

総 説

1 型糖尿病の発症阻止と寛解誘導

阿比留教生

Antigen specific treatment for the inhibition and remission of type 1 diabetes

NORIO ABIRU

Department of Endocrinology and Metabolism, Nagasaki University Hospital of Medicine and Dentistry

(Received October 15, 2008)

summary

Treatment with anti-CD3 antibodies appears promising to preserve residual beta-cell function in recent onset type 1 diabetes although many patients had therapy related adverse events. Insulin is an important islet antigen and autoimmunity to insulin may be central to disease pathogenesis of type 1 diabetes in man and NOD mouse. Evidence is strongest for the NOD mouse model, where blocking immune responses to insulin by amino acid substitution at positions B: 16, prevents diabetes. Insulin can be used to immunologically prevent diabetes of NOD mice, however, insulin-based preventive immunoregulation of diabetes in man is not yet possible. Treatment of NOD mice with insulin B-chain peptide and poly I: C, a Toll-like receptor 3 ligand, induces the pathogenic T cells as well as regulatory T cells and recruits them into the islets. Intranasal treatment with insulin B-chain analogue peptide with amino acid substitutions at positions B: 16 and 19 prevented the progression to diabetes and induced remission from hyperglycemia when co-administered with a mucosal adjuvant cholera toxin. Thus, an antigenic peptide vaccination with an alternative adjuvant or route might induce antigen-specific regulatory cell populations rather than pathogenic T cells. We believe that such an improved antigen specific therapy could provide more efficient and safer disease suppression and remission for human type 1 diabetes.

Key words—type 1 diabetes; prevention; autoantigen; insulin peptide; regulatory T cells

抄 録

近年、抗 CD3 抗体などの生物学的製剤を中心に、ヒト 1 型糖尿病の分野においても、疾患の治癒・寛解を目指し治療法の開発研究がすすめられているが、安全性、経済性などの問題を抱えている。インスリンは、ヒト、NOD マウスの 1 型糖尿病発症に関連した主要自己抗原である。膵島浸潤 T 細胞に反応せず、しかも、血糖降下作用を維持する変異インスリン (B 鎖 16 位残基アラニン置換) のみを発現する NOD マウスでは、インスリン自己抗体が発現せず、糖尿病も発症しない。NOD マウスに、poly I: C をアジュバントに、インスリン B 鎖ペプチドを皮下投与すると、制御性 T 細胞だけでなく、攻撃側の effector 細胞も膵島内に誘導する。一方、インスリン B 鎖 16, 19 位残基を置換したアナログペプチドを、コレラトキシンをアジュバントに経鼻投与すると、強力な糖尿病発症の抑制と高血糖からの寛解を誘導した。このように、膵島抗原を用いた免疫学的治療法は、投与ルートやアジュバント、補助療法に改良を加え、制御性 T 細胞を優位に誘導することより、今後、ヒト 1 型糖尿病において、安全な発症阻止、寛解誘導の治療法となる可能性がある。

はじめに

これまで、自己免疫疾患に対する治療は、ステロイドと免疫抑制剤による非特異的免疫抑制療法による、疾患を制御する治療が主流であった。近年特定のサイトカインやリンパ球表面抗原などに対するモノクローナル抗体が相次いで開発され、関節リウマ

チなどの分野では、抗 TNF- α 抗体等の生物学的製剤を中心に、疾患の治癒、寛解を誘導する治療へと、その治療法は劇的に変化しつつある。しかし、生物学的製剤を含む非特異的免疫抑制療法は、安全性や費用対効果の面において、未だ解決されない問題を抱えている。

1 型糖尿病の分野においても、これまでは、強化インスリン療法による疾患のコントロール治療が主流であったが、モノクローナル抗体などの生物学的

製剤の進歩により、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体などの、進展阻止、寛解誘導治療の開発がすすめられている¹⁾。我々は、これまで、1型糖尿病の自然発症モデルである NOD マウスを用いて、いくつかの自己抗原の中で、インスリン B 鎖が、発症機転に重要なエピトープである事を証明し、インスリン B 鎖ペプチドの投与による 1型糖尿病発症抑制法の開発に取り組んできた。本稿では、NOD マウスからヒト 1型糖尿病へと進められてきた、発症阻止治療の現状と、我々がすすめてきた自己抗原の投与による 1型糖尿病発症抑制法について紹介し、1型糖尿病の発症阻止、寛解を誘導する治療法の、今後の問題点と展望について解説する。

1 型糖尿病発症阻止治療の新展開

1 型糖尿病は、β 細胞の破壊が clinical onset の数年から数十年前よりすでに始まっており、Natural history のステージに応じて、一次予防（糖尿病発症前予防）、二次予防（発症後の β 細胞障害進展抑制）の治療法が検討されてきた（図 1）。一次予防では、抗原特異的免疫寛容誘導、二次予防では、抗原非特異的免疫抑制/修飾療法が中心となるが、治療法の改良により近年その守備範囲は拡大しつつある。1 型糖尿病の分野では、複数の自己抗体の測定が可能となり、ハイリスクな対象の発症予知が確立されたことを受け、これまで、NOD マウスの研究において発症予防効果が確認された治療法を中心に、ヒトへの臨床試験がすすめられてきた（表 1）。

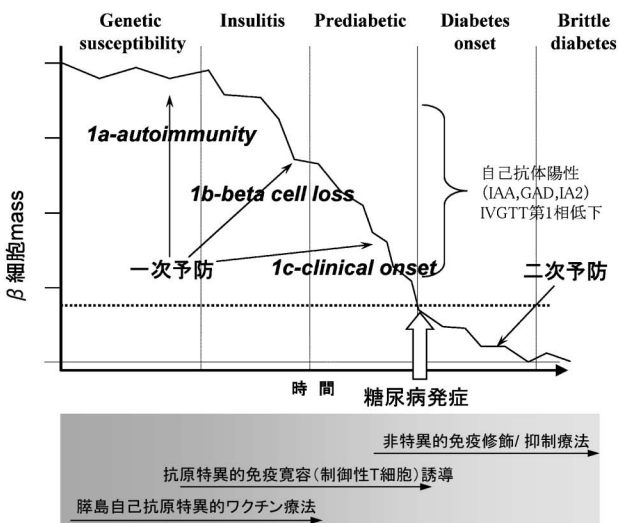


図 1 1 型糖尿病 Natural stage と推定される有効な発症予防治療。(Matthias von Herrath et al Nature Medicine. 2005; 11: 716 より改変抜粋)

一次予防の大規模臨床試験では、自己抗体陽性の第一度近親者を対象とした、ニコチナミド投与による臨床試験 (ENDIT)、インスリンの静脈内投与/皮下投与、経口投与による臨床試験 (DPT-1) が行われたが、残念なことに、いずれの治療においても糖尿病発症遅延効果は認められなかった^{2,3)}。一方、二次予防では、糖尿病発症直後の NOD マウスへの、抗 CD3 モノクローナル抗体の短期間投与が長期間の糖尿病寛解を誘導することから⁴⁾、無毒化 CD3 抗体を用いたヒトでの臨床試験が行われ、第 II 相試験では、糖尿病発症後の膵 β 細胞機能の温

表 1

治療法	NOD マウス	ヒト 1型糖尿病
サイクロスポリン	投与中に限局した発症抑制効果	投与中に限局した発症抑制効果. 腎毒性
ニコチナミド	発症遅延効果あり	発症遅延効果なし ²⁾ (ENDIT)
インスリン皮下注・静注投与	早期投与による発症抑制, 制御性 T 細胞の誘導	発症遅延効果なし ³⁾ (DPT-1)
経口インスリン投与	発症遅延効果あり	発症遅延効果なし ¹⁵⁾ (DPT-1) IAA 高値陽性者に遅延効果の可能性
GAD - Alum 皮下投与	発症後の糖尿病寛解誘導, 長期効果 ⁵⁾ TGFβ 依存性制御性 T 細胞の誘導	インスリン必要量の減少 ¹⁾ EB 感染様症候の一過性出現
抗 CD3 抗体	発症後の進展抑制 ⁴⁾	内因性インスリン分泌減少の低下 ⁵⁾

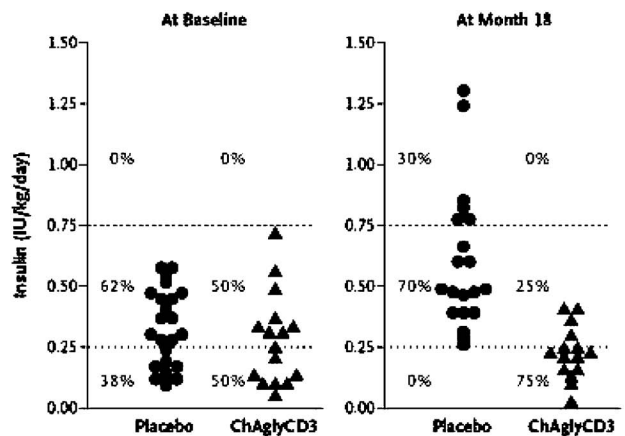


図 2 発症直後 1 型糖尿病患者への ChAglyCD3 の第 II 相試験での、治療 18 ヶ月後のインスリン必要量の減少効果。(N Engl J Med. 2005; 3 52: 2598 より抜粋)

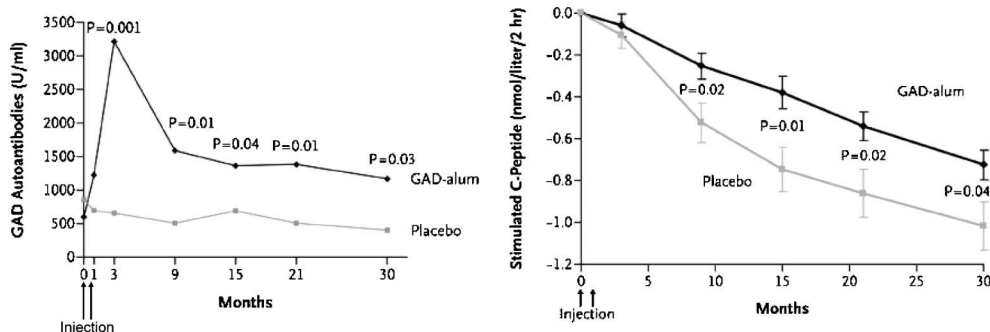


図3 発症後1型糖尿病患者へのGAD-alum皮下投与治療後30ヶ月間の抗GAD抗体価と負荷後C-ペプチドの推移 (N Engl J Med. 2008; E-pubより抜粋)

存とインスリン必要量の減少効果が報告された(図2)。しかし、副作用として、伝染性単核球症様の症候出現を認めたり¹⁾。また、抗原特異的免疫寛容誘導療法では、NODマウスにて、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)投与による、発症後の進展抑制を認めることから、発症直後のヒト1型糖尿病患者に、Alumをアジュバントに用いたGADの皮下投与の臨床試験が行われ、最近その結果が発表された。インスリン必要量の減少効果は認めなかったものの、明らかに抗GAD抗体価上昇と内因性インスリン分泌低下の有意な減少を認めた(図3)。また、明らかな有害事象は認めないことが報告されており、注目されている⁵⁾。このように、今後、より安全で効果的かつ生理的な1型糖尿病の発症阻止法として、抗原特異的な治療法の展開が期待される。

抗原特異的療法の標的としてのインスリンB鎖エピトープ

複数の自己免疫疾患の動物モデルにおいて、自己抗原の投与による疾患の抑制が報告されている。自己抗原の投与による発症阻止法の開発において重要なことは、自己免疫反応の主要標的抗原を同定し、抗原特異的な制御性T細胞誘導などの発症抑制機序について十分検索され、さらにヒトへの臨床応用を視野に、効果的な抗原投与ルート、アジュバント、補助療法を開発していくことである。

治療に応用する標的抗原の探索において、多くの自己抗原を同定しても、その抗原すべてが発症阻止に有効とは限らない。同定された抗原の中で、自己免疫現象の始点から終焉まで、疾患形成の主役となる抗原、あるいはT細胞エピトープを同定することが肝要である。ヒトおよびマウスモデルにおいて、1型糖尿病における自己抗原は、インスリンあるいは

は、GADなどの膵島由来蛋白であり、これまでに多くの、1型糖尿病に関わる自己抗原が同定されてきた。ヒト1型糖尿病において、膵リンパ節から樹立したT細胞クローンは、主にインスリンを認識することが証明された⁶⁾。これらは、ヒト1型糖尿病において、インスリンがT細胞の主要な標的抗原である可能性を示唆している。6~12週齢のNODマウスの膵島に浸潤する主なCD4⁺TおよびCD8⁺T細胞の多くは、インスリンを標的にしていることが明らかにされ、そのエピトープは、インスリンB鎖の9番目から23番目内に重複している(図4)^{7,8)}。我々は、この重複するB鎖の16位残基をアラニンに置換(B:16Ala)することにより、膵島浸潤T細胞クローンの反応が消失することを見出した⁹⁾。さらにB:16Ala変異インスリン遺伝子を発現するトランスジェニックNODマウスと、内因性のインスリン1およびインスリン2遺伝子を欠損させたNODマウスを作製し、順次交配することで、内因性インスリンを発現せずB:16Ala変異インスリン遺伝子のみを発現するNODマウスを得た。この内因性インスリン欠損-B:16Ala発現NODマウスはインスリン自己抗体の発現、自己免疫性糖尿病の発症を全く認めないことから(図5)、リンパ球の主要な標的エピトープは、インスリンB鎖ペプチドに存在することを証明し、このペプチドを応用した抗原特異的免疫療法開発の可能性を示した¹⁰⁾。

インスリンB鎖ペプチドとpoly I:C投与による制御性T細胞の誘導

NODマウスにインスリンB鎖ペプチド; B:9-23を皮下投与すると、糖尿病発症は抑制されることは以前から報告されていた¹¹⁾。発症抑制機序につ

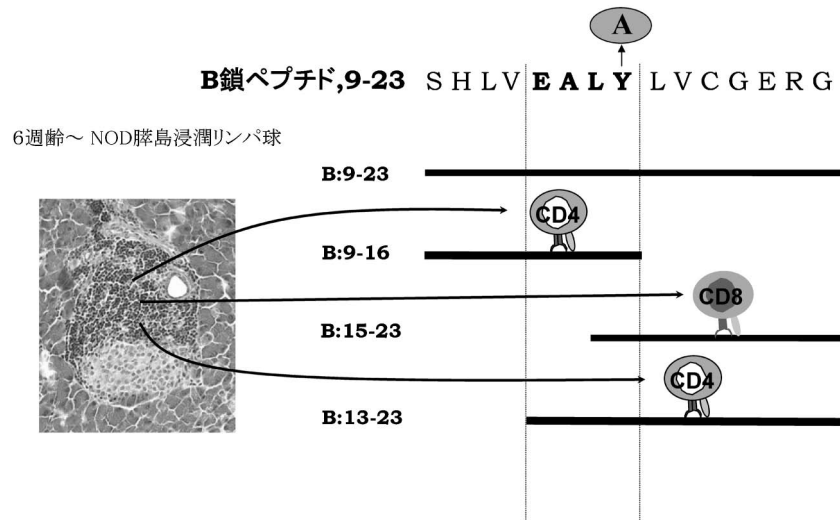


図4 NOD 膵島由来 CD4⁺ T 細胞クローンおよび CD8⁺ T 細胞クローンのエピトープ. 三つのエピトープが重複する B: 16 Tyr の Ala への置換によりすべてのクローンの反応性は消失する.

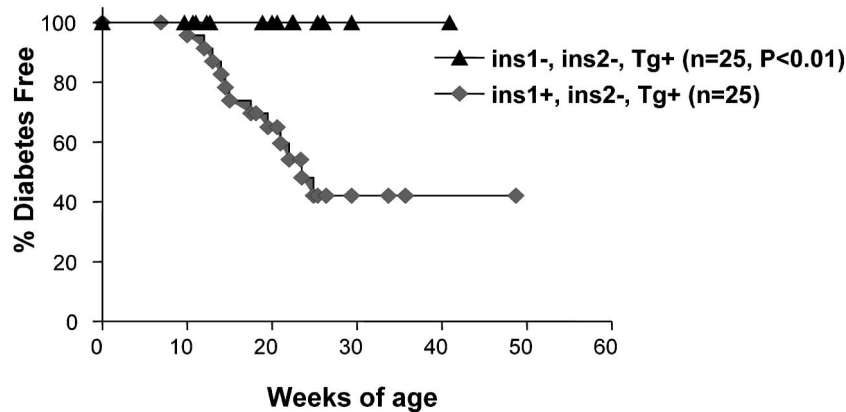


図5 内因性インスリン欠損 x B: 16 Ala 変異インスリン発現 NOD マウスでの, 糖尿病発症抑制. (Nakayama, M, Abiru, N et al. Nature. 2005; 435: 220 より抜粋)

いて一定した見解はないが, 抗原特異的な制御性 T 細胞が誘導され, 主な役割をはたしていると考えられている. 一方, B: 9-23 ペプチドの皮下投与は, NOD マウスのみならず特定の MHC 遺伝子を有する正常マウス (BALB/c マウスなど) においても, 高抗体価の IAA を急速に誘導し¹²⁾, さらに TLR 3 のリガンドである poly I: C を併用投与することで, 正常マウスにおいて膵島炎を誘導する¹³⁾. 我々は NOD マウスにおいて, 同様に B: 9-23 ペプチドと poly I: C を併用投与すると, 膵島炎は著明に促進するが, 糖尿病発症は抑制されるという一見矛盾した結果を得た (図 6A, B). この B: 9-23 ペプチドと poly I: C を併用投与により誘導された膵島炎では, 膵島内の Foxp3⁺/CD4⁺ 制御性 T 細胞の頻度は有意に上昇していた (図 7A). NOD マウスの

糖尿病進展に制御性 T 細胞が関与することは以前より推測されており, 我々の検討においても抗 CD25 抗体を, NOD マウスに投与し制御性 T 細胞を消去すると糖尿病の発症は促進された. そこで, 膵島内に増加していた Foxp3⁺/CD4⁺ 制御性 T 細胞と発症抑制の関連について検討するために, あらかじめ抗 CD25 抗体を投与したマウスに, B: 9-23 ペプチドと poly I: C を併用投与したところ, 発症抑制効果は消失し, 膵島特異的なリンパ球浸潤とともに, 投与 2 週間以内の超早期からの糖尿病進展を認めた (図 7B)¹⁴⁾. このように, インスリンペプチドと poly I: C の投与は, 諸刃の剣のごとく, pathogenic な自己反応性 T 細胞と同時に, 制御性 T 細胞を膵島内に誘導していることが示唆された. インスリン B 鎖ペプチド等の主要抗原を用いた効

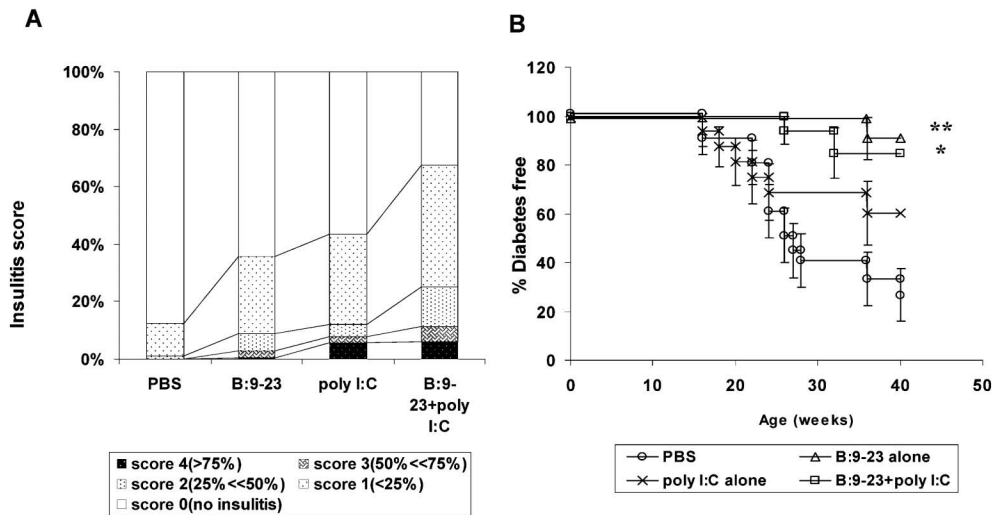


図 6A B: 9-23 ペプチド and/or poly I: C 投与による膵島炎の進展促進と, 6B 糖尿病発症抑制.

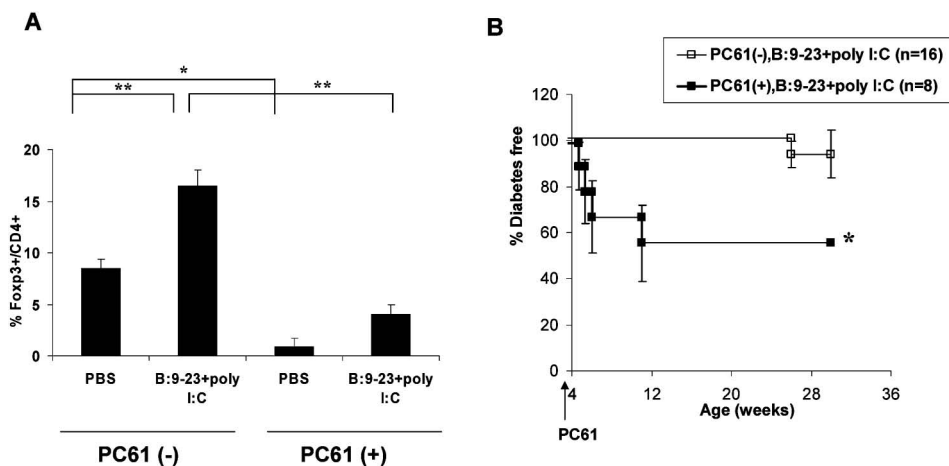


図 7A B: 9-23 ペプチドと poly I: C 投与による膵島内 Foxp3⁺/CD4⁺ 制御性 T 細胞の頻度上昇, 7B PC61 の前投与後の B: 9-23 ペプチドと poly I: C 併用投与による超早期の糖尿病誘導. (Fukushima, K, Abiru, N et al. BBRC. 2008; 367: 719 より抜粋)

果的な発症阻止法の開発には, 単に抗原を投与するだけでなく, 抗原特異的な制御性 T 細胞をいかに優位に誘導するかを検討することが重要な鍵となると考えられる.

インスリン B 鎖ペプチドの経粘膜投与による 1 型糖尿病の発症抑制

米国を中心にインスリン注射によるヒトでの大規模発症抑制治験 (DPT-1) が施行されたが, 有意な発症抑制効果が認められなかった³⁾. しかし, Alum をアジュバントに用いた GAD の皮下投与は発症直後患者への 2 回の免疫により, 抗 GAD 抗体の有意な上昇とともに, インスリン分泌低下を減少させることが報告された⁵⁾. 一方, DPT-1 では, インスリンを経口投与すると, インスリン自己抗体

高値の対象者において, 発症遅延の可能性が示唆された¹⁵⁾. このように, インスリンの粘膜免疫の有効性が期待されるが, インスリンの経口投与後のインスリン自己抗体価に変化は認められなかったことから¹⁶⁾, 粘膜免疫の臨床応用においても, GAD-Alum のようにアジュバントや補助療法など免疫原性を高める治療法の改良が必要であると考えられる.

我々は, NOD マウスにインスリン B 鎖ペプチドを経鼻投与しても, インスリン自己抗体の発現を増強しなかったため, コレラトキシンを粘膜アジュバントとして用いて, ペプチド抗体, および IAA 発現誘導に成功した (図 8A). しかし, 残念なことにこれらのマウスでは, 糖尿病発症抑制効果は限定的であり十分とはいえなかった. 十分な抑制効果が得られない原因の一つとして, 我々は, インスリン

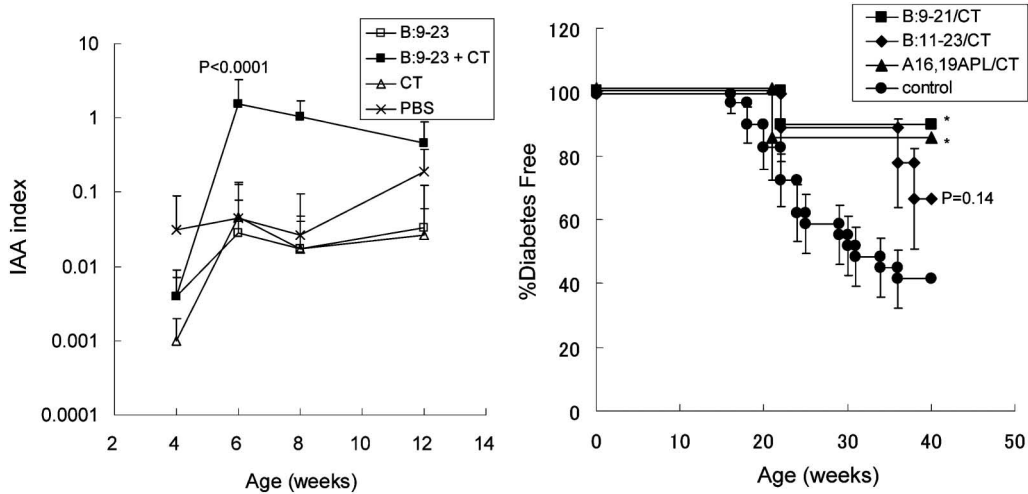


図 8A B: 9-23 ペプチドとコレラトキシン (CT) の経鼻投与によるインスリン自己抗体誘導. 8B 改変インスリン B 鎖ペプチド (B: 9-21, A16, 19 APL) の経鼻投与による発症抑制 *P < 0.05.

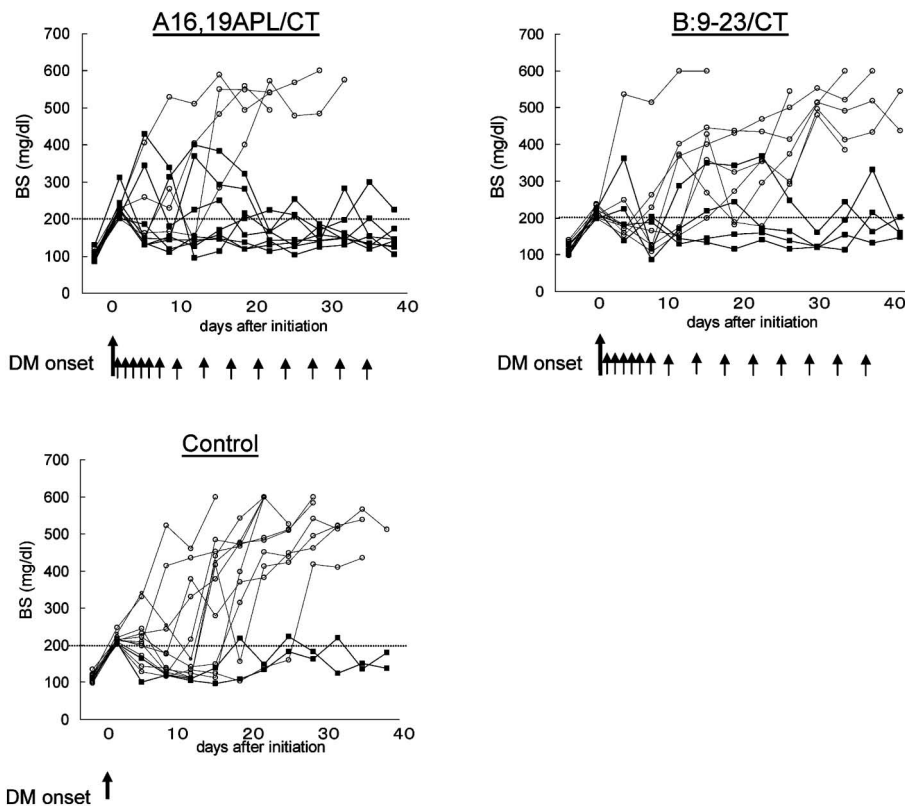


図 9 高血糖直後 NOD マウスへの A16, 19 APL/CT 経鼻投与による血糖値の改善効果. (Kobayashi, M, Abiru, N et al. J Immunol. 2007; 179: 2082 より抜粋)

反応性 CTL の活性化を考えた. 図 4 に示すように, 脾島浸潤 CD8 T⁺ 細胞のエピトープは B: 15-23 であることから, B: 9-23 エピトープの投与が, CD4 T⁺ 細胞だけでなく, CTL の活性化を誘導し発症抑制効果を中和しているのではないかと考えたわけである. そこで, B: 9-23 エピトープの C 端 22, 23 番目のアミノ酸を除去した B: 9-21 ペプチド

および, 16, 19 番目のアミノ酸を Ala に置換したアナログペプチド (A16, 19 APL) を合成し, 同様にコレラトキシンを粘膜アジュバントに経鼻投与を行った結果, 我々の期待通り, 両ペプチドは, 糖尿病発症を有意に抑制した (図 8B). 脾島炎進展においても著明に抑制した A16, 19 APL を用いて, 高血糖出現直後より同様の治療を行った結果, 高血糖か

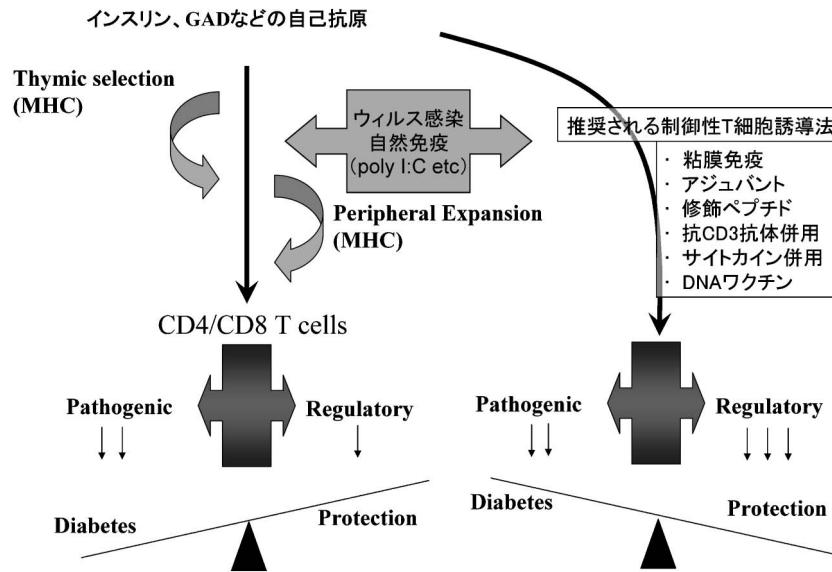


図 10 自己抗原による 1 型糖尿病の病態と抗原特異的制御性 T 細胞の誘導。

らの寛解を誘導しうる可能性を見出し、同治療による二次予防の可能性が示された (図 9)¹⁷⁾。

おわりに

インスリンや GAD などは、ヒト 1 型糖尿病の主要な自己抗原であり、MHC などの遺伝的背景を基礎に、胸腺での免疫寛容を逃れた自己反応性 CD4/CD8 T⁺ 細胞は末梢で増幅し、ウイルス感染などの環境因子の影響を受けることで糖尿病が発症してくるものと考えられる。今回、我々がインスリンペプチドの経鼻免疫の研究で示したように、自己抗原を用いた効果的な抗原特異的な治療法には、粘膜免疫、抗原エピートプの修飾、アジュバント、補助療法などの応用により、制御性 T 細胞優位な状態を誘導することが重要であると考えられる (図 10)。また、インスリンペプチドの経鼻免疫をヒトへ応用するためには、多様な MHC (HLA) に対応した標的抗原エピートプの探索、毒性を有する粘膜アジュバントの改良、さらに第 I 相試験の段階で治療効果を直ちに評価できる T 細胞アッセイなどの Surrogate marker の開発など、早急に解決していかなければならない問題がある。表 1 に示すように NOD マウスやヒト 1 型糖尿病患者でのパイロットスタディにて効果を認めた治療法も、大規模臨床試験を行うと効果が乏しく承認されず、残念な結果が続いてきたが、近年、抗 CD3 抗体、GAD-Alum など、ヒト 1 型糖尿病の進展阻止の有効性に期待が持てる治療法が出現してきた。今後、抗原非特異的、

抗原特異的免疫療法の両面から 1 型糖尿病の治療開発、および臨床応用が進められていくと思われる。

文 献

- 1) Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al.: Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* **352**: 2598–2608, 2005.
- 2) Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, Collier T.: European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet.* **363**: 925–931, 2004.
- 3) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **346**: 1685–1691, 2002.
- 4) Chatenoud L, Primo J, Bach JF.: CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* **158**: 2947–2954, 1997.
- 5) Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, et al.: GAD Treatment and Insulin Secretion in Recent-Onset Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* Oct 8. Epub ahead of print, 2008.
- 6) Kent SC, Chen Y, Bregoli L, et al.: Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* **435**: 224–228, 2005.
- 7) Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D.: Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T

- cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* **25**: 1056–1062, 1995.
- 8) Wong FS, Karttunen J, Dumont C, et al.: Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* **5**: 1026–1031, 1999.
 - 9) Abiru N, Wegmann D, Kawasaki E, Gottlieb P, Simone E, Eisenbarth GS.: Dual overlapping peptides recognized by insulin peptide B: 9–23 reactive T cell receptor AV13S3 T cell clones of the NOD mouse. *J Autoimmun* **14**: 231–237, 2000.
 - 10) Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al.: Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* **435**: 220–223, 2005.
 - 11) Daniel D, Wegmann DR.: Protection of non-obese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9–23). *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 956–960, 1996.
 - 12) Abiru N, Maniatis AK, Yu L, et al.: Peptide and MHC-Specific Breaking of Humoral Tolerance to Native Insulin with the B: 9–23 Peptide in Diabetes: Prone and Normal Mice. *Diabetes* **50**: 1274–1281, 2001.
 - 13) Moriyama H, Wen L, Abiru N, et al.: Induction and acceleration of insulinitis/diabetes in mice with a viral mimic (polyinosinic-polycytidylic acid) and an insulin self-peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**: 5539–5544, 2002.
 - 14) Fukushima K, Abiru N, Nagayama Y, et al.: Combined insulin B: 9–23 self-peptide and polyinosinic-polycytidylic acid accelerate insulinitis but inhibit development of diabetes by increasing the proportion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the islets in non-obese diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **367**: 719–724, 2008.
 - 15) Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, et al.: Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care.* **28**: 1068–1076, 2005.
 - 16) Barker JM, McFann KK, Orban T.: Effect of oral insulin on insulin autoantibody levels in the Diabetes Prevention Trial Type 1 oral insulin study. *Diabetologia.* **50**: 1603–1606, 2007.
 - 17) Kobayashi M, Abiru N, Arakawa T, et al. Altered B: 9–23 insulin, when administered intranasally with cholera toxin adjuvant, suppresses the expression of insulin autoantibodies and prevents diabetes. *J Immunol.* **179**: 2082–2088, 2007.