



Title	THERAPEUTIC VACCINE AGAINST S100A9 INHIBITS THROMBOSIS WITHOUT INCREASING THE RISK OF BLEEDING IN ISCHEMIC STROKE IN MICE
Author(s)	河野, 友裕
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72190
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 河野友裕

	(職)	氏	名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	望月 秀樹
	副 査	大阪大学教授	桑本 宏実
	副 査	大阪大学寄附講座教授	玉井 真人

論文審査の結果の要旨

脳梗塞二次予防のためには抗血栓療法が重要である。しかし、不十分な服薬アドヒアランスによる脳梗塞再発や、長期間抗血栓薬を内服することによる出血性合併症は、克服すべき大きな問題となっている。本研究は、血小板より放出されるS100A9タンパク質に着目し、ワクチン療法で服薬アドヒアランスと出血性合併症を克服することを目標に計画された。

申請者らが開発したS100A9ワクチンは、マウス脳梗塞モデルで既存の抗血小板薬クロピドグレルと同程度の抗血栓効果を発揮したが、出血傾向は示さなかった。また、2週間毎合計3回ワクチンを投与すると、その後2か月以上効果が持続し、抗体価が低下した場合は追加ワクチンで抗体価の上昇を認めた。

このようにS100A9ワクチンは、脳梗塞二次予防において有望な治療法となりえる可能性が示唆された。本研究は次世代の抗血栓療法開発の可能性を示す興味深い内容であり、学位の授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	河野 友裕
論文題名 Title	THERAPEUTIC VACCINE AGAINST S100A9 INHIBITS THROMBOSIS WITHOUT INCREASING THE RISK OF BLEEDING IN ISCHEMIC STROKE IN MICE (S100A9ワクチンはマウス脳梗塞モデルで、出血リスクを増やさずに血栓形成を抑制する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 脳梗塞二次予防のためには抗血栓療法が重要である。しかし、日本だけでなく欧米においても抗血栓薬の服薬アドヒアランスは十分とは言えず、抗血栓薬内服中断による脳梗塞再発は大きな問題となっている。ワクチン療法は、この様な服薬アドヒアランスの問題を解決し、脳梗塞再発予防に有用な治療法となる可能性を秘めているが、出血リスクを増加させることなく、抗血栓作用を有するターゲット分子の選択が重要な課題であった。そこで我々は、近年、血管傷害時に血小板より放出され、血小板表面に発現するCD36受容体を介した血小板の活性化により血栓形成を促進する分子であり、一方で正常の止血には影響を及ぼさない分子として報告されたS100A9 (Wang Y, et al. JCI 2014) に着目し、ワクチンによるS100A9シグナルの抑制による抗血栓ワクチンの開発を考案した。本研究では、S100A9のC末端をエピトープとし、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) をキャリアプロテインとして化学結合させたペプチドワクチンを作成し、S100A9ワクチンによる長期抗血栓作用および出血時間、免疫系への影響についての検討を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 C57BL/6J (雄) マウス (8週齢) に 2 週間毎計3回S100A9ワクチンを皮下投与した。対照群は等量のKLHのみを皮下投与した。ワクチン抗体価は、血清を用いてenzyme-linked immunoassay法(ELISA法)にて評価した。最終ワクチン投与から3週間後に、塩化鉄 (FeCl3) 刺激による遠位中大脳動脈 (dmCA) および総頸動脈(CCA) 血栓症モデルを作成し血管閉塞時間を比較した。S100A9ワクチンの細胞障害性T細胞に与える影響はenzyme-linked immunospot法(ELISPOT法)で評価した。 まず、S100A9ワクチンにより、血清中に抗S100A9抗体が産生されたことをELISA法とWestern blot法で確認した。dmCAでの検討では、dmCA閉塞時間はS100A9ワクチン投与群で有意に延長しており、高用量群(50μg/回)は低用量群 (20μg/回) と比較して、dmCA閉塞時間の延長を認めた。また、その効果は上市している抗血小板薬クロピドグレル投与群と同等であった。CCAでの検討では、S100A9ワクチン投与群においてCCA閉塞時間は有意に延長し、その効果はCD36ノックアウトマウス群と同等であった。経時的な抗体価測定では、最終ワクチン投与から84日間は、抗体価は徐々に低下するものの維持されており、追加免疫により再び上昇した。追加免疫前後でのdmCA閉塞時間は、いずれの場合でもS100A9ワクチン群において有意に延長していた。一方、出血時間、血小板数、PT、APTT値は、S100A9ワクチン投与群およびKLHコントロール群間において有意差を認めなかった。 dmCAでのモデル作成前後の血清中S100A9濃度についての検討では、KLHコントロール群では血栓症モデル作成後にS100A9濃度が増加していたが、S100A9ワクチン投与群では増加が抑制されていた。モデル作成後の血小板から抽出した蛋白をWestern blot法で解析すると、CD36受容体下流のJNKおよびVAV1のリン酸化が、S100A9ワクチン群では有意に抑制されていた。免疫系への影響を検討するために、S100A9ワクチン投与マウスの脾細胞を用いてELISPOT法で検討したところ、S100A9エピトープペプチドやリコンビナントS100A9タンパク質に対する炎症性サイトカインの産生上昇は認めなかったことから、S100A9ワクチンは細胞障害性T細胞を活性化させないことが明らかとなった。 〔総括(Conclusion)〕 我々の開発したS100A9ワクチンは、出血リスクを増加させることなく2か月以上の抗血栓作用を有すること、血管傷害後の血中S100A9濃度上昇と血小板におけるJNK、VAV1のリン酸化を抑制すること、有害な細胞障害性T細胞の活性化を惹起しないことが明らかとなった。S100A9ワクチンは、虚血性脳卒中二次予防において有望な治療法となりえる可能性が示唆された。	