

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890249

研究課題名（和文） 1 型糖尿病に対する新しい治療戦略の開発：NOD マウスを用いた検討

研究課題名（英文） Development of a novel strategy for treatment of type 1 diabetes mellitus with FTY720

研究代表者

辻 琢己 (TSUJI TAKUMI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：90454652

研究成果の概要：1 型糖尿病の多くは、学童期に発症する。その治療には、1 日 4 回のインスリン自己注射が行われるが、患児の負担は計りしれない。本研究では、1 型糖尿病モデルマウスを用いて、持効型溶解インスリンを 1 日 1 回皮下投与し、新規免疫抑制剤 FTY720 を週 2 回経口投与する併用療法の有用性を調べた。その結果、この併用療法により、良好な血糖コントロールが可能となり、その結果を生化学的および組織化学的に明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：FTY720, 1 型糖尿病, NOD マウス, 強化インスリン療法

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus) は遺伝的素因にウイルス感染などの環境因子が加わり発症する自己免疫疾患である。自己免疫機序によってインスリンを産生する膵臓のβ細胞が破壊されるため、インスリン分泌はほぼ完全に枯渇する。そのため、生命の維持にはインスリンの補充療法が必須である。この補充療法には、毎食直前の超速効型インスリンと就寝前の持効型溶解インスリンがよく用いられている。この持効型溶解インスリン (インスリン グラルギン) は、明らかなピークがなく、生理的基礎分泌に極めて近い血中濃度推移を示す。しかし、追加

分泌の補充が不可欠であり、1 型糖尿病の治療には、就寝前および毎食前の 1 日 4 回の頻回注射 (強化インスリン療法) が用いられている。好発年齢が学童期であるため、メンタルケアも必須であり、この療法による血糖コントロールは必ずしも良好ではない。

申請者らは既に、1 型糖尿病モデル動物 (NOD マウス) に対して発症前から FTY720 を投与することによって型糖尿病の発症を完全に抑制できること (図 1)、次いで、発症した NOD マウスに FTY720 を投与し、有意に延命できること (図 2) を明らかとしている。しかし、FTY720 によってインタクトサバイバルを得た個体は限定されていた (11 例中 4 例)。

本研究課題は、強化インスリン療法に新規免疫抑制剤 FTY720 を介入させることで、自己注射回数を1日1回とできる新しい治療方法を確立することを目的に研究を行った。

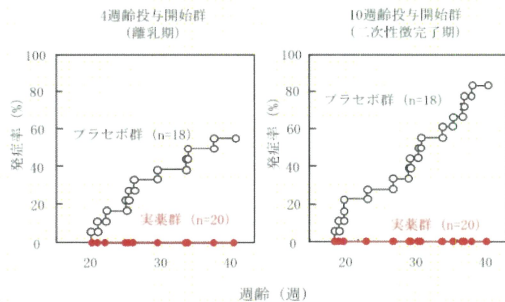


図1 FTY720 投与による NOD マウスの 1 型糖尿病発症予防効果

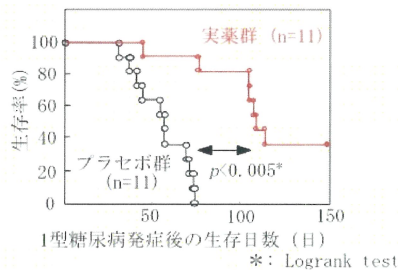


図2 FTY720による 1 型糖尿病に対する延命効果

2. 研究の目的

1 型糖尿病で用いられる、1 日 4 回の自己注射（強化インスリン療法）では、

- (1) 精神的苦痛を伴う。
- (2) ライフスタイルに制限が生じる。
- (3) 成長や二次性徴特有の問題があり、血糖コントロールが必ずしも良好ではない。

など、様々な問題点がある。これらを解決し、良好な血糖コントロールを可能とする新しい治療方法には、臨床からの強い要請がある。この要請に応えるべく、本研究では、自己注射回数を1日1回とする新しい治療戦略（図3）を構築することを企図した。インスリン自己注射をなくすことはできないが、健常児に近い日常生活ができる極めて有用な治療方法である。

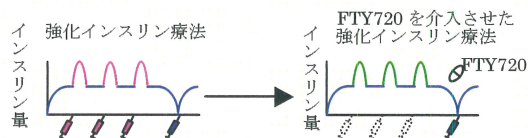


図3 自己注射回数を1回とする新しい治療戦略

3. 研究の方法

(1) 生化学的解析

FTY720 (0.1mg/kg, 週2回経口投与) と持効型溶解インスリン (インスリン グラルギンを1日1回皮下投与) の併用により、1 型糖尿病発症後の NOD マウスの治療効果を検討した。治療効果は、尿糖・ケトン体および血糖値の推移、血中 C-ペプチド濃度を用いて評価した。なお、糖尿病発症後の治療期間は 10 週間とした。

①グループ分け

NOD マウスに 1 型糖尿病を発症させ、下記の 3 グループに分け、治療効果を検討した。

FTY720+インスリン併用群 (n = 6)

発症を確認後、持効型溶解インスリンを 1 日 1 回皮下投与し、FTY720 (0.1mg/kg, 週 2 回) を経口投与した。

インスリン群 (n = 5)

発症を確認後、持効型溶解インスリンを 1 日 1 回皮下投与した。

プラセボ群 (n = 5)

経過観察のみで飼育した。

なお、各群の発症時期と血糖値は、FTY720 +インスリン併用群 (255±98 日齢, 526±71 mg/dL)、インスリン群 (183±48 日齢, 505±99 mg/dL) およびプラセボ群 (162±58 日齢, 484±119 mg/dL) であり、各群間で合致させた。

②糖尿病発症確認

週1回の尿糖測定で尿糖が陽性となった時点で血糖を測定し、血糖値 250 mg/dL 以上が 3 日間以上続いた場合を発症とした (Kaino, Y., et al, Prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by short-term and high-dose IGF-I treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 11: 267-272, 1998.)

③インスリン治療用量の決定

未発症雌性 NOD マウス, 14 週齢 (n = 3) と 26 週齢 (n = 4) の血糖を測定し、70~130 mg/dL を治療目標血糖値に設定した。インスリン グラルギン 1 IU を皮下投与して、血糖値を測定したところ、治療目標基準血糖値まで降下し、治療域を下回ることもなかったことから、治療用量を 1 IU とした。

④尿糖・尿ケトン体

治療開始後 1 週, 3 週, 5 週の尿糖および尿ケトン体をケトダイアスティックスを用いて測定した。尿糖は、ケトダイアスティックスの添付文書より陰性および 1+~5+, ケトン体は陰性, ±および 1+~4+とスコア

化した。

⑤血糖値

治療開始後 1 週, 3 週, 5 週の血糖値をグルコカード ダイアメーターαを用いて測定した。

⑥血中 C-ペプチド濃度

プラセボ群 (n = 3) と FTY720+インスリン併用群 (n = 6) について治療開始 5 週後の血清中 C-ペプチド濃度をレビス C ペプチド-マウス (U タイプ) (AKRCP-031, 株式会社 シバヤギ, 群馬) を用いて測定した。

(2) 組織化学的解析

(1) で治療開始後 10 週まで生存した個体は, FTY720+インスリン併用群, インスリン群およびプラセボ群で, それぞれ, 5 個体, 1 個体および 0 個体であった (研究成果, 図 4 参照)。そこで, FTY720 によるラ氏島の保護効果を組織学的に明らかとするため, 治療開始後 10 週のラ氏島数および膵島炎の程度を評価した。なお, 各群の発症時期と血糖値は, FTY720+インスリン併用群 (182±44 日齢, 485±93 mg/dL, n = 15), インスリン群 (173±58 日齢, 473±90 mg/dL, n = 15) およびプラセボ群 (175±58 日齢, 442±107 mg/dL, n = 15) であり, 各群間で合致させた。

①ラ氏島数

治療開始後 10 週を超えて生存していた FTY720+インスリン併用群 (n = 8) およびインスリン群 (n = 4) の膵臓のパラフィン切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色を行い, ラ氏島数をカウントした。なお, ラ氏島数は, 200μm 以上間隔を開けた 5 枚の組織を用いてカウントし, 1mm²あたりの個数として算出した。

②膵島炎の程度

ヘマトキシリン・エオジン染色像から炎症の強度を 5 段階に分け (膵島炎スコア, 図 4), ラ氏島 1 個あたりの平均膵島炎スコアを算出した (Kaino, Y., et al, Prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by short-term and high-dose IGF-I treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 11: 267-272, 1998.)。

0	1	2	3	4
見られない	ラ氏島付近	ラ氏島内部 1/3以下	ラ氏島内部 1/3~1/2	ラ氏島内部 1/2以上
				

図 4 膵島炎スコア

4. 研究成果

(1) 生化学的所見

①生存率

治療群およびプラセボ群の糖尿病発症後の延命効果について, 糖尿病発症確認後 10 週までの生存率を調べた (図 5)。プラセボ群では発症後 3 週で死亡例が現れ, 発症後 10 週で全個体が死亡した。インスリン群の経過もプラセボ群とほぼ同様であった。これに対し, FTY720+インスリン併用群では全個体が発症後 8 週まで生存し, 発症後 10 週でも 6 個体中 5 個体が生存しており, 有意な延命効果が認められた (P<0.05, Logrank test)。

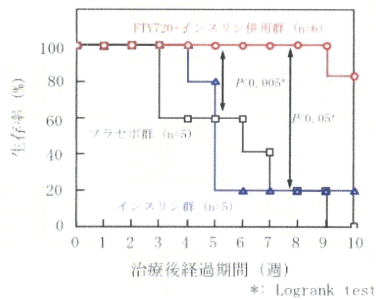


図 5 生存率

②尿糖

発症確認時の血糖値を 250 mg/dL と設定したことから, 各群で尿糖測定結果が 1+以下か, 2+以上か (2+~5+) を比較した。なお, ケトダイアスティックスの比色段階の 2+は血糖値 250 mg/dL に相当する。プラセボ群は治療開始後 3 週では 5 匹中 3 匹 (80%), 5 週では 3 匹中 2 匹 (67%, 2 個体は死亡) が 2+以上であった。インスリン群は, 2+以上の個体が治療開始後 3 週では 5 匹中 2 匹 (40%), 5 週では 2 匹中 2 匹 (100%, 3 個体は死亡) が 2+以上であった。FTY720+インスリン併用群は, 治療開始後 3 週および 5 週で 6 匹中 3 匹 (50%) が 2+以上であった。従って, 尿糖からも併用による治療効果が裏付けられた。

③尿ケトン体

正常では尿ケトン体は検出されないが, 糖代謝異常によるケトアシドーシスの場合, 血中よりも先に尿中に大量のケトン体が検出される。そこで, 尿ケトン体の結果が陰性か, 土および 1+~4+の陽性かを比較した。プラセボ群は治療開始後 3 週では 5 匹中 0 匹 (0%), 5 週では 3 匹中 2 匹 (67%, 2 個体は死亡) であった。インスリン群は治療開始後 3 週では 5 匹中 3 匹 (60%), 5 週では 2 匹中 0 匹 (0%, 2 個体は死亡) であった。FTY720+インスリン併用群は, 治療開始後 3 週では 6 匹中 5 匹

(83%), 5週では6匹中1匹(17%)であった。

④血糖値の推移

血糖値は、プラセボ群では治療開始後1週と比較して、3週、5週とも有意に上昇した ($P < 0.05$, Paired t -test)。インスリン群では治療開始後1週と比較して、3週では有意な上昇は見られなかったが、5週で有意に上昇した ($P < 0.05$, Paired t -test)。FTY720+インスリン併用群では、1週と比較して3週、5週とも有意な上昇は見られなかった ($P < 0.05$, Paired t -test)。

⑤血中C-ペプチド濃度

治療開始5週後のFTY720+インスリン併用群 ($n = 6$) の血中C-ペプチド濃度は、プラセボ群 ($n = 3$) と比較して、有意に高値であり ($P < 0.05$, Mann-Whitney's U -test)、インスリン分泌能を維持した β 細胞がプラセボ群より多く残存していることが示された。

(2) 組織化学的所見

①ラ氏島数

FTY720+インスリン併用群 ($n = 8$) のラ氏島数とインスリン群 ($n = 4$) のラ氏島数には有意な差 ($P < 0.05$, Mann-Whitney's U -test) は見られなかった (図5)。

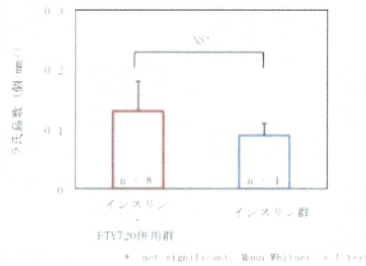


図5 ラ氏島数

②膵島炎の程度

FTY720+インスリン併用群 ($n = 8$) の膵島炎スコアはインスリン群 ($n = 4$) の膵島炎スコアに比べて有意に軽度 ($P < 0.05$, Mann-Whitney's U -test) であった (図6)。

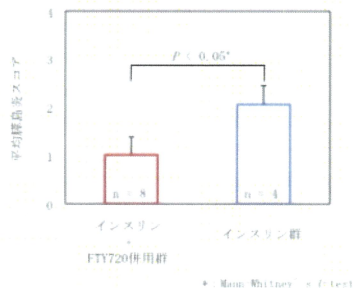


図6 平均膵島炎スコア

以上のことから、FTY720 とインスリン グラルギンを併用することによって、血糖値を良好にコントロールできることが示された。これは、血中C-ペプチド濃度がプラセボ群と比較して、有意に高値であったことから裏付けられた (生化学的所見)。また、FTY720+インスリン併用群とインスリン群のラ氏島数に有意な差はなかったものの、膵島炎の程度は、FTY720+インスリン併用群の方が有意に軽度であった。このことから、ラ氏島の破壊は糖尿病を発症した時点で生じているが、早期にFTY720を投与することによって、膵島炎の進行を抑制できると考えられた (組織化学的所見)。

以上の結果から、強化インスリン療法にFTY720を導入させる新しい治療方法は、1型糖尿病患児のメンタルケアを含めた、良好な血糖コントロールを可能とする極めて有用な治療方法となると考えられた。

この治療方法が可能となっても1日1回のインスリン自己注射は必要である。そこで、FTY720の β 細胞保護効果に加え、GLP-1の β 細胞増殖効果を企図したDPP-4阻害剤との併用療法も計画中である。

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)

[学会発表] (計 2件)

① 辻 琢己, FTY720を用いた1型糖尿病に対する新しい治療方法の開発: NODマウスを用いた検討, 2007年度日本免疫学会学術集会, 2007. 11. 22, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

② 辻 琢己, 1型糖尿病に対するFTY720とインスリン グラルギン併用療法: NODマウスを用いた検討, 第57回日本薬学会近畿支部大会, 2007. 10. 27, 大阪薬科大学 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 琢己 (TSUJI TAKUMI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号: 90454652

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

吉田 侑矢 (YOSHIDA YUYA)

摂南大学大学院薬学研究科博士前期課程

松下 尚弘 (MATSUSHITA NAOHIRO)

摂南大学大学院薬学研究科博士前期課程