

平成 21 年 3 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790642
 研究課題名 (和文) 1 型糖尿病の早期発見・治療を介して患者予後改善に資する発症予知システムの構築
 研究課題名 (英文) The development of prevention system for type 1 diabetes.

研究代表者
 馬場谷 成 (BABAYA NARU)
 近畿大学・医学部・講師
 研究者番号：10449837

研究成果の概要：1 型糖尿病は難治性疾患であり、早期発見・早期治療のための方策が必須である。本研究では、1 型糖尿病予知 (早期発見) システムの構築を目的とし、1 型糖尿病診断前より検出されるインスリン抗体の、より高感度な検出法を確立し報告した。また同様に、1 型糖尿病において検出される IA-2 抗体の、より高感度な検出法の開発を継続中である。これらと、DNA 遺伝情報を組み合わせることで、より適切な早期発見のための方策を検討した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2008 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 270,000 | 3,570,000 |

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：糖尿病学

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は一旦発症するとインスリンを投与しない限り生命を維持できない難治性疾患である。頻回のインスリン治療を行っても、糖尿病の慢性合併症による失明、神経障害、腎不全の発症は避けがたく、人生の質は著しく障害され、生命予後も健常人に比し不良である。これらの問題を解決し、健常人と同様の生涯を全うさせるためには、1 型糖尿病の早期発見・早期治療のための方策が必須である。1 型糖尿病は、インスリン産生細胞である膵ラ氏島の β 細胞に対する臓器特異

的自己免疫疾患であり、T 細胞を中心とした自己免疫反応により膵 β 細胞が破壊され、絶対的なインスリン欠乏に陥り糖尿病を発症する。現状では、1 型糖尿病と診断され治療を開始した時点で、既に健常人の約 20% 程度にまで β cell mass が低下しており、 β cell の再生が困難な現状では、手遅れ感が否めない。

2. 研究の目的

本研究では、1 型糖尿病の予知・予防・早期発見・早期治療を介して患者予後改善に資する 1 型糖尿病予知システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新たなインスリン抗体検出法の開発

インスリン抗体測定は、現在では非常に困難な糖尿病症状出現前の 1 型糖尿病をとらえる最も有用な手段と考えられている。現在使用されている方法は RIA 法であり、より高感度かつ簡便で汎用性の高い ELISA 法の確立が望まれている。

本研究では、開発に成功しているマウスにおけるインスリン抗体の ELISA 法による測定をより高感度かつ特異性の高い検査法に改良するとともに、ヒトへの応用展開を進めた。さらに、ヒトにおける抗 IA-2 抗体の ELISA による高感度かつ簡便な検出法の開発をすすめた。

(2) 新たなストラテジー “B cell ELISpot 法” の開発

“B cell ELISpot 法” は、自己抗体を産生する B cell そのものを取り出して ex vivo で産生される自己抗体を直接測定するという方法である。本法を用いることにより、膵島抗原に対する抗体が多く作られている状態（1 型糖尿病の病態が完成した状態）のみならず、発症前の超早期（B cell が、膵島浸潤 T cell からのシグナルを受け、膵島抗原に対する抗体を作り始める時期、インスリン自己抗体の「超微細」産生状態）に陽性所見をとることが可能となる。

本研究では、インスリン抗体産生トランスジェニックマウスの脾細胞から抽出した B 細胞を対象とした “B cell ELISpot 法” の条件設定を行った。また、1 型糖尿病モデルマウス（NOD マウス）を対象に測定系の開発を進めた。

(3) 1 型糖尿病発症予知システムの構築

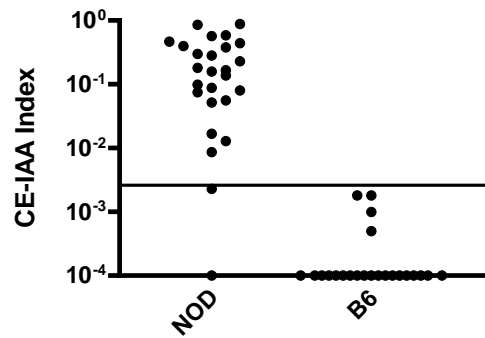
Profile の洗練された日本人 1 型糖尿病患者の血清・DNA を収集し、疾患感受性遺伝子の遺伝子タイピングの標準パネルの作製を進めた。

4. 研究成果

(1) 新たなインスリン抗体検出法の開発

①マウスのインスリン抗体 ELISA アッセイ系に関して、種々の改良を加えて測定系として確立した。

CE-IAA Sensitivity 92%, Specificity 100%



RIA-IAA Sensitivity 72%, Specificity 100%

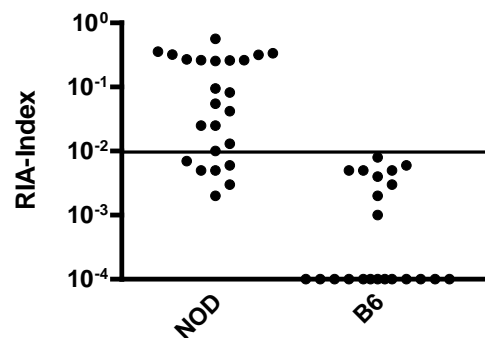


図1 New ELISA assay (CE-IAA、上図) and previous RIA assay (下図) (Babaya N, et al., Diabetes Technology and Therapeutics, in pressより引用)

②ヒトにおけるインスリン抗体の検出に関しては、ELISA条件、すなわちELISAプレートの選定、アナログインスリンなどの各種インスリン、ブロッキング剤の選定、各種抗ヒト免疫グロブリン抗体などで検討し改良を進めている。

ヒトにおける抗IA-2抗体（図2）に関しては、1 型糖尿病患者では、従来法である R I A 法と有意な相関が得られているが、健常コントロールでは一部の例において、E L I S A 法でfalse-positiveが検出されており、今後改良を加える必要がある。

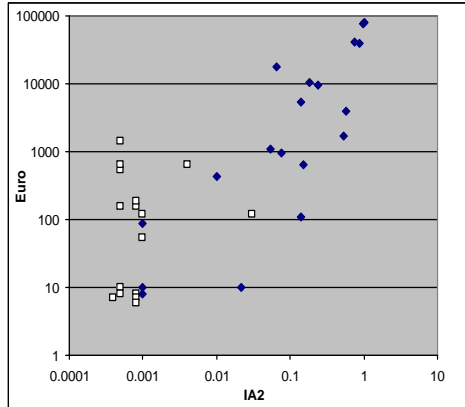


図2 抗体IA2抗体(ヒト)
(X軸RIA、Y軸ELISA)
(◆1型糖尿病発症前、□コントロール)

(2) 新たなストラテジー“B cell ELISpot法”の開発

B cell ELISpot法の開発においては、実験システムの立ち上げを行った。また、インスリン抗体産生トランスジェニックマウス (INSAb-TG) が、in vitroでもインスリン抗体を産生することが判明した(表1)。

表1 ELISA plateにて3日間脾細胞を培養し、上澄み液のインスリン抗体を測定(RIA)

| | | | |
|----------|---------------------|--------|-------|
| INSAb-TG | 細胞数 10^6 | LPS(+) | 0.183 |
| | | LPS(-) | 0.027 |
| | 細胞数 3×10^4 | LPS(+) | 0.013 |
| | | LPS(-) | 0.001 |
| B6 | 細胞数 10^6 | LPS(+) | 0.000 |
| | | LPS(-) | 0.002 |
| | 細胞数 3×10^4 | LPS(+) | 0.000 |
| | | LPS(-) | 0.000 |

B6:C57BL/6マウス

このポジティブコントロール (INSAb-TG) を用いて、1型糖尿病モデルマウス (NODマウス) への応用展開、およびELISpot assayの条件設定をおこなった。

(3) 1型糖尿病発症予知システムの構築

疾患感受性遺伝子の解析を継続して進めるとともに、遺伝子タイピング標準パネルの作製を行った。臨床情報の詳細が明らかな症例を対象に遺伝子型の決定、ならびに抗GAD抗体、

抗インスリン抗体、抗IA-2抗体の測定を進め、遺伝子型と自己抗体の相関パネル作製を進めた。

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8件)

- ① Babaya N (他5名、1番目)、Murine high Specificity/Sensitivity Competitive Europium Insulin Autoantibody Assay (CE-IAA)、*Diabetes Technology and Therapeutics*、査読有、in press
- ② Babaya N (他5名、4番目)、Congenic mapping of the MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in the NOD mouse: at least two genes contribute to the Idd16 effect、*Ann N Y Acad Sci*、査読有、1150、2008、90-92
- ③ Babaya N (他4名、3番目)、Genetic Basis of Type 1 Diabetes: Similarities and Differences between East and West、*Rev Diabet Stud*、査読有、5、2008、64-72
- ④ 馬場谷成 (他13名、8番目)、自己免疫疾患の臓器特異性に関する研究: 自己免疫性甲状腺疾患における睥島自己免疫・糖尿病発症とHLAの関連、*近畿大医誌*、査読有、33、2008、13
- ⑤ Babaya N (他11名、6番目)、Fatty liver and obesity: phenotypically correlated but genetically distinct traits in a mouse model of type 2 diabetes、*Diabetologia*、査読有、50、2007、1641-1648
- ⑥ 馬場谷成 (他4名、1番目)、インスリン遺伝子コピー数と耐糖能: インスリン遺伝子KOマウスを用いた検討、*Diabetes Frontier*、査読有、18、2007、431
- ⑦ 馬場谷成 (他3名、2番目)、1型糖尿病の遺伝解析: モデル動物とヒト両面からのアプローチ、*Diabetes Frontier*、査読有、18、2007、419
- ⑧ 馬場谷成 (他10名、6番目)、NSYマウスにおける耐糖能関連遺伝子座 (Nidd1n) のコンジュニック解析、*Diabetes Frontier*、査読有、18、2007、411

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① 馬場谷成、2 型糖尿病の機能遺伝学：コンソミックーコンジェニック解析による多因子の機能分割を用いた検討、第 23 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2009 年 2 月 13 日、岡山
- ② 能宗伸輔、コンジェニックマッピングを用いた NOD マウスの遺伝素因の解明、第 23 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2009 年 2 月 13 日、岡山
- ③ Babaya N、Genetic dissection and reconstitution of type 2 diabetes phenotypes using single and double consomic strains、The 22nd International Mammalian Genome Conference、2008 年 11 月 4 日、Prague
- ④ 能宗伸輔、複数の自己免疫疾患に対する疾患感受性遺伝子 FCRL3 と 1 型糖尿病との関連解析、第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008 年 7 月 25 日、神戸
- ⑤ 守口将典、自己免疫疾患の臓器特異性に関する研究：自己免疫性甲状腺疾患における膵島自己免疫・糖尿病発症と HLA の関連、第 64 回近畿大学医学会、2008 年 7 月 5 日、大阪狭山
- ⑥ 守口将典、自己免疫疾患の臓器特異性に関する研究：自己免疫性甲状腺疾患における膵島自己免疫・糖尿病発症と HLA の関連、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 23 日、東京
- ⑦ 廣峰 義久、インスリン治療のテーラーメイド化へむけての検討：食後血糖コントロールにおけるレギュラーインスリンと超速効アナログインスリンの比較、第 105 回日本内科学会総会、2008 年 4 月 13 日、東京
- ⑧ Hiromine Y、Congenic mapping of the MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in the NOD mouse: at least two genes contribute to the Idd16 effect、The 9th International Congress of the Immunology of Diabetes Society and American Diabetes Association Research

Symposium、2007 年 11 月 14 日、Miami

- ⑨ 守口将典、自己免疫疾患の臓器特異性に関する研究：自己免疫性甲状腺疾患における膵島自己免疫の特徴及び糖尿病発症に関する検討、第 5 回 1 型糖尿病研究会、2007 年 10 月 13 日、和歌山県伊都郡
- ⑩ 馬場谷成、アナログインスリンとヒトインスリンの使い分け、第 1 回大阪南サイエンス、2007 年 9 月 13 日、堺
- ⑪ 伊藤裕進、同一施設 567 例におけるメトホルミンの有効性と安全性に関する検討、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 26 日、仙台
- ⑫ 守口将典、自己免疫疾患の臓器特異性に関する研究：自己免疫性甲状腺疾患における膵島自己免疫の病態ならびに背景因子、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 25 日、仙台
- ⑬ 小林美里、2 型糖尿病モデル NSY マウスの Niddln 存在領域：コンジェニックを用いた解析、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日、仙台

〔図書〕（計 1 件）

- ① 馬場谷成（他 1 名、1 番目）、メディカ出版、糖尿病合併症まるわかり事典、2008、8-12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場谷 成 (BABAYA NARU)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10449837

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：