

機関番号：13501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591056
 研究課題名（和文） GAD65-encoding DNA ワクチンを用いた1型糖尿病の予防

研究課題名（英文） Immunological prevention of type 1 diabetes using GAD65-encoding DNA vaccine

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

Site-specific and decarboxylase (GAD) の遺伝子導入を electroporation 法にて雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスに行った。導入した GAD65 (1-83aa) (以下 N-GAD65) cDNA, GAD65 (244-443aa) cDNA (以下 Center-GAD65) および GAD65 (443-585aa) (以下 C-GAD65) cDNA はいずれも ELISPOT 法にて site-specific に T 細胞反応および GAD 抗体の産生をみた。

糖尿病累積発症率は雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスの 30 週令までで対照に比べてやや低い傾向を示したが有意差はみとめなかった。また、N-GAD65, Center-GAD65 および C-GAD65 投与群別にみても、3 群間に糖尿病発症率に有意差はみられなかった。

膵組織を検討したところ、糖尿病発症時における膵島炎の程度には差をみとめなかった。また β 細胞残存量にも差はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：

Preventive effect of human glutamic acid decarboxylase (GAD) 65 (GAD65) vaccination for type 1 diabetes was examined using NOD mice model. Subcutaneous electroporation of site-specific GAD65 fragments including GAD65 (1-83aa: N-GAD65), GAD65 (244-443aa: Center-GAD65) and GAD65 (443-585aa: C-GAD65) were done to 4 week female NOD mice.

Specific T cell responses to N-GAD65, Center-GAD65 and C-GAD65 were observed to respective GAD65 fragments in electroporated NOD mice. However, occurrence rate of diabetes in GAD65 vector- or empty vector- electroporated groups did not reach significant levels during 30 weeks.

Human GAD65 different from mice GAD65 may explain a failure to prevent the occurrence of diabetes by human site-specific GAD65 vaccination.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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： GAD65 ， 1 型糖尿病 ， 膵島炎 ， GAD 抗体

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は、自己抗原により活性化された T 細胞が膵 β 細胞を破壊することによって起こる。T 細胞と反応し β 細胞破壊に関係する膵島特異的の自己抗原には、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)、インスリン、IA-2 蛋白などが考えられている。GAD、なかでも isoform の GAD65 は、その分子に対する自己抗体

(GAD65 抗体) が、1 型糖尿病患者の血中に高頻度に検出されることから、1 型糖尿病の成因と関連することが推察される。最近 GAD65 および GAD67 の X 線解析による構造が発表された。(Fenalti G et al., Nat Struct Mol Biol 14: 280, 2007) この報告によれば GAD65 は酵素活性部位 (PLP domain) が、GAD67 と異なりきわめて flexible であること、N 末端と C 末端は GAD65 分子の外側に位置し、抗原となりやすいことが示唆される。このような成績から、分子 GAD65 分子の各ドメインと 1 型糖尿病における自己抗体産生、T 細胞反応、さらには発症予防における GAD65 分子の役割に興味を持たれている。

2. 研究の目的

申請者らは、ヒト GAD65 遺伝子 の一部を 1 型糖尿病と関係しない GAD の isoform である GAD67 遺伝子に置換した融合遺伝子を作成し、種々の GAD65/GAD67 のキメラ蛋白を合成し、1 型糖尿病患者における GAD65 抗体のエピト

ープを決定した。その結果、緩徐進行 1 型糖尿病 (SPIDDM) 患者での GAD65 抗体は GAD65 蛋白の N 末端 (17-51aa) を特異的に認識すること、一方急性発症 1 型糖尿病では中心部分 (244-443aa) および C 末端 (C443-585aa) を認識することを報告した (Kobayashi T et al., J Clin Endocrinol Metab 88:4768, 2003)。N 末端部分は GAD65 分子の細胞膜へのアンカリングドメインを含み、中心部分は GAD65 の活性部位 (PLP ドメイン) を含んでいる。この成績は、GAD65 分子の各のドメインに対する免疫反応が異なった糖尿病のフェノタイプ (緩徐進行 1 型糖尿病もしくは急性発症 1 型糖尿病) を生じることを示唆している。我々は、1 型糖尿病の予防介入にも興味をもって取り組んでおり、早期インスリン治療による緩徐進行 1 型糖尿病の進展阻止につき検討してきた (Maruyama T et al., J clin Endocrinol Metab 93: 2115-21, 2005)。最近化学的に変性させた GAD65 蛋白分子とアジュバントを用いた 1 型糖尿病のワクチン治療がスウェーデン Dyamid 社を中心に行われており (Phase III)、GAD65 分子と予防にも注目が集まっている。しかし、GAD65 遺伝子をプラスミドに組み込んだ GAD DNA ワクチンのモデル動物における報告は少なく、その予防効果も一定していない (Balasa B et al., Clin Immunol 99:241, 2001, Gaunrit A et

al., Clin Exp Immunol 137:253, 2004)。一般に DNA ワクチンは投与部位、投与時期などにより効果が異なるが、蛋白分子をアジュバントと共に投与する場合に比べその効果が永続するとされている。我々は GAD65 分子の各ドメインに注目し、以下の検討を行うこととした。

3. 研究の方法

Site-specific GAD の遺伝子導入

- (1) 発現ベクター pcDNA3.1 に、hGAD 65 (1-585aa) cDNA、hGAD 67 (1-594aa)、site-specific cDNA である N 末端 cDNA : hGAD65 (1-83aa および 1-244aa) cDNA、中心部分 : (244-443aa) cDNA、C 末端 (443-585aa) を挿入し、遺伝子導入用コンストラクトを作成する。HEK293 細胞に transfection し、発現のあることを Western blotting で確認する。
- (2) 上記 5 種類の pcDNA3.1/hGAD65/67 に加えて empty vector (pcDNA3.1) を、4 週齢の雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスおよび通常の雌性 NOD マウスの前脛骨筋に in vivo electroporation 法にて遺伝子導入 (50ug/50ml) する。導入を効率よく行うため cardiotoxin を加える。以降、2 週間毎に同様に遺伝子導入を繰り返す。
- (3) これらの免疫マウスの血糖値、血中インスリンを経時的にモニターリングし、耐糖能異常の出現をみる。また抗ヒト GAD65 N 末端抗体、抗中心部抗体、C 末端抗体の検出を既報の in vitro transcription/translation, immunoprecipitation 法にて行う。これらの抗体の IgG サブクラスの測定を行い、Th1 (IgG2a/2c) もしくは Th2 (IgG1)

の優位性を検討する。

- (4) これらのマウスの脾細胞を 5×10^5 cell の割合で分画し ELISPOT 法にて GAD65、GAD67 および各 site-specific GAD 分子への T 細胞反応を測定する。
- (5) 上記各群のマウスの比較により、ヒト GAD65 のそれぞれの site-specific 遺伝子導入が 1 型糖尿病発症に関して発症促進ないし抑制に作用するか否かを検討する。なおヒト GAD65 とマウス GAD65 とは 95.7% のホモロジーがある。
- (6) 糖尿病未発症および発症時点での上記 6 種類の免疫 NOD マウスの膵組織標本を作成し、 β 細胞残存の程度、insulinitis スコア、さらに浸潤リンパ球サブセットと GAD65/67 抗体の関連、認識部位との関連を探る。
- (7) マウスの飼育を継続し、定期的に経腹腔的ブドウ糖負荷試験 (2mg/g) を行い、糖尿病の重症化の程度、重症化に至る期間と GAD65/67 抗体の関連、認識部位の相違との関連を探る。
- (8) マウスの 30 週令での糖尿病累積発症率と各 GAD65 エピトープ抗体価、IgG サブクラスの関連、認識部位の相違との関連および T 細胞反応の変化を併せて検討する。
- (9) 発症予防効果のあった GAD65 分子に関しては、さらに GAD65 部を短縮した DNA コンストラクトを作成しこれを GAD65 (-/-) ・雌性 NOD マウスおよび通常の雌性 NOD マウスに in vivo electroporation 法にて免疫し、同様の手法にてさらに特異的な部位を特定する。

- (10) 発症促進性 GAD65 分子に関しても、さらに GAD65 部を短縮した cDNA もしくは GAD67 とのキメラを作成し、これを GAD65・(-/-)・NOD マウスに in vivo electroporation 法にて免疫し、同様の手法にてさらに特異的な部位を特定する。

Site-specific GAD65 分子での確認

- (11) 平成 20 年度までの研究で明らかになった 1 型糖尿病の進展阻止能を発揮した GAD65 配列部位、発症促進性能を発揮した GAD65 配列部位の cDNA を pGEX に結合し、これらと GST の融合蛋白を E. coli (BL21) 中で産生し、GST カラムにて精製する。
- (12) これらの融合蛋白を抗原として ELISA 法にて 1 型糖尿病患者血中の GAD 抗体の認識部位を明らかにする測定系を確立する。これらとそれぞれの病型を検討し、多数例での 1 型糖尿病患者での認識部位による GAD65 抗体の機能の相違を明らかにする。
- (13) 雌性 GAD65・(-/-)NOD マウスおよび皮下に精製 GST/進展阻止能のある GAD65 蛋白を Freund' complete adjuvant とともに免疫し、平成 20 年度と同様な指標を用いてその発症・進展が阻止できるか否かを検討する。
- (14) 雌性 GAD65・(-/-)NOD マウス皮下に精製 GST/発症促進性能のある GAD65 site-specific 蛋白を Freund' complete adjuvant とともに免疫し、⑬と同様にその発症・進展が促進されるか否かを平成 20 年度と同様な手法で検討する。

Site-specific GAD65 分子を用いた劇症 1 型

糖尿病における GAD65 抗体の陽性者の解析

劇症 1 型糖尿病症例では約 5% の頻度で GAD65 抗体が検出される (Imagawa A et al., Diabetes Care 26:2345, 2003)。我々は既報の GAD65/GAD67 キメラ分子を用いた検討で、この劇症 1 型糖尿病における GAD65 抗体が GAD65 分子の中心部位 (PLP site) を認識している成績を得た (未発表)。この年度では平成 21 年度の成績をふまえ、GAD 抗体陽性の劇症 1 型糖尿病に特異的な GAD65 エピトープ同定と、その特異的な配列を決定する。劇症 1 型糖尿病患者の第 1 度近親者には GAD65 抗体、IA-2 抗体、その他特異的自己抗体陽性者がみられ、この研究は未発症者の発症予知、予防に貢献するものと確信する。なお、GAD65-DNA ワクチンに関しては、長年の共同研究者である Lernmark 教授 (Malmoe, Sweden) と連携し、臨床応用を視野に置いて進めていく。また他施設へ出向中の田中昌一郎 (非常勤講師) も研究協力者として参加しこのプロジェクトを進めていく。

4. 研究成果

- (1) Site-specific GAD の遺伝子導入を electroporation 法にて雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスに行った。導入した GAD65 (1-83aa) (以下 N-GAD65) cDNA, GAD65 (244-443aa) cDNA (以下 Center-GAD65) および GAD65 (443-585aa) (以下 C-GAD65) cDNA はいずれも ELISPOT 法にて site-specific に T 細胞反応を示した。
- (2) 実験 A (n=10, 対照 n=10): Site-specific GAD 遺伝子導入による雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスに site specific GAD65 cDNA の 3 種 (前述) を electroporation した。

その結果, NGAD65, Center-GAD65 および C-GAD65 にエピトープを有する GAD65 抗体の産生が確認された。

- (3) 3. 実験 B (n=7, 対照 n=7): A と同様に, 3 種の site-specific 蛋白をアジュバンドとともに免疫した雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスでもそれぞれのエピトープを有する GAD65 抗体の産生が確認された。
- (4) 糖尿病累積発症率: 実験 (A) および実験 (B) における雌性 GAD65 (-/-) NOD マウスの 30 週令までの糖尿病の累積発症率は対照に比べてやや低い傾向を示したが有意差はみとめなかった。また, N-GAD65, Center-GAD65 および C-GAD65 投与群別にみても, 実験 A, 実験 B とも 3 群間に糖尿病発症率に有意差はみられなかった。
- (5) 膵島炎および β 細胞残存量: 膵組織を検討したところ, 糖尿病発症時における膵島炎の程度には差をみとめなかった。また β 細胞残存量にも差はみられなかった。

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 7 件)

- ① Toyoshi Endo and Tetsuro Kobayashi. Runx2 Deficiency in Mice Causes Decreased Thyroglobulin Expression and Hypothyroidism. *Molecular Endocrinology* 査読有 24(6): 1267-1273, 2010
- ② Masafumi Koga, Jun Murai, Hiroshi Saito, Soji Kasayama, Akihisa Imagawa, Toshiaki Hanafusa, Tetsuro Kobayashi and the Members of the Japan Diabetes Society' s Committee on Research on Type 1 Diabetes. Serum glycosylated albumin to haemoglobin A1C ratio can distinguish fulminant type 1 diabetes mellitus from type 2 diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 査読有 47: 313 - 317, 2010.
- ③ Y. Kawabata, H. Ikegami, T. Awata, A. Imagawa, T. Maruyama, E. Kawasaki, S. Tanaka, A. Shimada, H. Osawa, T. Kobayashi, T. Hanafusa, K. Tokunaga, H. Makino, on behalf of the Committee on Type 1 Diabetes, Japan Diabetes Society. Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. *Diabetologia* 査読有 52:2513-2521, 2009
- ④ Shoichiro Tanaka, Yoriko Nishida, Kaoru Aida, Taro maruyama, Akira Shimada, Masako Suzuki, Hiroki Shimura, Soichi Takizawa, Masashi Takahashi, Daiichiro Akiyama, Sayaka Arai-Yamashita, Fumihiko Furuya, Akio Kawaguchi, Masahiro Kaneshige, Ryohei Katoh, Toyoshi Endo, and Tetsuro Kobayashi: Enterovirus Infection, CXCL10, and CXCR3 Circuit -A Mechanism of Accelerated Beta-Cell Failure in Fulminant Type 1 Diabetes-. *Diabetes* 査読有 58:2285-2291, 2009
- ⑤ Toyoshi Endo and Tetsuro Kobayashi: Immunization with thyroglobulin induces Graves' -like disease in mice. *Journal of Endocrinology* 査読有 202:217-222, 2009.
- ⑥ Toyoshi Endo, Soichi Takizawa, Shoichiro Tanaka, Masashi Takahashi,

Hideki Fujii, Terumi Kamisawa, and Tetsuro Kobayashi: Amylase alpha-2A autoantibodies: Novel Marker of Autoimmune Pancreatitis and Fulminant Type 1 Diabetes . Diabetes 査読有 58: 732-737, 2009.

- ⑦ Takizawa S, Endo T, Xing Wanjia, Tanaka S, Kobayashi T.: HSP 10 is a new autoantigen in both autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes. Biochem Biophys Res Commun 査読有 386 : 192-196, 2009.

[学会発表] (計 12件)

- ① Tetsuro Kobayashi, Kaoru Aida, Shoichiro Tanaka : Pathological changes in the pancreas of fulminant type 1 diabetes and slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes. The 11th International congress of the immunology of diabetes society. songdo convensia, Incheon Korea. 2010/10/31-11/3
- ② Tetsuro Kobayashi; UK-Japan Workshop ~Frontiers of Diabetes Research~; Causes, Pathophysiology and Treatment of Type 1 Diabetes in Japan; Science and Innovation Section, British Embassy Tokyo, 2009/2/16-17
- ③ Tetsuro Kobayashi; Scientific Program Jakarta Diabetes Meeting 2008 ; Plenary Lecture I ; Immunological Aspect of Type 2 Diabetes: Pathophysiology and clinical Implication ; Jakarta, Indonesia, 2008/11/22-23
- ④ Souichi Takizawa, Toyoshi Endo,

Shoichiro Tanaka, Masashi Takahashi, Tetsuro Kobayashi, A novel autoantibody against heat shock protein 10 in diabetes associated with autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes. 68th Scientific Sessions. San Francisco, USA, 2008/06/6-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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