

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791093

研究課題名(和文) 経口剤のみで1型糖尿病を治療する方法の構築

研究課題名(英文) Development of oral therapy for type 1 diabetes mellitus

研究代表者

辻 琢己 (TSUJI, Takumi)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：90454652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病の治療には、1日4回のインスリン自己注射が用いられ、患児の負担は計りしれない。本研究では、経口薬のみの治療方法、即ち、新規免疫調節薬FTY720とシタグリプチン(dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)阻害薬)の併用療法の有用性および本併用療法が適応できる病勢(空腹時血糖値)を1型糖尿病モデルマウスを用いて調べた。その結果、空腹時血糖値が200 mg/dL未満を継続していれば、本経口療法が適応できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic effectiveness against type 1 diabetes mellitus of a novel immunomodulator, FTY720 (fingolimod), in combination with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, was examined in the non-obese diabetic (NOD) mouse model. In this study, we tried to develop criteria to identify those individuals for whom this combination therapy would be appropriate. In the result, combination therapy with FTY720 and sitagliptin is a promising candidate for type 1 diabetes mellitus treatment, and it might be important to initiate treatment at less than 200 mg/dL of the fasting-blood glucose level.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：FTY720 1型糖尿病 DPP-4阻害薬

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。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。申請者は、既に、1 型糖尿病の新しい治療戦略を構築する目的で、糖尿病を発症した 1 型糖尿病モデル動物 (non-obese diabetic (NOD) マウス) に対する新規免疫調節薬 FTY720 と持効型溶解インスリンアナログ製剤 (インスリン グラルギン、以下、グラルギン、1 日 1 回皮下注射) の併用療法の有用性を報告している (図 1) (Tsuji T, et al., *J. Diabetes. Invest.*, 3(2): 132-137, 2012.)。この併用療法は、自己注射を 1 日 1 回とできる画期的な治療方法である。しかし、好発年齢が学童期である 1 型糖尿病患者の自己注射への精神的、身体的負担は完全には排除できない。そこで、申請者は、経口剤のみでの治療、即ち、FTY720 とシタグリプチン (dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬) の併用療法を確立することを目的に研究を行った。

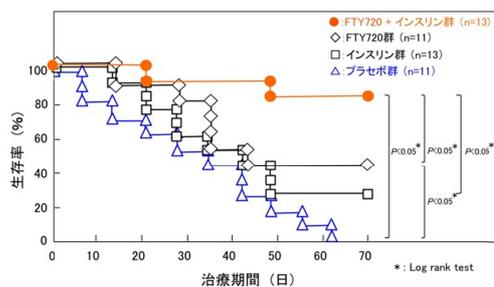


図1 FTY720とインスリン グラルギンの併用療法による延命効果

2. 研究の目的

インスリン製剤の進歩は目覚ましく、この 20 年の間に、超速効型インスリン (インスリン リスプロ、インスリン アスパルト、インスリン グルリジン) や持効型溶解インスリン (インスリン グラルギン、インスリン デテムル) などの遺伝子組換えインスリン製剤が数多く臨床に登場した。これにより、血糖コントロールは格段に容易となった。しかし、好発年齢が学童期である 1 型糖尿病では、必ずしも血糖コントロールは容易ではなく、下記のような解決すべき臨床的課題がある。

自己注射は患児に強い精神的苦痛を与える。

定時使用が原則であるため患児のライフスタイルが制限される。

成長や二次性徴など小児期特有の問題があり、メンタルケアを含めた良好なコン

ロールが困難である。

強化インスリン療法を行っている患者の 30~40% に低血糖が生じる。

このような背景から、良好な血糖コントロールを可能とする注射によらない 1 型糖尿病の新しい治療方法の開発には、強い臨床的要請がある。この臨床的要請に基づき、本研究では、NOD マウスを用いて 1 型糖尿病を経口薬のみで治療できる方法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 併用療法の有用性

NOD マウス

NOD マウス (9~10 週齢、雌性) は日本クレア株式会社 (東京) から購入した。マウスは、室温 25 ± 2 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間の SPF (Specific-Pathogen Free) 環境下で飼育し、ケージ交換および餌の供給は週 2 回行った。餌 (CRF-1 (ガンマ線照射飼料, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)) および水は自由摂取させた。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議: 2006 年 6 月 1 日) および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

FTY720 およびシタグリプチン

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl] propane-1,3-diol 塩酸塩 (FTY720 (Fingolimod)) は吉富製薬株式会社 (現、田辺三菱製薬株式会社, 東京) から恵与された。シタグリプチンリン酸塩水和物 (ジャヌビア) は、万有製薬株式会社 (現、Merck Sharp and Dohme 株式会社, 東京) から購入した。

試験プロトコール

自然経過で 1 型糖尿病を発症した NOD マウスを以下の 4 群に分け、死亡するまであるいは 70 日間治療した。治療効果は、生存率、空腹時血糖値、インスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比、膵島炎の程度、を調べた。

- 1) FTY720+シタグリプチン群 (n=6, FTY720 (0.1 mg/kg) およびシタグリプチン (1 mg/kg), 週 6 回経口投与)
- 2) FTY720 群 (n=6, FTY720 (0.1 mg/kg), 週 6 回経口投与)
- 3) シタグリプチン群 (n=6, シタグリプチン (1 mg/kg), 週 6 回経口投与)
- 4) プラセボ群 (n=6, 注射用蒸留水, 週 2 回経口投与)

なお、FTY720 およびシタグリプチンは、それぞれ、注射用蒸留水で 1 mg/mL および 10 mg/mL となるように溶解後 -20 で保存し、用事溶解して用いた。投与直前に NOD マウスの体重を測定し、1 回投与量が 0.1 mL となるように注射用蒸留水で希釈した。経口投与は、経口ゾンデ針 (0.9x70 mm, 夏目製作所) を用いて行った。

1 型糖尿病の発症確認

12 時間絶食させたマウスから尿を採取し、ケトダイアスティックス (バイエルメディカ

ル株式会社, 東京) を用いて, 週 1 回, 尿糖および尿ケトン体を測定した。尿糖が陽性になった時点で血糖値を測定し, 血糖値 250 mg/dL 以上が 3 日間連続で確認された場合を発症とした (Kaino, Y., et al., *J Pediatr Endocrinol Metab.* 11: 267-272, 1998.)。なお, 血糖値は, グルコカードダイアメーター (アークレイ株式会社, 京都) を用いて測定した。

マウスからの採血および組織の採取

マウスにネブタール注射液 (NEMBUTAL Injection, 大日本住友製薬株式会社, 大阪) 0.05 mL を腹腔内に投与した。正向反射がないことを確認した。腹部大静脈を露出させ, 全血採血した。その後, 直ちにマウスの頸椎を脱臼させ致死させた。採血した血液を 1.5 mL のマイクロチューブ (MPF-150C, 株式会社バイオメディカルサイエンス, 東京) 移し, 約 1 時間室温で放置後, 600 rpm, 5 分間遠心分離し, 血清を得た。血清は 0.6 mL のマイクロチューブ (330-106C, 株式会社バイオメディカルサイエンス) に回収し, -20 で保存した。続いて, 膵臓を摘出し, 十分量の 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (和光純薬株式会社) に入れ, 4 に設定した冷蔵庫で一晩静置した。その後, 10%, 15% および 20% のスクロース溶液にそれぞれ 4 時間浸した。膵臓を 2 つに切断し, パラフィン切片および凍結切片を作製した。

膵ランゲルハンス島数および膵島炎 (膵島炎スコア) の評価

作製したパラフィン切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色した。染色した組織を顕微鏡 (BX50, オリンパス株式会社, 東京) 下で観察し, 数をカウントした。膵ランゲルハンス島の大きさが 150 μm 前後であることから, 200 μm 毎に 5 枚の切片を用いて判定した。

膵島炎スコアは, ヘマトキシリン・エオジン染色をした組織を顕微鏡 (BX50, オリンパス株式会社) 下で観察し, 膵ランゲルハンス島を 1 個ずつ膵島炎スコアの評価基準 (図 2) に従いスコア化した。なお, 膵島炎スコアは個体毎に膵ランゲルハンス島 1 個当たりの平均値とした。膵ランゲルハンス島の大きさが 150 μm 前後であることから, 200 μm 毎に 5 枚の切片を用いて判定した。



図 2 膵島炎スコア

インスリン陽性 細胞/膵ランゲルハンス島面積比

作製したパラフィン切片を monoclonal rat anti-insulin antibody (R&D Systems, Inc.,

Minneapolis, MN, USA) を用いて免疫染色した。インスリン陽性 細胞面積および膵ランゲルハンス島面積は, Image J ソフトウェア (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) を用いて測定し, 膵ランゲルハンス島面積 (mm^2) 当たりのインスリン陽性 細胞面積として算出した。

(2) 併用療法が適応できる病勢 (空腹時血糖値) の検討

NOD マウス

(1) の と同様の方法で飼育した。

FTY720 およびシタグリプチン

(1) の と同様の方法で入手した。

試験プロトコール

自然経過で 1 型糖尿病を発症した NOD マウスを治療開始時の空腹時血糖値に基づいて, 以下の 4 群に分け, 死亡するまであるいは 70 日間, 本併用療法 (FTY720 (0.1 mg/kg) およびシタグリプチン (1 mg/kg), 週 6 回経口投与) で治療した。治療効果は, 生存率, 空腹時血糖値, インスリン陽性 細胞/膵ランゲルハンス島面積比, 膵島炎の程度, を調べた。

- 1) 200 mg/dL 未満群 (n=8)
- 2) 200~399 mg/dL 群 (n=6)
- 3) 400 mg/dL 以上群 (n=8)
- 4) プラセボ群 (75~380 mg/dL) (n=6)

1 型糖尿病の発症確認, マウスからの採血および組織の採取, 膵ランゲルハンス島数および膵島炎 (膵島炎スコア) の評価およびインスリン陽性 細胞/膵ランゲルハンス島面積比は (1) ④~⑦と同様の方法で解析した。

4. 研究成果

(1) 併用療法の有用性

生存率

各群の糖尿病発症後の延命効果 (生存率) を調べた (図 3)。治療は 1 型糖尿病の発症確認後直ちに開始し, 70 日間あるいは死亡するまで継続した。なお, 各群の治療開始時の日齢および血糖値は, 全群間で合致させた (FTY720+シタグリプチン群: 196 \pm 14 日齢, 454 \pm 91 mg/dL, FTY720 群: 189 \pm 35 日齢, 421 \pm 71 mg/dL, シタグリプチン群: 168 \pm 35 日齢, 492 \pm 67 mg/dL およびプラセボ群: 189 \pm 63 日齢, 406 \pm 102 mg/dL)。プラセボ群では, 1 型糖尿病発症後 58 日で全個体が死亡した。シタグリプチン群および FTY720 群では, それぞれ, 1 個体 (17%) および 3 個体 (50%) が発症 70 日後まで生存した。一方, FTY720+シタグリプチン群では, 5 個体 (83%) が発症 70 日後まで生存した。この FTY720+シタグリプチン群の生存率は, シタグリプチン群およびプラセボ群と比べて有意に高かった。さらに, FTY720+シタグリプチン群の生存率は, FTY720 とグラギンの併用で治療した群 (85%) と同程度であった。

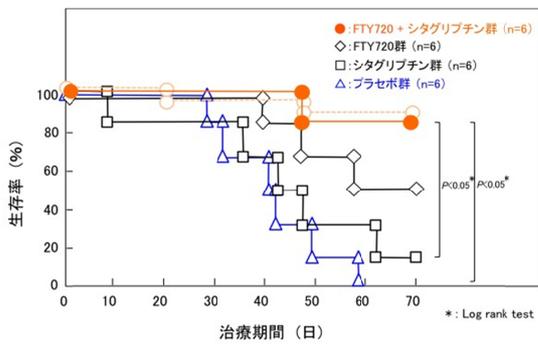


図3 FTY720とシタグリプチンの併用療法による延命効果

血糖値の改善効果

前述のように、FTY720+シタグリプチン群で有意な延命効果が示された。このことを生化学的に検証するため、治療に伴う空腹時血糖値の推移を調べた(図4)。治療群および週齢、性別を合致させた未発症個体の空腹時血糖値を治療開始28、42および56日後に測定した。FTY720+シタグリプチン群では、治療前に 454 ± 91 mg/dLであった血糖値は、治療により 182 ± 132 mg/dL(治療28日後)、 161 ± 109 mg/dL(治療42日後)、 77 ± 35 mg/dL(治療56日後)と低下した。さらに、治療56日後の血糖値は、週齢および性別を合致させた未発症個体の血糖値($n=5$, 91 ± 21 mg/dL)と同程度であり、FTY720群の血糖値($n=3$, 160 ± 35 mg/dL)に比べて有意に改善した。なお、治療方法に関わらず、死亡個体の空腹時血糖値は、FTY720+シタグリプチン群およびFTY720群の生存個体の血糖値に比べて高かった(図4)。

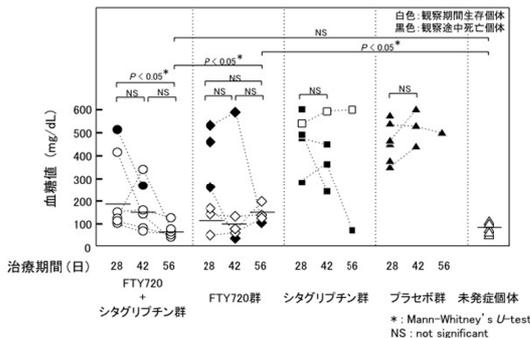


図4 血糖値の推移

インスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比への影響

前述のように、FTY720とシタグリプチンの併用療法により空腹時血糖値が有意に改善したことから、インスリン分泌能も改善していることが推定された。このことを免疫組織化学的に検証するため、治療期間が終了した個体あるいは死亡した個体から摘出した膵臓のパラフィン切片を作製し、インスリン染色によりインスリン陽性細胞を検出した。膵ランゲルハンス島面積およびインスリン陽性細胞面積を測定し、両者の比率(インスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比)を算出した(図5)。FTY720+シタグリプチン群の面積比は、 0.56 ± 0.40 ($n=6$)であり、週齢および性別を合致させた未発症個体

($n=5$, 0.69 ± 0.18)と同程度であった。一方、FTY720群($n=6$, 0.23 ± 0.29)、シタグリプチン群($n=6$, 0.05 ± 0.13)およびプラセボ群($n=4$, 0)の面積比は、週齢および性別を合致させた未発症個体に比べて有意に低値であった。さらに、FTY720+シタグリプチン群の面積比は、シタグリプチン群およびプラセボ群よりも有意に高く、FTY720群よりも高い傾向にあった。なお、治療方法に関わらず、死亡個体ではインスリン陽性細胞は消失していた。

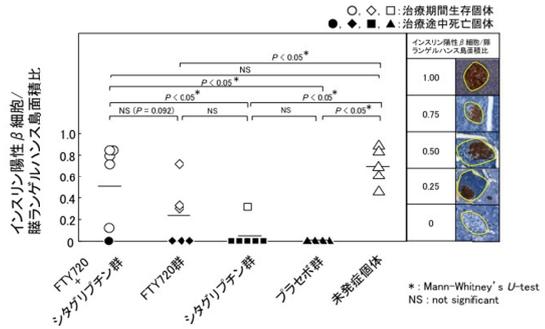


図5 インスリン陽性β細胞/膵ランゲルハンス島面積比

膵島炎の抑制効果

FTY720とシタグリプチンの併用療法により有意な延命効果がみられ、これはインスリン分泌能の維持による高血糖状態の改善に基づくことが明らかとなった。次に、膵ランゲルハンス島内/周囲への炎症性細胞の浸潤がどの程度改善しているかを調べた。治療期間が終了した個体あるいは死亡個体から摘出した膵臓のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により膵島炎の程度を比較した。なお、膵島炎の程度は5段階にスコア化し、膵ランゲルハンス島1個当たりの平均スコアとして算出した(図6)。FTY720+シタグリプチン群($n=6$, 2.0 ± 0.9)およびFTY720群($n=6$, 2.3 ± 0.4)の膵島炎スコアは、週齢および性別を合致させた未発症個体($n=5$, 2.0 ± 0.7)と同程度であった。一方、シタグリプチン群($n=6$, 3.5 ± 0.6)およびプラセボ群($n=4$, 3.4 ± 0.6)の膵島炎スコアは、週齢および性別を合致させた未発症個体と比べて有意に高かった。さらに、FTY720+シタグリプチン群の膵島炎スコアは、シタグリプチン群およびプラセボ群に比べて有意に低く、FTY720群に比べて低い傾向にあった。

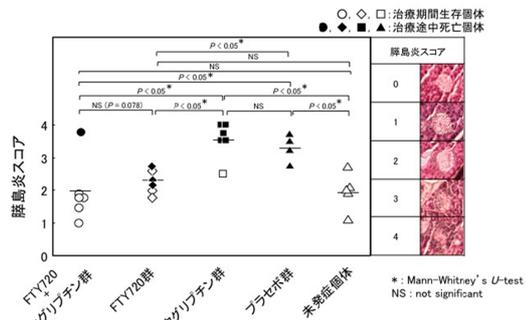


図6 膵島炎スコア

(2) 併用療法が適応できる病勢(空腹時血糖値)の検討

生存率

(1)のと同様に各群の糖尿病発症後の延命効果(生存率)を調べた(図7). 治療は治療開始から70日間あるいは死亡するまで続けた. なお, 各群の治療開始時の日齢は, 全群間で合致させた(200 mg/dL未満群: 210 ± 53日齢, 200~399 mg/dL群: 189 ± 49日齢, 400 mg/dL以上群: 224 ± 42日齢およびプラセボ群: 189 ± 63日齢). プラセボ群および400 mg/dL以上群では, それぞれ, 治療開始後58日および68日までに全個体が死亡した. 一方, 200 mg/dL未満群の生存率は75%であり, プラセボ群および400 mg/dL以上群と比較して有意に高値を示した.

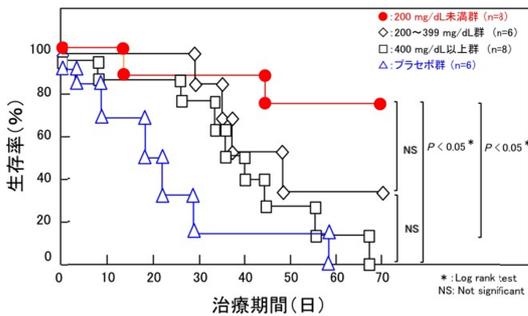


図7 治療開始時の空腹時血糖値の違いによる延命効果

血糖値の改善効果

前述のように, 200 mg/dL未満群で有意な延命効果が示された. このことを生化学的に検証するため, 治療に伴う空腹時血糖値の推移を調べた(図8). 200 mg/dL未満群の生存個体(6/8個体)の治療開始58日後の空腹時血糖値は135 ± 132 mg/dLであり, 性別・週齢を合致させた未発症個体(146 ± 62 mg/dL)同程度にコントロールされていた. しかし, 200 mg/dL未満群の中でも, 死亡する個体や一時的に血糖値が高値を示す個体, そして, 血糖コントロールができない個体も存在した. 一方, 他の群で未発症個体レベルにコントロールできていた個体は, 200~399 mg/dL群の1個体のみであった(データ非表示).

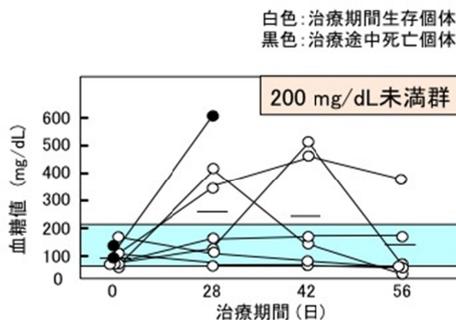


図8 血糖値の推移

インスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比への影響および膵島炎の程度

前述のように, 200 mg/dL未満群の中でも, 死亡する個体や一時的に血糖値が高値を示す

個体, そして, 血糖コントロールができない個体も存在したことから, 治療開始時の空腹時血糖値のみを本併用療法の適応基準とするのは困難と考えられた. そこで, 生存個体の病態を詳細に検討するため, 各群の生存個体のインスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比(図9)および膵島炎の程度(図10)を組織化学的に解析した. その結果, 200 mg/dL未満群の生存個体のうち血糖値が良好にコントロールされていた4個体のインスリン陽性細胞/膵ランゲルハンス島面積比は0.81 ± 0.05であり, 未発症個体と同程度(0.68 ± 0.17)に維持されており, インスリン分泌能が維持されていることが示されていた. また, 血糖コントロールが不良であった個体や, 一時的に血糖値が高値を示した個体では, インスリン産生能は, 明らかに低下していた. 一方, 膵島炎スコアは, 血糖コントロールが不良であった個体では, 膵島炎スコアも高値を示したが, 一時的に血糖値が高値を示した個体や上昇傾向の個体の膵島炎スコアは他の個体と同程度であった.

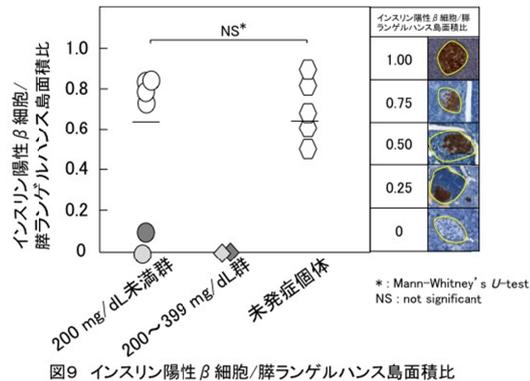


図9 インスリン陽性β細胞/膵ランゲルハンス島面積比

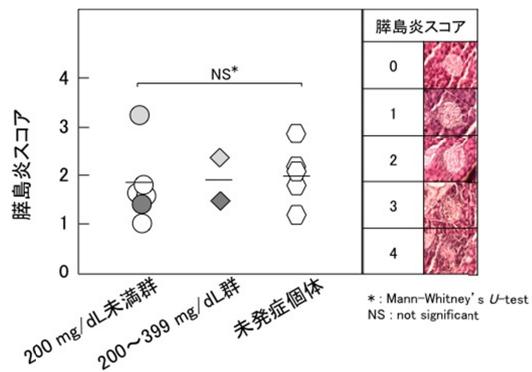


図10 膵島炎スコア

本研究の結果から, FTY720とシタグリプチンの併用療法によって, 1型糖尿病を発症したNODマウスの6個体中5個体(83%)が発症70日後まで生存した(図3). この延命効果は, FTY720とグラルギンの併用療法の結果(85%)と同程度であった. また, FTY720+シタグリプチン群の治療開始56日後の空腹時血糖値はFTY720単独群よりも有意に低値を示し, 週齢および性別を合致させた未発症個体と同レベルまで改善していた(図4). これらの結果は, インスリン陽性細胞/膵

ランゲルハンス島面積比(図5)および膵島炎の程度(膵島炎スコア)(図6)からも裏付けられた。さらに、尿糖が陽性かつ随時血糖値が高値であっても、治療開始時の空腹時血糖値が200 mg/dL未満、すなわち、IGT(impaired glucose tolerance)の状態であれば、この経口療法で治療できる可能性がある。但し、治療期間を通して、空腹時血糖値が200 mg/dL未満を継続している必要があり、治療経過で空腹時血糖値の上昇が確認された場合には、直ちにインスリン治療に切り替える必要があると考えられる。

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 1件)

Tsujii, T., Yoshida, Y., Fujita, T., Kohno, T.: Oral therapy for type 1 diabetes mellitus using a novel immunomodulator, FTY720 (Fingolimod), in combination with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, examined in non-obese diabetic(NOD) mice. J. Diab. Invest., **3**(5), 441-448, 2012. (査読有り)

[学会発表](計 3件)

辻琢己, 河野はるな, 田淵寿美, 宮西将之, 吉田侑矢, 藤多哲朗, 河野武幸: 経口薬による1型糖尿病の治療方法の開発(NODマウスを用いた検討), 第50回日本糖尿病学会近畿地方会, 2013.11.23(京都)

河野はるな, 田淵寿美, 宮西将之, 吉田侑矢, 辻琢己, 藤多哲朗, 河野武幸: 経口薬による1型糖尿病の治療方法の開発(NODマウスを用いた検討)その3, 第63回日本薬学会近畿支部大会, 2013.10.12(京都)

新文, 畑谷侑希, 河野はるな, 田淵寿美, 吉田侑矢, 辻琢己, 藤多哲朗, 河野武幸: 経口薬による1型糖尿病の治療方法の開発(NODマウスを用いた検討)その2, 第62回日本薬学会近畿支部大会, 2012.10.20(兵庫)

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-rinsho/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 琢己 (TSUJII, Takumi)

摂南大学・薬学部薬学研究科・講師

研究者番号: 90454652