

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25670433
研究課題名(和文) 糖尿病・脂質異常症に対するDNAワクチンの開発

研究課題名(英文) DNA vaccine for diabetes and dyslipidemia

研究代表者

森下 竜一 (Morishita, Ryuichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：40291439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：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のような自己抗原を標的とした研究も進められている。そこで本研究では脂質異常症ではLp(a)を標的とした、糖尿病に対してはDPP4を標的としたDNAワクチンの作製とモデル動物における治療効果の検討およびその作用機序の解明を目的とした。DPP-4ワクチンを野生型マウスに投与し高脂肪食を負荷したところ、糖負荷試験における血糖の有意な低下とインスリン負荷試験におけるインスリン抵抗性の改善が認められた。他の糖尿病マウスを用いた検討においても、ワクチン投与により耐糖能の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：We developed a dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)-targeted immune therapy for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus and a Lp(a)-targeted immune therapy for the treatment of high Lp(a) patients. Immunization with the DPP4 vaccine in C57BL/6J mice successfully increased DPP4 titer and inhibited plasma DPP4 activity. Moreover, this elevated titer was sustained for 3 month. In mice fed a high-fat diet, DPP4 vaccination resulted in improved postprandial glucose excursions and insulin sensitivity and, in the diabetic KK-Ay and db/db mice strains, DPP4 vaccination significantly reduced glucose excursions and increased both plasma insulin and pancreatic insulin content. Thus, this DPP4 vaccine may provide a therapeutic alternative for patients with diabetes.

研究分野：生活習慣病

キーワード：ワクチン 糖尿病 脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む我が国において右肩上がりに急増する医療費をいかに抑えていくかというのが今後の大きな課題である。生活習慣病の治療には血圧・糖尿病・脂質異常といった危険因子に対する薬剤による管理が中心であり、これらの薬剤はそれぞれ優れた有効性と副作用に関するエビデンスも蓄積されている。しかしながら、厳格なコントロールのためには一人の患者にそれぞれの疾患毎に複数の薬剤が必要となり、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。この問題に対し、仮に年に1~2回程度ワクチンを投与することによって、必要な薬剤量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。

先行研究では特に高血圧症に対するワクチン治療として、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 (Michel JB, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987)、アンジオテンシン I では有効性が得られなかった (Reade R, *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1989) 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 (Zhu F, *Cell Mol Immunol*, 2006) 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 (Ambuhl PM, *J Hypertens*, 2007)。しかし、脂質異常症あるいは糖尿病 (2型) に対するワクチン治療の開発研究は進んでいない。

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 (アミロイドベータ) のような自己抗原を標的とした研究も進められている。そこで本研究では脂質異常症では Lipoprotein(a) (以下 Lp(a)) を標的とした、糖尿病に対しては DPP4 を標的とした DNA ワクチンの作製とモデル動物における治療効果の検討およびその作用機序の解明を目的とした。

2. 研究の目的

社会構造の変化や抗体医薬などの高額医療の出現により、国民皆保険の我が国でも疾患の治療法にはコストや効率などを考慮した複数の選択肢が求められる時代となった。本研究ではワクチン治療の生活習慣病への応用を目指し、より安全性の高い高効率な DNA ワクチンの基盤技術を開発する。感染症・癌に対するワクチン治療と異なり、薬剤による治療が確立されている生活習慣病にはより高い安全性と確実な有効性が求められる。この観点から脂質異常症や糖尿病を対象として、内在性の標的分子に対する抗体産

生を効率に誘導しながらも T 細胞の活性化 (細胞性免疫) を可能な限り回避する DNA ワクチンシステムを構築し、その有効性と安全性を動物モデルで検討する。この基盤技術を土台として将来的な新規治療法へと発展させていくことを目的とする。

3. 研究の方法

1) DPP-4 あるいは Lp(a) を標的とした DNA ワクチン用ベクターの作成

Hepatitis B core (HBc) protein に DPP-4 あるいは Lp(a) の B cell epitope を融合し抗原提示能を高めた候補プラスミドを複数作成する。エレクトロポレーションを用いて野生型マウスへ遺伝子導入を行い、抗体価上昇誘導作用が最も強いプラスミドを選定する。

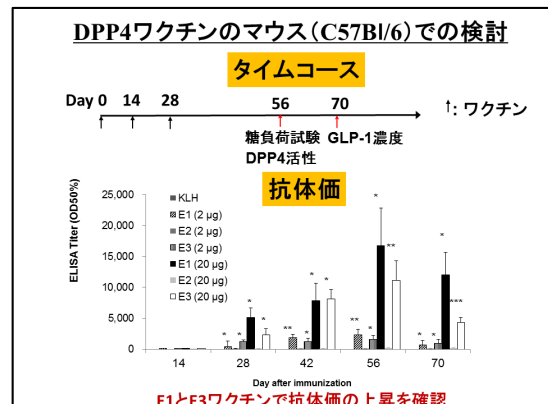
2) 疾患モデルでの薬効評価およびマウスでの機序解明

作製したベクターを糖尿病モデルマウスあるいは Lp(a) 過剰発現マウスに投与し、血糖および血中 Lp(a) 低下の評価と DPP-4 あるいは Lp(a) に対する抗体価の強さを経時的に観察する。観察終了後、脾臓を摘出し ELISPOT assay により細胞性免疫の程度を確認する。さらに、TLR9 および TBK1 欠損マウスに DNA ワクチン治療を行い、自然免疫活性化の機序を検討する。

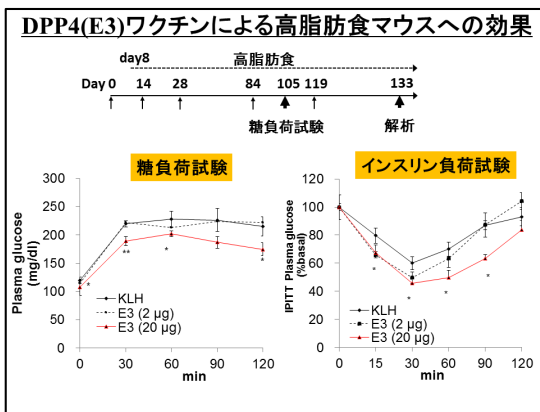
4. 研究成果

糖尿病 (標的分子 DPP-4) ワクチン

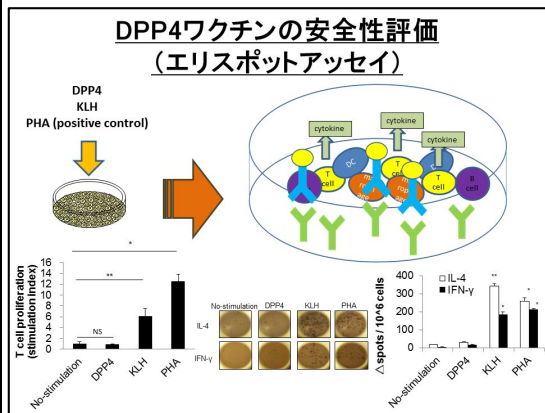
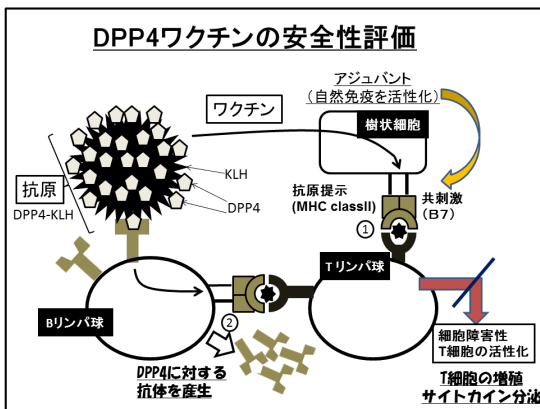
DPP-4 (CD26) は1回膜貫通型の蛋白であり、膜貫通部位付近で切断されて血中へと放出され、2量体を形成することでインクレチン (GLP など) を不活性化する酵素活性を有する。近年、糖尿病治療薬として CDD-4 阻害薬が臨床で用いられているが、インクレチンは血糖値が高い場合にはインスリン分泌を促進するため、持続的に DPP-4 を阻害しても低血糖は生じにくいと考えられる。そこで DPP-4 を標的とした糖尿病ワクチンを設計することとした。DPP-4 の配列の中から立体構造を考慮して抗原を3箇所選定しペプチド合成を行い、キュアリア蛋白である KLH とのコンジュゲートワクチンを合成した (それぞれ E1, E2, E3)。このワクチンを野性型マウスに2週間毎に3回投与して抗体価の上昇を評価した。結果として、E1 と E3 ワクチンでは抗体価が上昇したが E2 は無効であった。



次に E1 と E3 ワクチン投与後のマウス血清を用いて DPP-4 活性を測定したところ、E3 ワクチン投与後のマウス血清では DPP-4 活性阻害が認められたのに対して E1 ワクチン投与後のマウスでは DPP-4 活性が認められなかったそこで、E3 を有力な候補配列として次に薬効試験を遂行した。野生型マウスに E3 ワクチン（低用量・高用量）を投与し高脂肪食を负荷したところ、高用量ワクチン投与群において糖負荷試験における血糖の有意な低下とインスリン負荷試験におけるインスリン抵抗性の改善が認められた。他の糖尿病マウスを用いた検討においても、高用量 E3 ワクチン投与により耐糖能の改善が認められたことから、DPP4 ワクチンが糖尿病マウスモデルに対して有効であることが示唆された。



次に、安全性評価としてワクチン投与後の脾臓由来培養細胞を用いた検討を行った。培養細胞に抗原である DPP4 E3 ペプチドあるいは KLH を添加したときの、細胞増殖能 (T-cell proliferation assay) あるいは Th1/Th2 サイトカイン (インターフェロン およびインターロイケン 4) の分泌能力の測定 (エリスポットアッセイ) を行うことで、抗原配列 (E3) が T 細胞の活性化を有しているか否かを検討した。結果、KLH は T 細胞の活性化を誘導したのに対し、E3 配列は全く活性化を誘導しなかった。すなわち、DPP4 ワクチンにより細胞障害性 T 細胞の活性化が誘導されて自己免疫疾患に至る可能性は低いと考えられた。

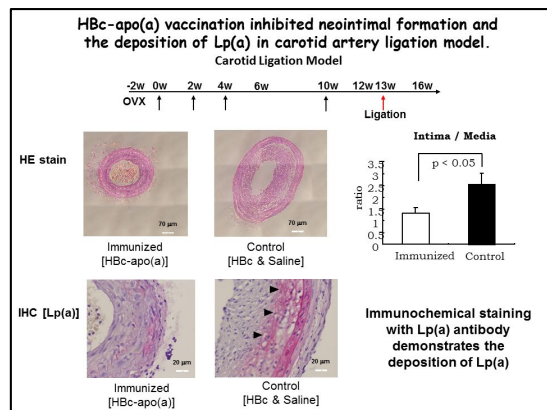


以上の結果より、糖尿網マウスモデルを用いた検討から、DPP4 を標的とした糖尿病ワクチンの有効性および安全性が示唆された。

脂質異常症 (標的分子 Lp(a)) ワクチン

同様のコンセプトで Lp(a) に対するワクチンにも取り組んだ。Lp(a) は Apo(a) と ApoB の複合体であることから、Apo(a) の部分配列で Lp(a) に特異性の高い配列を選択して、それに対するワクチンを設計した。ワクチンを 2 週間毎に 3 回投与し Lp(a) に対する抗体価の上昇を確認した後に、薬効試験を行った。Lp(a) は血管局所に蓄積して炎症を惹起することにより動脈硬化および血管リモデリングを促進すると考えられているため、Lp(a) 過剰発現マウスを用いた頸動脈結紮モデルで新生内膜肥厚の評価を行った。結果、ワクチン投与群で有意に新生内膜の肥厚が抑制され、また内膜への Lp(a) の蓄積も有意に抑制されていた。

以上の結果から、高 Lp(a) 血症に対する新しい治療法としてのワクチンの可能性が示唆された。



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)

Pang Z, Nakagami H, Osako MK, Koriyama H, Nakagami F, Tomioka H, Shimamura M, Kurinami H, Takami Y, Morishita R, Rakugi H.

Therapeutic vaccine against DPP4 improves glucose metabolism in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 ;111(13):E1256-63.

Kyutoku M, Nakagami H, Koriyama H, Nakagami F, Shimamura M, Kurinami H, Tomioka H, Miyake T, Katsuya T, Morishita R. Inhibition of Neointima Formation through DNA Vaccination for Apolipoprotein(a): A New Therapeutic Strategy for Lipoprotein(a). Sci Rep. 2013;3:1600

〔学会発表〕(計2件)

Hironori Nakagami 「Results of novel therapeutic vaccine for lipoprotein(a) in mice」 3rd Dresden International Symposium on Therapeutic Apheresis、2014.3.15、ドレスデン、ドイツ<シンポジウム>

中神 啓徳 「Therapeutic vaccine against DPP4 improves glucose metabolism in mice」第14回日本抗加齢医学会総会、2014.6.7、大阪<口演>

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi)

大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：40291439

(2) 研究分担者

中神 啓徳 (NAKAGAMI, Hironori)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20325369