

【研究の背景と目的】

本研究の目的は、1) 分泌型炎症促進分子セマフォリン 3E のバイオマーカーとしての有用性を糖尿病や肥満患者において詳細に検証すること、2) 抗体誘導ワクチンを用いたセマフォリン 3E 抑制系をマウスで確立することであった。我々が行ってきた研究により、肥満ストレス下で分泌型炎症促進分子セマフォリン 3E の発現が内臓脂肪で上昇すること、セマフォリン 3E はその特異的受容体であるプレキシシン D1 を発現するマクロファージに対して細胞遊走因子として作用することで、肥満時の脂肪炎症と全身のインスリン抵抗性（高インスリン血症）を惹起することが研究開始時にわかっていた (Shimizu et al., 2013)。そこで、我々は抗体誘導ワクチンを用いてセマフォリン 3E に対する中和抗体を生体内で産生し、セマフォリン 3E-プレキシシン D1 相互作用を抑制する系の確立に挑んだ。肥満や糖尿病において、DNA 損傷が主要な臓器に蓄積し病態を促進することは広く受け入れられている。p53 は DNA 損傷応答経路の中心的役割を担う分子である。p53 がセマフォリン 3E の発現を転写レベルで正に制御しているため、セマフォリン 3E を標的とした糖尿病治療法の開発は DNA 損傷応答を標的とした糖尿病治療法の開発を意味し、概念的にも新しく、他に類を見ない研究と考えられた (Minamino et al., 2009; Shimizu et al., 2014)。本申請研究において我々は、セマフォリン 3E スクリーニングによるハイリスク患者抽出の必要性の確立と、同分子を標的とした抗体誘導ワクチンを用いた先制医療の開発に挑んだ。

【方法】

本研究において、抗体誘導ワクチンを用いたセマフォリン 3E 抑制系をマウスモデルで確立し、肥満・糖尿病モデルにおける内臓脂肪炎症が抑制されるか、全身の代謝不全が改善するか検討した。本プロジェクトは以下のように行った。

<方法>

1) 抗体誘導ワクチンを用いたセマフォリン 3E 抑制系の確立

セマフォリン 3E に対する抗体誘導ワクチンは中神らから既に供与済みであり、マウスを用いて系の最適化をはかった。中神らは DNA や抗体誘導ワクチンを用いた研究を複数行っており、成果を上げてきた (Nakagami et al., 2014; Pang et al., 2014)。中神らが作成したセマフォリン 3E ペプチドとキャリア蛋白との複合ワクチンは自己蛋白であるセマフォリン 3E への細胞性免疫の活性化を回避しながら特異的な抗体誘導を目指した設計がされている。すなわち、T 細胞活性化配列 (T-cell epitope) を含まない短い抗原を設定し抗体誘導を高効率に誘導することを目的とする。自然免疫を活性化するアジュバントとこのセマフォリン 3E 抗体誘導ワクチンをマウスに皮下注射することで、B リンパ球にセマフォリン 3E に対する抗体を生体内で産生する系を確立することができる。セマフォリン 3E ペプチド-KLH 複合体を投与する前、投与後 2 週間後、4 週間後に尾静脈から採血を行い、セマフォリン 3E に対する自己抗体が産生されるか検討した。

2) 標的化合物の老化モデルにおける機能解析

in vivo の実験で、セマフォリン 3E に対する自己抗体の産生に成功したセマフォリン 3E 抗体誘導ワクチンを用いて、マウス肥満モデルで実験を行った。野生型マウスに高脂肪食負荷を行い肥満モデルを作成した。肥満モデルでは内臓脂肪炎症が生じ全身のインスリン抵抗性が生じるが、セマフォリン 3E 抗体誘導ワクチンを投与することで、これらの表現型が改善するか解析した。具体的にはセマフォリン 3E 抗体誘導ワクチンを肥満モデルマウスに投与することで、内臓脂肪に浸潤する炎症性マクロファージや炎症性サイトカインの産生が減少するか様々な分子生物学的手法を用いて解析した。これらの変化が全身のインスリン抵抗性の改善につながるか、インスリン負荷試験、糖負荷試験により検討した。

【結果】

1) 抗体誘導ワクチンを用いたセマフォリン 3E 抑制系の確立

セマフォリン 3E に対する抗体誘導ワクチンは中神らから供与された。中神らが作成したセマフォリン 3E ペプチドとキャリア蛋白 (KLH など) との複合ワクチンは自己蛋白であるセマフォリン 3E への細胞性免疫の活性化を回避しながら特異的な抗体誘導を目指した設計がされている。すなわち、T 細胞活性化配列 (T-cell epitope) を含まない短い抗原を設定し抗体誘導を高効率に誘導することを目的とした。自然免疫を活性化するアジュバントと、セマフォリン 3E 抗体誘導ワクチン (Sema3E ワクチン) をマウスに皮下注射することで、B リンパ球にセマフォリン 3E に対する抗体を生体内で産生する系を確立することができる。肥満マウスを用いて様々な条件検討を行なった結果、図 1 に記載する系が最適であるという結論に至った (図 1)。

2) Sema3E ワクチンを用いたマウス表現型解析

マウス肥満モデルを用いて、Sema3E ワクチンの効果の検討を行なった。肥満モデルマウスは高脂肪食負荷により作製した。肥満マウスに Sema3E ワクチンを投与すると、内臓脂肪における炎症細胞浸潤が抑制され (図 2A)、炎症性マクロファージのマーカーである Plxd1 の発現低下が生じた (図 2B)。また、活性酸素のレベルが低下し (図 2C)、老化マーカーである p53 (図 2D) とその標的分子である p21 (コード遺伝子

Cdkn1a)の発現が減少した(図2E)。これらの結果から、Sema3Eワクチンにより内臓脂肪における慢性炎症と活性酸素の産生が抑制されると考えられた。Sema3Eワクチンの全身の代謝に与える影響を検討するために、グルコース負荷試験を行なった。Sema3Eワクチンを投与することで、全身の糖利用障害が改善することが明らかとなり、内臓脂肪炎症抑制により、全身の代謝が改善する可能性が示唆された(図3)。興味深いことにコントロール群、ワクチン群共に肥満食管理下では、体重、接餌量、脂肪重量に変化はなかった。代謝ケージを用いた検討でも両群に明らかな変化を認めなかった。再現性の確認を今後行う予定である。また、今後ペプチドワクチンにより免疫細胞の活性化が生じないか検討を行う予定である。免疫細胞活性化が生じると、自己免疫疾患に罹患するリスクが増えるため、慎重に検討を行なっていく予定である。本研究により、糖尿病に対するペプチドワクチンを用いた次世代の治療法を開発できると確信する。

【考察及び臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの検討の結果から、セマフォリン3Eはマクロファージの誘導因子としての生理活性をもち、肥満時の脂肪組織においてセマフォリン3Eの発現が亢進することで脂肪炎症や全身のインスリン抵抗性が生じることが明らかとなっている。循環血液中のセマフォリン3Eは糖尿病患者においても上昇(特願2010-232400 出願名称:糖尿病の治療剤、発明者;南野徹)しており、セマフォリン3E-プレキシンド1受容体を介したシグナルの抑制が、糖尿病や肥満に対する次世代の治療標的となる可能性が高いと考えられた。そこで本プロジェクトにおいて、マウスモデルを用いて、セマフォリン3E-プレキシンド1相互作用を介した負の免疫応答を標的とした新規治療法の開発を目指した。具体的には、抗体誘導ワクチンを用いてセマフォリン3Eに対する中和抗体を生体内で産生し、セマフォリン3E-プレキシンド1相互作用を抑制する系の確立に挑んだ。セマフォリン3Eを治療標的とした抗体誘導ワクチンによる抗肥満治療、抗糖尿病治療は未だ存在しなく新規的且つ独創的な試みと考えられた。我々の検討の結果、セマフォリン3EはMCP-1の36分の1の濃度で同等の細胞遊走作用を持つことがわかっており、糖尿病に対してセマフォリン3E-プレキシンド1相互作用の抑制を介した新規治療法を確立する意義は大きいと確信する。

【参考・引用文献】

- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabefani, A., Oike, Y., Matsubara, H., *et al.* (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15, 1082-1087.
- Nakagami, H., Koriyama, H., and Morishita, R. (2014). Peptide Vaccines for Hypertension and Diabetes Mellitus. *Vaccines (Basel)* 2, 832-840.
- Pang, Z., Nakagami, H., Osako, M. K., Koriyama, H., Nakagami, F., Tomioka, H., Shimamura, M., Kurinami, H., Takami, Y., Morishita, R., *et al.* (2014). Therapeutic vaccine against DPP4 improves glucose metabolism in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1256-1263.
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Moriya, J., Nojima, A., Uemura, A., Kobayashi, Y., and Minamino, T. (2013). Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab* 18, 491-504.
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Suda, M., and Minamino, T. (2014). DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab* 20, 967-977.