

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25870715
 研究課題名(和文)新規アンジオテンシン受容体ワクチンの開発とその応用性の検討

 研究課題名(英文)The development of new angiotensin II receptor vaccine

 研究代表者
 畔上 達彦(Azegami, Tatsuhiko)

 慶應義塾大学・医学部・助教

 研究者番号：60573376

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧に対して少ない服薬回数で長期の降圧効果が得られる治療法の開発を目的とし、ワクチンに着目した。従来の皮下注射型ワクチンでは注射部位での疼痛や皮膚副作用が懸念されるため、粘膜を介した非注射型高血圧ワクチンの開発を試みた。経口ワクチン開発では、ワクチン抗原としてアンジオテンシンII受容体(AT1)-コレラ毒素Bサブユニットのキメラ蛋白を発現するような遺伝子組み換えイネを作成したが、AT1に対する免疫原性は得られなかった。経鼻ワクチン開発では、AT1-肺炎球菌表面抗原を抗原蛋白として作成し、アジュバント、ナノゲル技術を利用して、ラットに経鼻免疫したところ、降圧効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：To develop the new treatment for hypertension, that improves medical adherence, I focused on the vaccine strategy. To avoid the injection-related pain and skin adverse events, I aimed to create a new non-injectable anti-hypertensive vaccine. For the development of oral anti-hypertensive vaccine, the expression vector which angiotensin II type 1 receptor (AT1) - Cholera toxin B subunit(CTB) chimeric sequence was inserted into was used to transformed the rice. Although resultant transgenic rice seeds expressed AT1-CTB protein, its immunogenicity to AT1 was poor. For the development of nasal vaccine, AT1 partial peptide was synthesized and conjugated with pneumococcal surface protein A (PspA). AT1-PspA antigen was mixed with adjuvant and incorporated into nanogels. Intranasal immunization with AT1-PspA vaccine induced AT1-specific serum IgG antibody and also lower blood pressure in the spontaneously hypertensive rats.

研究分野：高血圧

キーワード：高血圧 アンジオテンシン ワクチン 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は、頻度が高く、脳・心血管系の合併症を引き起こし、単剤の降圧薬で十分な降圧が得られにくく、基本的に無症状である。そのため、高血圧による合併症を抑制し、さらに高血圧および合併症にかかる医療費を軽減するとともに、服薬アドヒアランスを改善するための治療戦略の開発が必要であり、新たな戦略としてワクチン療法が注目を浴びている。海外では第 a 相臨床試験が行われ(アンジオテンシン II を標的とした皮下注射ワクチン)、ヒトにおいて降圧効果が確認された(Tissot et al. Lancet 2008)。申請者は申請前の期間において、アンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体に対するワクチン療法の開発およびその効果や応用性を検討していた(Azegami et al. Hypertens Res 2012)。ラット AT1 受容体の細胞外部分配列(N 末端側から 181~187 番)を抗原ペプチドとし、抗原性を確保するためにキャリア蛋白である Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を結合し、さらに免疫応答を高めるために Freund's adjuvant と混合したものを AT1 ワクチンとした。AT1 ワクチンを皮下注射にて接種し、血圧、腎機能、動脈硬化に対する効果とその機序について実験動物を用いて検討してきた。その結果、皮下注射型 AT1 ワクチンは降圧のみならず、腎保護効果や抗動脈硬化作用を有することが明らかとなった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、AT1 受容体を標的としたワクチンが高血圧症およびその合併症を予防・治療するために有用である可能性が示されたが、これまでに用いてきた手法(皮下注射)では、注射時の疼痛や局所副作用(皮膚の発赤など)が問題となる。そこで、本研究においては、(1) 遺伝子組み換えイネ(MucoRice) 技術を応用した経口投与型 AT1 ワクチンを開発する (2) ナノゲル技術を応用した経鼻投与型 AT1 ワクチンを開発することとした。

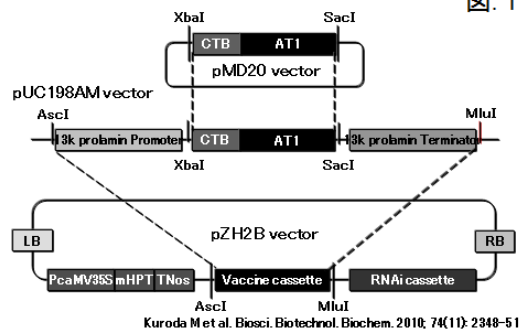
3. 研究の方法

(1) 経口型 AT1 ワクチンの作成

ワクチン抗原単独での経口投与は、胃酸による抗原の変性・消化や、経口免疫寛容により、有効な免疫応答が得られにくいことが知られている。そこで、胃での消化に耐性を有するコメ種子の蛋白貯蔵体内にワクチン抗原を発現させるように、遺伝子組換えイネを作成することとした。ラットの AT1 受容体の第 2 細胞外部位の全長(N 末端から 166-192 番のペプチド)を標的配列とした。抗原性を高めるために、標的配列にコレラ毒素 B サブユニット(CTB) が結合するような塩基配列を作成した(AT1-CTB 配列)。AT1-CTB 配列を

蛋白貯蔵体特異的プロモーター制御の下、アグロバクテリウムを介して、イネに遺伝子導入した。(図 1)

アグロバクテリウム法による遺伝子導入



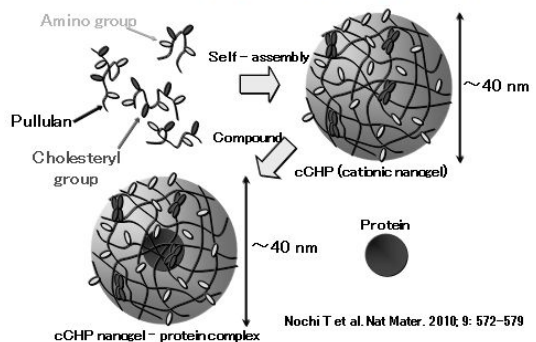
薬剤選抜の後には得られたコメ種子を培地上に播種し、苗が成長した時点で、育苗床土に移し、閉鎖型チャンバー内でイネを成長させた。成長したイネから、コメ種子を収穫した。得られたコメ種子の一部を、粉碎し、Western Blotting を用いて、目的蛋白(AT1-CTB 抗原)の発現を確認した。以後、ワクチン抗原を有する遺伝子組換えコメ種子のみを掛け合わせて、収穫・継代を繰り返した。

数世代継代させた後、遺伝子組換えコメを粉碎し(ワクチン抗原として使用)、Freund's adjuvant と混合し、AT1-CTB ワクチンとして、まずは皮下注射(2 週ごとに 3 回)にて免疫原性が得られるか(抗 AT1 受容体抗体が誘導されるか)を、高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて確認した。

(2) 経鼻型 AT1 ワクチンの作成

ワクチンを経鼻投与する際には、鼻粘膜上皮にワクチン抗原を滞留させ、効率よく免疫担当細胞に抗原を提示させなければならない。そこで、cationic cholesterol-bearing pullulan (cCHP) ナノゲルを抗原のデリバリー担体として利用することとした。cCHP は高分子多糖であるプルランをコレステロールで修飾して疎水性を付加することにより、生理条件下でナノメートルサイズの球状粒子を自己形成し、その粒子の内部に抗原蛋白を取込み、複合体を形成することを可能とした技術である。(図 2)

cCHPによる蛋白質取り込み 図 2



また、表面にアミノ基を付加することで、陽性荷電を有するようになり、陰性に帯電している鼻粘膜に効率よく付着することが可能となる。cCHP ナノゲルは鼻粘膜上で自然にゆっくりと崩壊するため、緩徐かつ持続的に抗原を提示することが可能となる。

抗原として、ラットの AT1 受容体の第 2 細胞外部位の全長 (N 末端から 166-192 番のペプチド) を標的配列とした。抗原性を高めるために、GGGS4 リンカーを介して、AT1 受容体部分配列を 3 回繰り返すような塩基配列を設計し、さらにキャリア蛋白配列として B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs) 配列を N 末端側に組み込んだ (AT1-HBs)。AT1-HBs を発現ベクター (pET20b) に挿入し、大腸菌 (Rosetta2(DE3)pLysS) に形質転換し、蛋白の発現を試みた。(後述の通り、蛋白発現は不成功に終わった)

ウイルス由来の配列 (HBs) は大腸菌での蛋白発現に適していないと考え、キャリア蛋白配列を菌由来の配列 (肺炎球菌表面抗原 [PspA]) に置き換え (AT1-PspA chimera)、発現ベクター (pET20b) に挿入し、大腸菌 (Rosetta2(DE3)pLysS) で蛋白合成した。得られた発現蛋白は、塩析、透析、His タグ (Ni カラム) アフィニティー精製、ゲル濾過を経て、精製した。得られた AT1-PspA chimera 抗原の免疫原性を確認するため、Freund's adjuvant と混合し、まずは皮下注射 (2 週ごとに 3 回) にて抗 AT1 受容体抗体が誘導されるかを、SHR を用いて確認した。(後述の通り、免疫原性は認められなかった)

次に、AT1 に対する抗原性を高めるために、AT1 受容体部分配列 (181-187 番) を標的としたペプチドワクチンを作成することとした。181-187 番部分配列を、マレイミド基を介して PspA 蛋白に化学的に結合させることで、PspA 1 分子あたりに結合する AT1 部分配列の分子数を飛躍的に増加させた。この AT1-PspA 抗原を、これまでと同様にまずは皮下注射 (2 週ごとに 3 回) にて抗 AT1 受容体抗体が誘導されるかを、SHR を用いて確認した。Freund's adjuvant は経鼻投与に適さないため、次に、経鼻投与に向けて適切なアジュバントを検討するため、cCHP ナノゲル内に内包可能な核酸アジュバント (cyclic di-GMP と polyIC) を用いて同様の皮下注射実験を行い、抗体価の誘導能を確認した。さらに、cyclic di-GMP をアジュバントとして、皮下注射と経鼻投与での免疫応答性の差異について検討した。最終的に、AT1-PspA 抗原 + cyclic di-GMP アジュバント + cCHP ナノゲルの組み合わせ (以下、これを AT1-PspA ワクチンと呼称する) が経鼻投与に最適と判断し、雄 SHR に対して 4-8 週齢にかけて週 1 回ずつ計 5 回 AT1-PspA ワクチンを経鼻投与し、その後の血圧や抗体価の変動を長期にわたって観察した。

4. 研究成果

(1) 経口型 AT1 ワクチンの作成

アグロバクテリウムを介して、AT1-CTB 配列を蛋白貯蔵体特異的プロモーター制御の下にコメ種子に遺伝子導入した。導入後、薬剤選抜の後、コメ種子を培養、育苗、収穫した (図 3)。

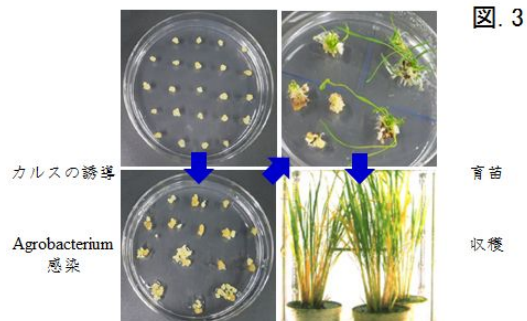


図 3

継代を繰り返し、遺伝的に均一となったところで、収穫したコメ種子を粉砕し、Western Blotting により目的抗原の発現を確認した (図 4)。

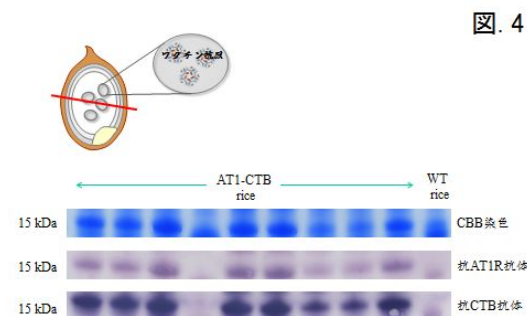
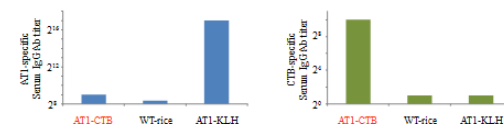


図 4

これらの抗原蛋白を Freund's adjuvant を用いて皮下注射免疫したところ、CTB に対する血清 IgG 抗体は誘導されたが、AT1 受容体に対する抗体価は誘導されなかった (図 5)。

図 5



AT1-KLH は申請前に作成していた AT1 + KLH + Freund's adjuvant を皮下注射していたラットの血清 (Azegami et al. Hypertens Res 2012)

これらの成果を踏まえ、経口コメ型 AT1 ワクチンは、遺伝子組換えコメ種子内にワクチン

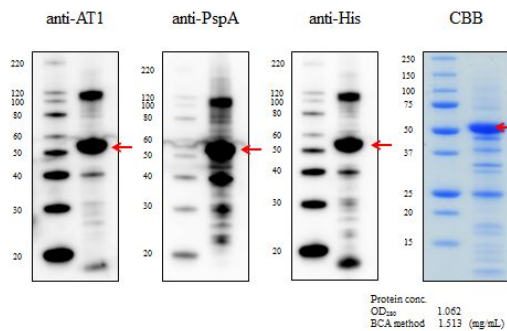
ン抗原として AT1-CTB を発現させることに成功したが、AT1 受容体に対する抗体価は誘導されず、抗高血圧ワクチンとして使用することが困難との結論に至った。

(2) 経鼻型 AT1 ワクチンの作成

ワクチン抗原として、AT1-HBs 蛋白の発現を試みたが、大腸菌内に発現させることはできなかった。

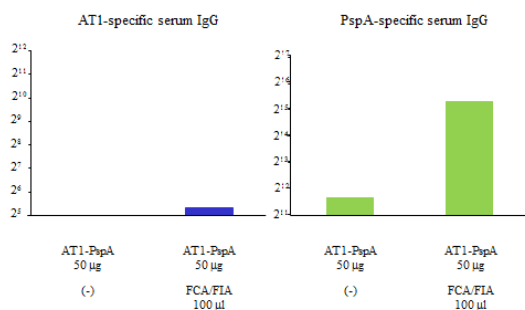
次いで、AT1-PspA chimera 蛋白の発現を同様に試み、発現に成功した (図 6)。

AT1-PspA chimera 蛋白の発現 図. 6



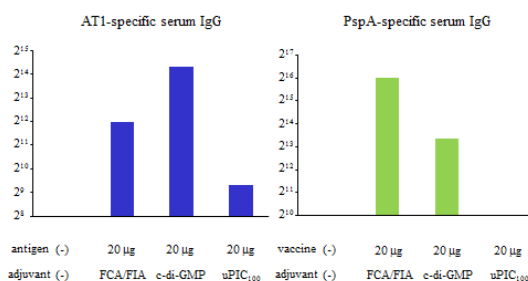
一方、Freund's adjuvant と共に AT1-PspA chimera 蛋白を皮下免疫したが、AT1 受容体に対する血清 IgG 抗体価は乏しかった (図 7)。

serum IgG antibody-titers 図. 7



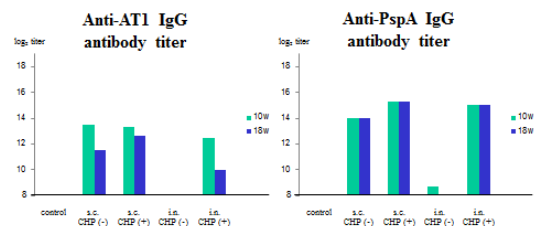
次に、AT1 部分配列ペプチドを、マレイミド基を介して PspA に化学結合させ、新たに AT1-PspA 抗原を作成した。これを、各種アジュバントを用いて皮下注射したところ、Freund's adjuvant, cyclic di-GMP を用いた際に、AT1 受容体に対して高抗体価が得られた (図 8)。

serum IgG antibody-titers (皮下注射) 図. 8



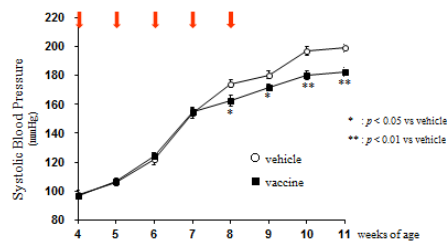
さらに経鼻投与での抗体価やナノゲルの必要性を検討した。図 9 の通り、経鼻投与 (4-8 週齢に 5 回、抗原量 計 50 µg) でも皮下注射 (4-8 週齢に 3 回、抗原量 計 60 µg) と同等の抗体価が得られた。また、ナノゲルなしで経鼻投与した場合には抗体価が誘導されなかったことから、鼻粘膜への抗原デリバリーに cHP ナノゲルが必須であることが示された (図 9)。

serum IgG antibody-titers (皮下注射 s.c. vs 経鼻投与 i.n.) 図. 9



AT1-PspA + cyclic di-GMP + cHP ナノゲルを雄 SHR に 4-8 週齢に計 5 回経鼻免疫したところ、対照群 (vehicle: cyclic di-GMP と cHP ナノゲルのみを投与) と比して、血圧は有意に低値であった (図 10)。

図. 10



以上の、成果から、本研究では経鼻投与可能な高血圧ワクチンの有用性を世界で初めて示すことに成功した。経鼻投与ワクチンは、接種を受ける患者に与える侵襲が少なく (注射時の疼痛や皮膚の副反応がない)、また針刺し事故や医療廃棄物を軽減することにもつながる。今後は、AT1-PspA 経鼻ワクチンの降圧機序を検討するため、免疫したラットから血清 IgG 抗体を抽出・精製し、invitro で receptor binding assay を行い、実際に AT1 受容体のシグナルを阻害できているかどうかを確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1

発表者名：畔上達彦，篠村裕之，林香，中村真理，伊藤裕

発表表題：経鼻投与型高血圧ワクチンの開発研究

学会名：第 51 回高血圧関連疾患モデル学会

発表年月日：平成 27 年 10 月 30 日

発表場所：千里ライフサイエンスセンター
(大阪府豊中市)

2

発表者名：畔上達彦，篠村裕之，林香，小口英世，中村真理，伊藤裕

発表表題：植物産生型経口アンジオテンシン II タイプ 1 受容体ワクチンの開発研究

学会名：第 37 回日本高血圧学会総会

発表年月日：平成 26 年 10 月 17 日

発表場所：パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畔上 達彦 (Azegami Tatsuhiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60573376