

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461250

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した高血圧症に対するワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Long-Term Reduction of High Blood Pressure by Angiotensin II DNA Vaccine in Spontaneously Hypertensive Rats

研究代表者

郡山 弘 (Koriyama, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60710093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオテンシンII DNAワクチンをSHRに投与し、無投与群と共に長期観察を行った。また一部の個体は投与半年後に解剖し、心臓、腎臓等の組織解析を行った。その結果、ワクチン群で血中アンジオテンシンII濃度の低下などが認められた。またワクチン群のHE染色で肝臓や腎臓に病理学的所見を認めなかった。これらの結果からアンジオテンシン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などが明らかとなった。これらの結果をまとめ、Hypertension誌に論文発表を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to design DNA vaccines for high blood pressure and eventually develop human vaccine therapy to treat hypertension. Plasmid vector encoding hepatitis B core-angiotensin II (Ang II) fusion protein was injected into spontaneously hypertensive rats using needleless injection system. Anti-Ang II antibody was successfully produced in hepatitis B core-Ang II group. Systolic blood pressure was consistently lower in hepatitis B core-Ang II group after immunization, whereas blood pressure reduction was continued for at least 6 months. Survival rate was significantly improved in hepatitis B core-Ang II group. This study demonstrated that Ang II DNA vaccine to spontaneously hypertensive rats significantly lowered high blood pressure for at least 6 months. In addition, Ang II DNA vaccines induced an adequate humoral immune response while avoiding the activation of self-reactive T cells, assessed by ELISPOT assay.

研究分野：老年・総合内科学

キーワード：高血圧症 アンジオテンシンII ワクチン

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 (Ref.1)、アンジオテンシン I では有効性が得られなかった (Ref.2) 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 (Ref.3) 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 (Ref.4)。

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 (Ref.5)。

我々はこれまでに高血圧症に対するワクチン研究を進め、アンジオテンシン II のペプチドワクチンが高血圧モデル動物の収縮期血圧を低下させ、高血圧症の新規治療法となり得ることを示した (Ref.6)。更にアンジオテンシン II 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 ワクチンはペプチドワクチンよりも効果の持続期間が長

く、抗アンジオテンシン II 抗体の抗体価の上昇と、それに伴う収縮期血圧の有意な低下が少なくとも半年以上に渡り持続することが明らかとなった。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。

そこで本研究は、ワクチンの長期的な臓器保護効果の検討や、心筋梗塞モデルでの検討、よりヒトに近い大型動物での検討、ワクチン効果が持続する機序の解明などを通じ、実用化を目指した高血圧 DNA ワクチンの製剤開発を行うことを目的とする。

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対照群と共に長期間観察し、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。この実験は既に開始してから1年近くが経過しており、研究期間内に解析を終えることが充分可能である。

2) 臨床応用に適したワクチンとしては、単に降圧効果があるのみではなく、その結果として心不全の増悪を抑制するなど、生命予後を改善する効果を持つことが望まれる。また、げっ歯類だけの検討では種差による効果の違いが評価できないため、よりヒトに近い大型動物での確認も必要である。そこで冠動脈結紮による心筋梗塞ラットモデルおよび僧房弁閉鎖不全症の作製による犬心不全モデルにワクチンを投与し、臨床応用に向けて、心不全に対する治療効果および種差の影響の有無について確認する。

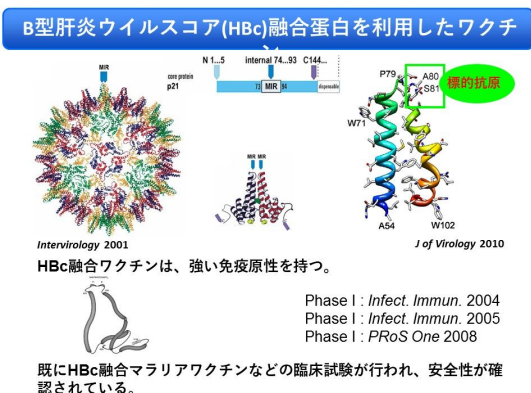
3) 我々の検討の結果、アンジオテンシン II の DNA ワクチンはペプチドワクチンよりも抗体価の持続期間が有意に長かったが、その詳細な理由は明らかでない。DNA ワクチンは、アジュバント効果を持つとされる CpG オリゴヌクレオチド配列を自身のプラスミド配列内に多数含んでいるため、このアジュバント活性が抗体価の維持に重

要な役割を担っている可能性が考えられる。CpG 配列のアジュバント活性の作用機序としては、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こり、自然免疫系の活性化が生じることが重要であると考えられている。そこで、TLR9 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長期間維持され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

Hepatitis B core (HBc) protein は下図に示すように、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やすく、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。そこで我々はこのシステムを利用し、AngII 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した。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。そこでこのシマジェットを用いて HBc-AngII ベクターを SHR の背部に複数回投与し、血圧降下の程度およびアンジオテンシン II 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。具体的にはアンジオテンシン II DNA ワクチンを SHR(n=10)および食塩感受性ダールラット(n=6)に 2 週間隔で 3 回投与(200μg/回)し、無投与群(n=10)と共に 2 年間の観察を行う。1 か月ごとに抗体価と収縮期血圧の測定を続け、ワクチンによる免疫効果の持続期間を確認する。また無投与群との生存率を比較し、寿命延長効果を確認する。投与後 1 年の時点で一部の個体は解剖し、高血圧に伴う心臓、腎臓の臓器障害のワクチンによる抑制効果の有無、程度を評価する。

チンによる抑制効果の有無、程度を評価する。

2) ラット心筋梗塞モデルでの検討: 8 週齢 SD ラット(n=6)にアンジオテンシン II DNA ワクチン(200μg/回)を 2 週間隔で 3 回投与し、初回投与の 6 週後に抗体価の上昇を確認する。抗体価が上昇した SD ラットの冠状動脈を結紮することで心筋梗塞を作成する。心筋梗塞作成前および 3 日後、1、2、4 週間後に経時的に心エコーにて心機能の評価し、採血にて ANP、レニン、アンジオテンシン濃度等を測定することで、慢性心不全に対する治療効果を確認する。経時観察後に心臓を摘出し、ワクチン非投与群(n=6)と比較して、心重量、心筋梗塞巣の縮小効果の有無や心筋梗塞後リモデリングの状態等々を評価する。大型動物での有効性の確認: ビーグル犬はげっ歯類よりも体重が多いが、DNA ワクチンの至適容量が種間を超えて体重に比例するか否かは明らかでない。そこでまず適切な投与量・投与方法について検討する。具体的には、少用量・皮内投与(400μg、シマジェット投与)群(n=2)、高用量・皮内投与(1200μg、シマジェット投与)群(n=2)、高用量・筋肉内投与(2000μg、筋肉注射)群(n=2)を作成(それぞれ 2 週間隔で 3 回投与)し、初回投与の 6 週後に各群の抗体価を比較する。最も高い抗体価の上昇が認められた投与量、投与経路にて、僧房弁の腱索断裂手術による慢性心不全モデルのビーグル犬(成犬を 4 週間高頻度ペースング、n=4)にワクチンを 2 週間隔で 3 回投与する。腱索断裂手術前および初回投与から、0、2、4、6 週間後、以後 1 か月ごとに心エコーによる心機能評価および採血にて ANP、レニン、アンジオテンシン濃度等の評価を行う。初回投与から 3 か月後に解剖し心臓の組織学的検討を行う。以上の検討により各モデルにおけるワクチンの有効性を評価する。

3) モデルマウスを用いた 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 (Ref.2)。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こり、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-AngII 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 経路を介しているか否かを確認する。

TLR9 経路を介していない場合には、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-AngII ワクチンの有効性を比較することで、TBK1 経路を介しているか否かを確認する。

また上記のことから臨床応用するにあたり、DNA ワクチンに CpG オリゴヌクレオチドを追加することで、アジュバント作用

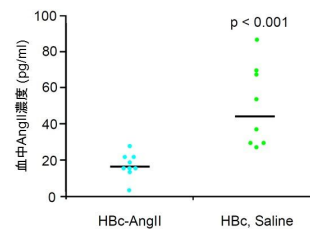
を補強することができると考えられる。そこで、実験が予定通りに行かず、抗体価が充分上昇しない場合等のバックアップとして ISS の追加投与を考えている。

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、無投与群と共に長期観察を行った。一部の個体は投与半年後に解剖し、心臓、腎臓等の組織解析を行った。その結果、ワクチン群で血中アンジオテンシン II 濃度の低下などが認められた。またワクチ

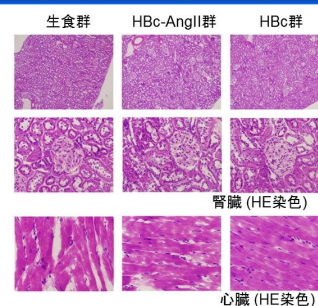
血中 Ang II 濃度



HbC-AngII群で、有意な血中Ang II濃度の低下が認められた

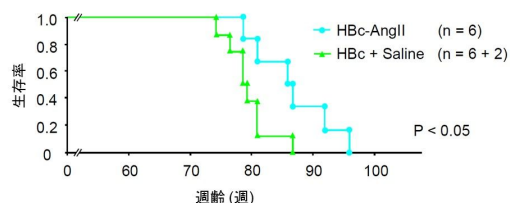
ン群の HE 染色で肝臓や腎臓に病理学的所見を認めなかった。これらの結果からアン

各組織の状態の観察



病的所見は認めなかった

生存率



ワクチン群で生存期間の延長を認めた

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が明らかとなった。これらの結果をまとめ、Hypertension誌に論文発表を行った。

以上の結果から、アンジオテンシン II を標的とした自己抗原ワクチンは、強い抗原性を持つ HBc タンパクと融合させることで、降圧作用をもたらす量の抗アンジオテンシン II 抗体を産生することが確認できた。また、今回ワクチンに用いたアンジオテンシン II は 8 アミノ酸と短いため、MHC 分子と結合せず、前駆体であるアンジオテンシノゲン発現細胞が細胞障害性 T 細胞からの攻撃を受けることは論理的に無いと考えられる。実際に各臓器の組織の詳細な観察で病理学的な変化が観察されなかったことや、生存期間延長の観察結果などからも、このワクチンの安全性は高いと考えられる。

2) その他の病態モデル、種差の検討

アンジオテンシン II ワクチンをビーグル犬に投与することで、ラットと同様に抗アンジオテンシン II 抗体が産生されることを確認した。またマウスにおいても同様に抗体価の上昇を確認した。これらの結果から、調べた限り種差によって産生される抗アンジオテンシン II 抗体価は大きく変わらないことが明らかとなった。

ラットモデルでの検討において、アンジオテンシン II の DNA ワクチンにより降圧効果だけでなく、生存期間延長の効果も認められたため、病態改善効果はある程度証明できたと考え、さらに効果が強く、長く持続するワクチンを開発することに主眼を移した。

3) 抗体価上昇のメカニズムの検討と、モデルマウスを用いた DNA ワクチンの免疫樹立機序の解析

DNA ワクチンはペプチドワクチンよりも効果の持続期間が長い傾向がある。この違いを詳細に検討する過程で、DNA ワクチンにペプチドワクチンを併用すると、著明な抗体価の上昇が得られることを見出した。さらに DNA、ペプチド併用ワクチンは、単回投与でも強い抗体価の上昇が得ら

れることが明らかとなり、用量依存性など最適な製剤条件を検討した。

このとき産生される抗体の IgG サブクラスを測定したところ、マウス、ラット共に IgG1 が多く、すなわち Th2 有意な免疫応答が起きていることが確認された。また、TLR9 ノックアウトマウスと野生側マウスで、ワクチンにより産生される抗 AngII 抗体価を比較したところ、TLR9 ノックアウトマウスの方が抗体価が低かった。このことから併用ワクチンの抗体価の増強には、DNA ワクチンに含まれる CpG 配列のアジュバント効果はその一部を担っていると考えられた。本項目の結果については、現在論文投稿準備中である。

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2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, 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7件)

郡山弘、DNA Vaccine as New Treatment for Hypertension、第81回日本循環器学会学術集会(シンポジウム) 2017.3.18.金沢

郡山弘、高血圧症に対するアンジオテンシン ワクチンによる新規治療法の開発、第16回日本抗加齢医学会総会、2016.6.10.横浜

郡山弘、The development of Angiotensin II vaccine for hypertension. HYPERTENSION SUMMIT 2016 KYOTO、2016.5.31.京都

郡山弘、アンジオテンシン II ワクチンの開発、第23回日本血管生物医学会学術集会、2015.12.11.神戸

郡山弘、アンジオテンシン II ワクチンの開発、脳心血管抗加齢研究会、2015.11.28.大阪

郡山弘、高血圧治療における最近の話題 ~ ワクチン治療を含めて ~、Molecular Jungle 2015、2015.10.16.大阪

郡山弘、アンジオテンシン II ワクチンに

よる高血圧症の新規治療法の開発、第 38
回日本高血圧学会、2015.10.9.愛媛

6 . 研究組織

(1)研究代表者

郡山 弘 (KORIYAMA, Hiroshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60710093