

機関番号：17301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790874
 研究課題名(和文) 膵島関連自己抗原経鼻投与によるNODマウスにおける1型糖尿病発症抑制に関する検討
 研究課題名(英文) Intranasal Administration of Autoantigenic Peptide /Poly (I:C) Enhanced protective efficacy to Diabetes induced by Alum-adjvant Treatment in NOD Mice
 研究代表者
 中村 寛 (NAKAMURA KAN)
 長崎大学・病院・医員
 研究者番号：70530426

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病発症直前のNODマウスに対し、皮下インスリンペプチド(B:9-23)/Alum 投与と経鼻 B:9-23/Poly(I:C)コンビネーション投与によりコントロール群と比較して有意な糖尿病発症抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Combination of single subQ-B:9-23/Alum and intranasal-B:9-23/Poly(I:C) less developed diabetes compared to the mice with single subQ-B:9-23/Alum alone or control mice up to 48 age-weeks (P<0.05).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病において膵β細胞の破壊は発症の数十年前よりすでに始まっており、発症前の一次予防、発症後の二次予防の治療法が検討されてきた。1型糖尿病モデルマウスであるNODマウスで有効な抑制法がヒト1型糖尿病に応用されたが、一次予防の大規模臨床治験では残念なことに、発症遅延効果は認められなかった。一方、二次予防では、無毒化CD3抗体やGAD-Alumを用いたヒトでの臨床治験が行われたが、CD3抗体投与ではインスリン必要量の減少を認めたものの副作用の発現を認め、GAD-Alum投与では内因性インスリン分泌低下の抑制という一定の効果は認めたものの、糖尿病の寛解治癒にはいたっておら

ず、1型糖尿病治癒をもたらす治療法開発が求められている。上記の二次予防に発症抑制効果を認めた治療法では、その機序にβ細胞攻撃性T細胞を抑制する制御性T細胞の誘導による免疫寛容誘導が重要である。これまでに自己免疫疾患モデル動物に対し標的抗原をTGF-βなどの抗炎症性サイトカインにより過剰な免疫反応を調節する機構が備わっている粘膜より投与することにより制御性T細胞を誘導し自己免疫疾患抑制効果を認めることが数多く報告されている。NODマウスにおいても標的抗原であるGADやインスリンB鎖ペプチドを経鼻投与することにより発症抑制を認めている。粘膜免疫ではアジュバントが必須であり、また、ヒト1型糖尿病では自己抗体が高値

の対象において、同一の自己抗原の経口投与が、限定的な疾患抑制効果を認めている。しかし、現在用いられている経鼻免疫アジュバントは、安全性の問題からヒトへの臨床応用が困難な状況である。

2. 研究の目的

1 型糖尿病発症阻止ワクチン療法を進化させ、ヒトへの臨床応用を目的として鼻粘膜投与(経鼻投与)等、1 型糖尿病発症抑制効果と安全性をもった新しいワクチン法を開発することである

NOD マウスを用いて、標的抗原である GAD、インスリン B 鎖及びプロインスリンなどの合成ペプチドを経鼻投与し発症抑制効果を検討する。粘膜アジュバントとして、Poly(I:C)、CMP 等の利用により免疫原性を高め、強力な免疫寛容の誘導による疾患抑制ができる方法を確立する。また、さらに強力な免疫方法として、寛解誘導治療として臨床試験が進行している生物学的製剤(抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体)を発症直後の NOD マウスに単回投与し、その後、標的抗原経鼻継続投与によるコンビネーションワクチンの有効性を検討し、ヒトへの実用化を目指す。また、先述の二次予防大規模臨床試験ではインスリン自己抗体(IAA)高値陽性患者に限定した有効性が示唆されている。NOD マウスにおいて、インスリン B 鎖ペプチド(B:9-23)を皮下投与することにより高力価の IAA の誘導が報告されており、発症直後の NOD マウスに B:9-23 などの膵島関連自己抗原を皮下投与しその後、経鼻継続投与によるコンビネーションワクチンの有効性を検討する。糖尿病発症したマウスは解剖し組織学的・免疫学的検討により発症機序の解析を行う。また、発症抑制効果認められれば、抑制に関与していると考えられるサイトカインに対する抗体投与による抑制消失効果の確認や自己リンパ球を有しない免疫不全マウスに糖尿病発症リンパ球と糖尿病抑制リンパ球を共養子移入し発症抑制効果を確認する。最終段階では、アジュバントチャレンジテストなどによりアジュバントの安全性を確実に実証し、ヒトへの臨床試験参加を目指す。

3. 研究の方法

4 週齢 NOD マウスに対しインスリン B 鎖ペプチド(B:9-23)/Poly(I:C)を 10 週齢まで経鼻投与を行い、その後の血清中抗ペプチド抗体を ELISA 法により測定した。12 週齢

マウスに、B:9-23/IFA 及び B:9-23/Alum の単回皮下投与後、B:9-23/Poly(I:C)経鼻投与併用群と非併用群での糖尿病発症率を比較した。

4. 研究成果

(1) Poly(I:C)の粘膜アジュバント効果の確認

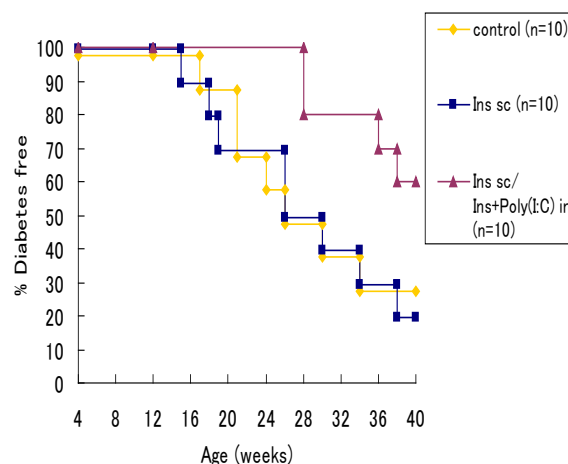
これまでに、Poly(I:C)をアジュバントとして用いて、インスリン B 鎖:9-23 番ペプチド(B:9-23)を 4 週齢 NOD マウスに経鼻投与し、血清中の抗ペプチド抗体の有意な上昇を確認し、Poly(I:C)の粘膜アジュバントとしての有用性を確認した。

(2) インスリンペプチド/IFA 皮下投与とインスリンペプチド/Poly(I:C)経鼻投与のコンビネーション治療

発症直前の NOD マウス (12 週齢) にインスリン B 鎖ペプチド B:9-23/IFA の単回皮下投与後に、B:9-23/Poly(I:C)経鼻投与を継続して行い、糖尿病発症抑制効果の検討を行ったが皮下・経鼻併用投与群において若干の糖尿病発症遅延効果を認めたものの有意な発症抑制効果は認められなかった。

(3) インスリンペプチド/Alum 皮下投与とインスリンペプチド/Poly(I:C)経鼻投与のコンビネーション治療

さらに強力な発症抑制効果を得るために 12 週齢の NOD マウスに実際にヒトにも使用可能な Alum を皮下アジュバントとして、B:9-23/Alum



の単回皮下投与後に、インスリン B 鎖ペプチド B:9-23/Poly(I:C)経鼻投与を継続して行い、糖尿病発症抑制効果を検討した。皮下・経鼻併用投与群において対照群に比し有意な発症抑制効果を認めた ($P < 0.05$)。現在、発症抑制機序の解明を行うため脾細胞のサイトカイン発現の解析膵リンパ節に

おける T 細胞のキャラクター分析や免疫不全マウスに対する養子移入などを行っている。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

①: 発表者 中村寛 第 8 回 1 型糖尿病研究会、題目:インスリンペプチドと polyI:C 投与による 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み形式:口頭発表、開催日:22 年 10 月 10 日~22 年 10 月 11 日 開催地:長崎県

②: 発表者 中村寛 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術総会、題目:インスリンペプチドと polyI:C 投与による 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み、形式:口頭発表、開催日:22 年 1 月 22 日~1 月 23 日 開催地:大阪府

③: 発表者 中村寛 第 7 回 1 型糖尿病研究会、題目:インスリンペプチドと polyI:C 投与による 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み、形式:口頭発表、開催日:21 年 11 月 7 日~21 年 11 月 8 日 開催地:栃木県

④: 発表者 中村寛 THE 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society、題目: Intranasal Administration of Autoantigenic Peptide/Poly (I:C) Enhanced Protective Efficacy to Diabetes Induced by Alum-adjvant Treatment in NOD Mice、形式:ポスター発表、開催日:21 年 10 月 31 日~11 月 3 日 開催地:韓国(仁川)

⑤: 発表者 中村寛 THE 4th ASIAN CONGRESS ON AUTOIMMUNITY、題目: NASAL ADMINISTRATION OF INSULIN B:9-23 PEPTIDE WITH POLY(I:C) AFTER SINGLE SUBCUTASNEOUS INJECTION

PREVENTS DIABETES IN ELDER NOD MICE、形式:ポスター発表、開催日:21 年 9 月 11 日~9 月 13 日 開催地: Singapore

⑥: 発表者 中村寛 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、題目:インスリンペプチドと polyI:C 投与による 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み、形式:ポスター発表 開催日:21 年 5 月 21 日~21 年 5 月 24 日 開催地:大阪府

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛 (NAKAMURA KAN)

長崎大学・病院・医員

研究者番号: 7 0 5 3 0 4 2 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：