

## 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 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591143

研究課題名（和文）1型糖尿病の発症阻止法の開発

研究課題名（英文）Development of treatment for the inhibition of type 1 diabetes

研究代表者：阿比留 教生（ABIRU NORIO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：00380981

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、膵島自己抗原投与による、制御性T細胞機能増強を介した1型糖尿病の進展阻止治療の開発である。今回、優れた1型糖尿病モデル動物であるNODマウスを用いて、膵島自己抗原+Alumアジュバントの皮下投与に、自己抗原+粘膜アジュバント；poly I:Cを用いた経鼻投与をadd-onし、発症抑制増強効果を確認した。しかし、免疫学的機序の検討では、制御性T細胞の量的増強の証拠は得られず、制御性T細胞のみならず、エフェクター細胞機能を考慮する必要があると考えられた。現在、エフェクター細胞を標的とした1型糖尿病発症抑制療法開発に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop the treatment for the inhibition of type 1 diabetes, we evaluated the combination treatments with intra-nasal (i.n.) and subcutaneous (sub-Q) autoantigen administration for diabetes inhibition in the NOD mice. The mice treated with combination of i.n. insulin B-chain peptide/polyI:C and a single sub-Q insulin peptide/Alum exhibited less development of diabetes compared to those with single subQ-peptide/Alum alone or control mice. However, such combination treatments did not alter population of regulatory T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
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：1型糖尿病，NODマウス，インスリン，経鼻免疫，polyI:C

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト1型糖尿病の発症阻止法の臨床研究

①**抗原特異的治療法**；GADとAlumアジュバントの皮下投与による、糖尿病発症直後からのβ細胞機能温存効果（N Engl J Med 2008）

②**抗原非特異的治療法**；無毒化CD3抗体；ChAglyCD3の第Ⅱ相試験にて、糖尿病発症後

のβ細胞機能温存とインスリン必要量減少効果。（N Engl J Med 2005）。抗CD20抗体も臨床治験進行中であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵島自己抗原を用いた抗原特異的免疫寛容療法を中心としたヒト1型糖尿病の進展阻止、および寛解誘導療法の開発

であり、抗原の選択、投与ルート、アジュバント、補助療法を詳細に検討し、ヒトへの臨床応用可能な、効果的で安全かつ生理的な治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) polyI:C/CMPの粘膜アジュバント効果検討

無毒化粘膜アジュバント探索として、NOD マウスへの、インスリン B 鎖ペプチド(B:9-23p) (20  $\mu$ g) と、poly I:C (10  $\mu$ g) あるいは、CMP(10  $\mu$ g)を経鼻投与し、抗体誘導について検討した。

#### (2)polyI:C/自己抗原ペプチド経鼻投与による一次予防の検討

4 週齢の雌性 NOD マウスに、B:9-23p と polyI:C を混合し、4 週齢から 10 週齢まで、計 9 回の経鼻投与を行い、48 週までの糖尿病発症率を検討する。

#### (3)抗原ペプチド-Alum皮下投与と経鼻投与のコンビネーションによる二次予防の検討

12 週齢以降の雌性 NOD マウスに対し、5 種類の候補自己抗原ペプチド (AP) (インスリン関連 3 種類、GAD 関連 2 種類、プロインスリン関連) を用いて、AP/IFA あるいは、AP/Alum アジュバントの単回皮下投与後、AP/poly I:C 経鼻投与併用を週 3 回 40 週齢まで継続し、無治療群、皮下投与単独群、皮下・経鼻併用群の 3 群間での糖尿病発症率を検討する。

#### (4) 糖尿病発症抑制機序の解明

抗原免疫により誘導された T 細胞の特徴を、フローサイトメトリー法により解析する。また、膵島での制御に関する蛋白発現を real time PCR により解析する

### 4. 研究成果

#### (1) polyI:C/CMPの粘膜アジュバント効果

NOD マウスへの B:9-23p と poly I:C、あるいは、CMP を混合し、4 週齢から 12 週齢に計 9

回の経鼻投与後、ペプチド抗体を測定し、B:9-23p+ poly I:C 投与マウスでは、コントロールマウスに比して有意に抗体価の上昇を認めた。一方、B:9-23p+CMP 投与マウスでは、抗体価の上昇はなく、B:9-23p+ poly I:C と、B:9-23p+ poly I:C+CMP 投与での抗体価の差を認めなかった。以上より、NOD マウスの AP 経鼻投与において、poly I:C は、有用な粘膜アジュバントであることが示された。

#### (2) B:9-23p/polyI:C経鼻投与による一次予防効果

4 週齢の NOD マウスへの、B:9-23p/poly I:C、B:9-23 p /CMP、B:9-23p/poly I:C/CMP の経鼻投与を行い、糖尿病発症率を検討した結果、図 1 に示すように、無治療あるいは、ペプチド単独投与のコントロールと比較して、明らかな発症抑制効果を認めなかった。

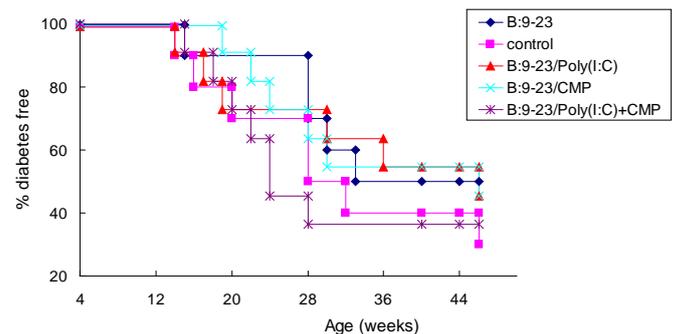


図 1 B:9-23p/アジュバント経鼻免疫での糖尿病発症率

#### (3)抗原ペプチド-Alum皮下投与と経鼻投与のコンビネーションによる二次予防効果

12 週齢雌性 NOD マウスに対し、B:9-23p/IFA を単回皮下投与を行いその後 B:9-23p/poly I:C 経鼻投与併用を週 3 回 40 週齢まで継続した結果、無治療群、B:9-23p/IFA 単回皮下投与群に比して、発症抑制傾向を認めたが有意差は得られなかった。さらに、5 種類の候補自己抗原ペプチドを用いて同様の検討を行った結果、GAD 関連ペプチドとプロインスリンペプチドにおいて、同様の発症抑制傾向を認めた。次に、12 週齢の NOD マウスに、イン

スリン B 鎖ペプチド B:9-23p/Alum アジュバントの単回皮下投与単独、あるいは皮下投与後の B:9-23p/poly I:C 経鼻投与週 3 回を併用した結果、図 2 に示すように、B:9-23p/Alum 単独では、無治療群と比較して有意な差を認めなかったが、経鼻投与を併用することにより、発症抑制有意な発症抑制効果を認めた。

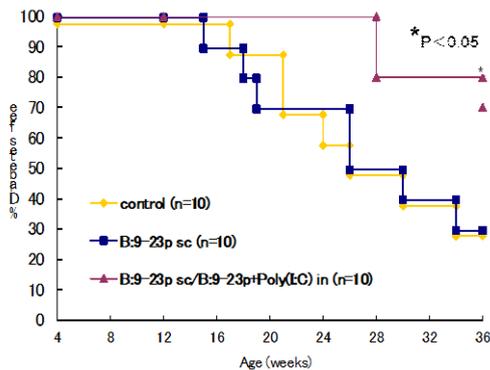


図 2 B:9-23p/Alum 皮下+B:9-23p/poly (I:C) 経鼻併用での発症抑制

このように、豚島自己抗原ペプチド/Alum アジュバントの皮下投与、あるいは、poly I:C 粘膜アジュバントの経鼻投与は、それぞれ単独では、十分に発症抑制効果が得られない場合でも、併用することにより、有意な発症抑制が得られる可能性が示された。

#### (4) 糖尿病発症抑制機序の解明

B:9-23p/Alum 皮下投与後に B:9-23p/poly I:C 経鼻免疫を 4 週間行い、マウスの脾細胞を採取し、in vitro の系にて、B:9-23 ペプチドの再刺激反応を行い、刺激後のリンパ球の、制御性 T 細胞の Fox P3 の発現について、フローサイトメトリー法により検討した結果、皮下投与単独群との有意な差を認めなかった。研究途上で、研究の基礎となった GAD と Alum アジュバントの皮下投与のヒト 1 型糖尿病での、膵β細胞量の維持効果や、無毒化 CD3 抗体の第 III 相試験が、最終的には、効果なしと判定された。現在は、制御性 T 細胞誘導治療から、エフェクター細胞の機能抑制を主

体とした 1 型糖尿病発症抑制療法開発に取り組んでいる。

#### 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 10 件)

- ① M Nakahara, K Johnson, A Eckstein, R Taguchi, M Yamada, N Abiru, Nagayama Y. Adoptive Transfer of Antithyrotropin Receptor (TSHR) Autoimmunity from TSHR Knockout Mice to Athymic Nude Mice. *Endocrinology*. 査読有 2012、(4):2034-42
- ② E Kawasaki, K Nakamura, G Kuriya, T Satoh, M Kobayashi, H Kuwahara, N Abiru, H Yamasaki, N Matsuura, J Miura, Y Uchigata, K Eguchi. Zinc transporter 8 autoantibodies in fulminant, acute-onset, and slow-onset patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 査読有 27(8)、2011、895-898
- ③ I Horie, N Abiru, H Sakamoto, Y Iwakura, Y Nagayama. Induction of autoimmune thyroiditis by depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in thyroiditis-resistant IL-17, but not interferon-gamma receptor, knockout nonobese diabetic-H2h4 mice. *Endocrinology*. 査読有 152(11)、2011、4448-54
- ④ M Nakahara, Y Nagayama, T Ichikawa, L Yu, GS Eisenbarth, N Abiru. The effect of regulatory T-cell depletion on the spectrum of organ-specific autoimmune diseases in nonobese diabetic mice at different ages. *Autoimmunity*. 査読有 44(6)、2011、504-510

- ⑤ I Ueki, N Abiru, K Kawagoe, Y Nagayama. Interleukin 10 deficiency attenuates induction of anti-TSH receptor antibodies and hyperthyroidism in a mouse Graves' model. *J Endocrinol.* 査読有 209(3)、2011、353-357
- ⑥ T Satoh, N Abiru, N Kobayashi, H Zhou, K Nakamura, G Kuriya, H Nakamura, Y Nagayama, E Kawasaki, H Yamasaki, L Yu, GS Eisenbarth, E Araki, M Mori, S Oyadomari, K Eguchi. CHOP deletion does not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse. *Apoptosis.* 査読有 6(4)、2011、438-48
- ⑦ I Ueki, N Abiru, M Kobayashi, M Nakahara, T Ichikawa, K Eguchi, Y Nagayama. B cell-targeted therapy with anti-CD20 monoclonal antibody in a mouse model of Graves' hyperthyroidism. *Clin Exp Immunol.* 査読有 163(3)、2011、309-317
- ⑧ I Horie, N Abiru, O Saitoh, T Ichikawa, Y Iwakura, K Eguchi, Y Nagayama. Distinct role of T helper Type 17 immune response for Graves' hyperthyroidism in mice with different genetic backgrounds. *Autoimmunity.* 査読有 44(2)、2011、159-165
- ⑨ E Kawasaki, K Nakamura, G Kuriya, T Satoh, M Kobayashi, H Kuwahara, N Abiru, H Yamasaki, N Matsuura, J Miura, Y Uchigata, K Eguchi. Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. 査読有 *Clin Immunol.* 138(2)、2011、146-153.
- ⑩ Y Kagohashi, N Abiru, M Kobayashi, M Hashimoto, O Shido, H Otani. Maternal dietary n-6/n-3 fatty acid ratio affects type 1 diabetes development in the offspring of NOD mice. *Congenit Anom (Kyoto).* 査読有 50(4)、2010、212-20
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 阿比留教生:1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み 第 23 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 ワークショップ : 岡山 平成 21 年 2 月 14 日, 岡山
- ② 阿比留教生, : NOD マウスのエフェクター T 細胞の糖尿病発症前の急激な質的变化について - 制御性 T 細胞抵抗性の獲得と Th17 細胞を中心に - 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、シンポジウム 平成 22 年 1 月 22 日, 大阪
- ③ 古林正和 : Granzyme B 遺伝子欠損による、NOD マウスのシクロフォスファミド誘導糖尿病の発症抑制 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 平成 22 年 1 月 22 日, 大阪
- ④ 中村寛 : 膵島抗原ペプチドと poly I:C 経鼻投与による 1 型糖尿病発症阻止法の開発の試み 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 平成 22 年 1 月 22 日, 大阪
- ⑤ 厨源平 : IL-17 欠損 NOD マウスにおける 1 型糖尿病の早期進展抑制 第 24 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 平成 22 年 1 月 22 日, 大阪
- ⑥ 阿比留教生 : NOD マウスにおける臓器特異的エフェクター T 細胞の週齢変化について 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 22 年 5 月 28 日、岡山
- ⑦ 古林正和 : Granzyme B 遺伝子欠損は、NOD マウスのシクロフォスファミド誘導糖尿病の発症を抑制するが自然発症には影響しない 第 53 回日本糖尿病学会年次学術

集会 平成22年5月28日、岡山

- ⑧ 厨源平：IL-17 欠損 NOD マウスは、糖尿病の早期発症を抑制する 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 平成22年5月28日、岡山
- ⑨ 古林正和：Genetic Deletion of Granzyme B Confers Resistance to Cyclophosphamide Induced Diabetes without Affecting the Natural Course of Diabetes in NOD Mice. 11<sup>th</sup> International Congress of the Immunology of Diabetes Society (IDS) 平成22年11月1日、Incheon, Korea
- ⑩ 中村寛：Intranasal Administration of Autoantigenic Peptide/Poly(I:C) Enhanced Protective Efficacy to Diabetes Induced by Alum-adjuvant Treatment in NOD Mice. 11<sup>th</sup> International Congress of the Immunology of Diabetes Society (IDS) 平成22年11月1日、Incheon, Korea
- ⑪ 厨源平：Genetic Deletion of IL-17 Suppresses The Progression to Diabetes in the NOD Mice in the Age-dependent Fashion. 11<sup>th</sup> International Congress of the Immunology of Diabetes Society (IDS) 平成22年11月1日、Incheon, Korea
- ⑫ 古林正和：Granzyme B 遺伝子欠損は、NOD マウスのシクロフォスファミド誘導糖尿病の発症を抑制するが自然発症には影響しない 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 平成23年5月20日、札幌
- ⑬ 赤澤 諭：IRF-4 欠損 NOD マウスにおける膵島炎の完全抑制 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 平成23年5月20日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿比留 教生 (ABIRU NORIO)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：00380981

### (2) 研究分担者

古林 正和 (KOBAYASHI MASAKAZU)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00380874

佐藤 剛 (SATO TSUYOSHI)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：70437896

厨 源平 (KURIYA GENPEI)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：50457579

中村 寛 (NAKAMURA KAN)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：70530426

### (3) 連携研究者

永山 雄二 (NAGAYAMA YUJI)

長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30274632