

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08590

研究課題名（和文）糖尿病性腎症を抑制する新規治療ワクチンの薬効とメカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic vaccine for diabetic nephropathy

研究代表者

勝谷 友宏（Katsuya, Tomohiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授

研究者番号：30311757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病合併症において（プロ）レニンに関連性が報告されている。我々のこれまでの検討において（プロ）レニンワクチンは糖尿病網膜症に対して抑制効果があることを明らかにしており、糖尿病腎症における効果について糖尿病モデルマウスを用いて検討を行った。糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに（プロ）レニンワクチンをアラムアジュバントと投与し、抗体価の上昇を確認した。これまでの検討と同様に体重、血糖は変化が認められなかった。ワクチンの腎機能に対する効果を検討するために尿中アルブミンを測定した。その結果、db/dbコントロール糖尿病マウスで上昇したアルブミン尿はワクチンにより抑制できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病や高血圧などの生活習慣病においては長期にわたり投薬治療が必要となり、服薬アドヒアランスは心血管疾患イベントの発症や死亡率に影響することも報告されている。しかしながら長期にわたる服薬は経済的にも身体的にも非常に負担が大きい。生活習慣病などの生涯投薬、治療を必要とする場合に標的治療分子に対する抗体を治療ワクチン投与により自己的に産生させるというコンセプトのもと、頻回に渡る薬剤（または抗体医薬）の投与の代わりに治療ワクチンを年に数回投与することで治療効果を持続的に達成することができればこれらの負担の軽減は大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：(Pro) renin is known to be associated with diabetic complications such as retinopathy and nephropathy. We previously showed that (pro)renin targeting vaccine inhibited diabetic retinopathy in diabetic mouse model. In this study, we evaluated the effect of (pro)renin vaccine on diabetic nephropathy in diabetic mouse model. db/db mice, diabetic model mice, administered with (pro)renin vaccine with alum adjuvant thrice at 2 week interval showed no difference in body weight and blood glucose level. To evaluate kidney function, we evaluated albuminuria by ELISA. As the result, (pro)renin vaccine inhibited albuminuria in db/db mice administered with (pro)renin vaccine. These data suggested that (pro)renin vaccine has the therapeutic effect on diabetic nephropathy in db/db diabetic mice model.

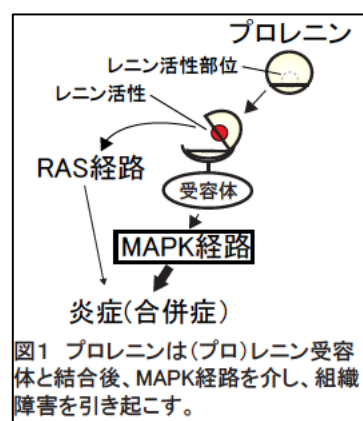
研究分野：糖尿病合併症

キーワード：糖尿病腎症 治療ワクチン

1. 研究開始当初の背景

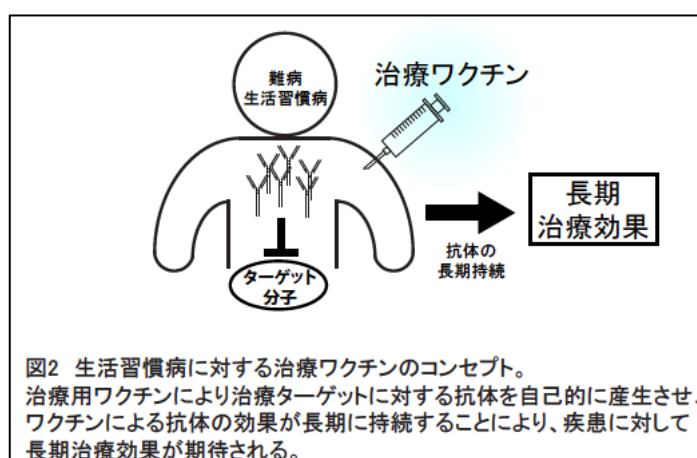
我が国において医療水準の高度化や食文化の欧米化に伴い平均寿命は増加し、同時に糖尿病患者数も増加している。糖尿病により血糖が高い状態が継続された場合は、まず小血管が障害をうけ、長い年月をかけて神経・網膜・腎臓において症状が現れる。これらは糖尿病3大合併症として知られ、網膜症は失明原因の上位に、腎症は透析の原因疾患の第一位として日常生活に大きな影響を与え、QOLの低下をもたらしている。現在のところ合併症に対する根本的な治療法は存在せず、いかに発症を予防できるかが重要である。

これまでレニン-アンジオテンシン (Renin-Angiotensin System, RAS) 経路が着目され、阻害剤が糖尿病腎症に一定の効果が認められているが発症そのものを抑制できてはいない (UK Prospective Diabetes Study Group, UKPDS, 1998, Luwis EJ, N Engl J Med, 2001)。一方で、このレニンの前駆体として知られている (プロ) レニンは血中に存在しており、糖尿病において血中濃度が上昇し、合併症とも相関することが報告されている (Franken AA et al, J Clin Endocrinol Metab,



1990, Franken AA et al, Diabetes Metab, 1992)。 (プロ) レニンは、その受容体を介して ERK 経路を活性化し、炎症性サイトカインや接着分子の発現を誘導する (Nguyen G et al, J Clin Invest, 2002) (図1)。その後、(プロ) レニンの受容体結合部 (Handle Region: HR) に対する阻害ペプチドが開発され、動物モデルにおいて網膜症や腎症において効果があることが示されている (Ichihara A et al, J Clin Invest, 2004, Ichihara A et al, J Am Soc Nephrol, 2006, Ichihara A et al, J Am Soc Hypertens, 2008)。

生活習慣病などの慢性疾患や、難病においては長期にわたり投薬による治療が必要であり、服薬アドヒアランスは心血管イベントの発症や死亡率に影響する (Kim YY et al, Sci Rep, 2018)。しかし、実際は長期に渡る投薬は患者にとって大きな負担であり、長期での正しい投薬は難しい (Lee JK et al,



JAMA, 2006, Sabate E et al, WHO, 2003, Osanai Y et al, Jpn J Soc Pharm, 2015)。

この問題を克服するため我々はこれまで治療ワクチンに着目しており、治療標的分子に対する抗体をワクチン投与により自己的に産生させるというコンセプトのもと頻回に渡る薬剤 (抗

体医薬)の投与の代わりに、年数回のワクチン接種で持続的な治療効果が期待できる(図2)。結果、患者の身体的経済的な負担軽減のみならず、薬剤アドヒアランスの改善にも大きく貢献できる。これまで高血圧や脳梗塞、糖尿病に対し動物実験において検討を続けてきた(Kawano T et al, Hypertens, 2018, Nakagami H et al, Hytertens, 2018, Kawakami R et al, Plos One, 2018, Wakayama K et al, 2017, Stroke, Watanabe R et al, Sci Res, 2017, Pang Z et al, 2014, Nakagami F et al, Plos One, 2013)。

2. 研究の目的

先行研究において(プロ)レニンワクチンを開発し、糖尿病網膜症に対する効果を糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いて解析したところ、網膜障害が抑制されていることがわかった(Yokota H, Hayashi H et al, Plos One, 2022)。また24週齢において腎臓を取り出して病理学的検討を行ったところ、ワクチン群では糸球体の肥大が抑制され、糖尿病腎症に対しても抑制効果を発揮する可能性が示唆された。これより本検討においては db/db 糖尿病モデルマウスを用いて(プロ)レニンワクチンの糖尿病腎症に対する効果を詳細に検討する。

3. 研究の方法

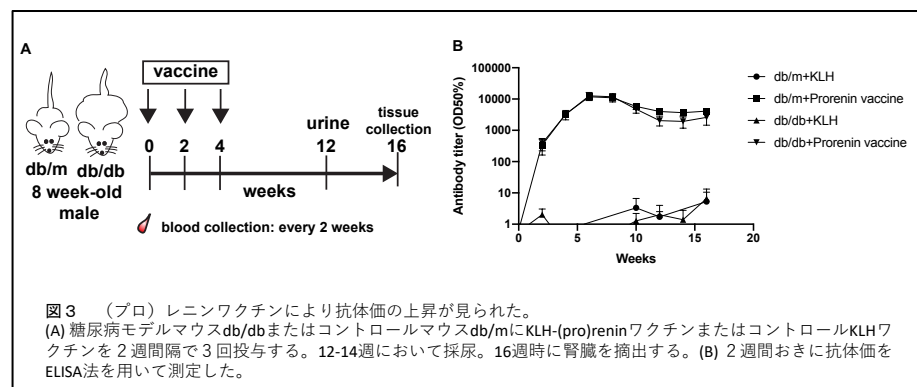
糖尿病モデルマウスである db/db マウス(雄)に8週齢から2週間隔で3回ワクチンを投与する。キャリアである Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)に(プロ)レニンに特異的な配列である TFERIPLKMC をコンジュゲートさせたものをワクチンとして 20 μ g をアラムアジュバントとともに皮内投与にて投与を行った。その後、2週間隔で体重、採血、血糖を測定した。1回目ワクチン接種後12-14週後で採尿を行い、尿中のアルブミン、クレアチニン測定を行い腎機能を評価した。16週後に腎臓組織を摘出し、mRNAを抽出しリアルタイムPCRにて炎症性サイトカインの測定、タンパクを抽出しシグナル経路の検討を行なった。

4. 研究成果

● ワクチンによる抗体産生の評価

糖尿病モデルマウスである db/db マウス、コントロールマウスである db/m マウスに(プロ)

レニンワクチン、またはコントロールワクチン(KLH)を2週間隔で3回投与し、2週間



おきに採血し、抗体価を ELISA 法により測定した (図 3A)。その結果、2 週目より抗体価の上昇を認め、6 週でピークになり、その後減少傾向であった (図 3B)。また随時血糖や体重はコントロールワクチン群と比較し、変化は認められなかった。ワクチンにより誘導された抗体はリコンビナント (プロ) レニンに対しても反応していることが確認された (図 4A)。また IgG のサブクラスは IgG1>IgG2 であり、Th2 型であることがわかった (図 4B)。

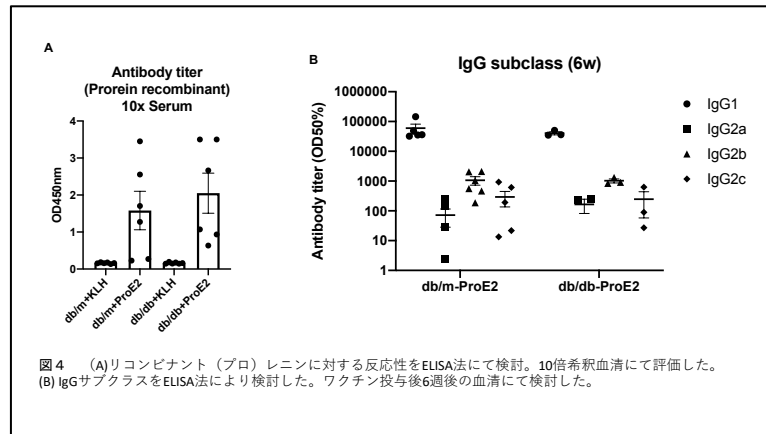


図 4 (A)リコンビナント (プロ) レニンに対する反応性をELISA法にて検討。10倍希釈血清にて評価した。(B) IgGサブクラスをELISA法により検討した。ワクチン投与後6週後の血清にて検討した。

コントロールワクチン群と比較し、変化は認められなかった。ワクチンにより誘導された抗体はリコンビナント (プロ) レニンに対しても反応していることが確認された (図 4A)。また IgG のサブクラスは IgG1>IgG2 であり、Th2 型であることがわかった (図 4B)。

- 糖尿病モデルマウスにおけるワクチンの腎機能への影響について。

(プロ) レニンワクチンの糖尿病における腎機能の評価として尿中のアルブミン、クレアチニン測定を実施した。

ワクチン後 12~14 週後において尿を採取し、アルブミン、クレアチニンの測定値よりアルブミン/クレアチニン比の算出を行なった。その結果、db/db マウスのコントロールワクチン群に比較して、(プロ) レニンワクチン群では低値であることがわかった。これにより、(プロ) レニンワクチンにより糖尿病による腎機能低下が抑制されていることがわかった (図 5)。

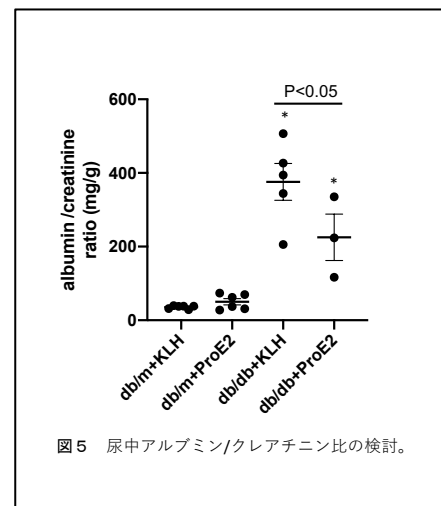


図 5 尿中アルブミン/クレアチニン比の検討。

- 腎臓における炎症惹起シグナルの評価

これまで (プロ) レニンは受容体を介した ERK シグナルを介して炎症性サイトカインが誘導されることがわかっている (Nguyen G et al, J Clin Invest, 2002)。ワクチン後 16 週後に腎臓を摘出し、ウエスタンブロットを用いて ERK のリン酸化を評価した。Db/db マウスの KLH コントロールワクチン群においては db/m 正常マウスと比較して、ERK は強くリン酸化が検出された。一方 db/db (プロ) レニンワクチン群は ERK のリン酸化が抑制されていることがわかった (図 6)。また p38 のリン酸化も同様にワクチンによって抑制されていることがわかった。

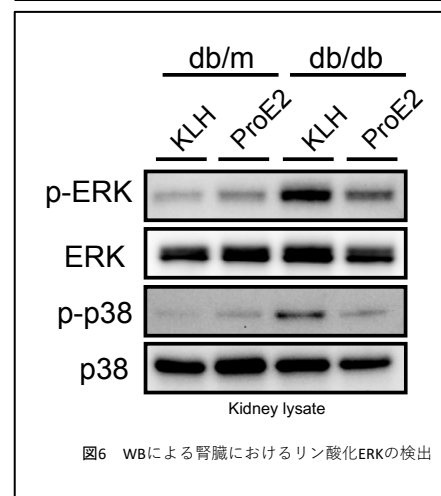


図 6 WBによる腎臓におけるリン酸化ERKの検出

- 腎臓における炎症性サイトカインの測定

次に腎臓における炎症性サイトカインの発現をリアルタイムPCRをもちいて検討した。db/db 糖尿病マウスのKLHコントロールワクチンを投与したマウスにおいては、炎症性サイトカインの発現 (TNF α , IL1 β , IL6) は上昇していたが、

(プロ) レニンワクチン群においては低下が認められた (図7)。

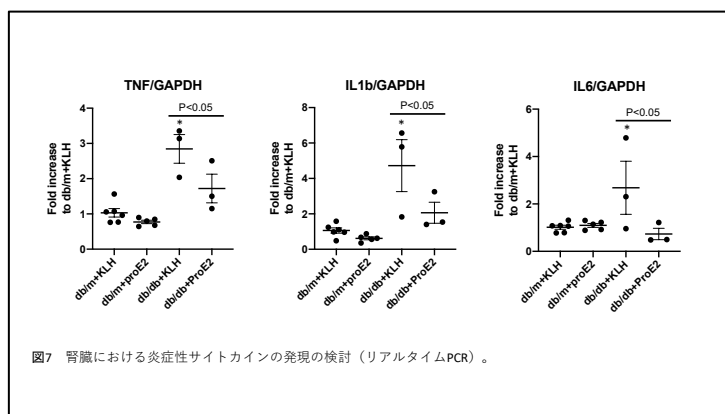


図7 腎臓における炎症性サイトカインの発現の検討 (リアルタイムPCR)。

これらの結果より、(プロ) レニンワクチンは糖尿病モデルマウスにおいて糖尿病腎症を抑制する効果があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|-------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369) | 大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 林 宏樹 (Hayashi Hiroki) (20813364) | 大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師 (14401) | |

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 |
|---------|---------|