

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 17 年度～平成 20 年度
 課題番号：17590940
 研究課題名（和文）インスリン B 鎖ペプチドワクチンによる、新しい 1 型糖尿病発症抑制・寛解療法の開発
 研究課題名（英文）Antigen specific treatment for the inhibition and remission of type 1 diabetes with insulin B chain peptide
 研究代表者
 阿比留 教生（ABIRU NORIO）
 長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：00380981

研究成果の概要：ヒトあるいは、NOD マウスでの 1 型糖尿病の主要抗原である、インスリン B 鎖関連ペプチドを用いた粘膜投与による糖尿病発症抑制法の開発を目的とした。NOD マウスにインスリン B 鎖ペプチドのアナログ、及び、コレラトキシンを粘膜アジュバントに用いた経鼻免疫や、同ペプチドと poly I:C を併用投与が、1 型糖尿病発症を有意に抑制し、高血糖状態からの寛解誘導効果を認めた。今後ヒトへの臨床応用が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 2005 年度	1,100,000	0	1,100,000
平成 2006 年度	900,000	0	900,000
平成 2007 年度	700,000	210,000	910,000
平成 2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

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：1 型糖尿病, 発症予防, インスリンペプチド, 粘膜免疫, インスリン自己抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 米国を中心にインスリン皮下注によるヒト 1 型糖尿病患者での大規模発症抑制治療が施行されたが、有意な発症抑制効果が認められなかった (NEJM 346:1685-91, 2002)。

(2) NOD マウスでは、主要自己抗原であるインスリン B 鎖ペプチド (B:9-23) およびアナログ (B:16, 19Ala) 投与は、糖尿病発症抑制効果を有する (Diabetes 2002;51:2126-213)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インスリンペプチドの粘膜投与（経鼻、経口）を応用し、ヒト 1 型糖尿病への臨床応用が可能な効果的、安全かつ生理的な、発症阻止法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) B:9-23 ペプチドおよび、アナログペプチドの経鼻免疫

4-10 週齢の雌性 NOD マウスにコレラトキシン (CT) (2 μ g) 添加, 非添加の, B:9-23 ペプチド,

B:9-23 ペプチド改変アナログ (各 10 μ g) を経鼻投与し、インスリン自己抗体(IAA)の発現、膵島炎進展、糖尿病発症率を検討した。

(2) CTB+B16,19A-APL 融合蛋白発現酵母経口投与による糖尿病発症抑制効果の検討

コレラトキシンの毒性欠損した B サブユニット(CTB) と B:16,19A1a の融合蛋白発現酵母を作製し、4-10 週齢の雌性 NOD マウスに同酵母(500ug)を、週に 2 回経口投与、その後の IAA 発現、糖尿病発症率を検討した。

(3) B:9-23 ペプチド+poly I:C 投与による糖尿病発症抑制と抑制機序の解析

雌性 NOD マウスに B:9-23 ペプチド(50 μ g) /IFA の皮下投与と poly I:C の腹腔内投与を併用し、糖尿病発症抑制を確認した。発症抑制機序への制御性 T 細胞の関与を、膵島内浸潤制御性 T 細胞(CD4⁺Foxp3⁺)の免疫染色、抗 CD25 抗体前投与による制御性 T 細胞除去の発症への影響により検討した。

4. 研究成果

(1)インスリンアナログペプチド/コレラトキシ経鼻免疫による発症抑制・寛解誘導

細胞傷害性 T 細胞の増殖させないアナログペプチド (B16,19A-APL を含む) に CT を添加し、経鼻免疫することにより、糖尿病発症が有意に抑制された。

B16,19A-APL/CT の経鼻投与は、インスリン自己抗体および膵島炎を強力に抑制した。

B16,19A-APL/CT を糖尿病発症直後マウスに経鼻投与し、高頻度 (67%) に、糖尿病寛解効果を認めた。

以上より、インスリンペプチドの経鼻免疫が 1 型糖尿病発症抑制、寛解誘導に有効である可能性を示した。一方、粘膜アジュバントとして用いたコレラトキシンの毒性など、ヒト 1 型糖尿病への臨床応用には解決すべき問題がある。以上を、J Immunol. 179: 2082-2088 2007 に報告した。

(2) CTB+B16,19A-APL 融合蛋白発現酵母経口投与による糖尿病発症抑制傾向

作成酵母の細胞内蛋白発現量は、ペプチド換算で 1 回投与量(500 μ g)中、100 ng 程度であった。

経口投与後のインスリン自己抗体の発現増強、抑制を認めなかった。

CTB-A16,19APL 発現酵母の経口投与は、コントロールに比し 51%の糖尿病発症抑制を認めたが、Kaplan Meyer 検定では有意差を得ることが出来なかった。

今後、発現宿主、蛋白発現量等の検討を加え、より発症抑制効果の高い治療法の開発が必要である。

(3) B:9-23 ペプチドによる糖尿病発症抑制機序への制御性 T 細胞の関与

NOD マウスへの B:9-23 ペプチドと poly I:C の併用投与により、膵島炎は重症化し、その後の糖尿病発症は抑制された。

重症化した膵島炎内には、CD4⁺Foxp3⁺の制御性 T 細胞の頻度が有意に増加していた。

制御性 T 細胞を除去した上で、B:9-23 ペプチドと poly I:C を併用投与した結果、発症抑制効果は消失し、投与後 2 週間という超早期からの糖尿病発症を認めた。

インスリン B 鎖ペプチド投与による発症抑制には、膵島内に浸潤する CD4 制御性 T 細胞が重要な役割をはたしていることを明らかにした。以上を、Biochem Biophys Res Commun. 367:719-724 2008 に報告した。

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 11 件)

1. Nagayama Y, Kaminoda K, Mizutori Y, Saitoh O, Abiru N.: Exacerbation of autoimmune thyroiditis by a single low dose of whole-body irradiation in non-obese diabetic-H2(h4) mice. Int J Radiat Biol. (査読有) 2008 84(9): 761-769.
2. 阿比留教生: 1 型糖尿病の発症阻止と寛解誘導. 日本臨床免疫学会会誌(査読なし) 2008 31(6): 432-439.
3. Fukushima K, Abiru N, Nagayama Y, Kobayashi M, Satoh T. (他 7 名, 2 番目): Combined insulin B:9-23 self-peptide and

polyinosinic-polycytidylic acid accelerate insulinitis but inhibit development of diabetes by increasing the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the islets in non-obese diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2008 367(4): 719-724.

4. Kobayashi M, Abiru N, Arakawa T, Fukushima K. (他 8 名, 2 番目): Altered B:9-23 insulin, when administered intranasally with cholera toxin adjuvant, suppresses the expression of insulin autoantibodies and prevents diabetes. *J Immunol* (査読有) 2007 179(4): 2082-2088.

5. Nagayama Y, Horie I, Saitoh O, Nakahara M, Abiru N: CD4⁺CD25⁺ naturally occurring regulatory T cells and not lymphopenia play a role in the pathogenesis of iodide-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H2^{h4} mice. *J Autoimmun* (査読有) 2007 129(2-3): 195-202.

6. 阿比留教生: 制御性 T 細胞と 1 型糖尿病. *Diabetes Journal* (査読なし) 2007 35(2): 51-57.

7. Saitoh O, Abiru N, Nakahara M, Nagayama Y: CD8⁺CD122⁺ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology* (査読有) 2007 148(12): 6040-6046.

8. 阿比留教生: 1 型糖尿病の発症予防は可能か? 1 型糖尿病発症予防の臨床治験の現状と問題点. *糖尿病診療マスター* (査読なし) 2006 4(6): 685-689.

9. 阿比留教生: インスリンと 1 型糖尿病 - 成因から治療へ - . *内分泌・糖尿病科* (査読なし) 2006 23(5): 502-510

10. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, (他 8 名, 2 番目): Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* (査読有) 2005 435(7039): 220-223.

11. Kagohashi Y, Udagawa J, Abiru N, Kobayashi M, Moriyama K, Otani H: Maternal

factors in a model of type 1 diabetes differentially affect the development of insulinitis and overt diabetes in offspring. *Diabetes.* (査読有) 2005 54(7): 2026-31.

[学会発表](計 13 件)

1. 阿比留 教生: 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み. 第 23 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 平成 21 年 2 月 14 日, 岡山

2. 福島慶子: Combined insulin B:9-23 self-peptide and polyinosinic - polycytidylic acid accelerate insulinitis but inhibit development of diabetes by increasing the proportion of CD4⁺Foxp3⁺regulatory T cells in the islets in nonobese diabetic mice.

9th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, 平成 19 年 11 月 17 日 Miami, USA

3. 阿比留 教生: インスリン B 鎖ペプチドの粘膜免疫による 1 型糖尿病の発症阻止の検討 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 19 年 5 月 25 日, 仙台.

4. 福島慶子: インスリン B:9-23 ペプチド + poly I:C 併用投与による、CD4⁺CD25⁺Foxp3 制御性 T 細胞の膵島内誘導と糖尿病の発症抑制 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 19 年 5 月 25 日, 仙台.

5. 福島慶子: Poly I:C and insulin B:9-23 self-peptide accelerate insulinitis containing pathogenic and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory cells which can inhibit the development of diabetes. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 6th Annual Meeting, 平成 18 年 6 月 3 日, San Francisco, USA.

6. 阿比留教生: インスリンと 1 型糖尿病: 成因から治療へ. 第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 18 年 5 月 27 日, 東京.

7. 福島慶子: NOD 膵島局所における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞による膵島炎から糖尿病への進展抑制. 第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 18 年 5 月 26 日,

東京 .

福島慶子 : Elimination of CTL epitope from insulin peptide B:9-23 provides nasal-induced suppression of insulinitis and diabetes in the NOD mouse .

8th International Congress of the Immunology of Diabetes Society , 平成 17 年 10 月 8 日 , 淡路

8. 阿比留教生 : Extremely rapid induction of diabetes in young NOD mice treated with Anti-CD25 Antibody in combination with poly-IC and an insulin self-peptide.

8th International Congress of the Immunology of Diabetes Society , 平成 17 年 10 月 7 日 , 淡路

9. 福島慶子 : Early Administration of Anti-CD25 Antibody Accelerates The Spontaneous Development of Diabetes And Abrogates The Disease Inhibition by Insulin B:9-23 Peptide Vaccination. 66thAmerican Diabetes Association Scientific Sessions (ADA) , 平成 17 年 6 月 13 日 , San Diego, USA .

10. 阿比留教生 : Nasal Administration of An Altered Peptide Ligand of Insulin Peptide B:9-23 with Cholera Toxin Suppresses The Expression of Insulin Autoantibodies and Prevents Diabetes in The NOD mouse. 66thAmerican Diabetes Association Scientific Sessions (ADA) , 平成 17 年 6 月 13 日 , San Diego, USA .

11. 古林正和 : NOD マウスにおける、インスリン B:9-23 altered peptide ligand の経鼻投与によるインスリン自己抗体発現抑制および糖尿病発症阻止 . 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会 , 平成 17 年 5 月 25 日 , 神戸 .

12. 福島慶子 : 1 型糖尿病自然発症およびインスリン B 鎖ペプチドによる 1 型糖尿病発症抑制機序への CD4+CD25+制御性 T 細胞の関与について . 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会 , 平成 17 年 5 月 24 日 , 神戸 .

13. 周好波 : コレラトキシン B サブユニット・インスリン B:9-23 アナログペプチド融合蛋

白発現酵母を用いた、1 型糖尿病の経口ワクチン法の開発 . 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会 , 平成 17 年 5 月 24 日 , 神戸 .

〔図書〕(計 1 件)

1. 阿比留教生 : インスリンと 1 型糖尿病 . 診断と治療社 , 糖尿病学 2006. 岡芳知 , 谷澤幸生編 , 2006 14-21 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

阿比留 教生 (ABIRU NORIO)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号 : 00380981

(2) 研究分担者

古林 正和 (KOBAYASHI MASAKAZU)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 00380874

福島 慶子 (Fukushima Keiko)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 80380872

佐藤 剛 (Satoh Tuyoshi)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 70437896

(3) 連携研究者