

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591041

研究課題名 (和文) 劇症 1 型糖尿病の成因・早期診断に関する研究

研究課題名 (英文) Early detection and diagnosis of fulminant type 1 diabetes mellitus

研究代表者

遠藤 登代志 (ENDO TOYOSHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：00152017

研究成果の概要：アミラーゼ自己抗体を検出する ELISA を確立し、種々の膵疾患での陽性率を検討した。その結果劇症 1 型糖尿病では 88% で陽性であったが、2 型糖尿病では 6% に留まった。一方、自己免疫性膵炎でもほぼ 100% で陽性であった。膵腫瘍、アルコール性膵炎患者等ではほぼ全例陰性であることが判明した。以上の結果はアミラーゼ自己抗体は劇症 1 型糖尿病および自己免疫性膵炎に特異的に産生され、両疾患の診断に有用であることが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：劇症 1 型糖尿病, 自己免疫性膵炎, アミラーゼ, 自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

劇症1型糖尿病は非自己免疫性1型糖尿病（タイプ1B型）の亜型として本邦より提起された病型であり、急激な発症・ケトアシドーシスの存在・GAD抗体やIA-2抗体などの膵島関連抗体が陰性などの特徴を有する。劇症1型糖尿病は本邦におけるケトアシドーシスを示した1型糖尿病の20%を占めるとも言われ、極めて重篤な1型糖尿病であり、その早期診断法の確立及び成因の解明は緊急の課題である。

現在、劇症1型糖尿病の成因は全く不明である。従来、コクサッキーB4ウイルス、パルボB19ウイルス、ヘルペス6型ウイルスなど感染説があるが膵島でのウイルス存在の証明はなく、一定の見解は得られていない。

本症の発症は急激であるが血清Cペプチドレベルより検討した我々の解析では発症時の膵β細胞機能は著明に低下しており、その後再生機転も認められないなど、発症時点で病像が完成しているとも考えられる(Diabetes care 27, 1936, 2004)。一方、申請者らは本症の剖検例において膵島に著明なリンパ球浸潤を認めること(N Engl J Med 342: 1835, 2000)、さらに本亜型の発症はHLA-DQ拘束性であること(Diabetes care, 25; 2320, 2002)などを報告してきた。また、その後多症例の劇症1型糖尿病患者の発症時の血清を用い、これら患者血中に自己抗体が存在するか否かの検討を行ってきた。その結果、Western Blot法により複数例におい培養膵β細胞を特異的に認識する例のあることを確認している。これらの事実は劇症1型糖尿病の発症に何らかの自己免疫機転が関与することを強く示唆するものであり、最近、インターフェロンγ誘導性蛋白やTリンパ球の解析など

からこれを支持する成績も多い。従って、本病型の成因に自己免疫が関与することを明らかにし、その抗原を解明することは劇症1型糖尿病の病態解明や新たな診断法の樹立に極めて重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者らは劇症1型糖尿病における自己免疫の関与およびその対応抗原を見いだすべく、患者血清を用いて、ヒト膵cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、陽性クローンのcDNA塩基配列の解析の結果、膵アミラーゼと一致したことより、本蛋白が自己抗原であるとの結果を得た。そこで、アミラーゼ自己抗体の産生と劇症1型糖尿病の病因への関与を検討するとともに、本自己抗体の検出系を確立し、劇症1型糖尿病や自己免疫性膵炎の早期診断法の確立、並びに臨床的な指標となりうるか否かを検討する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒトアミラーゼcDNA（第299-第512コドン）をpTrcHisAに挿入し、さらにE.coli BL21株にトランスフォームし、大腸菌内でリコンビナント蛋白を産生させる。その後菌体を溶解しHisBondカラムにて、産生リコンビナント全長蛋白を得る。これを用いて抗体特異性をWestern blot法で確認するとともに、cDNAを用いたin vitro translation法にて作成した蛋白での免疫沈降法にて確認する。

次に、リコンビナント蛋白を抗原として

ELISA プレートにコートし、アミラーゼ自己抗体検出系を確立する。即ち、患者血清とプレート中抗原と反応後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG を二次抗体とする自己抗体検出 ELISA システムを樹立する。

- (2) ELISA システムにて、劇症 1 型糖尿病患者における本自己抗体の頻度、臨床経過との関連等を検討する。さらに、1 a 型糖尿病（急性発症 1 型、緩徐進行 1 型）、2 型糖尿病での頻度・関連等についても調査する。また慢性膵炎（アルコール性、自己免疫性）や膵腫瘍患者での陽性率や全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチなどの抗原病患者での陽性率を検討し、本自己抗体の有用性を確認する。これらの血清は患者の infomed concent を得て凍結保存しているものを使用する。

#### 4. 研究成果

劇症 1 型糖尿病では 88% で陽性であったが、急性発症 1 型糖尿病では 21% のみ陽性、2 型糖尿病では 6% に留まった。

一方、自己免疫性膵炎でもほぼ 100% で陽性であった。膵腫瘍、アルコール性膵炎患者等ではほぼ全例陰性であることが判明した。以上の結果はアミラーゼ自己抗体は劇症 1 型糖尿病および自己免疫性膵炎に特異性が高く、両疾患の診断に極めて有用であることが示された。

一方、劇症 1 型糖尿病では発症直後抗体価が最も高く、経時的に本抗体価が漸減することが判明した。自己免疫性膵炎では未治療では抗体価は高力価が持続するが、副腎皮質ホルモンの投与により症状の改善とともに、著明に本抗体価が低下することも明らかと

なった。以上よりアミラーゼ自己抗体の検出は劇症 1 型糖尿病・自己免疫性膵炎の診断のみならず、臨床経過判定にも有用である事が明らかとなった。

#### 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 2 件)

- ① Endo T, et al. Iase  $\alpha$ -2A Autoantibodies: Novel Marker of Autoimmune Pancreatitis and Fulminant Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 58, 732-777, 2009. (査読有)

- ② S. Takizawa, T. Endo, Xing Wanjia, S. Tanaka, M. Takahashi, T. Kobayashi: HSP 10 is a new autoantigen in both autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes, *Biochem Biophys Res Commun*, in press. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Souichi Takizawa, Toyoshi Endo, Shoichiro Tanaka, Masashi Takahashi, Tetsuro Kobayashi: Novel autoantibody against heat shock protein 10 in diabetes associated with autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes. 68th Scientific Sessions of American Diabetes Association, Chicago, USA. Jun 16, 2008
- ② 滝澤壮一、遠藤登代志、田中昌一郎、小林哲郎: 自己免疫性膵炎と劇症 1 型糖尿病に検出される膵外分泌抗体の対応抗原。  
第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008 年 5 月 23 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 登代志(ENDO TOYOSHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

准教授

研究者番号：00152017

### (2) 研究分担者

小林 哲郎 (KOBAYASHI TETSURO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

教授

研究者番号：30113442

金重 勝博(KANESHIGE MASAHIRO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20377518

### (3) 連携研究者

なし