

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791487

研究課題名(和文) ラットにおけるアンギオテンシン 遺伝子ワクチンを用いた脳梗塞新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the Novel Therapeutic Strategy for Cerebral Infarction; The Efficacy of Angiotensin II DNA Vaccine in Rat Model of Cerebral Infarction.

研究代表者

若山 幸示 (Kouji, Wakayama)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50349263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞治療の新規治療戦略の確立をめざしAngiotensin II (Ang II) DNAワクチンによる脳梗塞治療の可能性をラット脳梗塞モデルで検討した。Ang II DNAワクチン接種ラットでは中大脳動脈閉塞術適齢期の8週齢での抗体価上昇率が極めて低く、Ang IIペプチドワクチンを検討したところ非常に強い抗体産生能を有することが確認されたため、Ang II ペプチドワクチンによる脳梗塞治療の可能性を検討した。一定以上の抗体価が得られた場合に脳梗塞縮小、神経機能改善が認められ、作用機序は脳組織レニンアンギオテンシン系の活性化阻害、抗酸化作用を介したものであることが示された。

研究成果の概要(英文)：The feasibility of therapeutic application of angiotensin II (Ang II) DNA vaccine against middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rat was investigated. Because of its low immunogenicity of Ang II DNA vaccine, the level of serum Ang II titer remained extremely low. The application of Ang II peptide vaccine was investigated to solve this problem. Ang II peptide vaccine induced substantially high level of Ang II titer in sera, which motivate us to verify the cerebroprotective effects of Ang II peptide vaccine against MCAo rat. The findings indicated that efficacy of Ang II peptide vaccine including amelioration of ischemic brain damage and neurological dysfunction was exerted only when sufficient level of serum Ang II titer was obtained at the time of cerebral ischemic insult. The antioxidative effect through inhibitory effect against brain rennin angiotensin system was the suggested mechanism of Ang II peptide vaccine in cerebral ischemia.

研究分野：脳血管障害の基礎研究

キーワード：脳血管障害 ワクチン療法

1. 研究開始当初の背景

近年、新たな高血圧治療法として Ang をターゲットとしたペプチドワクチンの臨床試験が行われ、ワクチン投与による血圧の有意な低下が Lancet 誌¹に報告されている。このようなワクチン療法の適応拡大の試みであるが、脳神経領域ではアルツハイマー病や多発性硬化症でのワクチン療法が検討されてはいるものの脳血管障害に対するワクチン療法の報告はほとんどみられない。RAS 阻害が脳血管自動調節能正常化、血液脳関門保護、抗炎症作用などを介して脳虚血に保護的に作用することも良く知られている。これらは Ang ワクチン療法が脳保護作用を有する可能性を強く示唆する。

本研究は、DNA ワクチンを用いての脳虚血保護の可能性を検討する。DNA ワクチンはペプチドワクチンに対して以下に挙げるような利点を有する。1) 抗原の発現期間がペプチドワクチンに比較して長い。2) DNA 自体が自然免疫系を活性化することからアジュバント製剤が不要である。3) 挿入する遺伝子の大きさに制限がなく構造が単純、容易かつ安価に作成可能である。一方で DNA ワクチンは免疫原性の低さからくる抗体誘導能の低さが実用化の障害になってきた経緯がある。より現実的な選択肢としてのペプチドワクチンが臨床研究を含め、より広範に検討が進められていることも考慮し、いまだに新たな治療選択肢としての十分な検討がなされていない、脳卒中ワクチンの実現に向けて検討を進める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では脳梗塞の病態進展に重要な役割を有することが知られる

Angiotensin II (Ang II) を内因性標的物質とする DNA ワクチンの事前接種が脳梗塞急性期の病態に保護的に作用するかを、ラット脳梗塞モデルを用いて検証した。脳梗塞治療の新たな選択肢としての DNA ワクチン療法の可能性を示すことで今後の研究の進展の重要なステップとなることをめざす。

3. 研究の方法

(1) Ang II DNA ワクチンの検討

DNA ワクチンプロトコール

正常血圧ラット (SD ラット、オス、5 週齢) を Ang DNA ワクチン接種群、生理食塩水 (生食) 接種群の 2 群に分け、針なし注射器を用いて 5, 6, 7 週齢の計 3 回、背部 2 か所に皮内投与 (100 μ g/100 μ l/回) を行った。

血清 Ang II 抗体価の算出

脳梗塞作成適齢期に該当する、8 週齢 (DNA ワクチン最終接種後 1 週目) の血清を採取し、ELISA を行い抗体価 (OD50%値) を算出し、血清中抗 Ang II IgG 濃度の定量化を行った。

ラット脳梗塞モデルの作成

ワクチン 3 回目接種ののち 1 週間後、8 週齢の時点でナイロン糸による永久中大脳動脈閉塞 (permanent-middle cerebral artery occlusion; p-MCAo) モデルを作成した。

脳梗塞体積の定量とワクチン接種の影響

中大脳動脈閉塞後 24 時間の時点でワクチン接種群、生食投与群、それぞれのラットを犠牲死させる。4%パラフォルムアルデヒド固定、スクロース溶液置換後、脳凍結ブロックを作成。1mm 間隔の連続切片を作成、cresyl-violet (CV) 染色により梗塞領域を同定、梗塞体積を算出した。

(2) ペプチドワクチンの検討

ペプチドワクチンプロトコール

正常血圧ラット (SD ラット、オス、4 週齢) を Ang ペプチドワクチン群、生食群の 2 群に分け、4, 6, 7 週齢の計 3 回、背部 4 ヶ所に

皮下注射(10 µg/200 µl/回)を行った。

なおワクチンは初回は complete Freund's adjuvant を 2 回目、3 回目は incomplete Freund's adjuvant を、Ang II-KLH と等量混合乳化し接種した。

Ang II 抗体血清抗体価の算出

8 週齢(ペプチドワクチン最終接種後 1 週目)の血清で ELISA を行い Ang II 抗体価(OD50%値)を算出した。

血圧の測定

Ang II ワクチン群、生食群それぞれ 4,6,7,8(脳梗塞前)週齢の各時点で収縮期血圧を測定した。

循環 Ang II 濃度の測定

8 週齢の時点で Ang II ペプチドワクチン群、生食群の血清を採取、ELISA にて Ang II 濃度を測定した。検査は SRL に委託した。

脳梗塞モデルの作成

8 週齢(ワクチン 3 回目接種後 1 週間)の時点で p-MCAo モデルを作成。ナイロン系の挿入以外は同じ手順で生食投与群のラットに sham 手術を行った。

脳実質抗体障害側健常側比の算出

脳梗塞 24 時間後の脳組織を障害側半球、健常側半球に分割、ホモジナイズして得られた組織抽出液(総蛋白 60 µg)を用い、マイクロプレートリーダーで OD450 の吸光度を測定、Ang II に対する IgG 抗体反応を定量化した。
(脳実質抗体障害側健常側比)=(障害半球の OD450 値)/(健常半球の OD450 値)

以上により全身循環から脳梗塞半球への抗 Ang II 抗体移行性を評価した。

脳梗塞病変中における Ang II 濃度の測定

Ang II ワクチン治療群、生食治療群それぞれにつき p-MCAo 6,12,24 時間の虚血半球サンプルをホモジナイズし、ELISA にて Ang II 濃度を測定した。検査は SRL に委託した。

脳梗塞体積の算出

p-MCAo 後 24 時間の時点で採取した脳連続切片の CV 染色により脳梗塞体積を算出した。

脳組織 RAS コンポーネントの定量

Sham 手術群は術後 24 時間、Ang II ワクチン群、生食群は p-MCAo 後 6,12,24 時間の各時点における MCA 領域の虚血側半球(sham 手術群は右半球)組織から RNA を抽出した。リアルタイム PCR により、18S rRNA の発現を対照として ang II 1 型受容体(AT1R)、angiotensinogen (AOPEN)の発現を評価した。

神経症候の評価

Sham 手術群、Ang II ワクチン群、生食群の各群のラットにつき MCAo24 時間後の神経重症度スコア(NSS)を記録、神経機能障害を定量化した。

脳梗塞病変における変性神経細胞の定量

Ang II ワクチン群、生食群の各群のラットにつき、MCAo24 時間後の脳梗塞病変を含む凍結切片を用い Fluoro-jade B 染色を行い変性神経細胞数を定量化した。

酸化ストレスの評価

Ang II の活性化は各種病態における酸化ストレスの促進に関わることが知られている。Ang II ワクチン群、生食群において MCAo24 時間後の虚血半球のホモジネートでウエスタンブロッティングを行い、代表的酸化ストレス産物で過酸化脂質生成物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)の生成量を調べた。

4. 研究成果

(1) Ang II DNA ワクチンの検討

Ang II 抗体価の測定

8 週齢(ワクチン最終接種後 1 週間目)の時点で各群の Ang II 抗体価(OD50%)増加がみられた個体の割合は以下の通りであった。なお、括弧内は(抗体価の増加した匹数)/(接種した全匹数)を示す。

DNA Ang II ワクチン群	9% (1/11)
生食群	0% (0/6)

また DNA ワクチン接種ラットで唯一、抗体価上昇が確認された個体もその抗体価は 416(OD50%)と低値であった。

ワクチン接種と脳梗塞体積

Ang II ワクチン接種群、生食群で MCAo24 時間後の脳梗塞体積を定量した結果、ワクチン群で脳梗塞体積が小さい傾向はみられたが統計的有意差は認めなかった(DNA ワクチン接種群 $104.76 \pm 27.41 \text{ mm}^3$ 、生食群 $153.08 \pm 42.69 \text{ mm}^3$, $P = 0.34$)。

以上の結果から Ang II DNA ワクチン接種による Ang II 抗体価増加率は 9%と低く、さらに抗体価に関して最も高い個体で 416 と低く DNA ワクチンの免疫原性の低さが問題と考えられた。脳梗塞体積はワクチン群で脳梗塞体積が小さい傾向がみられたが、ワクチン有効性の評価指標である抗体価の増加率が極めて低いことから Ang II DNA ワクチンを用いた脳梗塞治療研究の継続は困難と考えられた。現状、Ang II ワクチンは高血圧治療への応用をめざし検討がすすめられているが Ang II ペプチドワクチンによる脳梗塞治療の報告は存在しないこと、DNA ワクチンの有効性の検証という目標達成は不可能であっても、最大の目標である脳梗塞治療における新規治療法の開発という観点において、ペプチドワクチンを含めた脳梗塞ワクチン治療の報告自体は NMDA NR1 を標的としたワクチン治療の報告以外存在せず、Ang II ペプチドワクチンに変更しての研究継続を行った場合も研究の新規性、意義は全く失われまいと考えられた。従ってペプチドワクチンによる脳梗塞治療の可能性を検討した。

(2) Ang II ペプチドワクチンの検討

Ang II 抗体価の測定

各群の Ang II 抗体価(OD50%)増加がみられた個体はそれぞれ以下の通りであった。

ペプチド Ang II ワクチン群 100% (16/16)

生食群 0% (0/16)

さらにペプチドワクチン群における平均抗体価 (OD50%)は 6371.69 ± 1059.4 と DNA ワク

チンに比べ非常に高値であり、強い抗体産生能を有することが確認された。

ワクチン接種による血圧への影響

各群で接種前(day0)、2回目接種時(day14)、3回目接種時(day21)、脳梗塞手術前(day28)の収縮期血圧に差はみられなかった(図1)。

ワクチン接種による血清 Ang II 濃度の変化

3回目接種後1週間の時点における、血清 Ang II 濃度はワクチン接種群において血清 Ang II 濃度の増加が認められた(図2)。(ペプチド Ang II ワクチン群(VT); $615 \pm 108.97 \text{ pg/ml}$ 、生食群(S); $201.75 \pm 37.96 \text{ pg/ml}$, ** $P < 0.01$ vs. 生食群)

脳梗塞と抗 Ang II 抗体価の関連

脳梗塞体積と血清 Ang II 抗体価の関連性を調べた。ワクチン接種ラットにおける脳梗塞体積(mm^3)、血清抗体価の散布図を示す(図3A)。

有意な強い負の相関関係が認められ、以後の実験では抗体価 6000 以上の個体をワクチン治療群として設定した。

ワクチン治療群と生食群における脳梗塞24時間後の体積の比較を行ったところワクチン治療群で有意に脳梗塞体積の縮小が認められた(生食群; $163.1 \pm 9.75 \text{ mm}^3$ 、ワクチン治療群; $36.04 \pm 34.02 \text{ mm}^3$, * $P < 0.05$ vs. 生食群, 図3B)。

脳梗塞における血清 Ang II 抗体価と脳実質への抗体移行性の関連

脳梗塞組織への抗体移行性について調べる目的で脳実質中の抗体量について障害側健常側比(脳実質抗体障害側健常側比)を算出した。脳実質抗体障害側健常側比と血清抗体価は強い正の相関関係にあることが示された(図4A)。

血清抗体価 6000 を基準として血清抗体価につき高抗体価群、低抗体価群の2群に分類し、それぞれの脳実質抗体障害側健常側比を比較した場合、高抗体価群で有意に高値であつ

た (図 4B)。

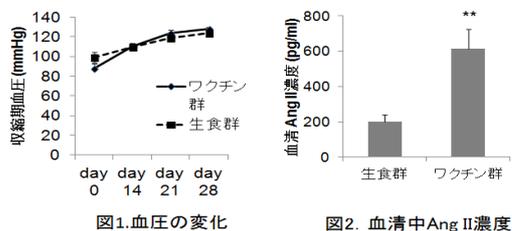


図1.血圧の変化

図2. 血清中Ang II濃度

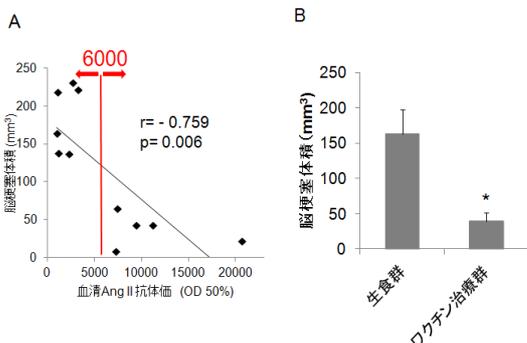


図3脳梗塞体積と血清抗体価

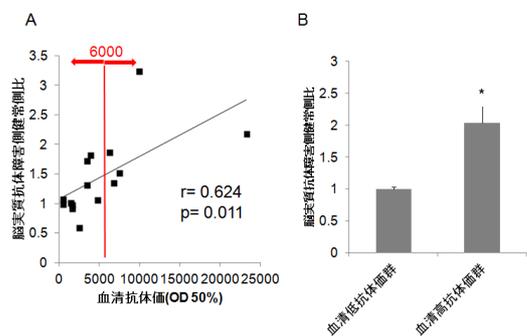


図4. 脳実質移行抗体障害側健康側比と血清抗体価

脳梗塞病変での組織 RAS コンポーネントに与える Ang II ワクチンの影響

ワクチン接種の脳組織 RAS コンポーネントへの影響を調べるため、脳梗塞 6 時間後、12 時間後、24 時間後の各時点の虚血側半球をもちいて angiotensin II 1 型受容体(AT1R)、angiotensinogen (AOPEN) の m-RNA 発現を realtime-PCR 法で、脳局所 Ang II 濃度を ELISA 法にて定量比較を行った。

ワクチン群では生食群に比して 24 時間の時点での AT1R 遺伝子発現が有意に抑制された (図 5A)。また AOPEN 遺伝子発現に関しては梗塞 12 時間の時点では sham に比べ両群でみられた発現抑制は 24 時間の時点では生食

群のみで観察された (図 5B)。ワクチン治療群では脳梗塞 12 時間の時点で生食群に比較して虚血組織における Ang II 濃度の有意な増加が認められた (図 5C) (* $P < 0.05$ vs. sham 群, # $P < 0.05$ vs. 生食群)。

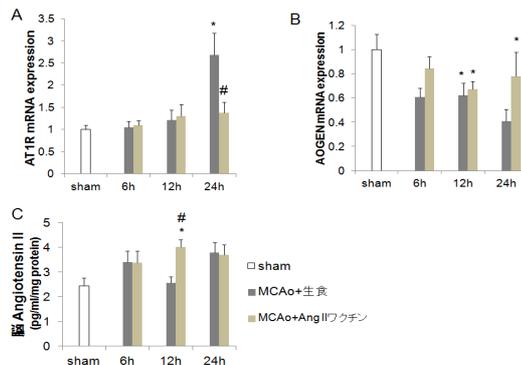


図5. 脳梗塞病変におけるRASコンポーネントの変化

Ang II ワクチン接種と神経機能障害

生食群に比べ、Ang II ワクチン群では有意な神経重症度スコアの改善を認めた (図 6) (sham 群 0, 生食群 8.63 ± 0.36 , ワクチン治療群 7 ± 0.47 , * $P < 0.05$ vs. sham 群, # $P < 0.05$ vs. 生食群)。

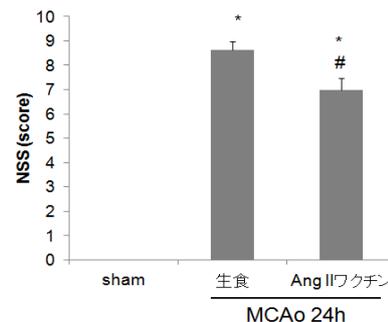


図6. 神経重症度スコア(NSS)

Ang II ワクチン接種と梗塞病変部位における神経細胞変性

ワクチン治療群、生食群それぞれの脳梗塞 24 時間後における梗塞病変での変性神経細胞を Fluorojade B (FJB) 染色で定量比較した。生食群では Ang II ワクチン群に比較し、有意な FJB 陽性細胞の減少が認められた (図 7)。

Ang II ワクチン接種と脳梗塞病変部位における酸化ストレス

Ang II ワクチン治療群では生食群に比べ、脳梗塞 24 時間後の 4-HNE 生成が有意に抑制

された。(図8)

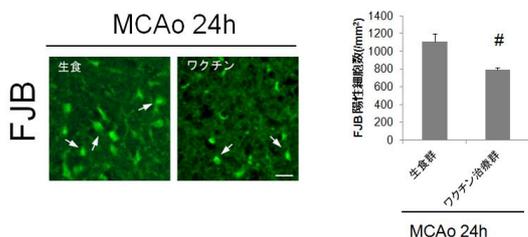


図7. 脳梗塞病変におけるFJB陽性細胞

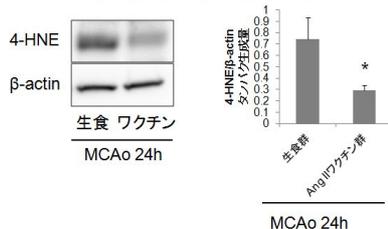


図8. 脳梗塞病変における4-HNE産生量

まとめ

本申請課題では Ang II を標的としたワクチン接種が脳梗塞急性期に RAS の抑制、抗酸化作用を介して神経保護的に作用し、虚血性脳卒中の新たな治療戦略になりうることを示した。しかしながら本来の目的である DNA ワクチンの脳梗塞への適応という観点からは、DNA ワクチン自体の抗体産生能の更なる改善が必須であることが明らかとなった。

引用文献

1. Tissot AC, Maurer P, Nussberger J, Sabat R, Pfister T, Ignatenko S, Volk HD, Stocker H, Müller P, Jennings GT, Wagner F, Bachmann MF. Effect of immunisation against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase IIa study. *Lancet*. 2008, 8;371(9615):821-7.

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)

[学会発表](計 1 件)

若山幸示、Therapeutic Efficacy of Angiotensin II Vaccine to Cerebral

Infarction in Rats. 第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 21 日、新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若山 幸示 (WAKAYAMA, Kouji)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50349263