

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09402

研究課題名(和文) 網羅的抗体解析を用いた劇症1型糖尿病早期診断のための特異的血清マーカーの開発

研究課題名(英文) Serum markers for early diagnosis of fulminant type 1 diabetes

研究代表者

花房 俊昭 (Hanafusa, Toshiaki)

大阪医科大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：60164886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、劇症1型糖尿病の新規診断マーカー抗CD300e抗体を明らかにした。網羅的抗体解析(Seromic analysis)の結果、劇症1型糖尿病患者の急性期血清において上昇を認める9つの抗体が明らかになった。ELISA法による多数例での検討では、抗CD300e抗体価は、劇症1型糖尿病患者急性期血清において自己免疫性1型糖尿病患者、2型糖尿病患者、自己免疫性甲状腺疾患患者、健常者と比較して有意に上昇していた。

研究成果の概要(英文)：The present study clarified a novel biomarker anti-CD300e antibody to diagnose fulminant type 1 diabetes (FT1D). Seromic analysis revealed 9 antibodies which showed high signals in sera from patients with FT1D in acute phase. Among them, the titre of anti-CD300e antibody was significantly higher in FT1D patients in acute phase than that in autoimmune type 1 diabetes (T1AD), type 2 diabetes (T2D), autoimmune thyroid disease (AITD) patients and healthy controls (HC) by ELISA.

研究分野：糖尿病 免疫学

キーワード：劇症1型糖尿病 抗CD300e抗体

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象とする劇症1型糖尿病は、私どもが発見・確立した新しい疾患単位である。劇症1型糖尿病調査研究委員会の全国的な疫学調査により、本国における劇症1型糖尿病の発症率は急性発症1型糖尿病の19.4%を占める重要なサブタイプであることを明らかにした。また、約1週間以内に膵細胞がほぼ消失し極めて急激に糖尿病が進行するため、発症時に診断が遅れると死亡する予後不良な疾患であることを明らかにした。近年、東アジアを中心とした世界各国からの報告も相次ぎ、劇症1型糖尿病は人種を超えた臨床病型であることが明らかにされつつある。

このように、劇症1型糖尿病は糖尿病における最重症型のサブタイプであり、決して稀な疾患ではないにもかかわらず、早期診断をするための特異的血清マーカーが存在しない。そこで私どもは、劇症1型糖尿病を診断するための特異的マーカーの作成を目的とし、劇症1型糖尿病患者血清を用いて約9000種類以上の網羅的抗体解析 (Seromic analysis)を行うに至った。

2. 研究の目的

本研究は、劇症1型糖尿病の急性期血清中において上昇する特異的マーカーを網羅的抗体解析 (Seromic analysis)を用いて明らかにすることを目的とすることである。

3. 研究の方法

(1) 網羅的抗体解析 (Seromic analysis)

3名の劇症1型糖尿病患者血清 (急性期と亜急性期)を用いて約9000種類以上の網羅的抗体解析 (Seromic analysis)を行い、急性期血清において上昇を認める抗体を選出した。

(2) ELISA法による多数例での検討

網羅的抗体解析 (Seromic analysis)により劇症1型糖尿病の急性期血清中において上昇を認めた候補抗体測定用のELISAキットを作成し、多数例での検討を試みた。対象を劇症1型糖尿病患者の急性期 (発症後2週間以内)30名、亜急性期 (発症後2週間から2ヶ月)30名、慢性期 (発症後1年以上)14名、自己免疫性1型糖尿病患者32名、2型糖尿病患者30名、自己免疫性甲状腺疾患患者20名、健常者31名とした。

(3) 特異性の検討

ELISA法にて劇症1型糖尿病患者急性期に上昇を認めた抗体に対応する抗原蛋白の遺伝子をトランスフェクションしたHEK293細胞を、劇症1型糖尿病患者急性期および健常者の血清、PE-IgG (2次抗体)と反応させた後、フローサイトメトリーにより血清中の抗体と反応した細胞数の測定をおこなった。

(4) ROC解析

ELISA法により得られた結果よりROC解析をおこない (劇症1型糖尿病患者急性期 vs 健常者、劇症1型糖尿病患者急性期 vs 自己免疫性1型糖尿病患者)、感度・特異度を算出した。

4. 研究成果

(1) 網羅的抗体解析 (Seromic analysis)

Seromic analysisにより劇症1型糖尿病の急性期血清中において上昇する9つの候補抗体が明らかになった。中でも免疫応答やマクロファージ活性化など、本疾患の発症機序に関連があることが想定される抗CD300e抗体と抗LGALS3抗体の2つに着目した。

(2) ELISA法による多数例での検討

抗CD300e抗体および抗LGALS3抗体価測定用ELISAキットを作成し、多数例で検討した。その結果、抗CD300e抗体価は劇症1型糖尿病急性期において、劇症1型糖尿病慢性期、他疾患 (自己免疫性1型糖尿病、2型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患)、健常者と比較して有意に高値を示した (各 $P < 0.05$) (図1)。

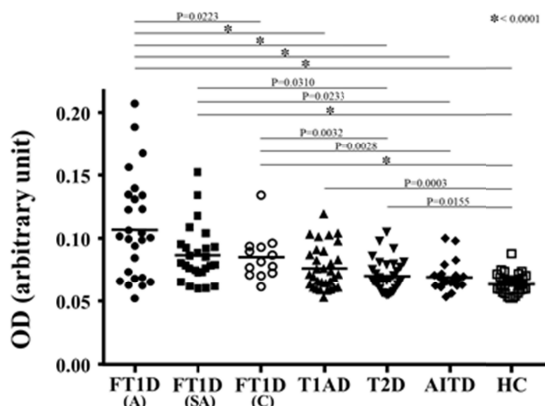


図1. 抗CD300e抗体価 (ELISA法)の結果

また、同一患者において、劇症1型糖尿病急性期の抗CD300e抗体価は、亜急性期と比較して有意に高値を示した ($P = 0.0018$, paired-t test) (図2)。

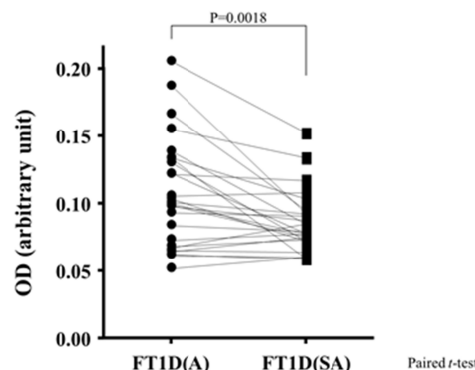


図2. 抗CD300e抗体価 (FT1D.A vs FT1D.SA)

さらに、抗 LGALS3 抗体価に関しても同様の方法にて測定した結果、自己免疫性 1 型糖尿病患者において、2 型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患、健常者と比較して有意に高値を示した(各 $P < 0.05$) (図 3)。

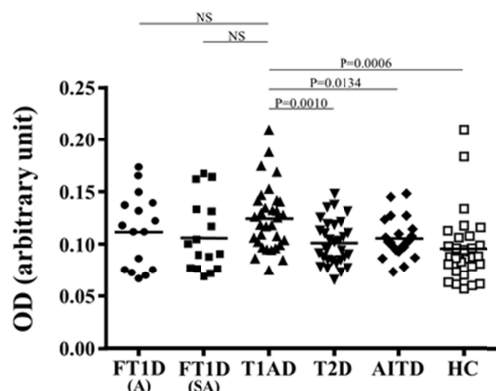
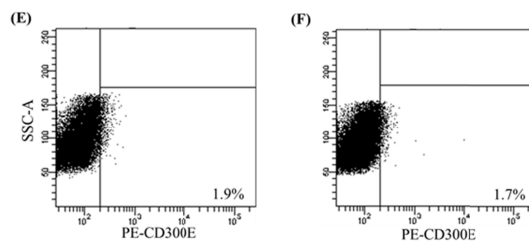
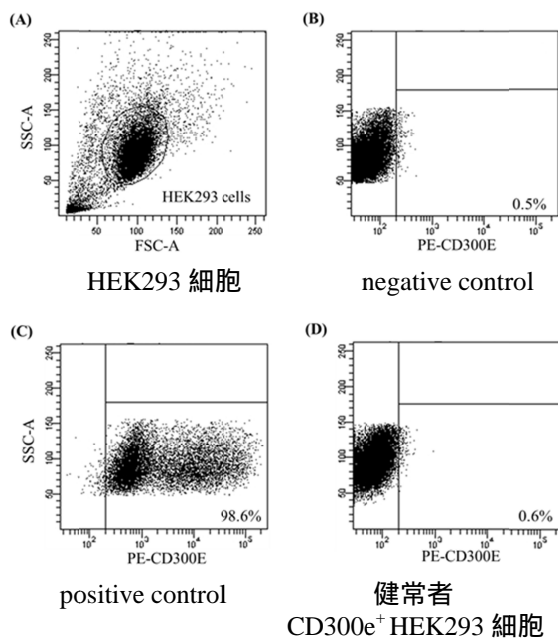


図 3. 抗 LGALS3 抗体価(ELISA 法)の結果

(3) 抗 CD300e 抗体、特異性の検討

CD300e 遺伝子をトランスフェクションした HEK293 細胞(CD300e⁺ HEK293 細胞)を、劇症 1 型糖尿病患者急性期および健常者の血清、PE-IgG(2 次抗体)と反応させた後、フローサイトメトリーにより PE-CD300e⁺ HEK293 細胞数の測定をおこなった。その結果、劇症 1 型糖尿病患者急性期の血清と反応させた CD300e⁺ HEK293 細胞において、健常者血清を用いたものより多くの PE-CD300e⁺ HEK293 細胞を確認できた(図 4)。



劇症 1 型糖尿病患者 2 名(E と F)の急性期 CD300e⁺ HEK293 細胞
図 4. FACS 結果

これらの事実から、ELISA 法により測定した抗 CD300e 抗体価の特異性を証明することができた。

(4) ROC 解析

ELISA 法で得られた抗 CD300e 抗体価の結果から、劇症 1 型糖尿病患者急性期と健常者において ROC 解析を行ったところ、感度は 73.1%、特異度は 87.1%であった。また、劇症 1 型糖尿病患者急性期と自己免疫性 1 型糖尿病患者において ROC 解析を行ったところ、感度は 81.3%、特異度は 65.4%であった。(図 5)

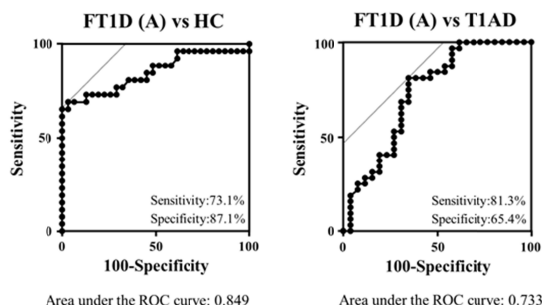


図 5. ROC 解析の結果

今回の研究では、早期診断をするための特異的血清マーカーが存在しなかった劇症 1 型糖尿病患者の急性期血清において上昇する新規抗体、抗 CD300e 抗体を明らかにした。抗 CD300e 抗体は、マクロファージの遊走能や自己応答性 T 細胞の免疫応答を調節することが報告されており、この抗体が認識する抗原蛋白の機能解明に成功すれば、早期診断だけではなく、予防・予知・治療への応用に大きく貢献することが期待される。

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)

1. Haseda F, Imagawa A, Nishikawa H, Mitsui S, Tsutsumi C, Fujisawa R,

Sano H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T. Antibody to CMRF35-Like Molecule 2, CD300e A Novel Biomarker Detected in Patients with Fulminant Type 1 Diabetes. PLoS One. 2016 Aug 11;11(8):e0160576

(4)研究協力者
()

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 長谷田 文孝、西川 博嘉、三井 しのぶ、堤 千春、藤澤 玲子、佐野 寛行、三柴 裕子、寺前 純吾、坂口 志文、花房 俊昭、今川 彰久：「劇症 1 型糖尿病患者急性期血清において上昇を認めた新規抗体、抗 CD300e 抗体」 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018 年 5 月 24-26 日、東京国際フォーラム（東京）

〔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

花房 俊昭 (Hanafusa Toshiaki)
大阪医科大学医学部 名誉教授
研究者番号：60164886

(2)研究分担者

佐野 寛行 (Sano Hiroyuki)
大阪医科大学医学部 助教
研究者番号：205564345

(3)連携研究者

()

研究者番号：