

## S100A9/CD36 シグナルを標的にした脳梗塞における抗血栓ワクチンの開発

島村宗尚

大阪大学大学院医学系研究科 健康発達医学講座

### 【研究の背景】

脳梗塞発症後の二次予防にとって、抗血小板薬および抗凝固薬の長期的な継続服用が重要であるが、不良な服薬コンプライアンスが、心原性、非心原性のいずれにおいても再発率増加の一因となっている(臨床神経 2011, Neurology 2011)。このような背景から我々は、抗血栓ワクチンが、服薬コンプライアンス不良に伴う脳梗塞の再発を抑制できる可能性を考えたが、長期間に及びうる出血リスクの抑制が、ワクチンにとっての大きな課題であった。

そこで我々は、止血・凝固系には影響をあたえず、血小板の CD36 を介して血栓形成を促進する S100A9(JCI 2014)に注目し、CD36 との結合部位であり B 細胞エピトープが想定される S100A9 のアミノ酸部位を KLH に結合した S100A9 ペプチドワクチンを作成した。同ワクチンをフロイントアジュバントとともに投与したマウスにおいて、中大脳動脈における塩化鉄(III)塗布血栓閉塞モデルを用い、ワクチンの効果および安全性を検討した。コントロールとして S100A8 ワクチンも作成した。

その結果、S100A8, S100A9 ワクチン接種後 2 週間後において抗体価は上昇し、また、Western blotting では S100A8, S100A9 に特異的な抗体が血清中に産生されることが明らかとなった。この時点で、塩化鉄(III)塗布による中大脳動脈血栓閉塞モデルを作成すると、S100A8 ワクチン投与マウスでは、血栓閉塞までの時間に延長は認められないものの、S100A9 ワクチン接種マウスでは、クロピドグレル投与マウスと同程度に血栓閉塞時間の延長が認められた。しかし、クロピドグレルとは異なり、尾動脈切断に伴う出血時間の延長が S100A9 ワクチン投与マウスでは認められず、また、PT、APTT、血小板数への影響も認められなかった。さらに、T-TAS を用いた flow chamber での血栓形成の解析においても S100A9 ワクチン投与マウスでは、血栓形成が抑制されていることが明らかとなった。また、ELISPOT assay では、免疫したマウスの脾臓から採取した細胞において、リコンビナント S100A9 あるいは S100A9 ペプチドに対する IL-4 あるいは IFN- $\gamma$  の産生が認められず、有害な自己免疫反応は本ワクチンでは発現しないことが明らかとなるとともに、IgG サブクラス解析では、S100A9 ワクチンでは IgG1 優位であることから、Th2 優位となっていることが明らかとなり、アルツハイマー病の A $\beta$  ワクチンで問題となった髄膜炎などの細胞障害を惹起しないことが示された。

今後の臨床応用への課題として、長期効果、ブースター投与による効果、血小板シグナルへの作用の検討、臨床応用可能なアジュバントへの変更の可否の検討が残されていた。

### 【目 的】

本研究では、マウスを用いて S100A9 ペプチドでの長期効果およびブースター投与による効果を明らかにするとともに、血小板シグナルへの作用を明らかにし、サルを用いて、臨床で使用されているアジュバントであるアラムでの抗体産生の有無を解明する。

### 【方 法】

#### a. 長期抗体価の推移とブースター効果の有無についての解析

S100A9 ペプチドワクチンを 2 週間おきに 3 回、C57BL/6J マウスに接種後、3 ヶ月にわたり抗体価の推移を ELISA にて確認する。3 ヶ月後の時点で抗体価の低下が見られるようであれば、この時点で S100A9 ペプチドワクチンの追加投与(ブース

ター)を 1 回行い、抗体価の再上昇があるか確認を行う。また、初回ワクチン後に抗体価が低下する時点、およびブースター投与にて抗体価が再上昇後に、血栓閉塞時間、尾動脈切断による出血時間を計測し、ワクチンの長期的効果を明らかにする。

b. 血小板シグナルへの影響の検討

ワクチンの効果のメカニズムとして、血小板での S100A9/CD36 下流の JNK, VAV のリン酸化が抑制されていることが想定される。そこで、血栓閉塞モデル作成直後の血小板を抽出し、Western blotting により JNK, VAV のリン酸化を解析する。

c. アジュバント変更による抗体価の検討

S100A9 はマウスとヒトで配列が大きく異なっているが、サルとヒトでは相同性が高い。マウスでのエピトープ部位に対応し、ヒトとサルの配列が同一である部位をエピトープとした(S100A9 の C 末端付近)ペプチドワクチンを作成し、すでにアジュバントとして臨床利用されているアラムを用いてカニクイザルに 2 週間おきに 3 回投与し、さらに 2 週間後に抗体の発現の有無を ELISA にて確認する。

【結 果】

a. 長期抗体価の推移とブースター効果の有無についての解析

図 1A のごとく免疫を行い、126 日間にわたって血清抗体価を測定した(図 1B)。結果、42-70 日後をピークに抗体価は徐々に低下するものの、126 日目まで抗体の発現が認められた。さらに 126 日目にブースターを行ったところ、140 日目で抗体価のさらなる上昇を認めた。また、抗体価が低下した 126 日目(図 1C)およびブースター後に中大脳動脈血栓モデルを作成したところ(図 1D)、ワクチン群では血栓の形成が遅延しており抗血栓効果を認める一方で、出血時間には差を認めなかった。

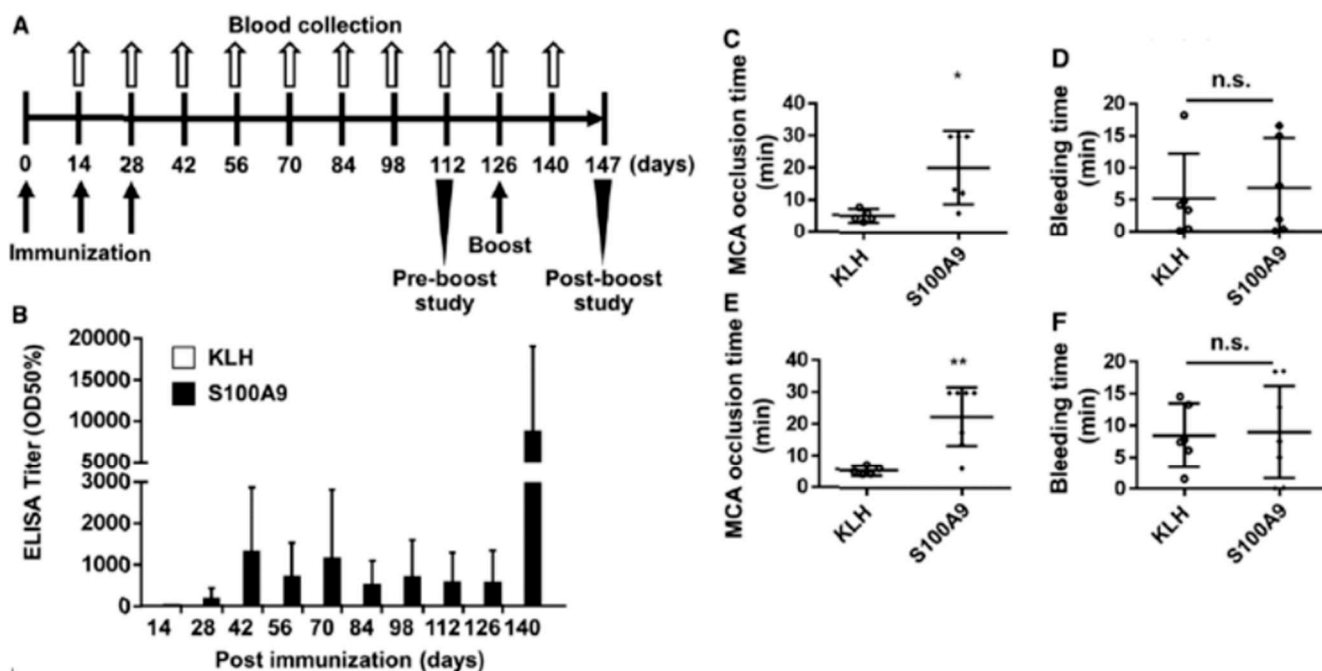


図 1 (文献 より引用改変)

b. 血小板シグナルへの影響の検討

まず、ワクチン前(図 2A pre-IM)、後(図 2A post-IM)と中大脳動脈血栓モデル作成 3 日後での血清中の S100A9 を ELISA にて測定した(図 2B)。中大脳動脈血栓モデル作成後には S100A9 値が上昇するが、ワクチン投与マウスでは、その発現が有意に抑制されていた。また、血小板での JNK および VAV1 のリン酸化も抑制されていることが確認された(図 2 C,D)。

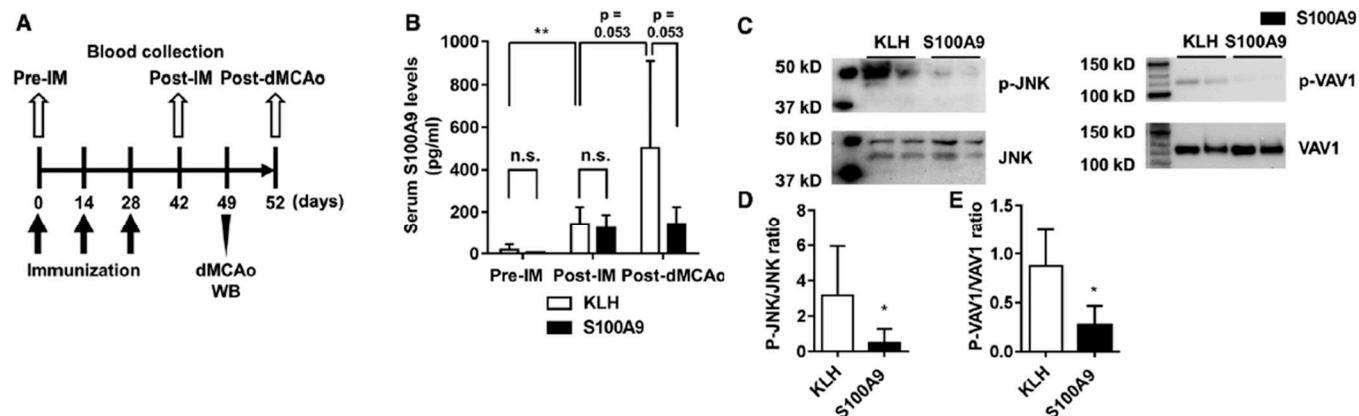


図 2 (文献 より引用改変)

c. アジュバント変更による抗体価の検討

ヒトおよびサルのエピトープに対応した S100A9 ペプチドをサル皮内にアラムと 2 週間おきに 3 回投与し、最終投与 14 日後の血清におけるヒト S100A9 に対する抗体価を計測した(2 頭)。ワクチン前に比較し、ワクチン後では明らかな抗体価の上昇を認めた。

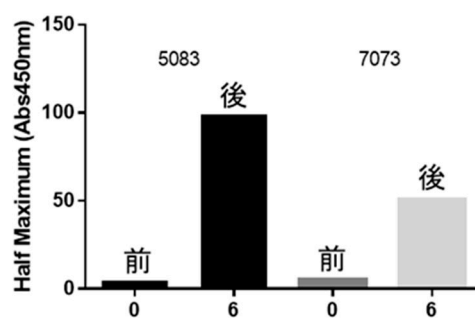


図 3

【考 察】

今回の検討により、ワクチン接種により抗体価と効果は少なくとも 2 ヶ月は持続することが明らかとなり、ブースターにより低下した抗体も再上昇することが明らかとなった。また、長期間経過後も、出血時間に影響はないことが明らかとなり、本ワクチンの長期有効性、また安全性が示唆された。また、ワクチンでは、血栓閉塞での S100A9 上昇が抑制されており、血小板の解析では、S100A9/CD36 シグナルの下流にある JNK, VAV1 のリン酸化が抑制されていることから、ワクチン投与により、血管傷害後に生じる血小板での S100A9/CD36 カスケードによる血小板凝集が抑制されることも明らかとなった。さらに、ヒト・サルエピトープに対応した S100A9 ワクチンのサルでのアラムとの投与で抗体の産生を認めたことから、本ワクチンの臨床応用への可能性が示唆された。今後は、サルにて産生された抗体が血栓形成を抑制することができるか、産生抗体の機能を確認する必要があると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

前述のごとく、我々の開発した S100A9 ペプチドは長期間にわたって抗血栓効果を有するとともに、出血リスクの増加が長期にわたって認められないことも明らかとなった。また、サルでも抗体の産生は明らかとなった。これらの結果は、本研究開始の背景となっている脳梗塞の二次予防におけるアドヒアランスの改善に、S100A9 ペプチドが寄与できる可能性を示唆している。今後、サルおよびヒト血液を用いた効果および安全性を検証していく必要があるが、抗血栓ワクチンの開発は可能であることが明らかとなり、抗血栓の今後の新しい治療法に発展する可能性があると考えられる。