

周 紅波論文内容の要旨

主 論 文

Oral administration of recombinant live yeast producing altered peptide ligand derived from insulin B:9-23 peptide linked to cholera toxin B subunit suppresses development of autoimmune diabetes in NOD mice

コレラトキシン B サブユニット-インスリン B:9-23 アナログペプチド (A^{16,19}APL) 融合蛋白発現酵母を用いた、NOD マウスの経口粘膜免疫による 1 型糖尿病発症抑制効果の検討

周紅波、阿比留教生、新川武、崎間里奈、宮田健、古林正和、福島慶子、川崎英二、山崎浩則、江口勝美

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA 9 月掲載予定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口勝美教授)

緒 言

1 型糖尿病はインスリンなどの膵島抗原を標的とした自己免疫疾患である。インスリン B 鎖ペプチド (B:9-23) は、NOD マウスにおける糖尿病発症に重要な主要自己抗原エピトープである。B:9-23 ペプチドの B16, 19 番目アミノ酸を Ala に置換した altered peptide ligand (A^{16,19}APL) を、コレラトキシン (CT) を粘膜アジュバントに用い、NOD マウスに経鼻免疫を行うと強力な糖尿病発症抑制効果を認める。CT は、その毒性のため、ヒトへの臨床応用が困難であるが、CT の B サブユニット (CTB) は、毒性がなく、小腸粘膜上皮細胞上の GM1 ガングリオシドに特異的アフィニティーをもつことから、CTB と抗原蛋白を融合した融合蛋白を、経口投与することで、消化管粘膜に約 100-1000 倍の抗原取り込みが期待されることが報告されている。

今回、我々は CTB と A^{16,19}APL の融合蛋白を産生する酵母発現系 *Pichia pastoris* を作製し、経鼻、経口の粘膜免疫による NOD マウスでの糖尿病の発症抑制効果を検討した。

対象と方法

1. CTB 全遺伝子を組み込んだ *Pichia pastoris* 酵母発現系ベクター pA0815-CTB に A^{16,19}APL 遺伝子を挿入、*Pichia pastoris* GS115 への形質転換を行った。
2. 約 100 個の CTB-A^{16,19}APL 融合タンパク発現酵母コロニーの中から、抗 CT 抗体、お

よび抗 APL 血清を用いた ELISA 法により、発現量の多い酵母株を選択した。また、融合蛋白の発現を、抗 CT 抗体を用いた Western Blot 法にて確認した。

3. 麻酔下の雌性 NOD マウスに、CTB-A^{16,19}APL 融合タンパク発現酵母株からの抽出蛋白を 20 μ g 経鼻投与した。

4. 雌性 NOD マウスに、50 μ g の CTB-A^{16,19}APL 融合タンパク発現酵母株そのものを、ゾンデを用いて経口投与した。投与後の血清中のインスリン自己抗体 (IAA)、14 週齢以降の血糖測定を 2 週間に 1 回行い、累積糖尿病発症率を検討した。

結 果

1. Western Blot 法により、CTB 発現酵母株および CTB-A^{16,19}APL 融合タンパク発現酵母株の抽出蛋白が、12KDa、13.5KDa のバンドが認められ、融合蛋白の産生を確認した。

2. 36 匹の NOD マウスを、CTB-A^{16,19}APL 単独投与群 (n=9)、CT 添加 CTB-A^{16,19}APL 投与群 (n=9)、CT 単独群 (n=9)、PBS 投与群 (n=9) に分類し、4 週齢に 5 日連続、5 週齢から 10 週齢まで週 1 回に経鼻投与を行った。CT 添加の有無に関わらず、CTB-A^{16,19}APL 融合蛋白の経鼻投与による、累積糖尿病発症率は、コントロール群 (CT 単独群、PBS 投与群)と比較して有意な差を認めなかった。

3. 27 匹の NOD マウスを、CTB-A^{16,19}APL 発現酵母投与群 (n=9)、CTB 発現酵母投与群 (n=9)、PBS 投与群 (n=9) に分類し、4 週齢から 10 週齢まで、週に 2 回の経口投与を行った。40 週齢までの累積糖尿病発症率は CTB-A^{16,19}APL 群は 37%、CTB 群は 55%、PBS 群は 76%であった。CTB-A^{16,19}APL 群は PBS 群に比較して 51%の発症率の低下を認めたが、Kaplan Meier 解析において有意差は認めなかった (P=0.08)。

4. CTB-A^{16,19}APL 群、CTB 群、PBS 投与群での、4 週齢、8 週齢、12 週齢の血清 IAA を比較検討した結果、すべての週齢において、3 群間に平均抗体価、抗体陽性率の差を認めなかった。

考 察

NOD マウスを用いて、コレラトキシン併用の経鼻免疫にて強力な発症阻止効果を示したアナログペプチド ; A^{16,19}APL とコレラトキシン B サブユニットとの融合タンパクによる粘膜免疫による糖尿病発症抑制効果を検討した。今回の結果にて、CTB-A^{16,19}APL を発現する酵母そのものを経口投与する方法により、発症抑制の傾向は認めたが、経鼻、経口ともに、明らかな発症抑制は証明されず、ヒトへの臨床応用は難しいと考えられた。A^{16,19}APL/CT の経鼻投与にて認めたインスリン自己抗体の抑制効果も確認されなかったことから、投与されたペプチドが、質的、量的に十分でなかった可能性がある。また、コレラトキシンは、粘膜投与により、消化管粘膜上に全身性の免疫応答を誘導するのに中心的な役割を果たす M 細胞を誘導することで粘膜アジュバントとしての役割を果たしていることが報告されているが、B サブユニットだけでは、全身性の免疫応答や、発症を抑制する制御性 T 細胞の誘導に十分でなかった可能性がある。今後、ペプチド発現の量的、質的な改良と、十分な制御性の免疫を誘導可能な粘膜アジュバントの開発、応用が必要であると考えられた。