

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790885

研究課題名（和文） 1型糖尿病発症メカニズム解明と早期診断システムの構築

研究課題名（英文） The investigation of the cause of type 1 diabetes and the development of its prediction system.

研究代表者

馬場谷 成 (BABAYA NARU)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10449837

研究成果の概要（和文）：1型糖尿病は難治性疾患であり、そのメカニズム解明と、疾患の早期発見・早期治療のためのシステム構築が急務である。本研究では、糖尿病症状出現前の1型糖尿病をとらえる最も有用な手段であるインスリン抗体の高感度検出法を確立し、その成果を報告した。また、1型糖尿病メカニズム解明に重要な糖尿病疾患感受性遺伝子を明らかにするとともに、早期診断のためのスクリーニングパネルを作製した。

研究成果の概要（英文）：The intervention of type 1 diabetes is difficult and not enough successfully at the moment, and therefore the only way for the eradication of type 1 diabetes is prediction, and consequent prevention of the disease. The aim of this study is to discover genetic determinants of type 1 diabetes, and to develop a prediction system for type 1 diabetes. In this study, I succeeded in the construction of new assay for insulin autoantibody. In addition, I developed a screening panel for early diagnosis of type 1 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、インスリン産生細胞である膵ラ氏島のβ細胞に対する臓器特異的自己免疫疾患であり、一旦発症するとインスリンを投与しない限り生命を維持できない難治性疾患である。頻回のインスリン治療を行っても、糖尿病の慢性合併症による失明、神経

障害、腎不全の発症は避けがたく、人生の質は著しく障害され、生命予後も健常人に比し不良である。これらの問題を解決し、健常人と同様の生涯を全うさせるためには、1型糖尿病のメカニズム解明と共に、早期の診断システムの構築が急務である。

1型糖尿病は、T細胞を中心とした自己免疫反応により膵β細胞が破壊されることに

より生じると考えられているが、診断後治療を開始した時点で、既に健常人の約20%程度にまでβ細胞量が低下しており、β細胞の再生が困難な現状では、手遅れ感が否めない。

## 2. 研究の目的

本研究では、1型糖尿病発症メカニズム解明と早期診断システムの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新たなインスリン抗体検出法の開発

インスリン抗体測定は、糖尿病症状出現前の1型糖尿病をとらえる最も有用な手段と考えられている。本研究では、従来法を用いたインスリン抗体の測定を、より高感度かつ高特異度のアッセイ系の確立のために検討を行なった。

### (2) 新たなストラテジー“B cell ELISpot法”の開発

これまで用いられている T cell ELISpot 法は、T cell から分泌されるサイトカインを定量的に検出する優れた方法であるが、本研究では、これを応用展開し自己抗体を産生する B cell そのものを取り出して ex vivo で産生される自己抗体を直接測定するという新たな方法であり、アッセイ系の確立のために検討を行なった。

### (3) 1型糖尿病発症予知システムの構築

Profile の洗練された日本人1型糖尿病患者の血清・DNAを収集し、疾患感受性遺伝子の遺伝子タイピングの標準パネルの作製を進めた。

### (4) 糖尿病疾患感受性遺伝子の同定

1型糖尿病疾患感受性遺伝子は、2型糖尿病疾患感受性遺伝子と共通性を有することが示唆されている。本研究では、1型糖尿病マウス (NOD) の姉妹系統である、2型糖尿病マウス (NSY) における疾患感受性遺伝子同定とその機能解析をすすめた。さらに、1型糖尿病発症に及ぼす Mafa 遺伝子の役割を、Mafa-K0 マウスを作製し検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 新たなインスリン抗体検出法の開発

ヒトにおけるインスリン抗体アッセイ系は、ELISA法では感度、特異度とも不十分であり、RIA法が主流となっている。本研究では、RIA法を用いたヒトでのアッセイ系をより高感度、高特異度のものに改良を行ない、報告した (Diabetes Metab Res Rev 25, 665-670, 2009)。(図1)

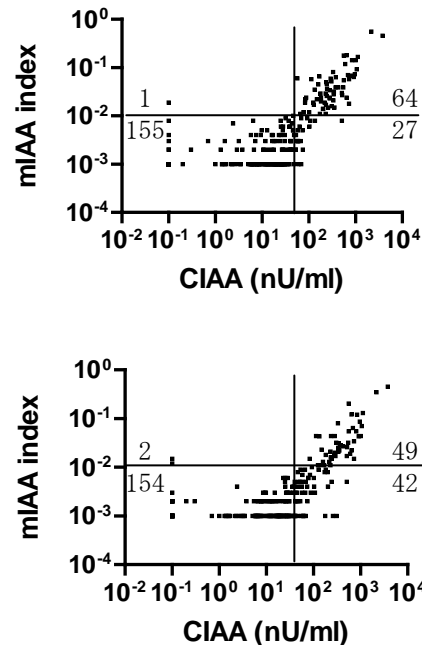


図1 New RIA assay (上図) and previous RIA assay (下図) (Babaya N, et al., Diabetes Metab Res Rev 25, 665-670, 2009より引用)

しかし、より簡便で安全なELISA法を用いたアッセイ系の確立は、本研究の目的である1型糖尿病予知を行なう上で必要不可欠である。ヒトにおけるインスリン抗体ELISAアッセイ系は未だ確立はされていないが、その基盤となるマウスのインスリン抗体ELISAアッセイ系に関しては、非常に高感度、高特異度のものが得られ報告した (Diabetes Technology and Therapeutics 11, 227-233, 2009)。ヒトの新たなインスリン抗体検出法の開発においては、Profile の洗練された日本人1型糖尿病患者血清を収集するとともに、既に収集を完了している欧米白人1型糖尿病患者血清を利用し様々なELISA条件、すなわちELISAプレートの選定、アナログインスリンなどの各種インスリン、ブロッキング剤の選定、各種抗ヒト免疫グロブリン抗体などで検討した。これと同時に、抗GAD抗体、抗IA-2抗体についても、新たなアッ

セイ系確立のために様々な条件で検討を行なった。また、これらの実験に使用する1型糖尿病患者血清を追加収集し、患者情報とともにデータベース化した。

## (2) 新たなストラテジー “B cell ELISpot法” の開発

インスリン抗体産生トランスジェニックマウス、NODマウスやコントロールマウスを系統維持した。インスリン抗体産生トランスジェニックマウスの脾細胞から抽出したB細胞を対象としたELISpot法を様々な条件にて検討した。

## (3) 1型糖尿病発症予知システムの構築

1型糖尿病の発症予知診断システム構築のために、まず臨床情報の詳細が明らかな症例を集め、データベースとして構築を進めた。これらの症例に対し疾患感受性遺伝子の解析を進めるとともに、遺伝子タイピング標準パネルの作製を行った (HLA-class II, HLA-class I, *INS*, *CTLA4*, *PTPN22*, *SUMO4*)。また、遺伝子型の決定、ならびに1型糖尿病関連自己抗体 (GAD抗体、インスリン抗体、IA-2抗体) の測定を行ない、遺伝子型と自己抗体の相関パネル作製を進めた。

## (4) 糖尿病疾患感受性遺伝子の同定

マウスの11番染色体および14番染色体上に耐糖能に関与する遺伝子が存在し、さらにそれらの間に遺伝子間相互作用を有することを証明した (*Diabetologia* 53, 1362-71, 2010) (図2)。

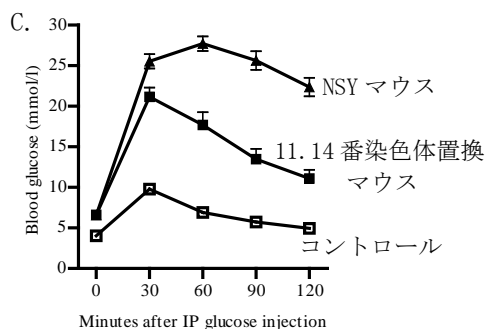
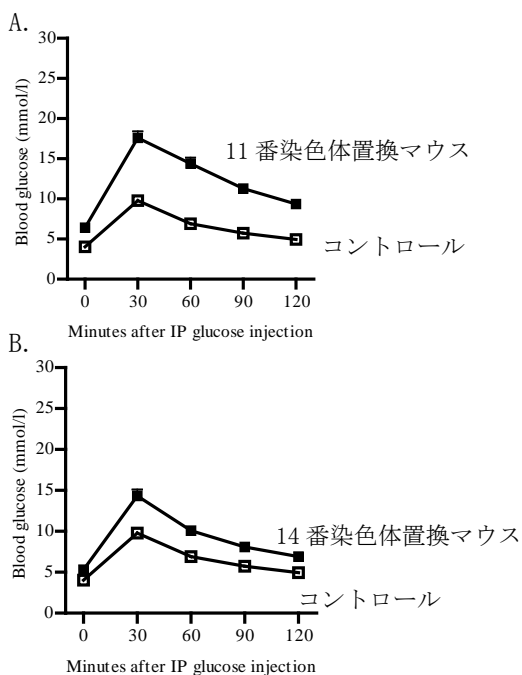


図2 染色体置換マウスにおける耐糖能 (Babaya N, et al., *Diabetologia* 53, 1362-71, 2010 より引用)

また、マウスにおいて MafA 遺伝子が、胸腺でのインスリンの転写に影響を及ぼし、1型糖尿病感受性に関連することを証明した (*Diabetes* 59, 2579-87, 2010)。

## 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8件)

- ① Babaya N (他15名、7番目)、Clinical and genetic characteristics of patients with autoimmune thyroid disease with anti-islet autoimmunity, *Metabolism*, 査読有、published online, 2010
- ② Babaya N (他10名、4番目)、Insulin transactivator MafA regulates intra-thymic expression of insulin and affects susceptibility to type 1 diabetes, *Diabetes*, 査読有、59, 2010, 2579-2587
- ③ Babaya N (他10名、1番目)、Direct evidence for susceptibility genes for type 2 diabetes on mouse chromosomes 11 and 14, *Diabetologia*, 査読有、53, 2010, 1362-1371
- ④ 馬場谷成 (他16名、8番目)、著明な低Na血症を呈し低血糖を伴った下垂体性副腎皮質機能低下症の1例, *近畿大医誌*, 査読有、35, 2010, 135-137
- ⑤ Babaya N (他8名、1番目)、Comparison of insulin autoantibody: polyethylene glycol and micro-IAA 1-day and 7-day

assays、*Diabetes Metab Res Rev*、査読有、25、2009、665-670

- ⑥ Babaya N (他5名、1番目)、Murine high Specificity/Sensitivity Competitive Europium Insulin Autoantibody Assay (CE-IAA)、*Diabetes Technology and Therapeutics*、査読有、11、2009、227-233
- ⑦ 馬場谷成 (他14名、7番目)、自己免疫性甲状腺疾患患者における膵島自己免疫に関する臨床的・遺伝的研究、*近畿大医誌*、査読有、34、2009、223-228
- ⑧ 馬場谷成 (他16名、8番目)、高齢者糖尿病の1症例、*近畿大医誌*、査読有、34、2009、211-213

[学会発表] (計39件)

- ① 馬場谷成 (他19名、6番目)、局所症状・所見を欠く不明熱精査の結果、外科治療を要す壊死性胆嚢炎と診断された高齢者糖尿病の一例、**第22回近畿老年病研究会**、2010年11月25日、大阪
- ② 馬場谷成 (他9名、7番目)、DPP-4阻害薬の併用が奏功した血糖コントロール不良インスリンアレルギー患者の2症例、**第47回日本糖尿病学会近畿地方会**、2010年11月13日、大阪
- ③ 馬場谷成 (他9名、6番目)、Basal-bolus療法における眼前基礎インスリンとしてのGlargineとDetemirの比較、**第47回日本糖尿病学会近畿地方会**、2010年11月13日、大阪
- ④ 馬場谷成 (他6名、4番目)、Genetic basis for strong familial clustering of type 1 diabetes in a rare Japanese multiplex family、*11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society*、2010年10月31日、Incheon
- ⑤ 馬場谷成 (他6名、4番目)、インスリン転写調節因子MafAは胸腺におけるインスリン発現と1型糖尿病疾患感受性に関与する、**第60回日本体質医学会総会**、2010年10月16日、熊本
- ⑥ 馬場谷成 (他3名、3番目)、1型糖尿病の遺伝解析:モデル動物とヒトの相互比較アプローチ、**第8回1型糖尿病研究会**、2010年10月10日、長崎
- ⑦ 馬場谷成 (他16名、4番目)、1型糖尿病の遺伝解析:濃厚発症家系におけるrare variantの探索、**第8回1型糖尿病研究会**、2010年10月10日、長崎
- ⑧ 馬場谷成 (他6名、4番目)、胸腺における新たなインスリン発現調節因子としてのMafAの役割と1型糖尿病発症への関与、**第1回5大学糖尿病フォーラム・大阪**、2010年10月8日、大阪
- ⑨ 馬場谷成 (他7名、4番目)、MafA is a key regulator of insulin expression in the thymus、*46th European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting*、2010年9月21日、Stockholm
- ⑩ 馬場谷成 (他9名、6番目)、著明な低K血症を呈した甲状腺中毒性周期性四肢麻痺の1例、**第192回日本内科学会近畿地方会**、2010年9月11日、大阪
- ⑪ 馬場谷成 (他15名、6番目)、BOT (Basal-supported Oral therapy) から強化インスリン療法への変更により眼前中間型インスリンを38単位から8単位に減量し得た2型糖尿病の1例、**第119回近畿糖尿病談話会**、2010年7月31日、大阪
- ⑫ 馬場谷成 (他15名、6番目)、インスリン頻回注射における至摘単位数の決定:CSIIを使用して、**第7回大阪南インスリン治療フォーラム**、2010年7月10日、堺
- ⑬ 馬場谷成 (他18名、7番目)、無症候性壊死性胆嚢炎の早期診断にガリウムシンチが有用であった高齢者糖尿病患者の一例、**第68回近畿大学医学会**、2010年7月3日、大阪狭山
- ⑭ 馬場谷成 (他9名、5番目)、多発骨折を契機に確定診断に至ったクッシング症候群の2例、**第191回日本内科学会近畿地方会**、2010年6月12日、京都
- ⑮ 馬場谷成 (他15名、2番目)、ステロイド投与時の血糖制御:正常耐糖能者、耐糖能異常者、糖尿病患者における検討、**第53回日本糖尿病学会年次学術集会**、2010年5月28日、岡山
- ⑯ 馬場谷成 (他16名、4番目)、1型糖尿病濃厚発症家系における疾患感受性遺伝子解析-rare variantの探索-、**第53回日本糖尿病学会年次学術集会**、2010年5月27日、岡山

- ⑰ 馬場谷成 (他0名、1番目)、持続血糖モニター(CGM) 使用症例の実際、*Diabetes Insulin Seminar*、2010年4月23日、堺
- ⑱ 馬場谷成 (他9名、7番目)、インスリン投与タイミングの最適化:インスリン治療のテーラーメイド化にむけて、**第107回日本内科学会総会**、2010年4月11日、東京
- ⑲ 馬場谷成 (他14名、7番目)、妊娠中の多発椎体骨折を契機に診断されたクッシング症候群の1例、**第83回日本内分泌学会学術総会**、2010年3月26日、京都
- ⑳ 馬場谷成 (他15名、6番目)、糖尿病患者におけるステロイド投与時のインスリン用量調整の検討~持続血糖測定器を用いた解析~、**第6回大阪南インスリン治療フォーラム**、2010年1月30日、堺
- ㉑ 馬場谷成 (他9名、6番目)、概日リズム関連遺伝子Rgs16 遺伝子ノックダウンマウスにおける行動及び代謝異常、**第24回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会**、2010年1月23日、大阪
- ㉒ 馬場谷成 (他3名、2番目)、自然発症2型糖尿病モデルNSYマウスを用いた多因子疾患の機能分割、**第24回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会**、2010年1月22日、大阪
- ㉓ 馬場谷成 (他15名、7番目)、肥満IGT症例における食欲コントロールと血糖・インスリンパターン~持続血糖モニタリング (CGM) を用いた検討~、**第118回近畿糖尿病談話会**、2009年11月21日、大阪
- ㉔ 馬場谷成 (他17名、7番目)、複数の自己免疫疾患に対する疾患感受性遺伝子FCRL3 と1型糖尿病との関連解析、**第7回1型糖尿病研究会**、2009年11月7日、鬼怒川
- ㉕ 馬場谷成 (他10名、7番目)、自己免疫性甲状腺疾患(AITD) 患者における睥島自己免疫-臨床的病態および遺伝的背景に関する検討-、**第52回日本甲状腺学会**、2009年11月4日、名古屋
- ㉖ 馬場谷成 (他10名、6番目)、糖尿病患者におけるステロイド投与時のインスリン用量調整の検討、**第46回日本糖尿病学会近畿地方会**、2009年11月3日、京都
- ㉗ 馬場谷成 (他10名、6番目)、ミトコンドリア遺伝子変異を伴いネフローゼ症候群を併発した若年発症糖尿病の一例、**第46回日本糖尿病学会近畿地方会**、2009年11月3日、京都
- ㉘ 馬場谷成 (他15名、7番目)、Basal supported oral therapyから強化インスリン療法への変更により眠前中間型インスリン投与量38単位を8単位にまで減量し得た一例、**第10回日本内分泌学会近畿支部学術集会**、2009年10月24日、和歌山
- ㉙ 馬場谷成 (他9名、6番目)、ミトコンドリア遺伝子変異を有し若年発症糖尿病とネフローゼ症候群を主病態とする1例、**第189回日本内科学会近畿地方会**、2009年9月26日、大阪
- ㉚ 馬場谷成 (他15名、7番目)、食後インスリン過分泌を伴った単純性肥満の1例~ $\alpha$ -GIとグリニド治療効果の比較~、**第33回南大阪内分泌代謝疾患研究会**、2009年9月12日、堺
- ㉛ 馬場谷成 (他15名、7番目)、速攻型インスリン2400単位を自殺目的で皮下注射した1症例、**第5回大阪南インスリン治療フォーラム**、2009年7月18日、堺
- ㉜ 馬場谷成 (他0名、1番目)、CGMS(持続血糖測定システム)を用いた血糖動態の解明~症例を中心に~、**第3回大阪南生活習慣病フォーラム**、2009年7月4日、大阪
- ㉝ 馬場谷成 (他9名、6番目)、MacroadenomaによるCushing病の1例、**第188回日本内科学会近畿地方会**、2009年6月13日、大阪
- ㉞ 馬場谷成 (他13名、6番目)、強化インスリン療法における夜間血糖コントロール:眠前SU薬とインスリンの長期追跡調査、**第52回日本糖尿病学会年次学術集会**、2009年5月22日、大阪
- ㉟ 馬場谷成 (他13名、7番目)、インスリン製剤と投与タイミングの最適化:インスリン治療のテーラーメイド化にむけて、**第52回日本糖尿病学会年次学術集会**、2009年5月22日、大阪
- ㊱ 馬場谷成 (他7名、4番目)、Association study of FCRL3, a susceptibility gene to multiple autoimmune diseases, with type 1 diabetes, **10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society**、2009年5月17日、Malmö

- ③⑦ 馬場谷成 (他 5 名、3 番目)、High-density SNP Analysis of extended HLA Region in Susceptible DR-DQ Haplotypes in Japanese Population、*10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society*、2009 年 5 月 17 日、Malmö
- ③⑧ 馬場谷成 (他 13 名、8 番目)、自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 患者における膵島自己免疫の実態及び臨床的・遺伝的背景の検討、*第 82 回日本内分泌学会学術総会*、2009 年 4 月 23 日、前橋
- ③⑨ 馬場谷成 (他 13 名、8 番目)、自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) と糖尿病との関連—膵島関連自己抗体と遺伝子解析による検討—、*第 106 回日本内科学会総会*、2009 年 4 月 12 日、東京

[図書] (計 3 件)

- ① 馬場谷成 (他 1 名、1 番目)、最新医学社、新しい診断と治療の ABC 18 糖尿病 改訂第 2 版、1 型糖尿病の成因・病態、2010、26-35
- ② 馬場谷成 (他 2 名、1 番目)、金原出版株式会社、小児科、小児疾患における臨床遺伝学の進歩 (1 型糖尿病)、50、2009、1158-1164
- ③ 馬場谷成 (他 3 名、4 番目)、ノボノルデイスクファーマ株式会社、インスリン研究助成 2007 報告書集、胸腺におけるインスリン発現調節機構の解明と 1 型糖尿病治療への展開、2009、15

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場谷 成 (BABAYA NARU)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：10449837

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：