

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659418

研究課題名（和文） アンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of DNA vaccine for Angiotensin II

研究代表者

勝谷 友宏 (KATSUYA TOMOHIRO)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：30311757

研究成果の概要（和文）：近年アルツハイマー病や脂質異常症のような自己抗原を標的としたワクチン開発も進められている。本研究では高血圧症に対するワクチン治療法を開発するため、アンジオテンシン II を標的としたペプチドおよび DNA ワクチンの作製とモデル動物における治療効果の検討およびその作用機序の解明を行った。

アンジオテンシン II と KLH の conjugate ワクチンを投与することにより、抗体価は抗原量依存的に優位に上昇した。ワクチンで抗体価上昇を確認した後にアンジオテンシン II を持続投与したところ、血圧は有意に低下し、その低下度は抗体価を逆相関の関係にあった。一方、高血圧自然発症ラットにアンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチンを投与したところ、抗体価の有意な上昇とそれに伴う血圧の低下を認め、この効果は投与後 6 か月間以上持続していた。

研究成果の概要（英文）：Vaccines have been recently developed to treat various diseases such as cancer, rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease. However, before use in the clinical setting, vaccines targeting self-antigens must be demonstrated to be effective and safe, evoking an adequate humoral immune response from B cells. In this study, we evaluated the efficiency and safety of an Ang II vaccine in mice and rats. Immunization with Ang II conjugated to KLH successfully induced the production of anti-Ang II antibody. In an Ang II-infused model, the non-immunized mice showed high blood pressure (BP), whereas the immunized mice (Ang II-KLH) showed a significant decrease in systolic BP. In terms of DNA vaccine, plasmid vector encoding hepatitis B core (HBc)-Ang II fusion protein was injected into spontaneously hypertensive rats (SHR). Anti-Ang II antibody was successfully produced in HBc-Ang II group, and antibody titers were sustained for at least 6 months. Systolic BP was consistently lower in HBc-Ang II group after immunization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：分子血管病態学、高血圧

1. 研究開始当初の背景

高血圧症の治療にはカルシウム拮抗薬や

レニン・アンジオテンシン系阻害剤などの降圧薬が広く用いられている。これらの薬剤は

いずれも優れた降圧効果を持ち、経年の使用により様々な有効性および副作用に関するエビデンスも蓄積されつつある。しかしながら数種類の降圧薬を併用しても降圧が不十分な症例も多く、そういった例では更に追加できる降圧手段の開発や、アドヒランスの向上も大きな課題である。また我が国は他に例の無い急激な速度で高齢化が進んでおり、今後高血圧症患者数がますます増加することは必至であり、それに伴う医療費の増大にどう対応するかも社会的な課題である。

もし、年に1~2回程度ワクチンを投与することによって、必要な降圧薬を減量あるいは中止することができたら、アドヒランス向上による治療効果の改善や、医療費の削減効果など、非常に有益な効果がもたらされると考えられる。これまでに高血圧症に対するワクチン治療としては、レニン、アンジオテンシン I および II、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いる。レニンでは副作用が認められ (Michel JB, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987)、アンジオテンシン I では有効性が得られなかった (Reade R, *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1989) が、アンジオテンシン II および1型アンジオテンシン受容体 (Zhu F, *Cell Mol Immunol*, 2006) では有効性が認められ、アンジオテンシン II では臨床試験も進められつつある (Ambuhl PM, *J Hypertens*, 2007)。

2. 研究の目的

DNA ワクチンは、感染症や腫瘍などを標的とした開発が盛んであるが、最近アルツハイマー病 (amiloid beta) や脂質異常症 (CETP) のような自己抗原を標的とした研究も進められており、CETP に対するワクチンでは脂質異常症の改善効果が報告されている (Mao D, *Vaccine*, 2006)。そこで本研究では高血圧症に対する DNA ワクチンによる治療法を開発するため、アンジオテンシン II を標的としたペプチドおよび DNA ワクチンの作製とモデル動物における治療効果の検討およびその作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) ペプチドワクチン

アンジオテンシン II に対する抗体上昇と薬効評価を行うために、まずはアンジオテンシン II と KLH との conjugate ワクチンを用いたマウスでの検討を行った。

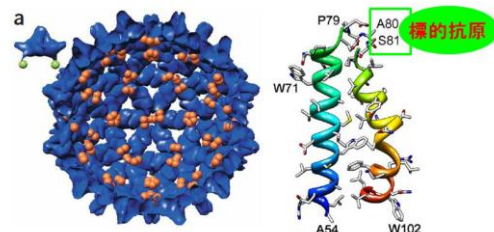
2週間毎に3回ワクチン接種を行い抗体価の上昇を確認した後に、アンジオテンシン II 持続投与による血圧上昇あるいは心筋肥大・線維化の程度に対する評価を行った。

2) DNA ワクチン

アンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチン用ベクターの作成抗原提示能を高めるために、自己集合して球状になる性質を有する Hepatitis B core (HBc) をを用いてアンジオテンシン II を HBc の A80-S81 の間に挿入したかたちで発現させるベクターを作製する。さらに免疫原性を高めるため、アジュバント活性を持つことが報告されている CpG 配列を含んだ Immunostimulatory Sequence (ISS) をプラスミドの非発現領域に挿入する。作製したベクターが HBc とアンジオテンシン II の融合蛋白 (HBc-AngII) を正しく発現することを確認するため、ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、この細胞抽出液に対し抗 HBc 抗体および抗アンジオテンシン II 抗体でウエスタンブロットを行う。

HBcを利用した免疫誘導システム

HBcは自己集合して球状になる。A80-S81の間にペプチドを挿入することで、表面に提示させることができる。免疫系に認識され易く、高力価の抗体が産生される。



3) 薬効評価

我々はこれまでに、シマジェットを用いてベクターを皮内に投与することで、筋肉内投与よりも少量で高効率に遺伝子導入できることを明らかにし、各種遺伝子治療研究に用いている (Kunugiza Y, *Gene Therapy*, 2006)。そこでこのシマジェットを用いて HBc-AngII ベクターを高血圧ラット (SHR) の背部に複数回投与し、血圧降下の程度およびアンジオテンシン II に対する抗体価の上昇の程度を確認する。血圧はテイルカフ法で計測し、抗体価は ELISA で測定する。投与間隔はまず2週間で行うが、適切な間隔についても検討する。

血圧および抗体価の測定終了後、脾臓を摘出し、ELISPOT assay により細胞性免疫の程度を確認する。また、抗原抗体複合体が腎臓に沈着して腎障害を引き起こす可能性について検討するため、腎臓の組織切片を作製し、病理組織学的に解析する。同様に、アンジオテンシン II を発現する細胞に対する傷害性の有無についても病理組織学的に解析する。

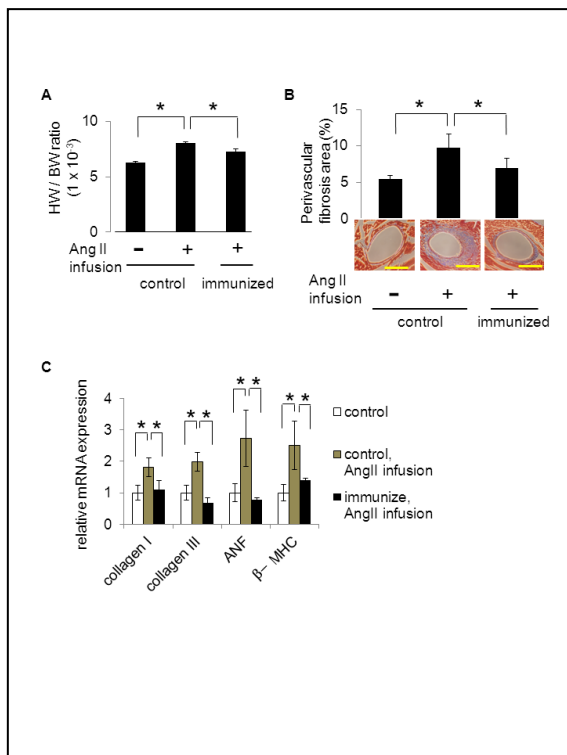
4. 研究成果

1) ペプチドワクチン

アンジオテンシン II と KLH の conjugate

ワクチンと CFA (Complete Freund Adjuvant) を同時に投与することにより、抗体価は抗原量依存的に優位に上昇した。抗体はアンジオテンシン II に比較的に特異的であり、アンジオテンシン I は弱く認識し、アンジオテンシノーゲンは認識しなかった。この野生型マウスではワクチン後も血圧の低下は認められなかった。すなわち、アンジオテンシン II の作用をブロックしても血圧は代償的に維持されていることは推察される。

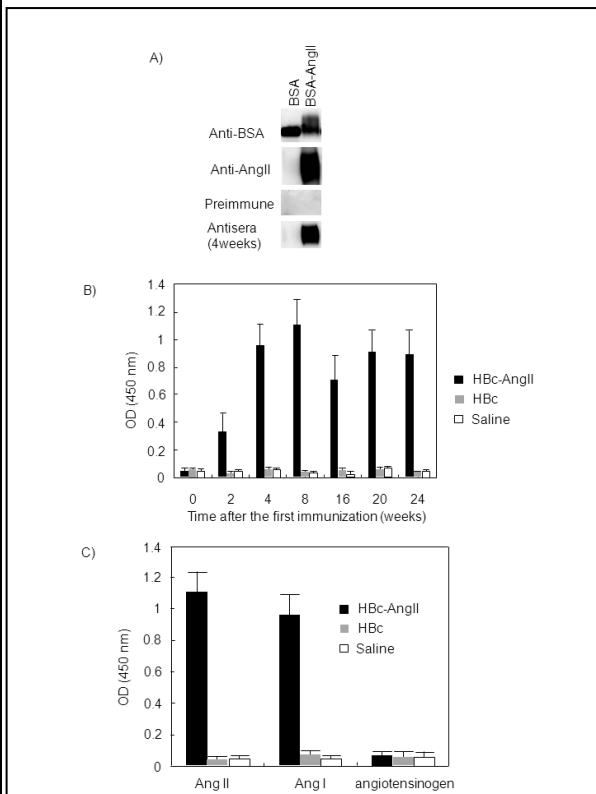
ワクチンで抗体価上昇を確認した後にアンジオテンシン II を持続投与したところ、血圧は有意に低下し、その低下度は抗体価を逆相関の関係にあった。また、アンジオテンシン II 持続投与によって誘導された心肥大及び線維化はワクチン投与で減弱していた (下図)。また、抗原であるアンジオテンシン II を持続投与しても抗体価は全く上昇せず、ブースター効果はなかった。すなわち、内因性のアンジオテンシン II に対する障害性、いわゆる自己免疫疾患は回避できたと考察された。



2) DNA ワクチン

高血圧自然発症ラットにアンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチンを 2 週間毎に 3 回投与したところ、アンジオテンシン II に対する抗体価の有意な上昇とそれに伴う血圧の低下を認め、この効果は投与後 6 か月間以上持続していた。すなわち、プラスミド DNA によって発現したアンジオテンシン II が抗原となって B 細胞を活性化して抗体産生を促し、さらに B 型肝炎コア蛋白の助けを借り

てヘルパー T 細胞が活性化することで抗体産生を助長したと考えられる。抗体の特異性に関して調べた結果、アンジオテンシン II のみならずアンジオテンシン I に対しても抗体価の上昇が認められたが、アンジオテンシノーゲンおよびアンジオテンシン (1-7) に対する抗体価は上昇していなかった。すなわち、今回のアンジオテンシン II を標的とした DNA ワクチンは結果としてアンジオテンシン I と II の両方を認識するため、ARB とは若干薬効が異なる可能性もあると考察される。



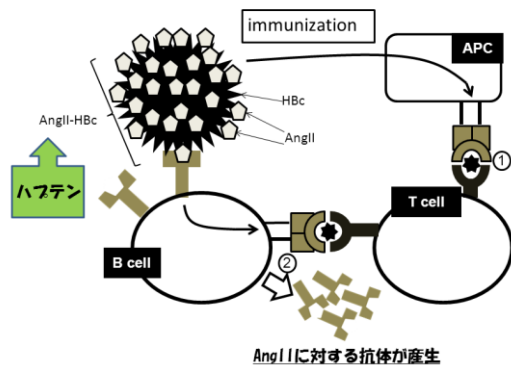
3) 安全性の評価として T 細胞の活性化 (ELISPOT アッセイ) の評価を行った。

アンジオテンシン II 単独での HbC および HbC-AngII で免疫したラットの脾臓由来培養細胞に、アンジオテンシン II あるいは HbC を添加して、インターフェロン γ およびインターロイキン 2、4、10 を定量化した。結果は、HbC あるいは HbC-AngII で免疫したマウスでは HbC 刺激によってインターフェロン γ およびインターロイキン 2 の発現が増加したが、アンジオテンシン II に対しては反応しなかった。どちらの刺激に対してもインターロイキン 4 および 10 の発現変化はなかった。すなわち、ヘルパー T 細胞の活性化作用は主として HbC の T cell epitope によって生じ、Th1 優位の活性化であることが示唆された。

今回用いた抗原は 8 アミノ酸しかないため、MHC クラス II への抗原提示はなく、MHC クラス I に対しても可能性はかなり低いと考えら

れる。このような免疫原性の低い抗原はハプテンと言われるが、その場合には免疫原性の高い物質、例えばKLHなどと融合させることで抗体産生を促す。このDNA ワクチンシステムではこの働きをHBc が担っており、T 細胞の活性化自体は HBc の配列中に含まれる T cell epitope によって活性化されると考えられる（下図）。

アンジオテンシンIIに対するDNAワクチン



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 1 件)

Nakagami F, Koriyama H, Nakagami H, Osako MK, Shimamura M, Kyutoku M, Miyake T, Katsuya T, Rakugi H, Morishita R. Decrease in Blood Pressure and Regression of Cardiovascular Complications by Angiotensin II Vaccine in Mice. PLoS One. 2013;8(3):e60493.

[学会発表] (計 2 件)

1. 中神啓徳 「Development of DNA vaccine for high blood pressure - Immunotherapy for angiotensin II -」 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会 2011.7.17 福岡
2. 森下竜一、中神啓徳 「高血圧自然発症ラット (SHR) モデルにおけるアンジオテンシン II ワクチン治療法の開発」 第 34 回日本高血圧学会 2011.10.21. 宇都宮

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝谷 友宏 (KATSUYA TOMOHIRO)
大阪大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任准教授
研究者番号 : 30311757

(2) 研究分担者

中神 啓徳 (NAKAGAMI HIRONORI)

大阪大学・連合小児発達学研究所・寄附
講座教授

研究者番号 : 20325369