

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591320

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病の病因・病態の解明及び新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiology of fulminant type 1 diabetes and development of its new therapy

研究代表者

遠藤 登代志 (ENDO, Toyoshi)

山梨大学・総合研究部・その他

研究者番号：00152017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミラーゼ自己抗体の膵疾患発症における役割を明らかにすべくヒト膵アミラーゼ(AMY)に対応したペプチドを合成し、これらを抗原としてELISA系の改良を試みた。合成ペプチド、P1～P9、でのELISAの結果P7に最も強い反応を認めAMYのC末端付近にエピトープが存在した。P7を抗原としたELISA (P7-ELISA)を用いて種々の膵疾患患者血中の本抗体陽性率を検討した。自己免疫性膵炎および劇症1型糖尿病には高い頻度で検出され既報の結果と一致した。一方、2型糖尿病患者でも16%が陽性であった。P7をマウスに免疫し膵組織を観察したところ、膵外分泌腺、特に膵島周囲にリンパ球浸潤を認めた。

研究成果の概要(英文)：To study epitopes of the autoantibody against AMY, we performed an ELISA using synthetic peptides corresponding to the C-terminal of AMY as antigens, and found that peptide 7 (P7) showed antigenicity to the autoantibody. Using P7 as an antigen, we screened for the autoantibody in patients with pancreas diseases. we screened for AMY autoantibody in AIP using the P7-coated ELISA plate (P7-ELISA). Eighteen out of 32 patients with AIP from our cohort were positive, suggesting that the results of P7-ELISA were more specific than those with C-AMY-ELISA. Of the 86 T2DM patients, 14 (16%) patients were positive for AMY autoantibodies. Fasting serum C-peptide levels of antibody positive-T2DM patients were significantly lower than that of antibody negative patients.
We immunized P7 peptide into subcutaneous tissues of mouse biweekly.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：アミラーゼ 自己免疫性膵炎 劇症1型糖尿病 2型糖尿病 ELISA

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは自己免疫性膵炎患者血中に膵アミラーゼに対する自己抗体が存在することを見いだした。さらに本抗体を検出せず人リコンビナントアミラーゼを抗原とする ELISA 確立し、種々の膵疾患での陽性率を検討したところ、自己免疫性膵炎および劇症 1 型糖尿病に高頻度に検出されることが判明した。

2. 研究の目的

アミラーゼ自己抗体の種々の膵疾患発症における役割を明らかにし、さらに疾患の早期診断などに臨床応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵アミラーゼに対応したペプチドを合成し、これらを抗原とし ELISA を実施することによりアミラーゼ自己抗体のエピトープを検索する。

(2) 最も抗原性の高い合成ペプチドをコートした ELISA 系を用いてシステムの特異性・感受性を改善するとともに、種々の膵疾患患者での本抗体の出現頻度を明らかにする。

(3) 人リコンビナントアミラーゼをマウスに免疫し、膵臓の病理学的検査、耐糖能、インスリン分泌能などを検討し本抗体の膵疾患発症における意義を検討する。

4. 研究成果

ヒト膵アミラーゼに対応する 9 つの合成ペプチドを作成し(P1~P9)本抗体発見の端緒となった強陽性患者血清を陽性コントロールとして ELISA アッセイ

を行った。その結果 P7 に最も強い反応を認め膵アミラーゼの C 末端付近にエピトープが存在することが推定された。次に P7 を抗原としてコートした ELISA (P7-ELISA)を用いて種々の膵疾患患者血中のアミラーゼ抗体陽性率を検討した。自己免疫性膵炎および劇症 1 型糖尿病には高い頻度で検出され既報の結果と一致した。一方、2 型糖尿病患者でも本抗体陽性の患者(16%)が見いだされた。

P7 をマウスに 2 週に一度アジュヴァントとともに免疫し 2 ヶ月後膵組織を観察したところ、膵外分泌腺特に膵島周囲にリンパ球浸潤を認めた。耐糖能については空腹時血糖には異常を認めなかったが糖負荷にて耐糖能低下が観察された。

以上の結果より P7-ELISA は種々の膵疾患の診断に有用であり、特に 2 型糖尿病における意義の解明は極めて重要と考えられた。また、本抗体が膵島炎の発症に関与している可能性が示唆された。

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 5 件)

- (1) Akihisa Imagawa, et, al., Reports of the Committee of the Japan Diabetes Society on the reserch of Fulminant and Acute-onset Type 1 Diabetes Mellitus: New diagnostic criteria of fulminant type 1 diabetes mellitus (2012). *Diabetology International* 3(4):179-183, 2012. 査読有
- (2) Endo T., Kobayashi T.: Concurrent overexpression of RET/PTC1 and TTF1 confers tumorigenicity to thyrocytes.

Endocr Relat Cancer 20(6):767-776.
2013. 査読有

- (3) Endo T., Kobayashi T.: Excess TSH causes abnormal skeletal development in young mice with hypothyroidism via suppressive effects on the growth plate. Am J Physiol Endocrinol Metab 305 : E660-E666, 2013. 査読有

- (4) Endo T., Kobayashi T.: Immunization of mice with a newly identified thyroid-stimulating hormone receptor splice variant induces Graves'-like disease. J Autoimmun 43 : 18-25, 2013. 査読有.

- (5) Aida K, Saitoh S, Nishida Y, Yokota S, Ohno S, Mao X, Akiyama D, Tanaka S., Awata T, Shimada A, Oikawa Y, Shimura H, Furuya F, Takizawa S., Ichijo M, Ichijo S, Itakura J, Fujii H, Hashiguchi A, Takasawa S, Endo T., Kobayashi T.: Distinct cell clusters touching islet cells induce islet cell replication in association with over-expression of regenerating gene (REG) protein in fulminant type 1 diabetes. PLoS ONE 9 : e95110, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 一條昌志、志村浩己、滝澤壮一、古屋文彦、田中昌一郎、會田薫、遠藤登代志、小林哲郎：膵細胞における IFN 発現についての検討。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2012/5/18.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 登代志 (ENDO, Toyoshi)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：00152017

(2) 研究分担者

金重 勝博 (KANESHIGE, Masahiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20377518

(3) 研究分担者

小林 哲郎 (KOBAYASHI, Tetsuro)

公益財団法人沖中記念成人病研究所・研究室・研究員

研究者番号：30113442

(4) 研究分担者

田中 昌一郎 (TANAKA, Syoichiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：70377521

(5) 研究分担者

滝澤 壮一 (TAKIZAWA, Soichiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80456467