

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02730

研究課題名(和文)慢性炎症疾患におけるアラミン・SASPを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel immunotherapy for chronic inflammatory diseases

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：S100A8/A9はTLRやRAGEを介した炎症惹起作用を有する炎症トリガー因子(アラミン)として知られている。また、血管障害時の活性化血小板から放出されCD36を介した血栓形成に關与する。S100A9ワクチンを作成し、抗血小板作用をマウスモデルで検証した。近年、老化細胞の除去がマウス老化形質を改善するとともに、寿命を延長させることが報告されている。本研究では治療ワクチンにより誘導された抗体のエフェクター機能(ADCC活性、CDC活性など)による標的細胞除去作用を活用し、CD153陽性の老化T細胞を標的とした細胞除去ワクチンを作成し、脂肪組織での老化T細胞の増加抑制と耐糖能改善を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。これは内因性分子に対する免疫応答を惹起して抗体産生を誘導する手法であり、生体内で疾患発症に先立ち上昇するアラミンあるいは老化細胞を標的とした新規免疫治療法を確立し、早期治療介入による脳梗塞・心筋梗塞の予防、健康寿命の延伸を目指した治療を提案する。

研究成果の概要(英文)：S100A9 (S100 calcium-binding protein A9) is known as an inflammatory trigger factor through TLR and RAGE, called as alarmin. It also contribute the thrombosis formation through Cd36 signaling in platelet, which was released from an activation platelet at acute vascular injury. Thus, we evaluated the effect of S100A9 vaccine in a mouse Fe-induced vascular injury model in mouse carotid artery. Senescence cells secretes the inflammatory factors to affect the tissue aging, and the removal of senescence cells might be novel therapy to achieve the life expand as well as improvement of aging related diseases. We focused on Senescent T cells which was defined as CD4+CD44hiCD62LoPD-1+CD153+ and developed CD153 vaccine. After being fed a HFD for 10-11 weeks, adipose senescent T cell accumulation was significantly reduced in the adipose tissue of CD153- vaccinated mice, accompanied by glucose tolerance and insulin resistance.

研究分野：老年内科

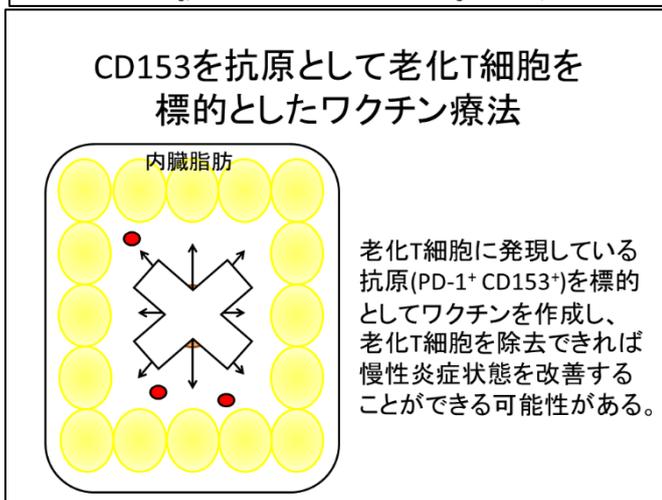
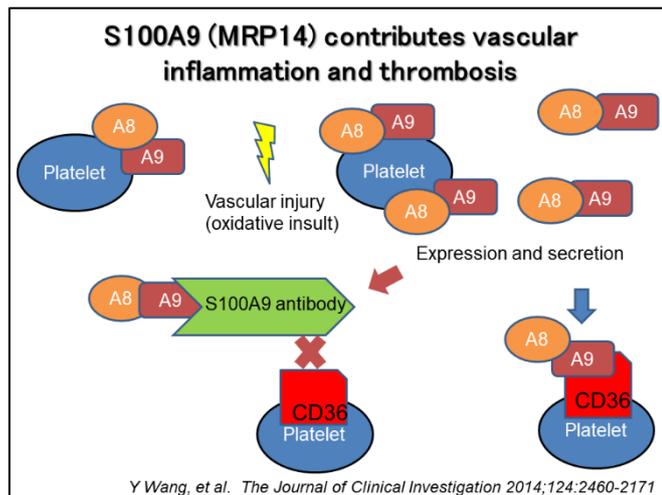
キーワード：ワクチン 抗体

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が進む我が国では労働人口の低下による国力低下が懸念され、その対策として健康寿命の延伸による元気な高齢者の就労促進が目標として掲げられている。そのためには脳梗塞・心筋梗塞などの虚血性疾患の早期予防・治療介入が必須であり、加齢に伴う慢性炎症進展に関連する標的分子に対する予防・早期治療介入によりその目標が達せられると考える。

心血管イベント発症は危険因子（血圧、血糖、脂質）の薬剤による厳格なコントロール、生活習慣（食生活、喫煙）の改善により著しく低下した。しかし、心血管イベント発症後のいわゆる2次予防においては危険因子のより厳格な管理に加えて、さらに慢性炎症を標的とした新規治療法が必要と考えられる。そこで、本研究課題ではアラミンとSASPという2つの標的に対する治療ワクチンの開発を提唱する。

我々はこれまで高血圧、糖尿病などの生活習慣病に対する治療ワクチンの動物モデルにおける有効性・安全性を検証してきた（PNAS 2014, Hypertension 2015, Stroke 2017, Sci Rep 2017）。この治療ワクチンは内在性自己蛋白を標的とするため、短い抗原配列ペプチドを用いキャリア蛋白とコンジュゲートさせたワクチン設計により細胞性免疫活性化を回避し、抗体誘導を主導するような工夫を施しているのが特徴である。この基盤技術は抗体医薬の代替治療の可能性を秘めており、さらに組織傷害時に発現するアラミンや加齢に伴い出現するSASPを標的とすることで正常組織を障害するリスクを低下させることができると考えた。本研究ではアラミンを標的分子とした抗体誘導ワクチン、オプソニン化などのエフェクター機能を有する抗体を誘導した標的老化細胞除去、の2つの戦略を考え、それに対する治療ワクチンの有効性を検討する計画である。



標的分子への治療介入アプローチとして一般に低分子化合物と抗体医薬の2つがある。低分子化合物は疾患治療標的分子の約15%しか制御できないと報告されているが、抗体は分子表面の広い領域で標的分子と結合するため、多くの疾患治療標的分子（膜分子および分泌分子）を制御できるとされる。一方、抗体医薬は製造コストが高価であるため長期投与が必要となる場合には医療費の逼迫に繋がるため、循環器疾患のようなその対象集団が大きい疾患にはその適応は限られる。従って、多くの患者集団に長期的に治療介入する手法として、能動免疫による治療ワクチンの開発は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として期待され、特に治療ワクチンはげっ歯類からヒトまで一貫通貫の治療法開発が可能な大きな長所であり、開発初期から臨床出口を見据えた検証ができる利点がある。治療ワクチンはより高い有効性と安全性が求められる。有用性に関しては一定値・一定期間の降圧ターゲット達成の費用-効果分析（CEA）、服薬コンプライアンス向上や二次イベント予防等の利点を考慮した費用-効果分析（CEA）などにより疾患毎の戦略構想が可能である。安全性に関しては、アルツハイマー病に対するアミロイドベータワクチン治療において、T細胞の活性化による細胞性免疫が活

性化されて脳炎という重篤な有害事象が発生したことから、T細胞の活性化を可能な限り回避した治療ワクチンシステムを構築した。この基盤技術を応用することで今後様々な疾患へのワクチン応用の波及効果が期待できる。

加齢に伴う慢性炎症進展を早期治療介入するための標的分子として2つの治療戦略を検証する。1つはアラミンとして知られている S100A9 (S100 calcium-binding protein A9) である。アラミンは心筋梗塞などの組織傷害によってネクローシスのような細胞死から細胞外に放出される炎症誘導因子、あるいは肥満や慢性腎臓病のような慢性炎症疾患において炎症性サイトカインの放出に先立ち分泌されて炎症応答を誘導する分子の総称であり、HMGB1 (high mobility group box 1)、IL-1 $\alpha$  や IL-33 のようなサイトカインや HSP (heat shock protein)、S100 タンパク質などが知られている。中でも S100A8/9 は動脈硬化進展・心血管イベントの発症と血中濃度の相関が報告されている。もう1つの治療戦略として、老化細胞から炎症性サイトカインなどが分泌される SASP (Senescence-associated secretory phenotype) に対し、老化細胞に発現する表面抗原 (Seno-antigen) を標的とした老化細胞除去治療 (Senolysis) であり、p16 陽性老化細胞をアポトーシス誘導により除去する遺伝子改変マウスを作製し、老化細胞の除去が老老症モデルマウスや高齢マウスの様々な老化形質を改善することが報告されている (Nature 2011, Nature 2016, Science 2016)。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。これは内因性分子に対する免疫応答を惹起して抗体産生を誘導する手法であり、生体内で疾患発症に先立ち上昇するアラミンあるいは SASP を標的とした新規免疫治療法を確立し、早期治療介入による脳梗塞・心筋梗塞の予防、健康寿命の延伸を目指した治療を提案する。

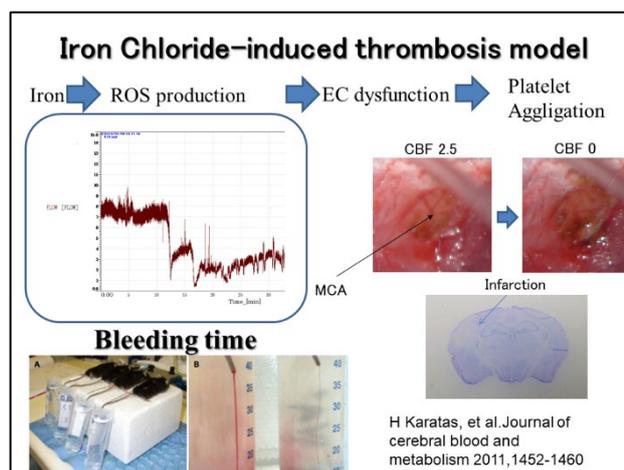
## 2. 研究の目的

自己蛋白を標的とする治療ワクチンは抗原配列に MHC クラス配列を除く必要があるが、抗原提示予想配列を避けて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ワクチンを創出した。この抗体誘導を主眼とした治療ワクチン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、将来的に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。脳心血管疾患は慢性炎症を基盤とする病態が多く、特に脳梗塞・心筋梗塞後の 2 次予防や肥満・慢性腎臓病などのハイリスク患者に対しては積極的な治療介入が望ましい。本研究課題は、慢性炎症制御という新しい切り口の治療薬の開発を目指し、我々独自の治療ワクチンシステムを用いたアラミンあるいは SASP を標的とした治療の有効性を検討することで新しい治療法を探索する。

## 3. 研究の方法

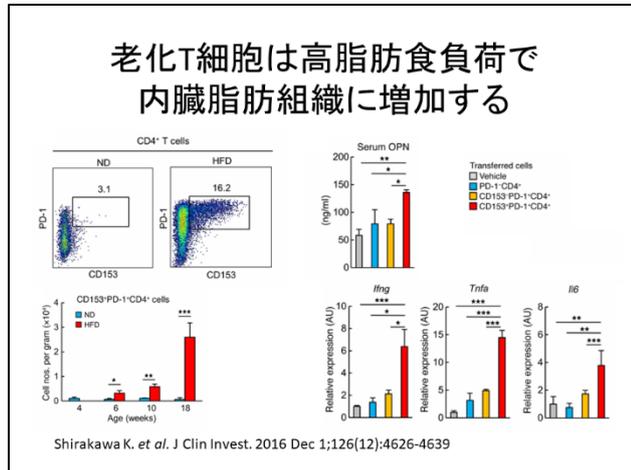
### 1) S100A9 (S100 calcium-binding protein A9) ワクチン

- S100A8およびS100A9のそれぞれに対するペプチドワクチンを設計して、マウスに投与して抗体価の確認を行う。それぞれの抗原に対する抗体の交差性、リコンビナント蛋白に対する反応性を検討する。
- 薬効評価として、鉄酸化ストレス誘導による内皮障害モデルを用いる (右図)。脳血流を血流計でモニタリングした状態で総頸動脈に内皮障害を加えると、血小板凝集が生じて結果が狭窄することにより血流が低下する。そこで、その血流低下までの時間を定量し比較検討する。
- 同時にマウス尾を用いた出血時間を測定して、薬効との相関を検証する。



2) 老化T細胞 (PD-1陽性、CD153陽性細胞) 除去を目指した治療ワクチン

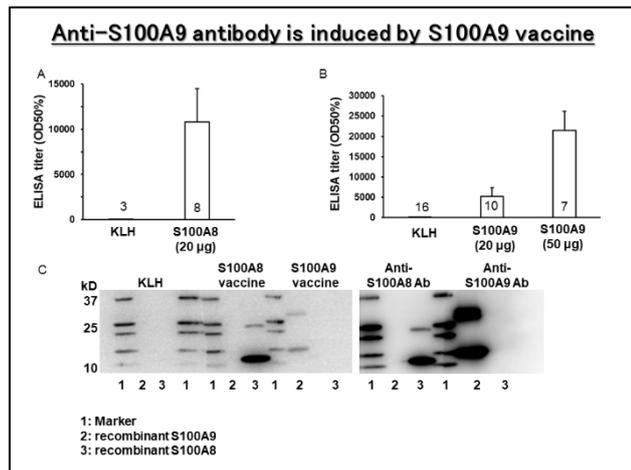
- 老化T細胞 (Senescence-Associated T cells) は CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>PD-1<sup>+</sup>CD153<sup>+</sup>で定義される細胞である。老化とともに全身で増加するが、高脂肪食負荷マウスにおいて、内臓脂肪組織に蓄積し増加することが報告されている。
- CD153に対するペプチドワクチンを設計・合成し、抗体価を測定する。さらに、アジュバントを使い分けることにより、抗体依存的な細胞障害性の有無を検討する。
- マウス高脂肪食負荷モデルを用い、CD153ワクチンの薬効評価を行う。内臓脂肪での老化T細胞を定量し、さらにインスリン負荷試験、糖負荷試験で耐糖能に与える影響について検証する。



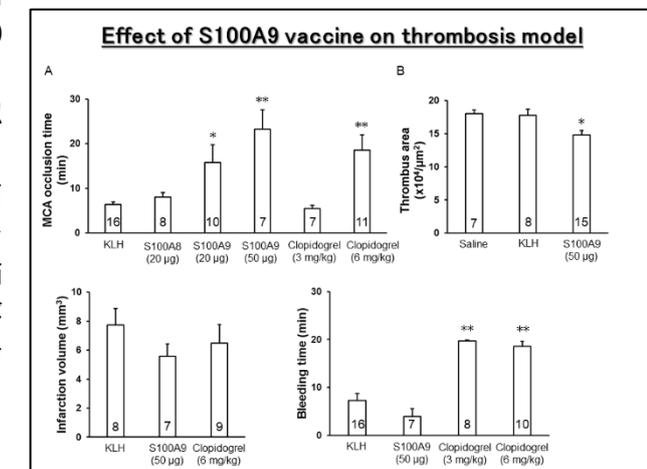
4. 研究成果

1) S100A9 (S100 calcium-binding protein A9) ワクチン

- S100A8およびS100A9のそれぞれに対するペプチドワクチンをマウスに投与して抗体価をELISAで測定した。それぞれのワクチンで抗原のS100A8およびS100A9由来ペプチドに対する抗体価の上昇を認めた。さらに、リコンビナントS100A8/A9蛋白に対する反応性をWensten Blot法で確認した。結果、S100A8ワクチンで誘導した抗体はS100A8に反応し、S100A9には反応しなかった。逆に、S100A9ワクチンで誘導した抗体はS100A9に反応し、S100A8には反応しなかった。以上より、ワクチンのお互いの交差性はなく特異的な抗体が誘導されていることが分かった。



- S100A8/A9ワクチンの薬効評価として、鉄酸化ストレス誘導による内皮障害モデルを用いて検討した。総頸動脈閉塞までの時間 (MCA occlusion time 分) はS100A9ワクチンで延長していたが、S100A8ワクチンでは対照群 (KLH投与) と差を認めなかった。臨床で抗血小板薬として用いられているクロピドグレルの高用量 (6 mg/kg) と効果はほぼ同等であった。同時に脳梗塞のサイズを評価したが、これはワクチン投与群およびクロピドグレル投与群のいずれも対照群と差を認めなかった。一方、マウス尾を用いた出血時間の検討では、S100A9ワクチン群では対照群と差を認めなかったが、クロピドグレル投与群 (低用量 3 mg/kg、高用量 6 mg/kg) で有意に延長していた。

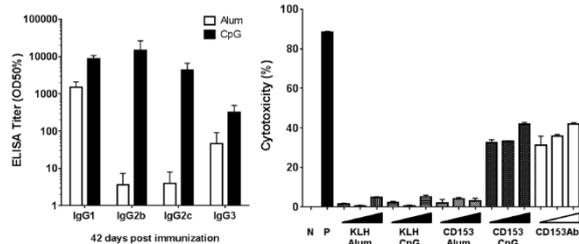


- ワクチン投与によるメカニズム解析の一つとして、S100A9によるCd36を介した細胞内JNKのリン酸化をwestern blotで確認した。結果、S100A9ワクチン投与によりJNKのリン酸化は有意に抑制された。
- ワクチン投与後のマウス血液解析として、血小板数、凝固系マーカー (PTおよびAPTT) の変化は認めなかった。また、組織学的に肺・腎臓に免疫細胞の異常な集積は認められなかった。

## 2) 老化T細胞 (PD-1陽性、CD153陽性細胞) 除去を目指した治療ワクチン

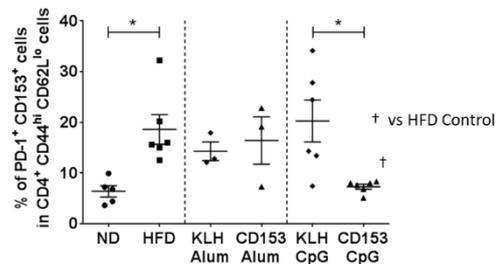
- CD153に対するペプチドワクチンを設計・合成し、抗体価を測定した。5種類のワクチンの中でDワクチンが最も抗体価が上昇していた。また、リコンビナントCD153蛋白に対する反応性をwestern blotで確認した。
- 上記抗原を用いて、水酸化アルミニウム (アラム) と核酸アジュバント (CpG) を用いたワクチンでそれぞれ評価を行った。IgGサブクラスの検討では、アラム投与ではIgG1が主に上昇するのに対し、CpGアジュバントではIgG2bおよびIgG2cが主に増加していた。マウスでは、IgG2がADCCやCDC活性などの細胞障害性を誘導できることが知られているが、培養細胞での検討において、CpGアジュバントを用いてワクチン投与後に得られたマウス血清でのみ、細胞障害性が認められた。
- C57BL/6マウスにCD153ワクチン投与を行い、アラムとCpGアジュバントをそれぞれ同時投与した。高脂肪食負荷を行った後に、内臓脂肪での老化T細胞 (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62<sup>Lo</sup>PD-1<sup>+</sup>CD153<sup>+</sup>) を定量した。結果、高脂肪食負荷で老化T細胞は増加するが、CpGアジュバントを用いたCD153ワクチンで増加が抑制された。一方、アラムアジュバントを用いたCD153ワクチンでは差を認めなかった。
- 同じマウス実験系で糖負荷試験を実施した。結果、高脂肪食負荷の耐糖能の増悪が認められたが、CpGアジュバントを用いたCD153ワクチンで改善した。一方、アラムアジュバントを用いたCD153ワクチンでは差を認めなかった。

### CD153-CpG ワクチン誘導抗体はCD153陽性細胞に対し細胞傷害性を示す



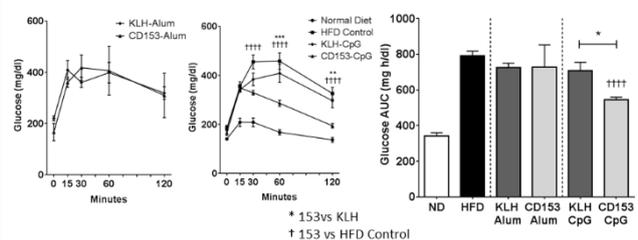
(左) C57BL/6J ♂ 7週齢に3回ワクチン投与した時点でのIgGサブタイプ  
 (右) LPS刺激RAW264.7細胞に対するCDC Assay  
 P, 100 µg/ml MHC Class I (H-2Kd/H-2Dd) antibody  
 closed triangle, 30, 100, 300 µg/ml · opened triangle, 10, 30, 100 µg/ml

### 老化T細胞解析 (内臓脂肪)



C57BL/6J ♂ 23-25週齢, 高脂肪食負荷後  
 内臓脂肪組織中の老化T細胞の割合

### CD153-CpG ワクチンは耐糖能を改善する



グルコース負荷試験(OGTT)  
 高脂肪食を8-10週間負荷後のC57BL/6J(♂) 20-24週齢に  
 8時間絶食後、グルコース2.0g/kgをマウスに経口投与した。

以上、S100A9 を標的とした抗血小板ワクチンあるいは CD153 を標的とした老化 T 細胞除去ワクチンのマウスモデルでの効果が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawano Tomohiro, Shimamura Munehisa, Nakagami Hironori, Iso Tatsuya, Koriyama Hiroshi, Takeda Shuko, Baba Kosuke, Sasaki Tsutomu, Sakaguchi Manabu, Morishita Ryuichi, Mochizuki Hideki	4. 巻 72
2. 論文標題 Therapeutic Vaccine Against S100A9 (S100 Calcium-Binding Protein A9) Inhibits Thrombosis Without Increasing the Risk of Bleeding in Ischemic Stroke in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11316	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 -

1. 著者名 Yoshida S, Nakagami H, Hayashi H, Ikeda Y, Sun J, Tenma A, Tomioka H, Kawano T, Shimamura M, Morishita R, Rakugi H.	4. 巻 11(1):
2. 論文標題 The CD153 vaccine is a senotherapeutic option for preventing the accumulation of senescent T cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16347-w.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	樂木 宏実 (Rakugi Hiromi)  (20252679)	大阪大学・医学系研究科・教授  (14401)	
研究分担者	島村 宗尚 (Shimamura Munehisa)  (60422317)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授  (14401)	

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
---------	---------