

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16006

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) The development of new therapeutic strategy for diabetic nephropathy

研究代表者

畔上 達彦 (Azegami, Tatsuhiko)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・助教

研究者番号：60573376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎臓病(DKD)はアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患で、その発症・進展には終末糖化産物受容体(RAGE)が深く関与する。DKDに対する治療戦略を構築するため、RAGEを標的とした治療ワクチンを開発した。RAGEワクチン接種により、ストレプトゾトシン投与マウス(1型糖尿病モデル)とレプチン受容体欠失db/dbマウス(2型糖尿病モデル)で、尿中アルブミン排泄、糸球体腫大、メサンギウム基質拡大、糸球体基底膜肥厚が軽減された。これらの結果から、我々の開発したRAGEワクチンは、DKDの進展抑制に有効であり、今後、DKD患者に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病では慢性の経過で血管合併症が発症・進展するため、長期の治療・管理が必要となる。本邦の糖尿病有病者は約1,000万人と推定され、患者数は膨大である。腎症は、血管合併症の1つで、末期腎不全のリスクであり、透析療法導入における原疾患として最多である。さらに、心血管疾患の発症リスクを増大し、糖尿病患者の生命予後に寄与する。したがって、糖尿病性腎症の治療戦略を確立することは、(1)患者個々の心血管予後・生命予後を改善、(2)末期腎不全への進展を抑制、(3)末期腎不全治療にかかる莫大な費用を抑制につながるため、本研究にて、腎症の進展抑制に寄与しうる新規戦略を開発できたことは社会的に意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Effective treatment of diabetic kidney disease (DKD) remains a large unmet medical need. Advanced glycation end-products (AGEs) - receptor for AGEs (RAGE) axis plays a pivotal role in the development and progression of DKD. To provide a new therapeutic strategy against DKD progression, we developed a vaccine against RAGE. The immunization of mice with the RAGE vaccine induced antigen-specific serum IgG antibody titers and attenuated the increase in urinary albumin excretion in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice (type 1 diabetes model) and leptin-receptor deficient db/db mice (type 2 diabetes model). In microscopic analyses, RAGE vaccination suppressed glomerular hypertrophy and mesangial expansion in both diabetic models and significantly reduced glomerular basement membrane thickness in STZ-induced diabetic mice. Thus, our newly developed RAGE vaccine attenuated the progression of DKD in mice and is a promising potential therapeutic strategy for patients with DKD.

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病性腎臓病 腎臓 ワクチン 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病では慢性的に高血糖状態が持続し、血管合併症が発症・進展するため、長期にわたる糖尿病治療・合併症管理が必要となる。平成 28 年国民健康・栄養調査の結果から、本邦の糖尿病有病者は約 1,000 万人と推定され、治療・管理すべき患者数は膨大である。糖尿病性腎症は、糖尿病による血管合併症の 1 つで、末期腎不全のリスクであり、本邦での透析療法導入における原疾患として最多である。さらに、糖尿病性腎症は、心血管疾患の発症リスクを増大し、糖尿病患者の生命予後に大きく寄与する。このような背景から、糖尿病性腎症の予防および治療戦略を確立することは、(1) 患者個々の心血管予後・生命予後を改善する、(2) 末期腎不全への進展を抑制する、(3) 透析療法をはじめとする末期腎不全治療にかかる莫大な費用を抑制し医療経済的な社会負担を軽減することにつながり、患者個人および社会全体に与える影響は多大である。

一方で、現在、糖尿病性腎症の予防・治療は、血糖や血圧の管理が主体であり、糖尿病性腎症に対して特異的に作用するような治療薬は乏しく、アンメット・メディカル・ニーズが高い。糖尿病性腎症の発症・進展には、高血糖に起因する終末糖化産物 (AGEs: advanced glycation end products) の蓄積、レニン-アンジオテンシン系の活性化、酸化ストレス、慢性炎症など多因子の関与が推察され、これらに対する治療法の開発が試みられている。また、糖尿病性腎症は、早期には自覚症状に乏しく、慢性の経過で発症・進展するため、長期間におよぶ予防・治療においては服薬アドヒアランスが低下する懸念があり、服薬アドヒアランスの向上が期待できる治療法の開発が望ましい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症の発症・進展に深く関与する AGEs の機能を抑制するため、AGEs の受容体である RAGE (receptor for advanced glycation end products) を標的とした治療ワクチンを作成し、糖尿病性腎症に対する予防・治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

1. ワクチン抗原の作成

自己蛋白を標的とするワクチン抗原の作成に際しては、抗体産生を効率よく誘導し (B cell epitope)、過剰な細胞性免疫応答 (T cell epitope) を回避するような抗原配列が望ましい。8 アミノ酸未満の短ペプチド配列は、B cell epitope となり得る一方で、T cell epitope にはならないことが知られており、立体構造解析ならびに親水性/疎水性予測を用いて、RAGE V ドメインのうち、終末糖化産物 (AGEs) との結合部位およびその周辺の配列から、8 アミノ酸未満の B cell epitope 配列を選定し、抗原候補配列を作成した。候補配列ペプチドに対する抗原性を確保するために、キャリア蛋白 (Keyhole limpet hemocyanin: KLH) を結合し、RAGE ワクチン抗原とした。

2. 1 型糖尿病モデルでの効果の検討

RAGE ワクチン抗原 20 μ g を Freund アジュバントと混合し (以下、抗 RAGE ワクチンとする)、雄 DBA/2J マウスに、4、6、8 週齢時に各 1 回ずつ皮下注射免疫を施した。vehicle 群には KLH 20 μ g を Freund アジュバントと混合し、皮下注射した。最終免疫の 1 週間後より、ストレプトゾトシン (40 mg/kg を 5 日間) を腹腔内投与し、糖尿病の発症を誘導したうえで、各種評価を行った。

3. 2 型糖尿病モデルでの効果の検討

抗 RAGE ワクチンを、雄 db/db マウスに、10、12、14 週齢時に各 1 回ずつ皮下注射免疫を施した。vehicle 群には KLH 20 μ g を Freund アジュバントと混合し、皮下注射した。その後、1 型糖尿病モデルと同様に、腎症に対する効果を検討するため、各種評価を行った。

4. in vitro での検討

ワクチン接種マウス、vehicle 接種マウスから血清 IgG 抗体を抽出・精製し、RAGE に対する効果 (下流シグナルの応答) を Western blotting を用いて確認した。

4. 研究成果

1 型糖尿病モデルでの効果の検討

2 回目のワクチン接種後より、抗原特異的な血清 IgG 抗体価が上昇し、最終接種 8 週後にピークとなり、その後数ヶ月かけて徐々に低下した。ワクチン接種群では vehicle 群と比較して、尿中アルブミン排泄が有意に低値であり ($333.6 \pm 104.7 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ vs $850.6 \pm 208.6 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$, $P = 0.04$)、糸球体肥大 ($3.18 \pm 0.17 \mu\text{m}^3$ vs $5.28 \pm 0.52 \mu\text{m}^3$, $P < 0.01$)、メサンギウム基質拡大 ($18.8 \pm 0.8\%$ vs $26.3 \pm 1.6\%$, $P < 0.01$)、ポドサイト減少 (8.77 ± 0.36 cells per glomerulus vs 6.72 ± 0.27 cells per glomerulus, $P < 0.01$)、糸球体基底膜肥厚 ($181.3 \pm 1.8 \text{ nm}$ vs $215.3 \pm 1.9 \text{ nm}$, $P < 0.01$) が軽減された。

2 型糖尿病モデルでの効果の検討

抗 RAGE ワクチンを、雄 db/db マウスに、10, 12, 14 週齢時に各 1 回ずつ皮下注射免疫を施した。vehicle 群には KLH $20 \mu\text{g}$ を Freund アジュバントと混合し、皮下注射した。ワクチン接種群では vehicle 群と比較して、尿中アルブミン排泄が有意に低値であり ($367.0 \pm 88.2 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ vs $737.7 \pm 116.4 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$, $P = 0.03$)、糸球体肥大 ($3.22 \pm 0.23 \mu\text{m}^3$ vs $5.67 \pm 0.18 \mu\text{m}^3$, $P < 0.01$)、メサンギウム基質拡大 ($23.6 \pm 1.0\%$ vs $32.7 \pm 2.3\%$, $P < 0.01$) の軽減が確認された。

in vitro での検討

血管内皮細胞 (HUVEC) を AGEs で刺激すると、VCAM-1 や ICAM-1 の発現が上昇したが、ワクチン群の IgG 抗体で前処置を施すことで、それらの発現上昇が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 畔上達彦, 林香, 菱川彰人, 吉本憲史, 中山亮振, 伊藤裕
2. 発表標題 終末糖化産物受容体を標的とした糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の開発
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuhiko Azegami, Kaori Hayashi, Akihito Hishikawa, Norifumi Yoshimoto, Takashin Nakayama, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Active Immunotherapy against receptor for advanced glycation end products attenuates the progression of diabetic kidney disease
3. 学会等名 Joint Meeting ISH-ESH 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 畔上達彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-159259	出願年 2019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
---------	---------