

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08534

研究課題名（和文）1型糖尿病の病態形成におけるCペプチド分子の免疫学的機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the immunological mechanism of C-peptide molecules in the pathogenesis of type 1 diabetes

研究代表者

及川 洋一（Oikawa, Yoichi）

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30296561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C-ペプチドとインスリンB鎖9-23番ペプチドとの融合ペプチド（B9-23E）に対する末梢血単核球の免疫応答をELISpot法で評価し、1型糖尿病の病態におけるB9-23E分子の免疫学的な役割を検討した。1型糖尿病患者（n=23）と2型糖尿病患者（n=19）では炎症に関わるinterferon- γ のスポット数に差を認めなかったが、免疫制御に関わるinterleukin-10については1型糖尿病患者の方がIL-10スポット数が多い傾向にあった（ $P<0.08$ ）。1型糖尿病の病態形成においてB9-23Eは免疫学的に重要な役割を担っている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は膵細胞の傷害によって絶対的なインスリン分泌欠乏に陥り高血糖の状態にいたる慢性代謝疾患である。1型糖尿病はインスリン治療を行わないと生命を維持できない難病であり、一生涯インスリン治療を続ける必要があることから、根治を目指した新たな治療法の開発が急務となっている。本研究の結果、B9-23E分子は1型糖尿病の病態形成において免疫学的に重要な役割を担っている可能性が示唆された。特に病態形成の進展に対して抑制性に作用している可能性があることから、1型糖尿病の発症予防や進展阻止を目的とした免疫療法（ワクチン療法）の標的分子として役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The immune response of peripheral blood mononuclear cells to a fusion peptide (B9-23E) of C-peptide and insulin B chain peptides 9-23 was evaluated using the ELISpot method, and the immunological role of the B9-23E molecule in the pathogenesis of type 1 diabetes was investigated. There was no difference in the number of spots for interferon- γ , which is involved in inflammation, between patients with type 1 diabetes (n = 23) and those with type 2 diabetes (n = 19). However, the former showed higher spot number for interleukin-10 ($P<0.08$), which is involved in immune regulation, than the latter. B9-23E may play an immunologically important role in the pathogenesis of type 1 diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：1型糖尿病 Hybrid insulin peptide 自己免疫 C-ペプチド

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は膵β細胞を標的とした細胞性免疫が関与する自己免疫疾患と考えられている。特にインスリンB鎖内の9-23番目のアミノ酸からなるペプチド(B9-23)ならびにその隣接ペプチドが1型糖尿病の主要な自己抗原であるとされてきた。しかし、自験例の結果、1型糖尿病患者においてB9-23関連分子に反応を示す割合は35%程度と低く、他のインスリン関連分子の関与について検討する必要があった。近年、欧米より、インスリン前駆体(プロインスリン)内のC-ペプチドが1型糖尿病の新たな自己抗原である可能性が報告された。日本人においてもC-ペプチドが1型糖尿病の発症に関与するのか?その免疫学的意義を明らかにすることを当初の目的としていた。しかし、中間解析の結果、C-ペプチドに対してinterferon(IFN)-γ産生性を示す末梢血単核球がほとんど検出されないことが判明し、C-ペプチド分子に着目した検討を続けることは現実的ではないと考えた。

2. 研究の目的

上記の中間解析の結果を受け、C-ペプチドの新たな免疫学的関与の可能性について検討する必要性が生じた。近年、Cペプチドと他のβ細胞関連ペプチド(アミロイド、インスリンA鎖など)との融合ペプチド(Hybrid insulin peptide, HIP)が1型糖尿病の新たな標的抗原として欧米で注目されている。しかし、日本人においてHIPが1型糖尿病の発症に関わるか否かについてはこれまで未検討であった。そこで日本人1型糖尿病患者の末梢血リンパ球を用いてB9-23とC-ペプチド内の一部のペプチドとのHIPであるB9-23Eに対する細胞性免疫応答能を評価し、1型糖尿病の病態形成における(標的抗原としての)B9-23Eの免疫学的機構を明らかにすることを目的とし、本研究を計画した。

3. 研究の方法

- 1) 埼玉医科大学病院内分泌内科・糖尿病内科通院中の日本人糖尿病患者(18歳~80歳)を対象とし、事前に当院IRBで承認を受けた説明文書を用いて本研究内容を説明し同意を得た42名(1型糖尿病患者:23名、2型糖尿病患者:19名)を対象として解析を進めた。表1に患者背景を示す。

	1型(n=23)	2型(n=19)		1型(n=23)	2型(n=19)
年齢(単位:歳)			BMI(単位:kg/m ²)		
平均(標準偏差)	53.1(18.3)	53.8(15.7)	平均(標準偏差)	21.22(3.86)	27.77(4.98)
中央値	52	53	中央値	20.9	26.9
最小値	24	27	最小値	14.2	19.9
最大値	77	75			
			罹病期間(単位:年)		
性別(単位:人)			平均(標準偏差)	6.62(10.39)	7.51(7.80)
男性	9(39%)	7(37%)	中央値	0.60	5.00
女性	14(61%)	12(63%)	最小値	0.00(※初発)	0.00(※初発)
			最大値	35.0	24.0

- 2) 既報¹⁾をもとに、インスリンB鎖9-23番ペプチド(B9-23:以下)ならびにB9-23分子と相同性の高いB9-23関連HIP(B9-23E:以下)を合成し刺激抗原として用いた。

刺激抗原

SHL VEA LYL VCG ERG (インスリンB鎖9-23番分子:B9-23)

SHL VEA LYL VCG EEG (インスリンB鎖9-23番分子のうち、22番目をアルギニン(R)からグルタミン酸(E)に置換したB9-23関連HIP分子:B9-23E)

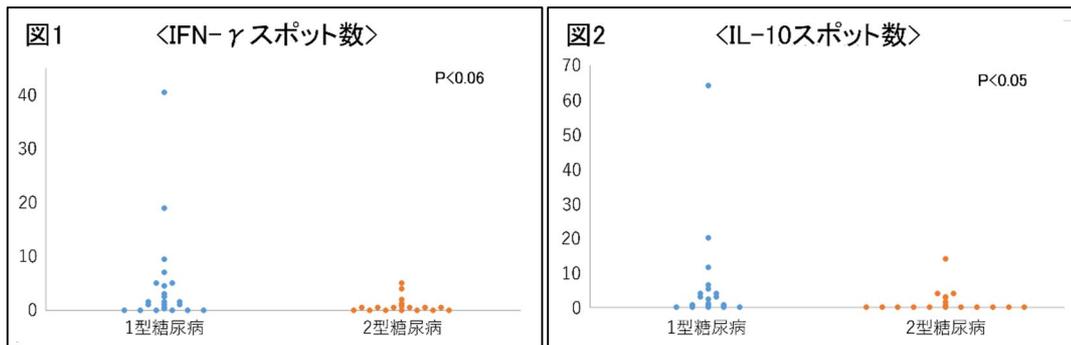
- 3) 対象者の末梢血単核球を用いて、各抗原に特異的に反応する単核球(リンパ球)の免疫応答能を抗原特異的Enzyme-linked immunosorbent spot(ELISpot)法で解析し、1型糖尿病におけるB9-23E特異的免疫応答の有無を検討した。具体的には、単離単核球浮遊液(1×10⁶個/mL)250μLに各抗原を添加(最終濃度:10μg/mL)し、ELISpotプレートの各Well内で3日間培養した。その際、抗原刺激を増幅させるため、あらかじめ抗CD28抗体を培養液中に追加した(最終濃度:3μg/mL)。続いて、炎症性サイトカインのIFN-γならびに免疫制御に関わるinterleukin(IL)-10産生単核球をELISpotキットの取説に従ってWellのメンブレン上で可視化し、単核球25万個あたりのスポット数をカウントした。これによって、末梢血中における標的単核球の頻度を評価することが可能となった。

- 4) 診療録情報(年齢、性別、罹病期間、糖尿病の病型、発症様式、血糖値、HbA1c値、自己免疫性甲状腺疾患を含む各種合併症・併発症の状況、治療内容等)や各種1型糖尿病関連自己抗体、1型糖尿病の疾患感受性ならびに抵抗性に関わるhuman leukocyte antigen(HLA)、血清サイトカイン・ケモカイン(IFN-γ、IL-10など)の濃度[いずれもEnzyme-

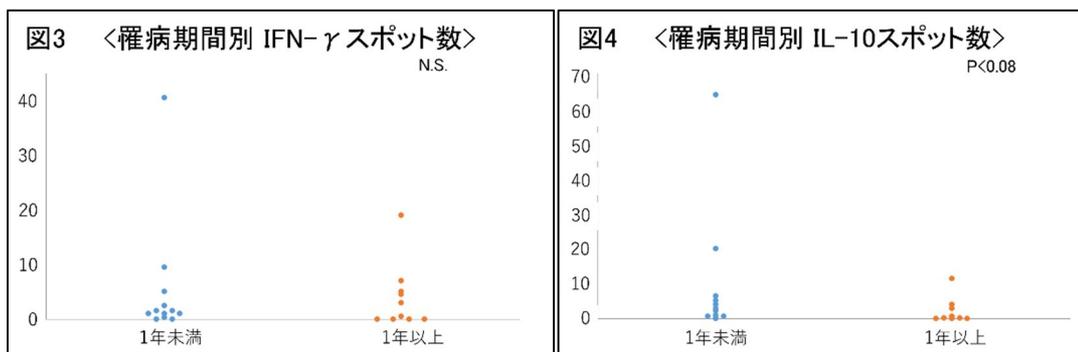
linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定]などをデータベース化し、**B9-23E** 特異的免疫応答の結果と突き合わせて解析することによって、**1** 型糖尿病の病態形成における **B9-23E** の免疫学的機構について考察した。

4. 研究成果

- 1) B9-23E** 特異的な **IFN- γ** (炎症促進)、**IL-10**(炎症抑制)産生単核球が **2** 型糖尿病患者と比べて **1** 型糖尿病患者の末梢血中で増加傾向 (**IFN- γ** ; $P < 0.06$ by Mann-Whitney U-test、**図1**) あるいは有意な増加 (**IL-10** ; $P < 0.05$ by Mann-Whitney U-test、**図2**) がみられた。以上より、**1** 型糖尿病では **B9-23E** に対する細胞性免疫応答が存在しており、病態形成において重要な役割を担っている可能性が示唆された。



- 2) 1** 型糖尿病患者のみを対象として罹病期間 **1** 年未満群と **1** 年以上群に分けて **B9-23E** 特異的な細胞性免疫応答を比較したところ、**IFN- γ** 産生単核球については **IFN- γ** スポット数について両群間に有意な差を認めなかったが (**図3**)、**IL-10** 産生単核球については罹病期間 **1** 年未満群の方が **1** 年以上群と比べて **IL-10** スポット数が多い傾向を示した ($P < 0.08$ by Mann-Whitney U-test、**図4**)。



IFN- γ については、**1** 型糖尿病の病態が慢性的かつ持続的であること示唆する所見と考えられた。一方、**IL-10** については急性発症 **1** 型糖尿病の発症早期にしばしば観察されるハネムーン期(一時的にインスリン必要量が少なくなる時期)の病態との関連性が示唆された。そこで、急性発症 **1** 型糖尿病患者に限定して同様の検討を行ったが、症例数が十分ではなく、**IFN- γ** 、**IL-10** のいずれにおいても有意な所見は得られなかった(データ未掲載)。

- 3) その他(罹病期間以外)の各種診療録情報(臨床パラメータ)についても、IFN- γ や IL-10 スポット数との間に有意な相関は認められなかった。**

【結論】

本研究の結果、インスリン分子と C-ペプチド分子との **HIP** である **B9-23E** に対する細胞性免疫応答が **1** 型糖尿病の病態形成において重要な役割を担っている可能性が示唆された。**B9-23E** に対する免疫制御性応答の誘導が **1** 型糖尿病の発症予防や進展抑制に役立つ可能性があり、将来的には **B9-23E** を用いた免疫ワクチン療法の開発につながることを期待される。

【参考文献】

- 1) Mitchell AM, Alkanani AA, McDaniel KA, Pyle L, Waugh K, Steck AK, Nakayama M, Yu L, Gottlieb PA, Rewers MJ, Michels AW. T-cell responses to hybrid insulin peptides prior to type 1 diabetes development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(6):e2019129118.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Satomura Atsushi, Oikawa Yoichi, Haisa Akifumi, Suzuki Seiya, Nakanishi Shunpei, Katsuki Takeshi, Shimada Akira	4. 巻 107
2. 論文標題 Clinical Significance of Insulin Peptide-specific Interferon- related Immune Responses in Ketosis-prone Type 2 Diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e2124 ~ e2132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgab912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oikawa Yoichi, Hashimoto Koshi, Hara Kazuo, Morimoto Jiro, Namai Kazuyuki, Tanaka Akihiko, Tanaka Satoshi, Shimada Akira	4. 巻 13
2. 論文標題 Current clinical state of type 1 diabetes in Saitama prefecture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 436 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-021-00557-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horii Takeshi, Oikawa Yoichi, Atsuda Koichiro, Shimada Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 On label use of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors might increase the risk of diabetic ketoacidosis in patients with type 1 diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurokawa Yasuharu, Oikawa Yoichi, Shimada Akira, Yajima Ken	4. 巻 13
2. 論文標題 Dupilumab-related type 1 diabetes in a patient with atopic dermatitis: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 300 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-021-00526-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Eiji, Oikawa Yoichi, Okada Akira, Kanatsuna Norio, Kawamura Tomoyuki, Kikuchi Tadashi, Terasaki Jungo, Miura Junnosuke, Itoh Yoshihisa, Hanafusa Toshiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Different interaction of onset age and duration of type 1 diabetes on the dynamics of autoantibodies to insulinoma associated antigen 2 and zinc transporter 8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 510 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Akira, Toda Kyoko, Inoue Ikuo, Yamada Taketo, Oikawa Yoichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Combination of anti CD25 antibody and poly I:C treatment in pregnant NOD mice may be used as 'pregnancy related' type 1 diabetes model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Tomoyasu, Kobayashi Tetsuro, Jimbo Erika, Aida Kaoru, Shimada Akira, Oikawa Yoichi, Mori Yasumichi, Fujii Takeshi, Koyama Rikako, Kobayashi Kazuhiko, Takeshita Akira, Yagihashi Soroku	4. 巻 13
2. 論文標題 Bi-glandular and persistent enterovirus infection and distinct changes of the pancreas in slowly progressive type 1 diabetes mellitus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33011-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Eiji, Shimada Akira, Imagawa Akihisa, Abiru Norio, Awata Takuya, Oikawa Yoichi, Osawa Haruhiko, Kawabata Yumiko, Kozawa Junji, Kobayashi Tetsuro, Takahashi Kazuma, Chujo Daisuke, Fukui Tomoyasu, Miura Junnosuke, Yasuda Kazuki, Yasuda Hisafumi, Kajio Hiroshi, Hanafusa Toshiaki, Ikegami Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Bivalent GAD autoantibody ELISA improves clinical utility and risk prediction for adult autoimmune diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 570 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Eiji, Shimada Akira, Imagawa Akihisa, Abiru Norio, Awata Takuya, Oikawa Yoichi, Osawa Haruhiko, Kawabata Yumiko, Kozawa Junji, Kobayashi Tetsuro, Takahashi Kazuma, Chujo Daisuke, Fukui Tomoyasu, Miura Junnosuke, Yasuda Kazuki, Yasuda Hisafumi, Kajio Hiroshi, Hanafusa Toshiaki, Ikegami Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparing the clinical significance and antigen specificity of insulinoma associated antigen 2 autoantibodies between radioimmunoassay and enzyme linked immunosorbent assay in Japanese patients with type 1 diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 58 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chujo Daisuke, Imagawa Akihisa, Yasuda Kazuki, Abiru Norio, Awata Takuya, Fukui Tomoyasu, Ikegami Hiroshi, Kawasaki Eiji, Katsuki Takeshi, Kobayashi Tetsuro, Kozawa Junji, Nagasawa Kan, Ohtsu Hiroshi, Oikawa Yoichi, Osawa Haruhiko, Shimada Akira, Shimoda Masayuki, Takahashi Kazuma, Tsuchiya Kyoichiro, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Japanese Type 1 Diabetes Database Study (TIDE-J): rationale and study design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 288 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-021-00541-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 及川 洋一, 島田 朗
2. 発表標題 1 型糖尿病におけるインスリン分子特異的細胞性免疫応答の臨床的意義
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤澤 征志, 森田 英生, 中西 俊平, 鈴木 誠也, 羽井佐 彬文, 里村 敦, 及川 洋一, 島田 朗
2. 発表標題 1型糖尿病におけるHybrid Insulin Peptideの免疫学的な意義
3. 学会等名 第22回日本先進糖尿病治療・第1型糖尿病研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 里村 敦, 及川 洋一, 中西 俊平, 鈴木 誠也, 羽井佐 彬文, 島田 朗
2. 発表標題 Ketosis prone Type 2 diabetesにおけるインスリンペプチド反応性T細胞の臨床的重要性
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 及川 洋一
2. 発表標題 1 型糖尿病における抗原特異的免疫応答
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 及川 洋一, 島田 朗
2. 発表標題 1型糖尿病における細胞性免疫指標の臨床的意義
3. 学会等名 第56回 糖尿病学の進歩 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 里村 敦, 及川 洋一, 中西 俊平, 鈴木 誠也, 羽井佐 彬文, 井上 郁夫, 島田 朗
2. 発表標題 Ketosis prone Type 2 diabetesにおけるインスリンペプチド反応性T細胞とHLAとの関係についての検討
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川 洋一, 島田 朗
2. 発表標題 1型糖尿病におけるインスリン分子特異的細胞性免疫応答の臨床的意義
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	島田 朗 (Shimada Akira) (60206167)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	里村 敦 (Satomura Atsushi)		
研究 協力者	羽井佐 彬文 (Haisa Akifumi)		
研究 協力者	鈴木 誠也 (Suzuki Seiya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤澤 柁志 (Fujisawa Masashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関