

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591064

研究課題名（和文）1型糖尿病の新規自己抗原を用いた発症・進展予知法の開発

研究課題名（英文）Development of predictive marker for the progression of type 1 diabetes using a newly discovered autoantigen

研究代表者

川崎 英二 (KAWASAKI EIJI)

長崎大学・病院・准教授

研究者番号：70336171

研究成果の概要（和文）：GAD 抗体陽性 NIDDM の前向き調査により、GAD 抗体の抗体価が高い場合、GAD65 中央部分のエピトープを認識する場合、他の膵島関連自己抗体（インスリン自己抗体、IA-2 抗体、ZnT8 抗体）の重複陽性が早期インスリン治療開始の予知因子であることおよび、他の膵島関連自己抗体の重複陽性が最も強い独立した進展予知因子であることが明らかになった。また、ZnT8 抗体エピトープ解析により、発症年齢によって ZnT8 に対する液性免疫反応の違いが証明された。

研究成果の概要（英文）：In the prospective study of GAD autoantibody-positive NIDDM, the high levels of GAD autoantibody, the GAD65 middle epitope recognition, and positivity of other anti-islet autoantibodies (insulin autoantibody, IA-2 autoantibody, and ZnT8 autoantibody) were identified as predictive markers for the progression of insulin deficiency. Furthermore, multivariate logistic regression analysis of the likelihood of requiring insulin showed that only the presence of multiple islet autoantibodies was a significant predictor. Moreover, the difference of humoral autoimmune reaction to ZnT8 was proven by age of diabetes onset by the ZnT8 autoantibody epitope analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
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：1型糖尿病、自己抗体、自己抗原、亜鉛、一塩基多型、劇症1型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は細胞傷害性 T 細胞により膵 β 細胞が破壊されインスリンの絶対的不足に陥る自己免疫疾患で、これまでに我々は日本人 1 型糖尿病および他の自己免疫疾患における膵島関連自己抗体 (IAA, GAD65 抗体、IA-2 抗体) の臨床的意義や標的抗原エピトープの

検討に精力的に取り組み、自己免疫性 (1A 型) 糖尿病の診断および病型分類、発症・進展過程における膵島関連自己抗体解析の有意性について世界に向けて発信してきた。1 型糖尿病は臨床的に劇症型、急性発症型、緩徐発症型の病型がありそれぞれ病因は異なっていると推定されている。国外では、膵島

関連自己抗体の組み合わせ解析による高リスク者の同定に基づいた急性発症 1 型糖尿病の発症予防介入試験 (DIPP、DPT-1 など) や緩徐発症 1 型糖尿病 (別名 LADA) の自然史の解析ならびに熱ショック蛋白ペプチド (DiaPep277) や GAD65 を用いた進展予防介入試験の多施設共同研究が進められている。

しかし、これまでの膵島関連自己抗体の 1A 型糖尿病の診断、発症予知における限界も指摘され、第四の膵島自己抗原の発見が待たれていた。John Hutton (Barbara Davis Center for Childhood Diabetes, USA) らは、2007 年に 1 型糖尿病の新規自己抗原として膵 β 細胞に特異的に発現する亜鉛トランスポーター (ZnT8) を同定し、その自己抗体 (ZnT8 抗体) が GAD65 抗体、インスリン自己抗体 (IAA)、IA-2 抗体と独立した 1 型糖尿病の自己抗体であること、さらに 1 型糖尿病の第 1 度近親者における検討で 1 型糖尿病の優れた発症予知マーカーであることを明らかにした (PNAS 104: 17040-17045, 2007)。

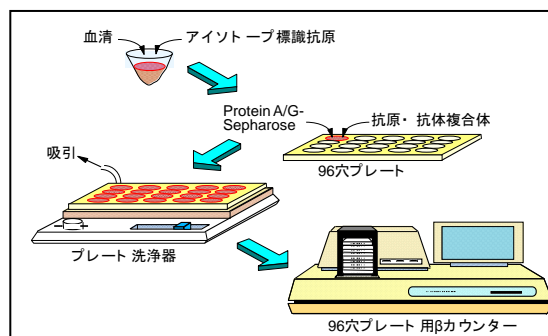
2. 研究の目的

1 型糖尿病や他の自己免疫疾患における免疫療法をめざましい進歩の一方で、治療対象者を適確に選定できる液性免疫および細胞性免疫指標の開発が望まれている。1 型糖尿病における自己免疫現象のひとつに膵島関連自己抗体があり、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD65)、チロシンホスファターゼ関連蛋白 (IA-2) がその標的抗原とされていた。近年、膵 β 細胞に特異的に発現し亜鉛のホメオスターシスの調節機構に携わるトランスポーター (ZnT8) に対する自己抗体 (ZnT8 抗体) が GAD65 抗体、インスリン自己抗体 (IAA)、IA-2 抗体と独立した 1 型糖尿病の優れた発症予知・診断マーカーであることが明らかにされたため、ZnT8 抗体の 1 型糖尿病および他の自己免疫疾患における免疫反応を網羅的に解析することで、1 型糖尿病の発症・進展予知のための高感度予知法を開発し、進展阻止への応用を行うことを目的とし、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ZnT8 抗体測定系の確立と疾患特異性の検討: ヒト ZnT8 cDNA を用い、我々の開発した radioligand binding assay により ZnT8 抗体の高感度測定系を確立した。具体的には、まず完全鎖長ヒト ZnT8 cDNA よりいろいろな長さの fragment を PCR 法にて増幅し、発現ベクターに挿入した。次に、*in vitro* transcription/translation 法により ^{35}S 標識 ZnT8 蛋白を作成し、radioligand binding assay にて健常人、1 型糖尿病、他の自己免疫疾患患者血清との反応性を検討した。自己抗体のカットオフ値は、健常人血清における

結合率の 99 パーセントイルを用いた。



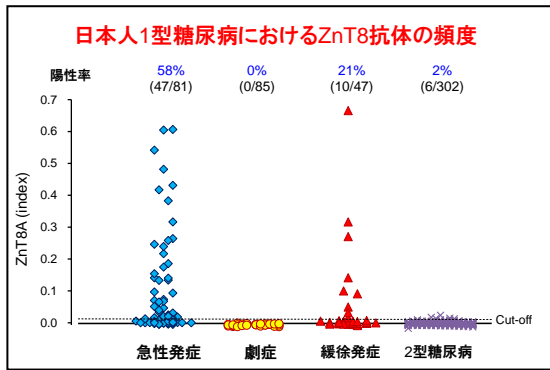
(2) ZnT8/ZnT3 キメラ蛋白の作成と ZnT8 抗体エピトープの解析: 他の膵島関連自己抗体の場合のように、1 型糖尿病患者の自己抗体が ZnT8 の立体構造を認識する可能性がある。そこで、立体構造を保持するために ZnT8 と相同性が高いが ZnT8 抗体に認識されない ZnT3 とのキメラ蛋白を作成し、1 型糖尿病発症時および発症後の ZnT8 抗体エピトープの経時的変化を検討した。具体的には、まずヒト ZnT3 cDNA をヒト脳 cDNA より PCR 法にて増幅し、ベクターに挿入した。次に ZnT3 および ZnT8 の N 末端、膜貫通部、C 末端部の cDNA をそれぞれ PCR で増幅し、ZnT8/ZnT3 キメラ cDNA を作成、発現ベクターに挿入した。さらに、radioligand binding assay にて、1 型糖尿病の病型や臨床的特徴と ZnT8 抗体エピトープの関連を検討した。

(3) 1 型糖尿病の進展予知因子の検討: 約 3,000 名の 2 型糖尿病患者における GAD 抗体のスクリーニングにより同定された約 50 名の GAD 抗体陽性 NIDDM 患者を対象に前向き調査し、早期インスリン治療開始 (インスリン分泌不全状態への進展) の予知因子を検討した。

4. 研究成果

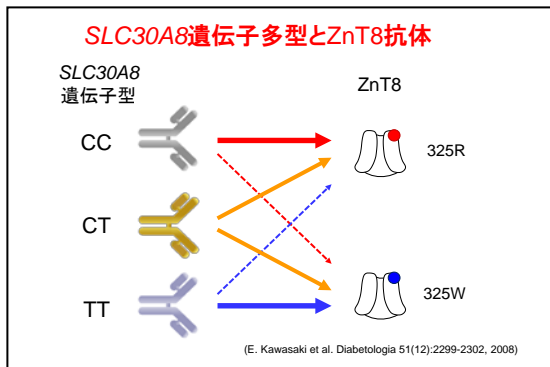
(1) ZnT8 抗体測定系の確立
PCR 法により増幅した ZnT8 の cDNA をいくつかの発現ベクターに挿入し、*in vitro* transcription/translation 法により ^{35}S 標識 ZnT8 蛋白の標識効率を検討したところ、pTnT において最も高い標識効率を得られたため、radioligand binding assay には、ZnT8-pTnT を用いた。ZnT8 抗体のカットオフ値を決定するため 139 サンプルの健常血清における結合率を検討し、99 パーセントイルによりカットオフ値を決定した。次に、劇症 1 型糖尿病、急性発症 1 型糖尿病、緩徐発症 1 型糖尿病、2 型糖尿病血清との反応性を検討した結果、陽性率はそれぞれ、0%、58%、20%、2%であり、1 型糖尿病において感度は高いが病型によって異なることが明らかになった。また、発症年齢が若いほど

陽性率は高値であった（10歳未満の陽性率70%）。



(2) ZnT8 抗体の特異性と遺伝子多型の関連についての検討

ZnT8 遺伝子 (*SLC30A8*) の Arg325Trp 多型は、2 型糖尿病疾患感受性 SNP であるが、同時に ZnT8 抗体の認識部位に存在している。そこで、ZnT8 の 325Trp、325Arg、およびその hybrid cDNA を用いて、1 型糖尿病患者の Arg325Trp 多型と ZnT8 への反応性について検討した。その結果、Arg325Trp 多型は、ZnT8 抗体の結合性に強い関連を示し、本多型が ZnT8 抗体の特異性を決定していることが明らかになった。



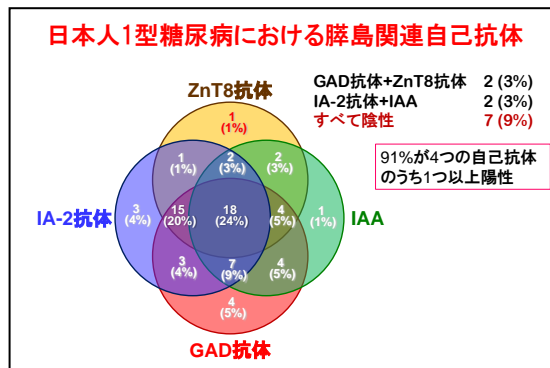
(3) ZnT8/ZnT3 キメラ蛋白の作成と ZnT8 抗体エピトープの解析

立体構造を保持するために ZnT8 と同一性が高いが ZnT8 抗体に認識されない ZnT3 とのキメラ蛋白を、ZnT3 の細胞内部分および ZnT8 の細胞内部分の cDNA を用いて作成した。得られた ZnT8/ZnT3 キメラ cDNA を用いて *in vitro* transcription/translation 法により ZnT8 抗体エピトープの解析を行った。その結果、1 型糖尿病患者では、主に 2 つの主要なエピトープがあること、および発症年齢によって ZnT8 抗体エピトープの違いが認められた。

(4) ZnT8 抗体と 1 型糖尿病の臨床像に関する検討

1 型糖尿病 114 例の血清における ZnT8 との反応性と 1 型糖尿病の発症年齢、病型と ZnT8 抗体陽性率および HLA-DR との関連

を解析した。その結果、対象における ZnT8 抗体の陽性率は 50%であり、他の膵島関連自己抗体の陽性率は GAD 抗体 82%、IA-2 抗体 58%、IAA 55%であった。また、この 4 つの膵島関連自己抗体を組み合わせると、94%がひとつ以上の自己抗体が陽性であった。さらに、ZnT8 抗体の陽性率は小児期発症 1 型糖尿病で高く、発症年齢と陽性率は逆相関を示した。また、ZnT8 抗体価と HLA-DR4 コピー数との逆相関が見られた。



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 28 件)

1. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kobayashi M, Kuwahara H, Abiru N, Yamasaki H, Matsuura N, Miura J, Uchigata Y, Eguchi K. Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. Clin Immunol、査読 有、138、2011、146-153
2. Nakamura K, Kawasaki E, Abiru N, Jo O, Fukushima K, Satoh T, Kuriya G, Kobayashi M, Kuwahara H, Yamasaki H, Ide T, Eguchi K. Trajectories of anti-islet autoantibodies before development of type 1 diabetes in interferon-treated hepatitis C patients. Case reports and a literature review. Endocr J、査読 有、57、2010、947-951
3. Horie I, Kawasaki E, Shimomura A, Satoh T, Ueki I, Kuwahara H, Ando T, Abiru N, Usa T, Eguchi K. Emergence of anti-islet autoantibodies in Japanese patients with type 1 diabetes. Endocr J、査読 有、57、2010、623-628
4. Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kuwahara H, Kobayashi M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K. Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2,

and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. J Clin Endocrinol Metab、査読 有、95、2010、707-713

5. Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Fujishima K, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Wenzlau JM, Davidson HW, Hutton JC, Eguchi K. Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes. Diabetologia、査読 有、51、2009、2299-2302
6. Kawasaki E, Kuriya G, Satoh T, Fujishima K, Moriuchi A, Fukushima K, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K. Humoral immune response to islet autoantigens in Japanese patients with type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci、査読 無、1150、2008、248-251

[学会発表] (計 19 件)

1. 川崎英二. 1型糖尿病の遺伝因子と膵島抗原・自己抗体. 第45回糖尿病学の進歩、2011.2.18-19、福岡市
2. 川崎英二. GAD抗体陽性NIDDMにおける進展予知マーカーの検討. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010.5.27-29、岡山市
3. Kawasaki E. Zinc transporter 8 autoantibodies in patients with three forms of Japanese type 1 diabetes. 70th American Diabetes Association Scientific Sessions、2010.6.25-29、オランダ、米国
4. 川崎英二. 1型糖尿病の成因と分類. 第44回糖尿病学の進歩、2010.3.5-6、大阪市
5. Kawasaki E. Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. The 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society、2010.10.31-11.3、インチョン、韓国
6. 川崎英二. 1型糖尿病における亜鉛トランスporter-8 (ZnT8) 抗体の検討. 第48回日本糖尿病学会九州地方会. 2010.10.29-30、別府市
7. 川崎英二. 亜鉛トランスporter (ZnT8) の一塩基多型と1型糖尿病の診断. 第20回日本微量元素学会学術集会、2009.7.2-3、東京都
8. 川崎英二. 1型糖尿病における ZnT8 抗体の臨床的有用性の検討. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会、2009.5.21-24、大阪

市

9. Kawasaki E. ZnT8 autoantibodies in patients with three forms of Japanese type 1 diabetes. 10th International Congress of the Immunology of Diabetes Society、2009.5.17-20、マルメ、スウェーデン
10. 川崎英二. 1型糖尿病の成因. 第43回糖尿病学の進歩、2009.2.20-21、松本市
11. Kawasaki E. Anti-islet autoantibodies in Japanese type 1 diabetes. The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus、2009.11.2-021、チェジュ島、韓国
12. 川崎英二. GAD抗体陽性NIDDMにおける進展予知マーカーの検討. 第47回日本糖尿病学会九州地方会、2009.10.23-24、北九州市
13. Kawasaki E. Association between anti-ZnT8 autoantibodies and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese type 1 diabetes. 44th Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes (EASD)、2008.9.7-11、ローマ、イタリア
14. 川崎英二. 遺伝因子と膵島関連自己抗体の新展開. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008.5.22-24、東京都
15. 川崎英二. 膵島抗原と自己抗体の意義. 第46回日本糖尿病学会九州地方会、2008.10.10-11、久留米市

[図書] (計 20 件)

1. 川崎英二. 診断と治療社、糖尿病の療養指導 2010、2010、pp. 1-4
2. 川崎英二. 診断と治療社、糖尿病の療養指導 2009、2009、pp.87-91
3. 川崎英二. 診断と治療社、糖尿病の療養指導 2008、2008、pp.132-136
6. 研究組織
(1) 研究代表者
川崎 英二 (KAWASAKI EIJI)
長崎大学・病院・准教授
研究者番号：70336171
(2) 研究分担者
阿比留教生 (ABIRU NORIO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：00380981
(3) 連携研究者
なし