

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20935

研究課題名（和文）脂質異常症に対するワクチン療法の開発

研究課題名（英文）Development of a therapeutic vaccine for dyslipidemia

研究代表者

深水 大天（Fukami, Hirotaka）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：00908006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：アンジオポエチン様因子3(ANGPTL3)を標的としたペプチドワクチンの開発に着手し、脂質異常症に対する改善効果を有するペプチド配列（E3）を特定した(Fukami and Morinaga et al, Cell Reports Medicine 2021., 基本特許：特願2021-84971, PCT/JP2022/20850)。また、野生型マウスを用いた本ワクチンの持続性評価では、初回接種から60週間、抗体価および脂質改善作用が保たれていた。さらにbooster接種により老齢に相当する113週齢まで抗体価が保たれ、この期間に明らかな副反応は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ワクチンは、ANGPTL3を標的とした既存のバイオ医薬品に比し安価な新規薬剤となり、発展途上国等での普及も期待される。また、半年から年に1回投与で効果が期待できることから、経済的な負担軽減に加え、接種による疼痛の頻度を減らすことで患者のアドヒアランス向上に寄与できる。本研究は多くの治療抵抗性脂質異常症に対する効果的かつ安価な薬剤提供を実現するためのスタートアップと位置付けられる重要な研究基盤となる。

研究成果の概要（英文）：We have initiated the development of a peptide vaccine targeting Angiotensin-like protein 3 (ANGPTL3) and have identified a peptide sequence (E3) that demonstrates an ameliorating effect on dyslipidemia (Fukami and Morinaga et al., Cell Reports Medicine, 2021; Patent application: JP 2021-84971; PCT/JP2022/20850). In an assessment of the vaccine's durability in wild-type mice, the antibody titer and the suppression of circulating triglyceride levels were maintained for 60 weeks after the first administration. Furthermore, booster vaccinations sustained the antibody titer until 113 weeks of age, and no apparent adverse reactions were observed during this period.

研究分野：腎臓内科学、内分泌代謝学

キーワード：ANGPTL3 脂質異常症 ペプチドワクチン 家族性高コレステロール血症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

脂質異常症は動脈硬化性疾患における発症及び進展の主要な要因である。脂質異常症の中でも、家族性高コレステロール血症 (FH) は全世界で約 3,400 万人が罹患する遺伝性疾患であり、ホモ接合性 FH の場合は高用量スタチンや PCSK9 阻害薬などを使用しても十分な治療効果が得られない症例や、スタチン不耐性のため選択できる薬剤が限定されている症例が存在する。また、透析患者における高トリグリセリド (TG) 血症に対しては治療薬がないことも、臨床の現場では問題になっている。これらの脂質異常症は、心血管疾患発症および生命予後に強くかかわることから新規の治療法開発は急務である。このような中、新たな治療標的としてアンジオポエチン様因子 3 (ANGPTL3) が着目されている。ANGPTL3 は血管新生作用のほか、Lipoprotein lipase (LPL) 阻害作用を介した脂質制御作用が知られるが、ヒトにおける本遺伝子変異は明らかな病原性を示さず、LDL-C および心血管疾患 (CVD) 発症リスクを抑制する。現在、抗 ANGPTL3 抗体等を用いた ANGPTL3 機能抑制による薬剤開発が進められ、ヒト治療抵抗性脂質異常症において現行治療への上乗せ治療効果が証明されているが (Raai FJ, et al. *N Engl J Med.* 2020)、これらの治療戦略は高額である。医療費に対する負担増加や薬剤アドヒアランスにどのように対処するか、という課題が残されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は脂質異常症による人類の健康に関する諸問題を、医療経済的負担を増加させることなく、解決に導くことである。申請者は、ANGPTL3 を標的とした脂質異常症改善ワクチンを開発し、マウスでの POC を得た。本ワクチンは、ANGPTL3 を標的とした既存のバイオ医薬品に比し安価な新規薬剤となり、発展途上国等での普及も期待される。また、半年から年に 1 回投与で効果が期待できることから、経済的な負担軽減に加え、接種による疼痛の頻度を減らすことで患者のアドヒアランス向上に寄与できる。

## 3. 研究の方法

本研究では本シーズの脂質異常症に対する臨床応用可能性をより確かなものにするため、(1) ワクチンの作製、(2) 複数の脂質異常症動物モデルを用いたワクチン効果の検証、(3) ワクチン効果の持続性の検証、(4) ワクチンの安全性検証を行う。

### (1) ANGPTL3 ペプチドワクチンの作製：

ANGPTL3 に対する液性免疫を誘導するエピトープ候補を、バイオインフォマティクス手法を用いて選定し、各合成エピトープとキャリアタンパクを結合し、アジュバントを添加してワクチンを作製する。

### (2) ペプチドワクチンを用いた脂質異常症進展の抑制効果の検討：

野生型の C57BL/6J マウス、肥満モデルである ob/ob マウスに加え、重度の脂質異常症や動脈硬化表現型を示す B6.KOR/StmSlc-ApoE<sup>shl</sup> マウスに対して 2 週おきに 3 回ワクチン接種を行い、ANGPTL3 に対する免疫誘導を確認する。免疫誘導の確認は具体的に、接種ペプチドがワクチン接種後のマウス血清抗体と反応するかを ELISA 法と Western blot 法を用いて評価する。更に、上記の血清 LDL-C 値の改善作用、肝臓組織における中性脂肪減少作用を合わせて確認する。また、脂質改善効果が ANGPTL3 機能低下によるものか評価するため、血清や肝臓組織中の ANGPTL3 発現量の変化、脂質代謝に関連する mRNA の発現を評価する。

### (3) ペプチドワクチン効果の持続性評価：

野生型の C57BL/6J マウスに対して上記(2)と同じプロトコールでワクチン接種を行い、接種ペプチドに対する抗体価と血清の脂質プロファイルを経時的に評価し、ワクチン効果の持続性を検証する。治療開始 60 週以降はワクチンの効果が減弱することが予想されるため、以後 30 週おきを目安に booster 接種を行う。

### (4) ペプチドワクチンによる細胞障害性自己免疫誘導の評価：

本ワクチンは生体内において自己の ANGPTL3 を標的とすることから、細胞障害性の自己免疫誘導が懸念されるが、ワクチンペプチドのアミノ酸を短くすることで細胞障害性免疫誘導を回

避することが可能である。実際、本ワクチンで免疫誘導されたマウス脾臓細胞を用いて、接種ペプチド刺激によっても T 細胞が活性化されないこと、ANGPTL3 の主な発現臓器である肝臓においても組織傷害を認めないことを確認しているが、本研究では上記の手法を用いて他のエピソードや誘導条件においても評価を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) ワクチンの作製：

ANGPTL3 のアミノ酸配列から短いアミノ酸鎖(ペプチド)配列を 3 か所 (E1、 E2、 E3) 選択し、各々を標的とするペプチドワクチンを作製した。

##### (2) 複数の脂質異常症動物モデルを用いたワクチン効果の検証：

3 つの候補ペプチドから作成したワクチンを過食/肥満関連性の脂質異常症および脂肪肝を示すモデルマウス(*ob/ob* マウス)に接種したところ、接種ペプチドがワクチン接種後のマウス血清抗体との反応が認められ、特に E3 を用いたワクチン(E3 ワクチン)が最も脂質異常症および脂肪肝に対して改善効果を示した。mRNA 評価においても、E3 ワクチン群で肝臓組織中の *Angptl3* の優位な発現低下は認められなかったが、*Acc1* など脂質代謝に関する遺伝子や、*Il-6* など炎症に関する遺伝子の発現低下が確認された。また、*ob/ob* マウスだけでなく野生型マウスや自然発生 ApoE 欠損マウスにおいても、本 ANGPTL3 ワクチンがマウス系統を超えて脂質異常症を改善する結果が得られたことから、脂質異常症治療ワクチンとしての臨床応用可能性がより確かなものとなった。

##### (3) ワクチン効果の持続性の検証：

治療開始時から 60 週目(68 週齢)まで抗体価および脂質改善作用が保たれていた。さらに booster 接種によって、老齢に相当する 105 週目(113 週齢)まで抗体価が保たれていた。この期間中に、肝臓、腎臓、肺に明らかな副反応は認められなかった。

##### (4) ワクチンの安全性検証：

マウス系統や観察期間が異なる各実験においても、本ワクチンで免疫誘導されたマウス脾臓細胞を用いて、接種ペプチド刺激によっても T 細胞が活性化されないこと、ANGPTL3 の主な発現臓器である肝臓においても組織傷害を認めないことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okadome Yusuke, Morinaga Jun, Yamanouchi Yoshinori, Matsunaga Eiji, Fukami Hirotaka, Sakaguchi Takeshi, Hirayama Ryo, Ishimura Tatsuhiro, Kuwabara Takashige, Usuku Koichiro, Yamamoto Tatsuo, Mukoyama Masashi, Suzuki Ryusuke, Fukui Toshihiro, Oike Yuichi, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Increased numbers of pre-operative circulating monocytes predict risk of developing cardiac surgery-associated acute kidney injury in conditions requiring cardio pulmonary bypass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02313-x	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 Fukami Hirotaka, Morinaga Jun, Nakagami Hironori, Hayashi Hiroki, Okadome Yusuke, Matsunaga Eiji, Kadomatsu Tsuyoshi, Horiguchi Haruki, Sato Michio, Sugizaki Taichi, Kuwabara Takashige, Miyata Keishi, Mukoyama Masashi, Morishita Ryuichi, Oike Yuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Vaccine targeting ANGPTL3 ameliorates dyslipidemia and associated diseases in mouse models of obese dyslipidemia and familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100446 ~ 100446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xcrm.2021.100446	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 Okadome Yusuke, Morinaga Jun, Fukami Hirotaka, Hori Kota, Ito Teruhiko, Sato Michio, Miyata Keishi, Kuwabara Takashige, Mukoyama Masashi, Suzuki Ryusuke, Tsunoda Ryusuke, Oike Yuichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Hyperglycemia and Thrombocytopenia Combinatorially Increase the Risk of Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction Undergoing Veno-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 707 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-21-0043	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、松永 英土、中神 啓徳、森下 竜一、栗原 孝成、尾池 雄一、向山 政志
2. 発表標題 アンジオポエチン様因子(ANGPTL3)を標的とした脂質異常症および関連疾患治療ワクチンの開発
3. 学会等名 Science Pioneers Consortium 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、森下 竜一、向山 政志、尾池 雄一
2. 発表標題 健康長寿を阻害する動脈硬化関連疾患へのワクチン治療薬開発
3. 学会等名 第18回 脳心血管抗加齢研究会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、栗原 孝成、森下 竜一、尾池 雄一、向山 政志
2. 発表標題 Development of a therapeutic vaccine for dyslipidemia and related diseases targeting angiotensin-like protein (ANGPTL3)
3. 学会等名 第29回 国際高血圧学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、栗原 孝成、向山 政志、尾池 雄一
2. 発表標題 健康長寿を阻害する動脈硬化関連疾患へのワクチン治療薬開発
3. 学会等名 第54回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、森下 竜一、柴原 孝成、尾池 雄一、向山 政志
2. 発表標題 アンジオポエチン様因子 (ANGPTL3) を標的とした脂質異常症および関連疾患治療ワクチンの開発
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、森下 竜一、柴原 孝成、尾池 雄一、向山 政志
2. 発表標題 臨床研究に基づく治療候補選定及びangiopoietin様 蛋白3 (ANGPTL3) を標的とした脂質異常症ワクチンの開発
3. 学会等名 第119回 日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深水 大天、森永 潤、中神 啓徳、尾池 雄一、向山 政志
2. 発表標題 アンジオポエチン様因子3 (ANGPTL3) を標的とした新規脂質異常症治療ワクチンの開発
3. 学会等名 日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂質異常関連疾患治療薬	発明者 尾池 雄一、森永 潤、深水 大天	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-84971、2021-183876	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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