

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591127

研究課題名（和文） 劇症1型糖尿病と自己免疫性膵炎に認められる膵特異的自己抗体の意義と臨床応用

研究課題名（英文） Characterization of autoantibody against Amylase  $\alpha$ -2A in patients with fulminant type 1 diabetes mellitus and autoimmune pancreatitis, and its clinical use.

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（和文）：劇症1型糖尿病において Amylase  $\alpha$ -2A (AMY)に対する自己抗体が産生され、これを高感度・高特異的に検出して、本疾患の迅速診断を試みてきた。今回合成ペプチドを作成し、これらを抗原とする ELISA 系を構築し、さらに AMY をマウスに免疫しその病因を検討した。その結果、AMY の C 端側より相当する部位のペプチド7を用いた時に、本症をより高感度・高特異的に検出できることが判明した。また、AMY 免疫マウスではリンパ球浸潤を伴う膵炎が惹起された。

研究成果の概要（英文）：Fulminant type 1 diabetes mellitus (FT1DM) is a subtype of T1DM, which frequently induces diabetic ketoacidosis. However, no useful marker for rapid diagnosis of FT1DM exist. We reported that patients with FT1DM have an autoantibody against Amylase  $\alpha$ -2A (AMY), and developed a enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting the antibody. Because background in the system is relatively high, so, we have improved ELISA using synthetic peptide corresponding AMY as a new antigen. When we employed peptide-7 as an antigen, we obtained good results for detecting AMY autoantibody from patients with FT1DM (sensitivity 94.3%, specificity 93.7% by ROC analysis), which might applicable for clinical use for rapid diagnosis of FT1DM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

劇症1型糖尿病は急激に発症する極めて重篤な糖尿病であり、その迅速な診断法の確立及び成因の解明が急務である。本疾患では GAD 抗体は通常陰性であり、グリコヘモグロビン A1c も正常域にあるため、診断に難渋することも多く、有用なマーカーも存在していなかった。申請者

らは本疾患において Amylase  $\alpha$ -2A (AMY)に対する自己抗体が産生され、この検出が診断に寄与する可能性を報告してきたが、比較的 background が高く、低力価抗体の検出に難があり、より高感度に検出可能なように測定系の改良が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では AMY 自己抗体検出による劇症 1 型糖尿病の迅速診断法を確立し、発症早期の病態を詳細に把握・解析し、さらに AMY をマウスに免疫することにより本症発症機序における AMY 自己抗体の意義を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

従来 Human Amylase  $\alpha$ -2A のアミノ酸 No. 299 より No.512 に相当する部位を抗原として ELISA 法を実施して来たが、バックグラウンド値が高く、測定プレートや測定緩衝液等を検討したが、上記抗原自体に非特異結合が認められるとの結論に至った。そこで、Human Amylase  $\alpha$ -2A (No. 299・No.512) に相当する種々の合成ペプチドを作成し、これらを抗原とする ELISA を実施し、より高感度・高特異性の測定系を確立する。また、併せて劇症 1 型糖尿病患者の AMY 自己抗体のエピトープの解析を検討を行う。

さらに AMY(299-512)をマウスに免疫し、膵形態、耐糖能、インスリン分泌能などを検討することにより、その意義につき検討する。

## 4. 研究成果

AMY 自己抗体検出のための ELISA (原法)ではヒト AMY の No. 299 より No.512 アミノ酸に相当するリコンビナント蛋白を抗原として使用していた。今回、これらを N 末端より 21~25 アミノ酸より構成される 9 領域に分割し、各々に相当するペプチドを合成した (ペプチド No.1~No.9)。No.1~No.9 ペプチドを抗原として用いた ELISA の結果を図 1 に示す。

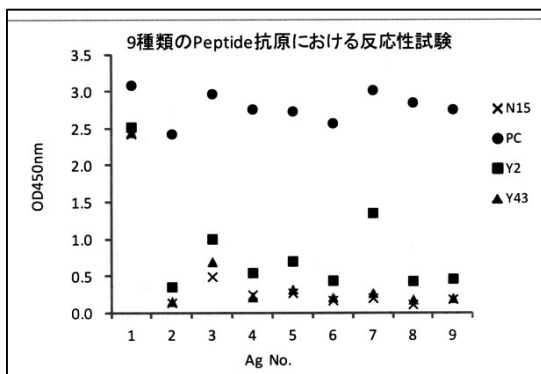


図 1

横軸には使用した合成ペプチドのナンバー (Ag No.) を、立て軸は吸光度を示す。PC: 高力価陽性患者血清、Y2: 中力価陽性患者血清、Y43: 陰性患者血清、N15: 正常血清

ペプチド No.1, No.3 は非特異的結合が強く、この領域が ELISA (原法) での backbroud 高値に関与していることが推定された。一方、ペプチド No.2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 を用いた ELISA では、いずれも高力価陽性血清 (PC) で高値を示したが、その titer は各々のペプチドで異なり、エピトープが広く分布していることが判明した。一方、中力価陽性血清用いた場合、ペプチド No.7 抗原のみに反応しており、他のペプチドでの反応は認められなかった。このことは、同じ AMY 自己抗体陽性劇症 1 型糖尿病患者でも、エピトープが異なることを示している。

以上の結果より、ペプチド-7 を抗原として用いた結果が ELISA (原法) とよく一致しており、以後ペプチド-7 を使用して検討を行うことに決定した。そこで、原法確立の際使用した血清を用いて再検討を行ったところ、劇症 1 型糖尿病患者中の自己抗体を、高感度・高特異的に検出できることが判明した (感度 94.3%, 特異度 93.7%)。

以上の結果より、合成ペプチドを用いることにより劇的にバックグラウンド値が低下し、十分臨床応用可能なレベルとなった。また、本症患者での AMY 自己抗体は C 端側近傍にあることが判明した。

一方、AMY 免疫マウスでは 2 ヶ月後、リンパ球浸潤を伴う膵炎、膵島周囲炎が観察されたリンパ球は主に膵管周囲や膵島周囲に存在し、病初期である可能性が示唆された。この時点では空腹時血糖や糖負荷後の血糖に免疫群とコントロール群に有意な差は存在せず、免疫方法や免疫後の期間などをさらに検討すべきと考えられた。

## 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 8 件)

- (1) Toyoshi Endo, Tetsuro Kobayashi. Thyroid-specific gene expression in chondrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 416: 227-231, 2011. 査読有
- (2) Nakamura K, Kawasaki E, Imagawa A, Awata T, Ikegami H, Uchigata Y, Kobayashi T, Shimada A, Nakanishi K, Makino H, Maruyama T, Hanafusa T, Type 1 Diabetes and Interferon Therapy: A nationwide survey in Japan.; the Research Committee on Type 1 Diabetes of the Japan Diabetes Society. Diabetes Care 34:2084-2089, 2011. 査読有

- (3) Kaoru Aida, Yoriko Nishida, Shoichiro Tanaka, Taro Maruyama, Akira Shimada, Takuya Awata, Masako Suzuki, Hiroki Shimura, Soichi Takizawa, Masashi Ichijo, Daiichiro Akiyama, Fumihiko Furuya, Akio Kawaguchi, Masahiro Kaneshige, Jun Itakura, Hideki Fujii, Toyoshi Endo, and Tetsuro Kobayashi. RIG-I- and MDA5-Initiated Innate Immunity Linked With Adaptive Immunity Accelerates  $\beta$ -Cell Death in Fulminant Type 1 Diabetes. *Diabetes* 60: 884-889, 2011. 査読有
- (4) Toyoshi Endo and Tetsuro Kobayashi. Runx2 Deficiency in Mice Causes Decreased Thyroglobulin Expression and Hypothyroidism. *Molecular Endocrinology* 24: 1267-1273, 2010. 査読有
- (5) 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 glycated albumin to haemoglobin A1C ratio can distinguish fulminant type 1 diabetes mellitus from type 2 diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 47: 313 - 317, 2010. 査読有
- (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* 58: 732-737, 2009. 査読有
- (7) Takuya Awata, Eiji Kawasaki, Shoichiro Tanaka, Hiroshi Ikegami, Taro Maruyama, Akira Shimada, Koji Nakanishi, Tetsuro Kobayashi, Hiroyuki Iizuka, Miho Uga, Yumiko Kawabata, Yasuhiko Kanazawa, Susumu Kurihara, Masataka Osaki, Shigehiro Katayama on behalf of the Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics; Association of Type 1 Diabetes with Two Loci on 12q13 and 16p13 and the Influence Coexisting Thyroid Autoimmunity in Japanese.; *J Clin. Endocrinol. Metab* 94:231-235, 2009. 査読有
- (8) Eiji Kawasaki, Takuya Awata, Hiroshi Ikegami, Tetsuro Kobayashi, Taro Maruyama, Koji Nakanishi, Akira Shimada, Miho Uga, Susumu Kurihara, Yumiko Kawabata, Shoichiro Tanaka, Yasuhiko Kanazawa, Katsumi Eguchi, and the Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics; Genetic Association between the Interleukin-2 Receptor- $\alpha$  Gene and Mode of Onset of Type 1 Diabetes in the Japanese Population; *J Clin Endocrinol Metab* 94: 947-952, 2009. 査読有
- [学会発表] (計7件)
- (1) 徳永あゆみ, 西尾博, 早田敏, 今川彰久, 下村伊一郎, 小林哲郎, 花房俊昭, 日本糖尿病学会1型糖尿病調査研究委員会 : 劇症1型糖尿病症例における腹部MRI所見についての検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011/5/21 札幌市
- (2) 西田頼子, 会田薫, 田中昌一郎, 丸山太郎, 島田朗, 栗田卓也, 小林哲郎. : 劇症1型糖尿病瘵(FT1D)における自然免疫/獲得免疫関連分子の発現 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011/5/21 札幌市
- (3) 会田薫, 西田頼子, 田中昌一郎, 丸山太郎, 島田朗, 栗田卓也, 小林哲郎. 劇症1型糖尿病と緩徐進行1型糖尿病の瘵: その異質性. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011/5/20 札幌市
- (4) 会田薫, 西田頼子, 田中昌一郎, 丸山太郎, 島田朗, 小林哲郎: 1型糖尿病の瘵病変: 劇症1型糖尿病と緩徐進行1型糖尿病の対比から. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010/5/27 岡山.
- (5) 青柳美帆, 志村浩己, 滝澤壮一, 高橋昌志, 山下さやか, 古屋文彦, 田中昌一郎, 遠藤登代志, 小林哲郎: 劇症1型糖尿病における自己抗体認識抗原であるアミラーゼの瘵島での発現調節機構および機能の解析. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010/5/27 岡山.
- (6) 村井潤, 古賀正史, 斎藤博, 笠山宗生, 清水一紀, 小林哲郎, 今川彰久, 花房俊昭, 日本糖尿病学会1型糖尿病調査研究委員会. 妊娠中発症の劇症1型糖尿病のGA/HbA1c比測定の有用性. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010/5/27 岡山.
- (7) 石原 千尋, 伊藤 祐子, 金重 勝博, 志村 浩己, 太田 一保, 小林 哲郎: 抗GAD抗体及びIA-2抗体ともに陽性を示した劇症1型糖尿病の1例. 第46回日本糖尿

病学会関東甲信越地方会. 横浜市.  
2009/01/24

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

滝澤 壮一 (TAKIZAWA SOUICHI)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助  
教  
研究者番号:80456467

(3)連携研究者

なし