

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790620

研究課題名（和文）自己免疫性膵炎と劇症 1 型糖尿病の新規自己抗体の発見と測定系の確立

研究課題名（英文）Discovery of novel autoantibodies of fulminant type 1 diabetes and autoimmune pancreatitis, the establishment of a measurement system.

研究代表者

滝澤 壮一 (TAKIZAWA SOICHI)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：80456467

研究成果の概要（和文）：我々は糖尿病を合併した自己免疫性膵炎の患者血清を用いて、膵 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。予備実験で自己免疫性膵炎と劇症 1 型糖尿病に共通している新規の自己抗体と対応抗原を報告している。その中の一つであるアミラーゼ抗体に関して Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法の構築を行った。アミラーゼ抗体の抗原決定基の特定を試みた結果、抗原性が高い部位を特定することができた。現在、その抗原部位を固相化し、より感度、特異度の高い ELISA 法を構築している。

研究成果の概要（英文）：We screened the human pancreas cDNA library using serum of the autoimmune pancreatitis with diabetes. I reported the new autoantibody which were common to autoimmune pancreatitis and fulminant type 1 diabetes mellitus by a preliminary experiment. I built the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting autoantibody against human amylase. As a result of having tried identification of the epitope of the amylase antibody, I was able to pinpoint the part that antigenicity was high in. I try to build the ELISA having high sensitivity and specificity more now.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：免疫血清学

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎は、その発症に自己免疫機序の関与が疑われる膵炎で、主膵管の狭小化やびまん性の膵腫大を特徴とし、組織的には著明なリンパ球浸潤を伴う。我々は CD8⁺ と CD4⁺ リンパ球が膵外分泌腺と同様に、膵島にも浸潤していることを明らかにしている (Tanaka S et al. *Diabetes Care* 24: 1661, 2001)。また、我々は自己免疫性膵炎例では高率に糖尿病を合併し、ステロイド治療が奏功するこ

とを報告している (Tanaka S et al. *Lancet* 356: 910, 2000)。血清学的には IgG、特に IgG4 の上昇を認めることが報告されている (Hamano H et al. *N Engl J Med* 344: 732, 2001)。自己免疫性膵炎に特徴的な自己抗体としては抗 Lactoferrin 抗体、抗 Carbonic Anhydrase II 抗体の存在が報告されているが、その陽性頻度は低く、臓器特異性もない。現在の臨床的問題点としては、有効な診断マーカーがないことから膵癌や胆管癌などの腫

瘍性病変との鑑別が困難な症例が存在しており、不必要な開腹術や膵切除術がなされてしまうことが挙げられる。

一方、劇症1型糖尿病は発症1週間前後以内に高血糖とケトアシドーシスに陥る急性発症の糖尿病である。膵酵素上昇を認めることが多いが、原則として抗GAD抗体などの膵島関連自己抗体は陰性である。病因に関しては未だ不明であるが、我々は剖検膵の検討から組織学的に、自己免疫性膵炎と同様に膵島へのCD4⁺とCD8⁺リンパ球が浸潤していることを報告しており (Tanaka S et al. *N Engl J Med* 342: 1835, 2000)、病因に自己免疫的機序が関与している可能性が高いと考えられる。

このように自己免疫性膵炎と劇症1型糖尿病には膵島および膵外分泌腺へのリンパ球浸潤という共通点があり、両疾患に共通の新規自己抗体が存在する可能性が高い。実際、我々は患者血清を用いた expression cloning の手法を用いて両疾患に共通する2種の自己抗体と対応抗原をクローニングしている。(Takizawa S et al. *Biochem Biophys Res Commun* 14:386(1):192-6, 2009, Endo T et al. *Diabetes* 58(3):732-7, 2009.)、さらに多くの自己抗体とその対応抗原が同定され、両疾患への発症機序への関与の解明が期待される。

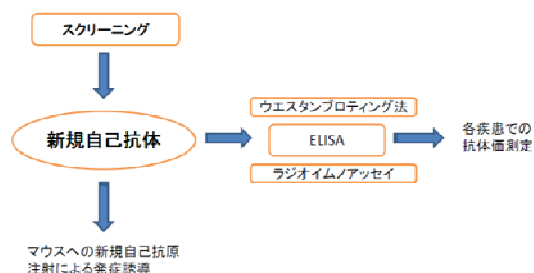
2. 研究の目的

自己免疫性膵炎と劇症1型糖尿病では膵の内分泌、外分泌組織がともに免疫反応により著しく傷害される疾患であるが、主要な標的抗原および自己抗体と病因は未だ充分明らかになっていない。本研究では、血清IgGおよびIgG4が著明に高値を示す自己免疫性膵炎および劇症1型糖尿病の患者血清を用い、ヒト膵cDNA発現ライブラリーをスクリーニングし、新規自己抗体および対応抗原の検索を行い、併せてその臨床的意義や発症機序についても検討する。

3. 研究の方法

患者血清をプローブとした Expression cloning 法により自己抗原の同定を行う。λ TripleEx2 human pancreas cDNA library を大腸菌に感染させてプラークを形成させ、上記の自己免疫性膵炎患者の血清を用い免疫学的にスクリーニングを行う。得られた陽性プラークに含まれるcDNAをDNAシーケンスにより同定する。その後、そのcDNAを含むプラスミドを作成し、大腸菌に導入後、組換え蛋白質として精製する。その組換え蛋白質を用いてウエスタンブロッティング法、ラジオイムノアッセイを行い、上記患者血清で

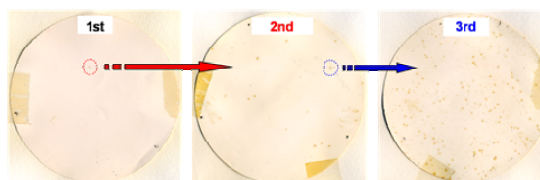
の陽性反応を確認する。また、ELISA法を確立し、自己免疫性膵炎、劇症1型糖尿病を含めた各疾患の血清を用いて疾患特異性と臨床的意義を検討する。



< 具体的方法 >

(1) 免疫学的スクリーニング

λ TripleEx2 human pancreas cDNA library を大腸菌 XL-1 に感染させてプラークを形成させ、ニトロセルロース膜に発現蛋白質を転写する。一次抗体に上記の自己免疫性膵炎患者血清、二次抗体に Goat HRP-conjugated anti-human IgG を用い、免疫染色を行う。その後、二次、三次スクリーニングにて陽性プラークを確認する。



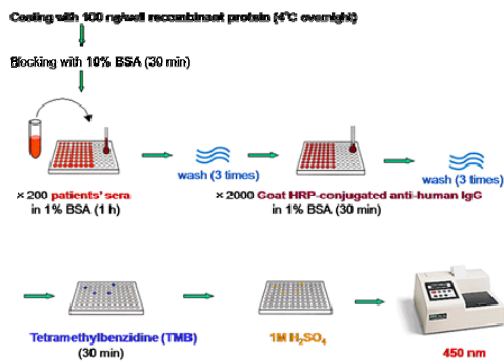
(2) 同定されたcDNAから組換え蛋白質の精製

得られた陽性プラークに含まれるcDNA断片をPCRで増幅後、DNAシーケンスにより同定する。その後、プラスミド pTrcHis に得られた陽性プラークのcDNAをライゲーションし、大腸菌 BL-21 にトランスフェクション後、His タグにより組換え蛋白質として精製する。



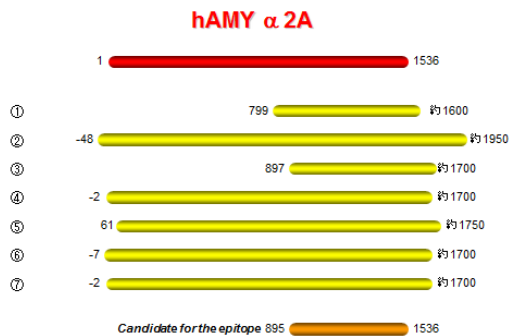
(3) ウェスタンブロッティング法、ラジオイムノアッセイによる陽性反応の確認
 精製した組換え蛋白質を用い、自己免疫性膵炎患者血清を一次抗体としてウェスタンブロッティング法、ラジオイムノアッセイを行い、陽性反応を確認する。

(4) ELISA による測定系の確立と各疾患の抗体価測定
 精製された組換え蛋白質を固相化し、ELISA法を確立する。その後、自己免疫性膵炎、アルコール性慢性膵炎、膵腫瘍、劇症1型糖尿病、急性発症1型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病、2型糖尿病の患者および劇症1型糖尿病患者の第1度近親者の血清を用いて分析する。



4. 研究成果

我々は血清 IgG および IgG4 が著明に高値を示す糖尿病を合併した自己免疫性膵炎の患者血清を患者同意の上、複数検体採取した。この患者の血清 IgG は著明に高値であり、この血清を用いて、膵 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、新規の自己抗体とその対応抗原を同定した。予備実験で自己免疫性膵炎と劇症1型糖尿病に共通している新規の自己抗体と対応抗原を報告している。



その一つであるアミラーゼ抗体に関して Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法の構築を行った。従来の方法では非特異的反応があり陰性検体でも偽陽性となることがあった。そのためアミラーゼ抗体の抗原決定基の特定を試みた。具体的にはアミラーゼ抗原を 24 基のアミノ酸ずつに断片化し、それぞれの断片を固相化し ELISA 法と比較した。

hAMY α2A amino acid sequence

- ① WGFVPSDRAL VFVDNHDNQR GHGA
- ② GGASILTFWD ARLYKMAVGF MLAH
- ③ PYGFTRVMSS YRWPRQFQNG NDVN
- ④ DWVGPPNNG VIKVETINPD ITCG
- ⑤ NDWVCEHRWR QIRNMVIFRN VVDG
- ⑥ QPFINWYDNG SNQVAFGRGN RGF1
- ⑦ VFNDDWSFS LTLQTLPG TYCD
- ⑧ VISGDKINGN CTGIKIYVSD DGKA
- ⑨ HFSISNSAED PFIAIHAESK L

その結果、抗原性が高い部位を特定することができた。現在、その抗原部位を固相化し、より感度、特異度の高い ELISA 法を構築している。また、その抗原部位をさらに分割し、抗原部位のより詳細な特定を進めている。今後、自己免疫性膵炎、劇症1型糖尿病、急性発症1型糖尿病、2型糖尿病などの患者血清を用い、陽性率を測定し、臨床的特徴と照らし合わせ検討を行う。また、新たに構築した ELISA 法にて特定された陽性患者では、発症前の検体から時系列で抗体価の測定も行う。そのことにより、アミラーゼ抗体が発症予測に役立つ可能性がある。もし発症前診断が可能となれば、妊娠後期に重篤な糖尿病性ケトアシドーシスを呈し、母体およびその胎児に生命の危険を及ぼすことが知られている劇症1型糖尿病の発症を予測でき、母体、胎児ともに救命できる可能性がある。

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)
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝澤 壮一 (TAKIZAWA SOICHI)
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：80456467

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし