

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461127

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した高血圧ワクチンの開発

研究課題名(英文) The development of hypertension vaccine toward clinical application.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧症に対する新規治療法を開発するため、レニンアンジオテンシン系を標的としたワクチンの有効性を検討した。アンジオテンシンII DNAワクチンを自然発症高血圧ラット(SHR)に投与し長期観察を行ったところ、心血管周囲の線維化の抑制などの臓器保護効果が認められた。またレニンエピトープDNAワクチンを作製しSHRに投与したところ、抗レニン抗体の産生と、それに伴う収縮期血圧の低下が認められた。組織切片の解析を行ったところ腎臓など各臓器に病的所見を認めず、小さなエピトープを標的としたレニンワクチンの有効性と安全性が確認された。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel therapy for hypertension, we evaluate the effectivity of vaccines against renin-angiotensin system. Angiotensin II DNA vaccine reduced perivascular fibrosis of heart tissue in spontaneously hypertensive rat (SHR). Then we construct renin epitope DNA vaccine. Anti-renin antibody was produced by administration of renin vaccine in SHR. Systolic blood pressure was significantly reduced in the renin vaccine group. Histological analysis revealed that there are no any pathological findings in the kidney, liver, and heart. These results indicate that small epitope vaccine targeting renin is safe and effective.

研究分野：老年・高血圧内科学

キーワード：高血圧症 ワクチン レニン アンジオテンシンII

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)。

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 (Aβ) 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)。そこで我々はこれまでに、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 DNA ワクチンの作製と高血圧ラットモデルにおける治療効果の検討を行った。その結果、DNA ワクチン投与によって、抗アンジオテンシン II 抗体の抗体価の上昇が認められ、それに伴って収縮期血圧も少なくとも半年以上に渡り、有意な低下が持続することが明らかとなった (詳細は 8 ページに記載)。有効性および安全性が確認できたものの、より降圧効果の強いワクチンの開発、長期間持続するワクチンの開発、またこれらのワクチンの詳細な作用機序の解明などがこれからの

課題である。

レニンワクチンは、1980 年代に開発が試みられた。ワクチン投与の結果、降圧効果が得られたものの、自己免疫性の腎障害などの副作用が生じたと報告されている (Michel JB, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987)。この自己免疫反応の出現はレニンの全長をペプチドワクチンとして免疫したことが原因であると考えられる。一方で、8 アミノ酸と小さいアンジオテンシン II を免疫付けた場合、前駆体であるアンジオテンシノーゲンに対する細胞性自己免疫反応は、他のグループの臨床治験および我々の観察において一切認められていない。したがって、レニンについても全長ではなく、小さな B 細胞エピトープのみを免疫することにより、安全で有効なワクチンとなり得るものと想定される。そこで本研究では、まずレニンに対する DNA ワクチンを作製し、その有効性および安全性を確認する。更にレニン、アンジオテンシン II の 2 価 DNA ワクチンを作製することで、より降圧効果など有効性に優れたワクチンを開発することを目的とする。

2. 研究の目的

1) アンジオテンシン II DNA ワクチンの投与は、長期的な影響として、免疫反応による有害な作用が認められないこと、降圧に伴う臓器保護効果が認められることを、詳細な検討により明らかにする。そのために、ワクチン投与ラットを長期間観察し、寿命延長効果の有無や臓器障害の抑制効果等を評価する。

2) レニンの全長を免疫すると、有害な自己免疫反応が生じることが過去の報告から予想される。しかしレニン配列のうち、B 細胞エピトープとなる一部分の配列のみを免疫すると、レニン抗体産生による降圧のみが得られ、有害な T 細胞性自己免疫反応は生じないであろうと想定される。この仮説を実証することで、エピトープワクチンの安全性に関する理解を深め、より安全で有効なワクチンの作製に資することを目的とする。具体的には、レニン配列の一部分 (レニン阻害剤アリスキレンとの結合に重要な部位) を組み込んだ DNA ワクチンを作製し、高血圧ラットに投与することで降圧効果が得られることを確認する。また、投与中止後の降圧効果と抗体価の持続期間を確認する。また、免疫複合体などによる有害な副作用が生じないことを確認する。レニン全長を免疫原とするレニンワクチンを同時に作製、投与し、安全性面における、エピトープワクチンの優位性を確認する。

3) RAS系に対するワクチンはレニン、アンジオテンシン II、AT1Rを標的としたものが降圧効果を発揮したという報告があるが、それらを組み合わせてその有効性の増強効果を観察した研究はこれまでなされていない。一方ヒト臨床試験の結果を見ると、ワクチン単剤の降圧効果は十分とは言えない。そこで、DNAワクチンは遺伝子操作により複数のエピトープを組み込むことが容易であるので、この利点を生かし、レニン、アンジオテンシン II 両方を標的とした2価ワクチンを作製し、その降圧効果の増強程度等につき検討する。

4) TLR ノックアウトマウスに対する投与実験等を行い、本 DNA ワクチンによる免疫が成立する機序について詳細に検討する。

3. 研究の方法

1) アンジオテンシン II DNA ワクチンの長期的な安全性・有効性の評価

アンジオテンシン II DNA ワクチンを SHR に投与し、無投与群と共に2年間の観察を行う。生存率を比較し、寿命延長効果を確認する。投与後2年の時点で一部の個体は解析し、高血圧に伴う臓器障害の有無・程度を評価する。

2) レニンを標的とした DNA ワクチン用ベクターの作成

Hepatitis B core (HBc) protein は右図に示すように、自己集合して球状になる性質を持ち、A80-S81 の間に任意のペプチドを挿入することで球の表面に提示させることができる。提示されたペプチドは免疫系に認識され易く、高力価の抗体が誘導されることから、ワクチンの作製に利用されている (Xing YP, *World J Gastroenterol*, 2005)。そこでこのシステムを利用し、まずレニンのエピトープを 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。

作製したベクターが HBc とレニンエピトープの融合蛋白(HBc-Renin)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 抗体および抗レニン抗体でウエスタンブロットを行う。比較のため、レニン全長 DNA ワクチンも同時に作製し、HEK293 細胞での発現も同様に確認する。

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-Renin 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レニン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。血圧降下および抗体価の上昇が認められたら、投与を休止し、測定を続けることで、ワクチンによる免疫効果の持続期間を確認する。

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、レニンを発現する細胞に対する傷害の有無についても病理組織学的に解析する。降圧に伴う、心血管周囲の線維化の抑制など、臓器保護効果が認められるか確認するため、心臓の組織切片の解析もあわせて行う。

3) レニンエピトープ、アンジオテンシン II 2 価 DNA ワクチンの開発

レニンのエピトープおよびアンジオテンシン 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。

1 価の DNA ワクチンと同様に、抗体価、収縮期血圧、各臓器の状態等を確認することで、2 価ワクチンの有効性の増強程度を評価する。

4) アンジオテンシン II DNA ワクチンの免疫樹立機序の解析

抗体価をより強く上昇させ、長く維持できる DNA ワクチンを開発するためには、DNA ワクチンの免疫付けに關与する因子の理解が重要である。

ワクチンでは免疫原性を高めるために、古くからアジュバントが抗原とともに投与される。アジュバントとしては CFA(Complete Freund Adjuvant)などがよく知られ、ヒトワクチンでは水酸化アルミニウム(アラム)がよく用いられている。このアジュバントの1つに Immunostimulatory Sequence (ISS)と呼ばれる細菌ゲノムから発見された CpG 配列を含むオリゴヌクレオチドがある。この ISS はヒトでの臨床試験が既に行われており、抗体価の低下を遅らせる作用があることが報告されている (Klinman DM, *Vaccine*, 2010)。ISS として報告される配列には多様性があり、DNA ワクチンはそのベクターの骨格に CpG 配列を多数含むため、これらがアジュバントとしての作用を担っている可能性が考えられる。

ISS の基本的な作用機序としては、CpG を含む配列が、抗原提示細胞表面の Toll Like Receptor 9 (TLR9)に結合することで

情報伝達が起き、自然免疫系の活性化が生じることが知られている。この自然免疫系の活性化が、獲得免疫系の誘導すなわちワクチン効果の発現に重要であると考えられているが、詳細については不明な点が多い。また近年、アジュバントの効果発現には、TLR9 非依存性の自然免疫活性化経路も重要な役割を担っている可能性を示唆する知見が報告されているが、その情報伝達経路を活性化する受容体はいまだ同定されていない。そこでまず、TLR9 ノックアウトマウスと正常マウスに HBC-Renin ワクチンを投与し、ISS による増強効果が TLR9 ノックアウトマウスで消失するか否かを検討することで、この効果が TLR9 経路を

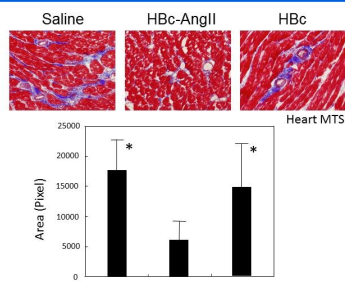
通しているか否かを確認する。TLR9 経路を通っていない場合には、TLR9 非依存性の自然免疫活性化経路の下流の因子と考えられている TBK1 のノックアウトマウスと正常マウスでの HBC-Renin ワクチンの有効性を比較することで、TBK1 経路を

4. 研究成果

1) アンジオテンシン II DNA ワクチンの長期的な安全性・有効性の評価

アンジオテンシン II DNA ワクチンを SHR に投与し、無投与群と共に観察を行った。投与後 1 年の時点で解剖し、心臓の組織切片を作成、血管周囲の線維化をマッソントリクローム染色で評価した。その結果、ワクチン群で有意な線維化の抑制が認められた。この結果から、本ワクチンは降圧に伴い臓器保護効果も期待できると考えられた(下図)。

心臓組織の状態の評価



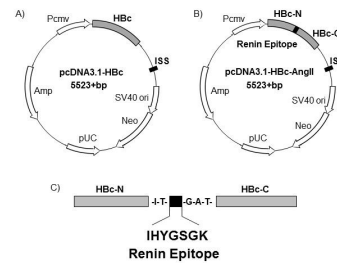
HBC-Ang II 群で心血管周囲の線維化が有意に抑制されていた

2) レニンエピトープ DNA ワクチンの作成とその有効性の評価

安全性の高いレニンワクチンを作製するため、T 細胞の活性化能が無いと想定される小さなレニンエピトープを選択した。これに T 細胞活性化配列を付与し、抗原提示能を高めるため、自己集合して球状になる性質を有する Hepatitis B core (HBc) を用いることとし、レニンエピトープを HBc の A80-S81 に挿入したかたちで発現させるベクターを作製した(右上図)。ベクター

を HEK293 細胞にトランスフェクション

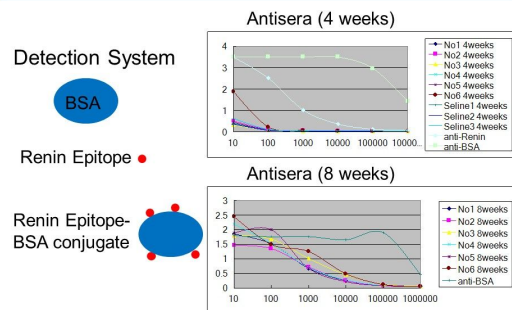
HBc-レニンエピトープ DNA ワクチンの作製



し、この細胞抽出液に対し抗 HBc 抗体および抗レニン抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、作製したベクターが HBc とレニンエピトープの融合蛋白 (HBc-Renin) を正しく発現することが確認できた。レニン全長 DNA ワクチンも作製した。

針なし注射器を用いて HBc-Renin ベクターを SHR の背部に 2 週間隔で 3 回投与した。初回投与 4 週後、8 週後の血清を採

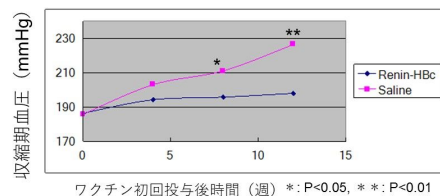
抗レニン抗体の産生



ワクチン群で抗レニン抗体の産生が認められた

取し ELISA を行った結果、ワクチン群で抗レニン抗体価の上昇を認めた(上図)。また血圧を測定した結果、ワクチン投与群で収縮期血圧の有意な低下を認めた(下図)。腎臓の組織学的解析で病的所見を認めなかった。

収縮期血圧の推移



レニンワクチン群で収縮期血圧の有意な低下が認められた

レニンの全長を免疫すると、有害な自己免疫反応が生じることが過去の報告から予想される。しかしレニンの配列のうち、B 細胞エピトープとなる一部分の配列のみを免疫すると、レニン抗体産生による降圧の

みが得られ、有害な T 細胞性自己免疫反応は生じないであろうと推測された。この仮説を確認することで、エピトープワクチンの安全性に関する情報を得ることが出来た。直接的レニン阻害薬は、本研究期間中に糖尿病患者における ACR 阻害薬や ARB との併用が禁忌となるなど、処方される機会が減少した。そこで開発の意義があまりなくなったと考え 3) レニン、アンジオテンシン II 2 価ワクチンの開発は行わなかった。

4) アンジオテンシン II DNA ワクチンの免疫樹立機序の解析

我々のこれまでの研究で、アンジオテンシン II の DNA ワクチンにペプチドワクチンを併用すると抗体価が増強することが確認された。この DNA、ペプチド併用ワクチン投与で生じた抗 AngII 抗体の IgG サブクラスの解析を行ったところ、Th2 タイプが主体であり、液性免疫誘導型のワクチンとして好ましいと考えられた。

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 3 件)

Hiroshi Koriyama, Hironori Nakagami, Katsuya Tomohiro. Long-Term Reduction of High Blood Pressure by Angiotensin II DNA Vaccine in Spontaneously Hypertensive Rats. Hypertension 査読有、66 巻、2015、167-174

Hironori Nakagami, Ryuichi Morishita Development of DNA vaccines as an anti-hypertensive therapy or for anti-angiogenesis. Expert Opin. Biol. Ther. 査読有、15 巻、2015、431-436

Hironori Nakagami, Hiroshi Koriyama, Ryuichi Morishita Therapeutic vaccines for hypertension and dyslipidemia. Int. Heart J. 査読有、55(2)巻、2014、96-100

[学会発表](計 14 件)

中神啓徳、 高血圧ワクチンの開発、第 8 回日本内分泌学会学術集会、2015

中神啓徳、 高血圧を標的とした DNA ワクチンの開発、第 15 回日本抗加齢医学会総会(招待講演)、2015

中神啓徳、 Angiotensin II Vaccine May One Day Help Lower Blood Pressure. 第 38 回日本高血圧学会、2015

中神啓徳、 Development of therapeutic vaccine for hypertension. 第 21 回国際個別化医療学会、2015

中神啓徳、 高血圧ワクチン開発に向けた基礎的検討、第 3 回臨床高血圧フォーラム、2014

中神啓徳、 次世代バイオロジクスとして

の高血圧ワクチン開発、第 37 回日本高血圧学会、2014

中神啓徳、 高血圧ワクチンの歴史とその必要性、第 21 回日本未病システム学会学術総会、2014

郡山弘、中神啓徳、勝谷友宏、 Long Term Blood Pressure Reduction by Angiotensin II DNA Vaccine in Spontaneously Hypertensive Rats Model. America Heart Association, Scientific Session 2013.

中神啓徳、 Challenge of novel therapeutic vaccines for Angiotensin II or VEGF. Seoul Brain Barrier Symposium, 2013

中神啓徳、 アンジオテンシン II を標的とした高血圧ワクチンの実験動物での検討、第 36 回日本高血圧学会総会、2013

中神啓徳、 次世代治療としての高血圧ワクチンへの挑戦、Young Investigator Research Forum、2013

中神啓徳、 DNA ワクチンを用いた高血圧新規治療、第 21 回日本血管生物医学学会学術集会、2013

郡山弘、中神啓徳、勝谷友宏 高血圧症に対する DNA ワクチン-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 DNA ワクチン治療法の開発、第 55 回日本老年医学会学術集会・第 28 回日本老年学会総会、2013

郡山弘、中神啓徳、勝谷友宏、 高血圧症に対する DNA ワクチンによる新規治療法の開発、脳心血管抗加齢研究会、2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

勝谷 友宏 (KATSUYA, Tomohiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・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・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20325369