

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32665  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K09835  
研究課題名（和文）糖尿病網膜症の発症予防のためのワクチン治療の開発と新規糖尿病網膜症モデルの確立  
  
研究課題名（英文）Development of vaccine therapy for diabetic retinopathy, and new model of diabetic retinopathy  
  
研究代表者  
横田 陽匡（YOKOTA, Harumasa）  
  
日本大学・医学部・准教授  
  
研究者番号：60431417  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症の発症に関与する分子の1つであるプロレニンに対するペプチドワクチンを開発した。プロレニンペプチドワクチンを2型糖尿病モデルマウス（db/dbマウス）に接種することにより糖尿病網膜症の神経障害、炎症を抑制することを証明した。また糖尿病網膜症の創薬を加速化させるトランスレーショナルリサーチの促進のために、ヒトとサイズが近いブタを用いた糖尿病網膜症モデルの樹立に取り組んだ。若年発症成人型糖尿病タイプ3（MODY3）ブタの網膜病変を観察したところ、微小血管障害を確認した。本研究によって新しい治療法としてプロレニンペプチドワクチン、新しい実験モデルとしてのMODY3ブタを報告した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は全世界で増加していて、糖尿病網膜症による中途失明は今後も重要な健康課題の1つである。糖尿病網膜症に対する治療法は、重症化した糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固、硝子体手術、抗VEGF療法が挙げられる。これらの治療法は機器の進歩、新規創薬により治療成績は向上してきているものの、治療効果に限界があることから、良好な視機能の維持のためには、糖尿病網膜症の発症を防ぐことが重要となる。ワクチン治療はその効果が持続すること、比較的安価であることから、毎日服用する必要がある内服薬に比べると、身体的、経済的負担が軽減できる。また糖尿病網膜症による中途失明を予防することは、国家財政の負担軽減にもなる。

研究成果の概要（英文）：We design peptide vaccine based on the sequence of prorenin that has been proven to play a key role in the development of diabetic retinopathy. We injected prorenin peptide vaccine into type 2 diabetic mode db/db mice and found that prorenin peptide vaccine halt neuronal dysfunction and inflammation in the early stage of diabetic retinopathy.

In addition, we attempted to establish a new animal model of diabetic retinopathy. We examine the retina of transgenic pig model of maturity onset diabetes of the young type 3 (MODY3) and confirmed the microangiopathy in this model. MODY3 pigs may serve as a suitable DR model to test effects of newly developed compounds on DR.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 プロレニン ペプチドワクチン 若年発症成人型糖尿病 MODY ブタ

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、糖尿病患者の加速度的増加により年々その罹患患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病網膜症は我が国の中途失明の主因であり、社会経済的損失も図りしれず、その病態解明と発症予防、治療法の確率は急務である。現在、眼科で行われている治療は、進行した糖尿病網膜症に対する網膜光凝固術、硝子体手術、硝子体内注射などの外科的治療が主体である。抗 VEGF 療法の臨床応用により、糖尿病黄斑症などの一部の病態に対して有効な治療法が確立されつつあるが、より良好な視機能の維持と中途失明を確実に予防するためには早期の介入が必要である。

我々はこれまでにレニン-アンジオテンシン系 (RAS) の最上流に位置するプロレニンに着目して糖尿病網膜症に対する新規治療法の確立に取り組んできた。糖尿病では循環と組織においてプロレニンが増加する。プロレニン(プロ)レニン受容体と結合することにより3次元構造が変化して、結果的にレニン様活性を獲得する。このレニン様活性により RAS の生理活性物質であるアンジオテンシン II の産生が亢進する。また同時に(プロ)レニン受容体のリン酸化に伴いアンジオテンシン II とは別の経路で細胞内シグナルが活性化し、結果として酸化ストレスと慢性炎症が増悪する。しかしプロレニン、(プロ)レニン受容体を標的とした治療法は未だに確立されていない。最近になり新たな標的分子の阻害方法としてペプチド治療ワクチンが注目されている。Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) とプロレニンの中でも特に(プロ)レニン受容体に結合する際に重要であるハンドル領域 (HR) の配列を有したペプチドを合せたペプチドワクチンを合成する。プロレニンペプチドワクチン(以下プロレニンワクチン)を接種することによりプロレニンに対する特異的な抗体が持続的に体内で産生され、その効果は半年以上継続することが期待されている。本治療の特徴としては、糖尿病患者のアドヒアランスの影響を排除することができ、これまでの毎日服用する低分子医薬と比べてはるかに安価で確実な治療法を確立できることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究ではプロレニンワクチンを2型糖尿病マウスに接種し、糖尿病網膜症に対する有効性を確認する。またそれと同時に糖尿病網膜症のトランスレーショナルリサーチを加速させるために有用であると考えられる遺伝子改変糖尿病ブタの糖尿病網膜症を検討する。

## 3. 研究の方法

プロレニンペプチドワクチンの2型糖尿病マウスの糖尿病網膜症に対する効果

2型糖尿病マウスとして db/db マウスを用いた。8週齢の雄 db/db マウスにプロレニンペプチドワクチン ( $V_p$ ) を頸部皮下に 0.1ml 接種した。その後隔週で抗体価、血糖を測定した。12週齢で高酸素負荷試験、14週齢でフリッカー刺激試験、20週齢で網膜電図 (ERG)、24週齢に眼球を採取し、組織学的検討を行った。コントロールとして db/m の非糖尿病マウス、コントロールワクチンとしてプロレニンペプチドワクチンの抗原を含まないキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) を用いた。Db/m に KLH を接種した群 (db/m+KLH)、db/db に KLH を接種した群 (db/db+KLH)、db/db に  $V_p$  を接種した群 (db/db+ $V_p$ ) の3群を設定した。

## 若年発症成人型糖尿病タイプ3 (MODY 3) の網膜病変

1月齢の MODY3 ブタを購入して、毎月血糖測定と眼底検査を行った。4月齢と7月齢で摘出血管拡張試験を行い、網膜血管の内皮機能を評価した。1月齢、4月齢、7月齢で採取した網膜を用いて IsolectinB4 で血管を可視化し、共焦点顕微鏡で画像を取得後に血管密度を測定した。10月齢で採取した眼球は透過型電子顕微鏡で観察し、毛細血管基底膜の厚み(血管基底膜厚)を測定した。対象コントロールとして非糖尿病ブタ(野生型:WT)を用いて、同様の検討を行い比較した。

## 4. 研究成果

### プロレニンペプチドワクチンの2型糖尿病マウスの糖尿病網膜症に対する効果

V<sub>p</sub>を8週齢、10週齢、17週齢に頸部皮下に接種した。V<sub>p</sub>によって産生された抗体の抗体価は24週齢まで安定して高値を示していた(図1)。Db/dbマウスの血中プロレニン値はdb/db+KLHで有意に上昇していたが、db/db+V<sub>p</sub>で上昇が抑制された。網膜における(プロ)レニン受容体(P)RRの発現は各群で有意差はなかった。網膜における神経血管連関を評価するために高酸素負荷時の網膜血流(Hyperoxia)とフリッカー刺激時の網膜血流(Flicker stimulation)を測定した。非糖尿病の通常マウスでは高酸素負荷時に網膜血流は低下、フリッカー刺激時に網膜血流は増加するが、糖尿病ではこれらの反応が低下、あるいは反転する。Db/db+V<sub>p</sub>では低下や反転現象が抑制され、ほぼ正常化していた。ERGではdb/dbにおいてb波の潜時が延長するが、db/db+VPでは潜時の延長が有意に抑制された。

我々は以前に糖尿病患者において血中プロレニン値が上昇すること、糖尿病網膜症の重症度に応じて、さらに高値になることを報告した。本研究では、糖尿病マウスであるdb/dbマウスでも血中プロレニン値が有意に上昇し、プロレニンペプチドワクチンがプロレニン高値を抑制することを初めて確認した。

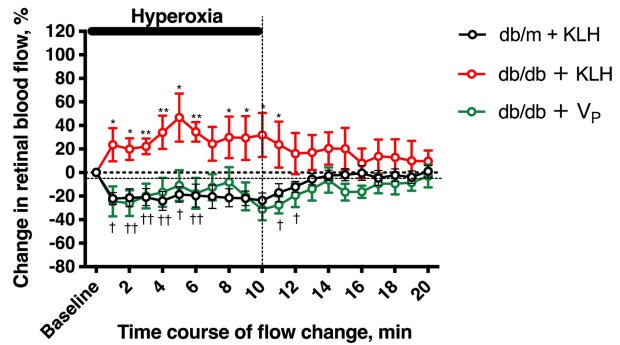


図1. 高酸素負荷血流試験

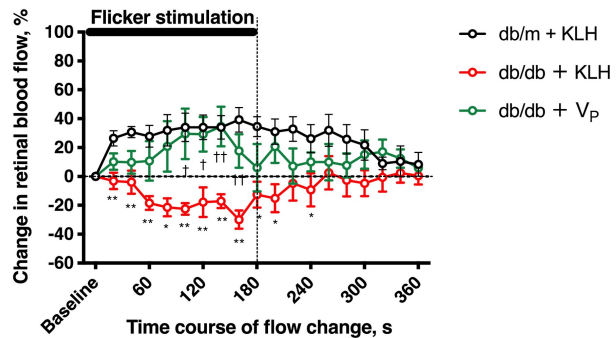


図2. フリッカー刺激負荷血流試験

Db/db マウスは過食に伴い肥満と高血糖を呈する2型糖尿病マウスであるが、高血糖に伴い神経血管連関と神経障害が発生する。神経血管連関の機能障害はグリアの障害、網膜電図の異常は、神経機能の異常を反映している。最近我々のグループは、db/db マウスにおいて神経血管連関と神経機能が db/db でも障害を受けていることを報告した。同モデルに対してプロレニンペプチドワクチンを接種したところ、コントロールワクチンを接種した群と比較して有意に抑制されていることから、プロレニンペプチドワクチンは糖尿病網膜症における神経、グリアの障害を予防することができると考えられた。

糖尿病網膜症は毛細血管瘤、無灌流領域、網膜新生血管などの血管病変が主体であり、本研究では糖尿病網膜症における血管病変に対して、プロレニンペプチドワクチンが有効であったかどうかを評価することができなかった。今後は糖尿病網膜症の血管病変を評価できる新たなモデルの作成、およびそのモデルに対してプロレニンペプチドワクチンの効果を確認する必要があると考えられた。

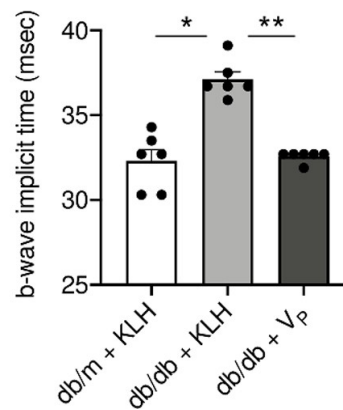


図3. b波の潜時

#### 若年発症成人型糖尿病タイプ3 (MODY3) の網膜病変

野生型ブタ (WT) の空腹時血糖はどの測定時においても 100mg/dl 以下であったのに対し、MODY3 ブタでは常に 200mg/dl であった。また空腹時血糖は経時的に上昇する傾向にあった。7 月齢の網膜を観察したところ、MODY3 ブタでは網膜血管に沿って白斑が散在していて、網膜血管は蛇行していたことから、ヒト糖尿病網膜症の前増殖糖尿病網膜症に相当する所見であった。一方、蛍光眼底造影検査で、初期病変である毛細血管瘤の検出を試みたが、毛細血管瘤は一切確認することができなかった。共焦点顕微鏡で網膜における毛細血管網を表層 (SVP)、中間層 (IVP)、深層毛細血管網 (DVP) を観察し、画面中の血管長を測定し、毛細血管密度を評価したところ、MODY3 ブタにおいて IVP の血管密度が顕著に低下している。また7月齢においては、SVP と DVP でも血管密度が低下していた。ブタ網膜摘出血管を用いた血管内皮機能に依存した拡張機能を比較したところ、4月齢ではWTとMODY3で差が認められなかったが、

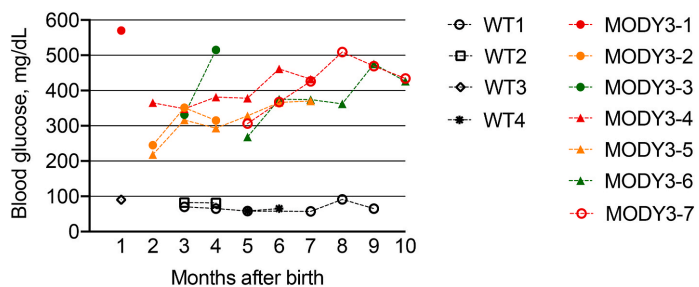


図4. 空腹時血糖

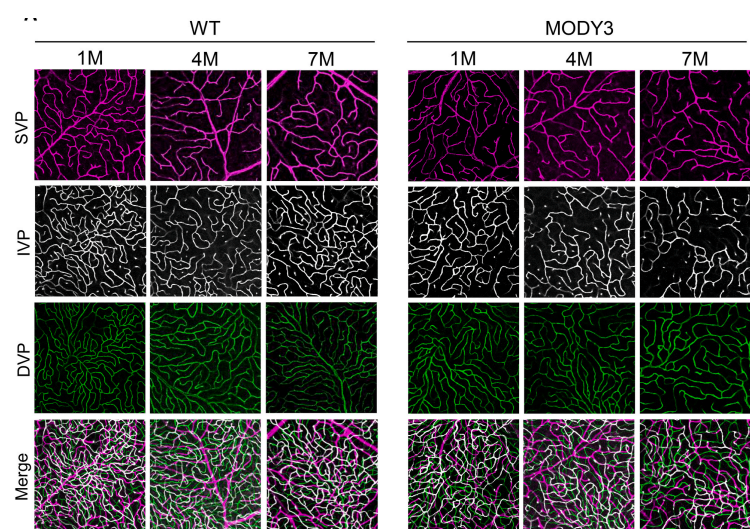


図5. 網膜毛細血管網の観察.

7月齢では血管内皮依存の拡張反応が MODY3 において有意に低下しており、糖尿病網膜症における血管内皮機能障害を確認することができた。透過型電子顕微鏡で取得した画像から網膜毛細血管の基底膜の厚みを測定したところ、MODY3 ブタで有意に基底膜が肥厚していた。

これまで糖尿病網膜症の実験モデルとしてげっ歯類であるマウス、ラットが用いられてきた。しかしげっ歯類を用いた糖尿病モデルでは、糖尿病網膜症の特徴である血管病変が観察できない欠点があり、研究成果が直ちにヒトへの臨床応用へ結びつけることが困難であった。本研究では遺伝子改変糖尿病ブタである MODY3 ブタの初期網膜病変を観察し、白斑病変、毛細血管密度の低下、毛細血管基底膜の肥厚などが観察された。ヒトで観察される毛細血管瘤は観察されなかったものの、MODY3 ブタの糖尿病網膜症所見は新たな治療法の効果を確認するのに有用であると考えられた。今後は先述したプロレニンペプチドワクチンの効果を MODY3 ブタで確認して、網膜血管病変に対して有効であるかどうかを検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harumasa Yokota, Hiroki Hayashi, Junya Hanaguri, Satoru Yamagami, Akifumi Kushiya, Hironori Nakagami, Taiji Nagaoka	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of prorenin peptide vaccine on the early phase of diabetic retinopathy in a murine model of type 2 diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0262568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262568. eCollection 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横田陽匡、林宏樹、高瀬公陽、花栗潤哉、渡部昌久、大野皓、小熊秀隆、丸山高史、阿部雅紀、櫛山暁史、中神啓徳、山上聡、長岡泰司
2. 発表標題 プロレニンペプチドワクチンの血清、房水中の抗体価
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高瀬公陽、横田陽匡、花栗潤哉、渡部昌久、大野皓、櫛山暁史、石館文善、櫛山櫻、山上聡、長岡泰司
2. 発表標題 遺伝子改変糖尿病ブタの網膜病変の組織学的検討
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Harumasa Yokota
2. 発表標題 Effect of prorenin peptide vaccine on an early phase of diabetic retinopathy in murine model of type 2 diabetes mellitus
3. 学会等名 ARV02021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長岡泰司
2. 発表標題 糖尿病網膜症診断・治療の低侵襲化への挑戦
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ワクチン、医薬及び糖尿病合併症治療薬	発明者 長岡泰司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-031201	出願年 2021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
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)	

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
---------	---------