

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08278

研究課題名(和文)慢性腎臓病に対するVasohibin-2ペプチドワクチン療法の有効性の検討

研究課題名(英文)Therapeutic effects of Vasohibin-2 peptide vaccine against chronic kidney diseases

研究代表者

田邊 克幸(Tanabe, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40534805

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)：本研究は、糖尿病性腎症のモデルマウスにおいてVasohibin-2 (VASH2)を標的としたペプチドワクチン接種の有効性の確認を目的として実施した。VASH2ペプチドワクチンの接種は、血清中抗VASH2抗体価の著明な上昇につながり、糖尿病マウスで認められる尿中アルブミン排泄増加や糸球体病変の発生を有意に抑制した。その機序としてアンジオポイエチン2発現の抑制を介した糸球体微小炎症の抑制の可能性が考えられた。これらの結果は、糖尿病性腎症に対する新規の予防戦略としてのVASH2ペプチドワクチン療法の有益性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、慢性腎臓病患者の中で透析療法を必要とする末期腎不全へ移行する可能性が最も高い糖尿病性腎症に対する新たな予防・治療法としてVasohibin-2 (VASH2)を標的としたペプチドワクチン接種の実行可能性を示唆するものである。ペプチドワクチンは抗体製剤よりも安価で利便性が高く、早期の臨床応用につながると考えられる。糖尿病性腎症が特に高齢者で増加しており、ポリファーマシーの回避などの点からもペプチドワクチン療法は有用な手段であり、既存の治療と組み合わせるとVASH2ペプチドワクチンの接種が糖尿病性腎症の腎予後を改善させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the preventive effects of vasohibin-2 (VASH2)-targeting peptide vaccine in diabetic nephropathy mouse model. Treatment with the VASH2-targeting peptide vaccine successfully induced serum anti-VASH2 antibody, and significantly prevented hyperglycemia-induced albuminuria and glomerular hypertrophy, independent of blood glucose levels. The vaccination significantly inhibited renal angiotensin-2 (Angpt2) expression and prevented glomerular macrophage infiltration in diabetic mice. These results suggest that the VASH2-targeting peptide vaccine may be useful as a preventive strategy against diabetic nephropathy through inhibiting Angpt2-mediated glomerular microinflammation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 Vasohibin-2 ワクチン療法 アンジオポイエチン2 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 chronic kidney disease (CKD)は、末期腎不全の原因となるだけでなく心血管疾患の主要な危険因子と考えられており、本邦でも成人人口の8人に1人という国民病となっている。CKDから末期腎不全に至り透析療法を必要とする患者は既に34万人を超え、巨額な透析関連医療費に加えてCKDに関連する心血管疾患の医療費の増加を考えると、CKDの進行を抑制する新たな治療戦略の開発は、国民の健康と財政の両面にとって重要な課題となっている。末期腎不全に至るCKDの原疾患として、糖尿病性腎症は42%と高い割合を維持しており、CKDの進行抑制には特に糖尿病性腎症の病態の解明及び治療戦略の開発が必要である。

糖尿病性腎症の腎組織での特徴として、糸球体毛細血管の滲出性病変やメサンギウム基質の増加が認められることから、正常毛細血管構造の破綻と線維化促進過程が重要な病態と考えられる。これらの糖尿病糸球体病変には様々な血管新生関連因子の関与が示唆されている。

Vasohibin-1 (VASH1)は、腫瘍における内皮細胞由来の血管新生抑制因子として同定されたが、正常組織では血管内皮細胞のストレス耐性を増大することで内皮保護因子として作用することが示されている。研究代表者らは、VASH1の発現増加が糖尿病性腎の動物モデルで治療効果を発揮し、逆にVASH1の発現減少は病態を増悪させることを報告してきた。しかし、VASH1蛋白質を補充または強制発現する治療戦略は、臨床応用の面から実現が困難であった。一方、Vasohibin-2 (VASH2)は、血管新生促進因子として作用し、腫瘍細胞でTGF- β シグナルの増幅により上皮間葉転換(EMT)を誘導することが報告されている。研究代表者らは、VASH2が糸球体内でメサンギウム細胞に発現し、その発現は糖尿病の発症に伴い増加し、VASH2欠損マウスでは糖尿病糸球体病変が軽減することを報告した。このため、VASH2は糖尿病糸球体病変の進行に役割を担うと考えられ、VASH2を標的とした治療戦略の可能性が示唆される。研究代表者らは、内因性の抗VASH2抗体産生を誘導する手段として東北大学と大阪大学の共同研究によりVASH2ペプチドワクチンを作成しており、これは臨床応用可能な新規の治療戦略の手段となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症の一般的なモデルマウスを用いて、VASH2ペプチドワクチンの接種による尿中アルブミン排泄及び糖尿病糸球体病変への予防的効果を検討し、ペプチドワクチン療法の糖尿病性腎症に対する新規治療法としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) Streptozotocin (STZ)誘発糖尿病マウスにおけるVASH2ペプチドワクチン接種による尿中アルブミン排泄及び糖尿病糸球体病変の予防的効果の検討

6週齢雄性C57BL/6JマウスにVASH2ペプチドワクチンを2週間隔で2回接種したが、初回は完全フロイトアジュバント、2回目は不完全フロイトアジュバントと1:1で混合して皮下投与した。2回目の接種後に0.1Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)に溶解したSTZを50mg/kgの用量で5日間連日腹腔内投与し、糖尿病を誘発した。STZ投与から6週後に血糖値を測定し、随時血糖 $>280\text{mg/dl}$ を満たすマウスのみを糖尿病マウスとして使用した。対照の非糖尿病マウスには、クエン酸緩衝液のみを同様に腹腔内投与した。最終的に、非糖尿病非ワクチン接種(NDM-V)群7匹、非糖尿病ワクチン接種(NDM+V)群8匹、糖尿病ワクチン非接種(DM-V)群9匹、糖尿病ワクチン接種(DM+V)群9匹のマウスを解析に使用した。血清中抗VASH2抗体価の測定のため、4週毎に尾静脈より微量採血を行った。初回のVASH2ペプチドワクチン接種から16週後に蓄尿を行って尿を回収し、20週後に採血を行った後、腎臓を摘出した。

血清中抗VASH2抗体価の測定には、マウスVASH2ペプチドをコーティングしたELISAプレート系を使用した。段階希釈した血清を4で一晚インキュベートしてプレートを洗浄後、HRP抗マウスIgG抗体を室温で3時間インキュベートし、洗浄後にTBMを加えて発色させた。0.5N硫酸による反応停止後、プレートリーダーによりOD値を測定した。抗VASH2抗体価は、最大OD値の50%値となる希釈倍率として表示した。

(2) 2型糖尿病db/dbマウスにおけるVASH2ペプチドワクチン接種による尿中アルブミン排泄及び糖尿病糸球体病変の治療効果の検討

6週齢雄性db/dbマウスにVASH2ペプチドワクチンを上記と同様に2週間隔で2回接種した。初回ワクチン接種から2、9、15週で蓄尿を行って尿を回収し、16週後に採血を行った後、腎臓を摘出した。本実験では、ワクチン非接種のdb/dbマウス(db/db-V)群6匹とワクチンを接種したdb/dbマウス(db/db+V)群6匹の間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) STZ誘発糖尿病マウスにおけるVASH2ペプチドワクチン接種による尿中アルブミン排泄及び糖尿病糸球体病変の予防的効果の検討

VASH2ペプチドワクチンの接種により非糖尿病マウスと糖尿病マウスの両群で8~12週後

に血清中抗 VASH2 抗体価は $>1:10,000$ へ上昇が認められた (図 1A)。これらの抗体のサブタイプは主に IgG1 であり、Th2 優位の免疫反応による抗体産生が示唆された。また、250 倍に希釈した血清は immunoblotting により完全長の組換えマウス VASH2 蛋白質と結合することが確認された (図 1B; 矢頭が VASH2、矢印が VASH2/SVBP 複合体)。更に、ワクチンを接種した非糖尿病マウスの主要臓器 (腎臓、心臓、肺、肝臓、膵臓、大動脈) において明らかな炎症細胞浸潤は認められず、VASH2 ペプチドワクチンの安全性が確認された。

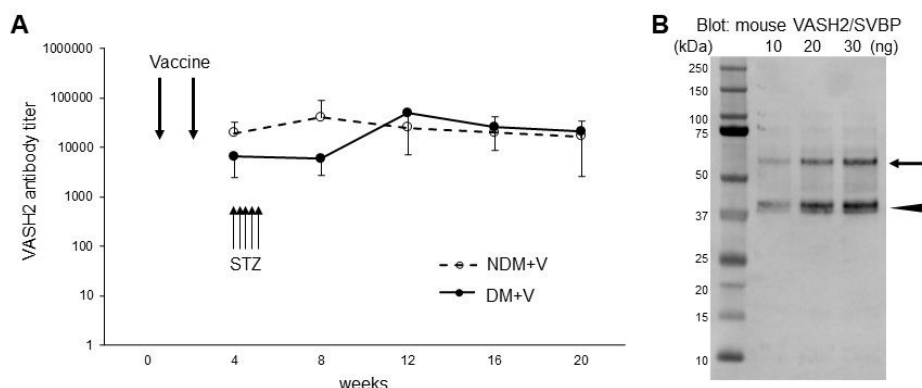


図 1 VASH2 ペプチドワクチンによる血清中抗 VASH2 抗体の誘導

VASH2 ペプチドワクチンを接種した糖尿病マウスと非接種の糖尿病マウスの間で体重、血糖値、HbA1c 値、収縮期血圧、血中尿素窒素、血清クレアチニン値に有意な差は認められなかったが (図 2A) 糖尿病による尿中アルブミン排泄量の増加は VASH2 ペプチドワクチンの接種により有意な減少が認められた (図 2B)。また、糖尿病による糸球体の肥大はワクチン接種により有意に抑制され (図 2C) メサンギウム基質の増加も有意に抑制された (図 2D)。以上より、VASH2 ペプチドワクチンの接種は、血糖値とは独立して糖尿病性腎症の尿中アルブミン排泄と糸球体組織学的変化の発生を抑制することが示された。

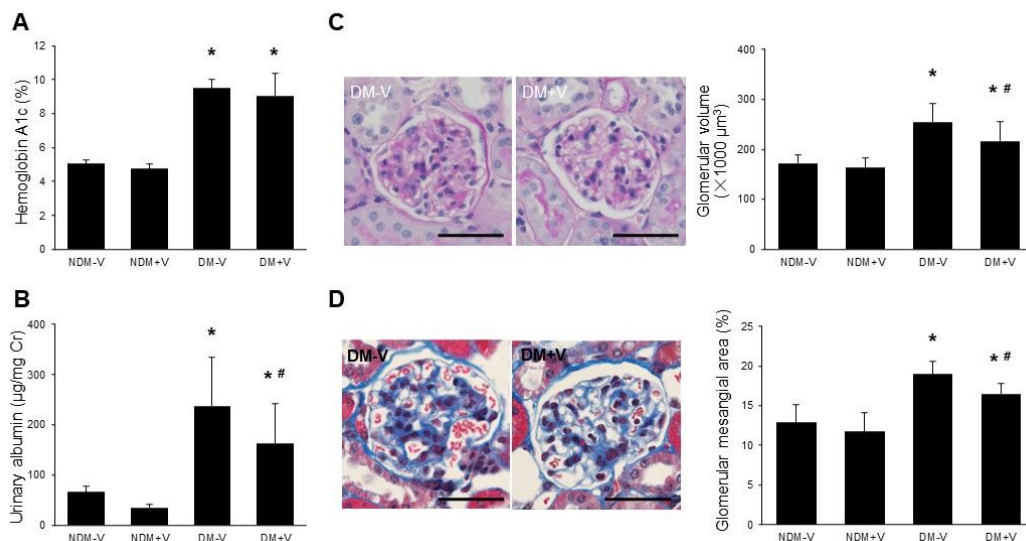


図 2 VASH2 ペプチドワクチンの尿中アルブミン排泄と糸球体障害への効果

次に、VASH2 ペプチドワクチンの腎組織における血管新生関連因子の発現への効果を検討した。腎組織における *Vash2* mRNA レベルは糖尿病により有意に増加したが、VASH2 ペプチドワクチン接種により影響を受けなかった (図 3A)。*Vefga* mRNA レベルも糖尿病により増加したが、やはりワクチン接種群と非接種群の間で差はなかった。*Vash1* mRNA レベルは糖尿病により減少したが、ワクチン接種により有意な影響は認めなかった。一方で、腎組織におけるアンジオポイエチン 2 (*Angpt2*) の mRNA 及び蛋白質発現は、糖尿病により増加し、VASH2 ペプチドワクチン接種により有意に減少することが認められた (図 3B と C)。*Angpt2* の発現増加は微小炎症と関連することが報告されており、腎組織における ICAM-1 の蛋白質発現を確認したところ、糖尿病による ICAM-1 発現の増加は、ワクチン接種により有意に抑制された (図 3C)。更に、糸球体内へのマクロファージ浸潤を Mac-2 の免疫組織化学により評価したところ、糖尿病マウスでの糸球体内 Mac-2 陽性マクロファージ数の増加は、VASH2 ペプチドワクチン接種により有意に抑制された (図 3D)。以上の結果から、VASH2 ペプチドワクチン接種により誘導

された抗 VASH2 抗体は、糖尿病性腎症において Angpt2 発現増加を抑制することで糸球体の微小炎症を改善し、尿中アルブミン排泄増加や糸球体の組織学的変化の抑制につながるものと考えられた。

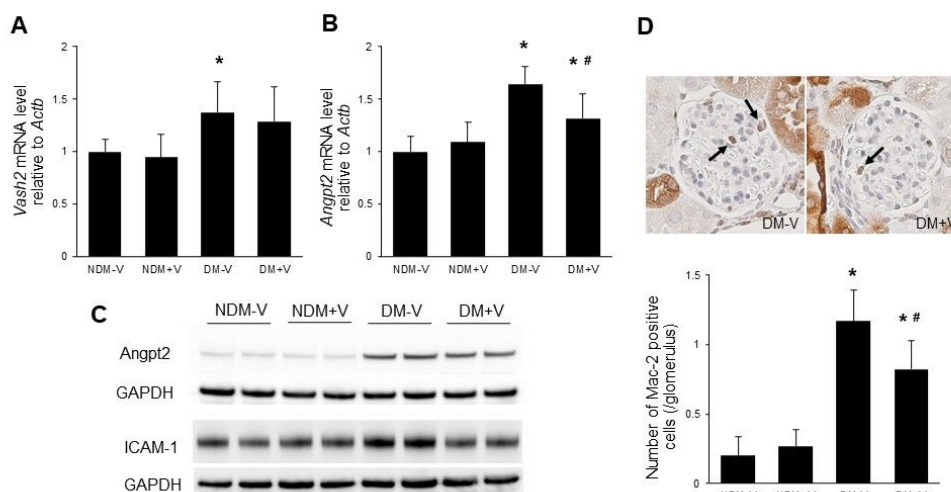


図3 VASH2 ペプチドワクチンの糸球体微小炎症への効果

(2) 2型糖尿病 db/db マウスにおける VASH2 ペプチドワクチン接種による尿中アルブミン排泄及び糖尿病糸球体病変の治療効果の検討

STZ 誘発糖尿病マウスの実験と同様に、db/db マウスへの VASH2 ペプチドワクチンの接種により血清中 VASH2 抗体価は平均 1:14,820 へ上昇することを確認した。

STZ 誘発糖尿病マウスとは異なり、db/db マウスは 2 回目のワクチン接種の時点で既に高血糖を示し、軽度のアルブミン尿も認めていた。VASH2 ペプチドワクチンの接種は、db/db マウスの体重、HbA1c 値、血中尿素窒素、血清クレアチニン値に有意な影響を及ぼさなかった (図 4A)。一方、尿中アルブミン排泄は、19 週間の期間中にワクチン非接種の db/db マウスで優位に増加したのに対して、VASH2 ペプチドワクチンを接種した db/db マウスでは増加が認められなかった。糸球体の組織学的解析においても、ワクチン接種により db/db マウスで認められる糸球体肥大やメサンギウム基質増加が有意に抑制された。以上より、VASH2 ペプチドワクチンは 2 型糖尿病モデルである db/db マウスにおいても尿中アルブミン排泄や糸球体障害に有効性を持つことが示された。

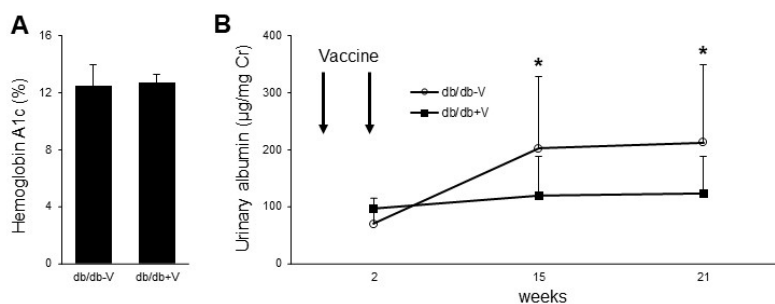


図4 db/db マウスにおける VASH2 ペプチドワクチンの有効性

これらの結果は、VASH2 ペプチドワクチンの投与が動物モデルにおいて糖尿病性腎症の発症・進展を防止することを示すものであり、糖尿病性腎症の予防戦略としてのワクチン療法の可能性を示唆している。また、db/db マウスの実験では、微量アルブミン尿の出現後のワクチン接種が、その後のアルブミン尿増加を抑制していることから、早期の糖尿病性腎症においては予防効果のみでなく治療効果も期待できる。これらの研究成果は、American Journal of Physiology-Renal Physiology 誌に掲載された。

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 Nakashima Y, Tanabe K, Mifune T, Nakadoi T, Hayashi H, Nakagami H, Sato Y, Wada J	4. 巻 in press
2. 論文標題 Preventive effects of vasohibin-2-targeting peptide vaccine for diabetic nephropathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00341.2023	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中島有理、田邊克幸、御舩朋代、林宏樹、中神啓徳、杉山斉、佐藤靖史、和田淳
2. 発表標題 早期糖尿病性腎症に対するVasohibin-2を標的としたペプチドワクチン療法の有効性
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田邊克幸
2. 発表標題 Vasohibin-2を標的とした糖尿病性腎症に対する新規治療の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田邊克幸、佐藤靖史、中神啓徳、和田淳
2. 発表標題 糖尿病性腎症における血管新生関連因子の治療標的としての役割
3. 学会等名 第33回日本糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中土井崇人、田邊克幸、中島有理、佐藤靖史、和田淳
2. 発表標題 糖尿病性腎症の進行におけるVasohibin-2発現増加の意義の検討
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nakashima Y, Tanabe K, Nakadoi T, Mifune T, Nakagami H, Sato Y, Wada J
2. 発表標題 Preventive strategy with vasohibin-2-targeting peptide vaccine against diabetic kidney disease
3. 学会等名 Kidney Health In Aging and Aged Societies JSN/ERA Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔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
研究協力者	佐藤 靖史 (Sato Yasufumi)		

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