎 4 回の投与つまり抗体の十分な上昇までに 10 週間

を有することが分かった。そのため、MnSOD-ck0 マウスの心不全経過が早すぎて、ワクチンの効果が出る前に生命予後がきてしまうことが分かった。そのため、より長い経過をたどる心不全ハムスターモデルに変更した。ハムスターでも抗体の上昇は確認できた。しかしながら、心機能、生命予後の変化という点については、ワクチンの保護的な効果は確認されなかった。いっぽう、コントロールのためにワクチンを投与していた健常ハムスターは、ワクチンを投与していないハムスターよりも寿命が長くなる傾向にあり、その機序は不明であるためその効果の確定と確認の実験が望まれる。

2) 心筋梗塞モデルにおける sEH ワクチンの効果について

sEH ワクチンをあらかじめ投与し、抗体価が上がった状態でラットに心筋梗塞を作成した。。これまでの結果より、Wister rat にワクチンを投与するとマウスよりも抗体の産生は良好であった。ペプチド については3回投与にてほぼ免疫を獲得できる可能性が高いことが分かった。実験の結果、心筋梗塞から7日後の心機能はワクチン非投与群に比べ維持されていた。また、心筋梗塞部のサイズはワクチン投与群において有意に小さい傾向にあった。左室収縮能はワクチン投与群において維持される傾向であった。組織学的検討では心筋梗塞部の周囲において小血管が増加し、また心筋では VEGF 蛋白や eNOS 蛋白発現の上昇が認められ、sEH 蛋白の阻害により EETs の濃度が上昇し、VEGF 蛋白や eNOS 蛋白の発現上昇を促し、小血管の増生を伴い、最終的に心筋梗塞サイズを小さく保つ効果があったものと推測された。また in vitro の実験ではラット体内で産生されていた抗体は sEH 阻害効果を示し、EET の分解を抑制することを確認した。結果は米国心臓協会、国際高血圧学会などの国際会議にて発表し、論文は Scientific Reports に掲載された。血管障害系モデルにおいて sEH ワクチンは効果が認められ、今後脳梗塞や閉塞性動脈硬化症などにおいて応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Kitsuka, Aya Shiraki, Jun-ichi Oyama, Hironori Nakagami, Atsushi Tanaka and Koichi Node	4. 巻 12
2. 論文標題 A Novel Soluble Epoxide Hydrolase Vaccine Protects Murine Cardiac Muscle Against Myocardial Infarction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahiro Kitsuka, Aya Shiraki, Jun-ichi Oyama, Hironori Nakagami, Atsushi Tanaka and Koichi Node
2. 発表標題 A Novel Soluble Epoxide Hydrolase Peptide Vaccine Attenuates Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through Angiogenesis
3. 学会等名 American Heart Association （国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木塚 貴浩, 木塚 貴浩, 白木 綾, 中神 啓徳, 田中 敦史, 野出 孝一
2. 発表標題 可溶性エポキシドヒドロラーゼをターゲットとしたペプチドワクチンは心筋梗塞後のリモデリングを抑制する
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木塚 貴浩, 白木 綾, 中神 啓徳, 田中 敦史, 野出 孝一
2. 発表標題 可溶性エポキシドヒドロラーゼペプチドワクチンは心筋梗塞誘発性心室リモデリングを抑制する
3. 学会等名 第131日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド及び医薬組成物	発明者 白木綾 野出孝一 木塚貴浩 中神啓徳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、SU2103JPPS	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

佐賀大学医学部循環器内科 基礎研究の紹介 https://saga-cardiology.com/basic_research/ さがシーズ 医学部研究者一覧 白木 綾 https://musubime.saga-u.ac.jp/medicine/shiraki_aya/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野出 孝一 (Node Koichi)		
研究協力者	中神 啓徳 (Nakagami Hironori)		
研究協力者	木塚 貴浩 (Kitsuka Takahiro)		
研究協力者	尾山 純一 (Oyama Jun-ichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------