

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-40544

(P2017-40544A)

(43) 公開日 平成29年2月23日(2017.2.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A N 2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C O 8 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 H O 4 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-162065 (P2015-162065)	(71) 出願人	504176911
(22) 出願日	平成27年8月19日 (2015.8.19)		国立大学法人大阪大学
			大阪府吹田市山田丘1番1号
		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宣
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀
		(74) 代理人	100163658
			弁理士 小池 順造
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病の新規バイオマーカーおよび新規治療用ワクチン

(57) 【要約】

【課題】1型糖尿病の検査方法の提供および1型糖尿病の予防または治療用ワクチンの提供。

【解決手段】被験者由来の試料から、以下の(1)または(2)の自己抗体を測定することを含む、1型糖尿病の検査方法を提供する：

(1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体、および

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者由来の試料から、以下の（１）または（２）の自己抗体を測定することを含む、1型糖尿病の検査方法：

（１）配列番号：２に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：２に対応するアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体、および

（２）配列番号：２に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：２に対応するアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体。

【請求項 2】

10

試料が血漿または血清である、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】

免疫学的方法により自己抗体を測定することの特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

以下の（１）または（２）のペプチドを含有してなる、1型糖尿病の検査キット：

（１）配列番号：２に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：２に対応するアミノ酸配列からなるペプチド、および

（２）配列番号：２に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：２に対応するアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド。

20

【請求項 5】

以下の（１）～（３）のいずれかの物質を含む1型糖尿病または1型糖尿病に関連する疾患の予防または治療用ワクチン：

（１）配列番号：４に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：４に対応するアミノ酸配列からなるペプチド；

（２）配列番号：４に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：４に対応するアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；および

（３）上記（１）または（２）のペプチドを発現し得る発現ベクター。

30

【請求項 6】

キャリアタンパク質を含む、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 7】

キャリアタンパク質がスカシ貝ヘモシアニンである、請求項 6 に記載のワクチン。

【請求項 8】

アジュバントを含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、GFAP (glial fibrillary acidic protein) の特定の部分アミノ酸配列に対する自己抗体を測定することを含む1型糖尿病の検査方法、およびGFAPの特定の部分アミノ酸配列を免疫原として含む1型糖尿病および1型糖尿病に関連する疾患の予防または治療用ワクチンに関する。

40

【背景技術】

【0002】

1型糖尿病(T1DM)は膵臓の膵島の炎症と障害によってインスリンの量的不足と持続的な高血糖症を生じる自己免疫疾患であり、その発症率は毎年増加傾向にある。1型糖尿病に対する治療アプローチの1つとしては抗原特異的免疫療法があり、(プロ)インスリン、GA D65、タンパク質チロシンキナーゼIA1(IA-2)、HSP60などが1型糖尿病の標的抗原として挙げられる。現在、モデル動物を用いた試験やヒトに対する臨床試験において、膵島上に提

50

示される特異的自己抗原(GAD65, IA-2, ZnT8など)を標的にする治療アプローチが実施されており、Th1偏重からTH2偏重にT細胞分化をシフトさせることによって、膵島細胞に対して自己寛容性を有するT細胞を回復させることに成功している。将来においては、1型糖尿病の免疫寛容を誘導するために免疫系の異なる経路を標的とする免疫療法同士の組み合わせが必要になることが予想される。

【0003】

ところで最近の研究では、膵島だけでなく、膵島周囲のシュワン細胞(pSCs)のような神経内分泌系組織にも自己抗原が顕著に発現していることが報告されている。例えば、1型糖尿病モデルマウス(NOD(non-obese diabetic)マウス)では、膵β細胞の障害に先んじてシュワン細胞に炎症が生じ、これはシュワン細胞特異的な自己反応性T細胞応答とシュワン細胞に発現しているGFAPに対する自己抗体が関連していることが報告されている(非特許文献1)。また、NODマウスを用いてGFAPのT細胞エピトープが探索され、K^dによって抗原提示されるペプチドとして、マウスGFAPの79-87番目のアミノ酸配列および253-261番目のアミノ酸配列、IA^{g7}によって抗原提示されるペプチドとして、マウスGFAPの96-110番目のアミノ酸配列、116-130番目のアミノ酸配列および216-230番目のアミノ酸配列が見出され、そのうちマウスGFAPの79-87番目のアミノ酸配列を用いた免疫療法が糖尿病の進行を抑制したことが報告されている(非特許文献2)。さらに、1型糖尿病はT細胞依存的な組織特異的自己免疫疾患である一方、B細胞もまたその発症に関与しており、ヒト血中自己抗体濃度は潜在する自己免疫に対する重要な予測マーカーとなりうる。従って、GFAPに関する鋭敏な抗体価検出システムは1型糖尿病の早期診断に有用であると考えられ、同時に治療介入に対して有効であるとも考えられるが、未だにそのような治療アプローチが成功したという報告はない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Winer, S., et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. Nature medicine 9, 198-205 (2003).

【非特許文献2】Tsui, H., et al. Targeting of pancreatic glia in type 1 diabetes. Diabetes 57, 918-928 (2008).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、GFAPの特定の部分アミノ酸配列に対する新規自己抗体を検出することを含む1型糖尿病の検査方法を提供することを課題とする。また本発明は、GFAPの特定の部分アミノ酸配列を含む1型糖尿病または1型糖尿病に関連する疾患の予防または治療用ワクチンを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、1型糖尿病モデルマウスであるNODマウスの抗GFAP抗体を継続的に観察したところ、抗GFAP抗体は既存の1型糖尿病マーカーである抗GAD65抗体よりも早期から上昇し、抗GFAP抗体価とCペプチドレベルは逆相関を示すことを見出した。また、抗GFAP抗体が陽性のNODマウスは、抗GAD65抗体が陽性であるNODマウスよりも1型糖尿病の発症率が高かった。さらに、NODマウスの抗GFAP抗体が認識するマウスGFAPのアミノ酸配列を特定し、該アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を選択し、KLHとコンジュゲートしたワクチンをNODマウスに投与したところ、Th1偏重からTh2偏重へのT細胞分化が誘導され、1型糖尿病の発症が抑制されることを初めて見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、

〔1〕被験者由来の試料から、以下の（1）または（2）の自己抗体を測定することを含む、1型糖尿病の検査方法：

（1）配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体、および

（2）配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体；

〔2〕試料が血漿または血清である、〔1〕に記載の検査方法；

〔3〕免疫学的方法により自己抗体を測定することの特徴とする、〔1〕または〔2〕に記載の方法；

〔4〕以下の（1）または（2）のペプチドを含有してなる、1型糖尿病の検査キット：

（1）配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチド、および

（2）配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；

〔5〕以下の（1）～（3）のいずれかの物質を含む1型糖尿病または1型糖尿病に関連する疾患の予防または治療用ワクチン；

（1）配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列からなるペプチド；

（2）配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；および

（3）上記（1）または（2）のペプチドを発現し得る発現ベクター；

〔6〕キャリアタンパク質を含む、〔5〕に記載のワクチン；

〔7〕キャリアタンパク質がスカシ貝ヘモシアニンである、〔6〕に記載のワクチン；

〔8〕アジュバントを含む、〔5〕～〔7〕のいずれか1つに記載のワクチン；
を提供する。

【発明の効果】

【0008】

GFAPの特定のアミノ酸配列を認識する自己抗体を被験者の試料から検出することにより、被験者が1型糖尿病を発症しているかあるいは将来的に発症するかを精度よく判断することができる。また、GFAPの特定のアミノ酸配列をワクチンとして用いることによって、T細胞反応性を抑制し、Th1偏重からTh2偏重のT細胞分化を誘導することによって、1型糖尿病および1型糖尿病に関連する疾患の発症を予防または治療できる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】A：NODマウス(n=30)の1型糖尿病の発症の割合を示すグラフである。B：全長GFAPタンパク質に結合する抗GFAP抗体の各IgGサブクラスを示す図である。**：P<0.01

【図2】A：9週齢のNODマウスの抗GFAP抗体価を基準とした9，17，21，25週齢のNODマウス(n=30)における抗GFAP抗体価の増加倍率を示すグラフである。B：9週齢のNODマウスの抗GAD65抗体価を基準とした9，17，21，25週齢のNODマウス(n=30)における抗GAD65抗体価の増加倍率を示すグラフである。

【図3】A：21および25週齢のNODマウスの抗GFAP抗体価の増加倍率と随時グルコースレベルとの間の相関関係を示すグラフである。グルコースレベルは27週齢時に2日連続計測した。B：21および25週齢のNODマウスの抗GAD65抗体価の増加倍率と随時グルコースレベルとの間の相関関係を示すグラフである。グルコースレベルは27週齢時に2日連続計測した。

【図4】A：25週齢の全NODマウスの抗GFAP抗体価の増加倍率とCペプチド分泌との間の相関関係を示すグラフである。B：25週齢の全NODマウスの抗GAD65抗体価の増加倍率とCペプ

10

20

30

40

50

チド分泌との間の相関関係を示すグラフである。C：25週齢のNODマウス（糖尿病群）の抗GFAP抗体価の増加倍率とCペプチド分泌との間の相関関係を示すグラフである。D：25週齢のNODマウス（糖尿病群）の抗GAD65抗体価の増加倍率とCペプチド分泌との間の相関関係を示すグラフである。E：25週齢のNODマウス（非糖尿病群）の抗GFAP抗体価の増加倍率とCペプチド分泌との間の相関関係を示すグラフである。F：25週齢のNODマウス（非糖尿病群）の抗GAD65抗体価の増加倍率とCペプチド分泌との間の相関関係を示すグラフである。

【図5】A：17，21及び25週齢の各時点で抗GFAP抗体が陽性であったマウスが、30週齢時点で糖尿病を発症している割合を示すグラフである。B：17，21及び25週齢の各時点で抗GAD65抗体が陽性であったマウスが、30週齢時点で糖尿病を発症している割合を示すグラフである。C：17，21及び25週齢の各時点で抗GFAP抗体および抗GAD65抗体が陽性であったマウスが、30週齢時点で糖尿病を発症している割合を示すグラフである。D：17，21及び25週齢の各時点で抗GAD65抗体および抗GAD65抗体が陰性であったマウスが、30週齢時点で糖尿病を発症している割合を示すグラフである。

【図6】A：抗GFAP抗体とGFAPの各部分ペプチドC1，C2，C3，C4の結合を示す図である。
***：P<0.005，B：C3ペプチドに結合する抗GFAP抗体の各IgGサブクラスを示す図である。
*：P<0.05

【図7】A：GFAPワクチン、KLHワクチンまたは生理食塩水で免疫したNODマウスの抗体価を示すグラフである。B：GFAPワクチン、KLHワクチンまたは生理食塩水で免疫したNODマウスの1型糖尿病の発症の状況を示すグラフである。

【図8】A：GFAPワクチン、KLHワクチンまたは生理食塩水で免疫したNODマウスのCペプチドレベルを示すグラフである。B：GFAPワクチン、KLHワクチンまたは生理食塩水で免疫したNODマウスの膵島へのT細胞の浸潤の程度を示すグラフである。C：GFAPワクチン、KLHワクチンまたは生理食塩水で免疫したNODマウス由来の抗体のC1ペプチド、C2ペプチド、C3ペプチドおよびC4ペプチドに対する結合性を示すグラフである。
*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.005；+：P<0.05，++：P<0.01；#：P<0.05，D：C4ペプチドに結合する抗GFAP抗体の各IgGサブクラスを示す図である。
*：P<0.05，**：P<0.01

【図9】A：1型糖尿病を発症したNODマウスの脾臓細胞をC3ペプチド、組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞を示す図である。B：1型糖尿病を発症したNODマウスの脾臓細胞をC3ペプチド、組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞数を示すグラフである。C：1型糖尿病を発症していないNODマウスの脾臓細胞をC3ペプチド、組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞を示す図である。D：1型糖尿病を発症していないNODマウスの脾臓細胞をC3ペプチド、組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞数を示すグラフである。

【図10】A：KLHワクチンで免疫したNODマウスの膵島組織の組織染色像。B：KLHワクチンで免疫したNODマウスの脾臓細胞を組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞を示す図である。C：KLHワクチンで免疫したNODマウスの脾臓細胞を組換えGFAP(全長)、組換えGAD65(全長)またはPHAで刺激し、IL-4またはIFN- γ 産生する細胞数を示すグラフである。
*：P<0.05，**：P<0.01

【発明を実施するための形態】

【0010】

1. 1型糖尿病の検査方法

後述する実施例の通り、マウスGFAPの特定のアミノ酸配列をエピトープとする自己抗体が、NODマウスにおける1型糖尿病の発症のマーカーとなることを見出した。従って、本発明は、被験者由来の試料から、以下の(1)または(2)の自己抗体を測定することを含む、1型糖尿病の検査方法（以下、本発明の検査方法）：

- (1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体、および
- (2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物にお

10

20

30

40

50

いて配列番号：2に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体を提供するものである。

【0011】

本発明の検査方法の被験者は、任意の哺乳動物であってよいが、1型糖尿病を発症している哺乳動物または1型糖尿病を発症するおそれのある哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類及びウサギ等の実験動物、イヌ及びネコ等のペット、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ及びヒツジ等の家畜、ヒト、サル、オランウータン及びチンパンジー等の霊長類等が挙げられ、特にヒトが好ましい。被験者は、1型糖尿病に対する治療を受けていても受けていなくてもよい。

10

【0012】

被験者由来の試料は特に限定されないが、被験者への侵襲が少ないものであることが好ましく、例えば、血液、血漿、血清、尿、唾液などの生体から容易に採取できるものが挙げられる。血清や血漿を用いる場合、常法に従って被験者から採血し、液性成分を分離することにより調製することができる。また、被験者由来の試料は、本発明の検査方法を実施する前に、予め低分子量のペプチド画分などを分離除去しておくこともできる。

【0013】

本発明の検査方法で測定される自己抗体(以下、本発明の自己抗体)は、

(1) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体、または
(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドに対する自己抗体である。

20

【0014】

本発明の検査方法で測定される上記(1)の自己抗体が結合するペプチドは、GFAP(gli al fibrillary acidic protein)のアミノ酸配列の部分配列である。GFAPは公知の遺伝子であり、そのヌクレオチド配列やアミノ酸配列も公知である。具体的には、上記(1)の自己抗体が結合するペプチドとしては、ヒトの場合、ヒトGFAPアミノ酸配列(配列番号：11)のアミノ酸番号279～287に該当する配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。また、該部分配列は、例えば配列番号：1で表されるヌクレオチド配列によってコードされる。さらに、上記(1)の抗体が結合するペプチドとしては、非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列からなるペプチドも好ましく挙げることができる。非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列としては、本明細書中の配列番号：2に開示されたアミノ酸配列の情報や、公知の配列データベースを利用して、適切なプライマーやプローブを設計し、RT-PCRやブラークハイブリダイゼーション等の通常の遺伝子工学的手法を用いて容易に取得することが出来る。例えば、ヒトGFAPの部分配列である配列番号：2に対応する、マウスGFAPアミノ酸配列(配列番号：12)の部分配列は、配列番号：8で表されるアミノ酸配列として挙げることができ、該部分配列は、例えば配列番号：7で表されるヌクレオチド配列にコードされる。また、ここで非ヒト哺乳動物とは上記した哺乳動物からヒトを除く哺乳動物である。

30

40

【0015】

また、本発明の検査方法は、天然に存在するGFAPの変異体または多型(1～数アミノ酸の置換、欠失、挿入等)を有するGFAPを有する被験者に対しても用いることができる。従って、本発明の検査方法で測定される上記(2)の自己抗体が結合するペプチドとしては、GFAPアミノ酸配列の部分配列において1又は数個(好ましくは1～数(2～5)個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。そのようなペプチドとしては、ヒトの場合、配列番号：2で表されるアミノ酸配列において1又は数個(好ましくは1～数(2～5)個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付

50

加されたアミノ酸配列からなるペプチドも含まれる。該アミノ酸配列としては、例えば、(1)配列番号：2に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：2に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号：2に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：2に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わせられたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が、1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個））が挙げられ、その中でも、(1)配列番号：2に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、および(2)配列番号：2に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列が好ましく挙げられる。また、上記(2)の自己抗体が結合するペプチドとしては、非ヒト哺乳動物において配列番号：2に対応するアミノ酸配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドも好ましく挙げることができる。そのようなペプチドとしては、マウスの場合、配列番号：4で表されるアミノ酸配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドも含まれる。該アミノ酸配列としては、例えば、(1)配列番号：8に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：8に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号：8に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：8に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わせられたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が、1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個））が含まれ、その中でも、(1)配列番号：8に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、および(2)配列番号：8に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列が好ましく挙げられる。

【0016】

「アミノ酸残基の置換」としては、例えば保存的アミノ酸置換があげられる。保存的アミノ酸置換とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と同様の性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と同じグループに属する他のアミノ酸により置換される。同様の性質の側鎖を有するアミノ酸のグループは、当該分野で公知である。例えば、このようなアミノ酸のグループとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、中性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）があげられる。また、中性側鎖を有するアミノ酸は、さらに、極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、および非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）に分類することもできる。また、他のグループとして、例えば、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、水酸基（アルコール性水酸基、フェノール性水酸基）を含む側鎖を有するアミノ酸（例えば、セリン、トレオニン、チロシン）などもあげることができる。

【0017】

「アミノ酸残基の欠失」としては、例えば配列番号：2で示されるアミノ酸配列の中から、任意のアミノ酸残基を選択して欠失させることができるが、そのなかでもN末端側またはC末端側のアミノ酸残基の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）を欠失させることが好ましい。例えば、配列番号：2に示されるアミノ酸配列のN末端側および／またはC末端側のアミノ酸残基の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列などが挙げられる。

【0018】

「アミノ酸残基の挿入」としては、例えば配列番号：2で示されるアミノ酸配列の内部、N末端側またはC末端側に、アミノ酸残基を挿入させることができる。

【0019】

「アミノ酸残基の付加」としては、例えば配列番号：2で示されるアミノ酸配列の内部、N末端側またはC末端側に、アミノ酸残基を付加させることができるが、そのなかでもN末端側またはC末端側のアミノ酸残基の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）を付加させることが好ましい。例えば、配列番号：2に示されるアミノ酸配列のN末端側および／またはC末端側のアミノ酸残基に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸を付加したアミノ酸配列などが挙げられる。付加するアミノ酸配列は、任意のアミノ酸配列であってよいが、GFAPアミノ酸配列（例えば、ヒトの場合、配列番号：11）において対応するアミノ酸であることが好ましい。例えば、ヒトGFAPアミノ酸配列（配列番号：11）のアミノ酸番号279～287に該当する配列番号：2のN末端側にアミノ酸を5個付加する場合、付加されるアミノ酸配列は配列番号：11のアミノ酸番号274～278に該当するアミノ酸配列であることが好ましく、配列番号：2のC末端側にアミノ酸を5個付加する場合、付加されるアミノ酸配列は配列番号：11のアミノ酸番号288～292に該当するアミノ酸配列であることが好ましい。

【0020】

本発明の自己抗体が結合する前記のペプチドは、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステル何れであってもよい。また、該ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、該カルボキシル基がアミド化またはエステル化されていてもよい。さらに、該ペプチドは、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が、例えばホルミル基、アセチル基などで置換されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が他の置換基（例えば、ホルミル基、アセチル基など）で置換されたものであってもよい。

また、前記のペプチドは酸又は塩基との塩であってもよく、特に酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0021】

前記のペプチドは、公知のアミノ酸配列情報に基づいて化学的に合成することができる。

前記のペプチドのアミノ酸配列の一部を含むペプチドは、好ましくは、上記したGFAPのアミノ酸配列情報に基づいて化学的に合成される。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の1) または2) に記載された方法等が挙げられる。

1) M. Bodanszky およびM.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

2) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

10

20

30

40

50

また、反応後は通常の前記の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0022】

本発明の検査方法における自己抗体の測定は、該自己抗体が認識するペプチド、該自己抗体が認識するペプチドを認識する抗体、該自己抗体に対する二次抗体などを用いて行うことができる。

【0023】

本発明の自己抗体が認識するペプチドとしては、前記のペプチドと同じものを利用することができる。

【0024】

本発明の自己抗体が認識するペプチドを認識する抗体としては、本発明の自己抗体が認識するペプチドを特異的に認識するものである限り特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール(PEG)等のタンパク質安定化作用を有する分子などで修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

【0025】

上記の抗体がモノクローナル抗体である場合、例えば、以下の方法によって調製することができる。

本発明の自己抗体が結合する前記のペプチドを調製する。該ペプチドは、免疫原性を有していれば不溶化したものを直接免疫することもできるが、低分子量の抗原を用いる場合には、これらの抗原ペプチドは通常、免疫原性の低いハプテン分子なので、適当な担体(キャリア)に結合または吸着させた複合体として免疫することができる。担体としては天然もしくは合成の高分子を用いることができる。天然高分子としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のサイログロブリン、例えばニワトリのオボアルブミン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)などが用いられる。合成高分子としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合体または共重合体などの各種ラテックスなどが挙げられる。該キャリアとハプテンとの混合比は、担体に結合あるいは吸着させた抗原に対する抗体が効率よく産生されれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテンに対する抗体の作製にあたり常用されている上記の天然もしくは合成の高分子キャリアーを、重量比でハプテン1に対し0.1~100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。

【0026】

ハプテンとキャリアタンパク質のカップリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同士を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2,4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同士を架橋するN,N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同士を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬(例えば、SPDPなど)を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。またハプテン(ペプチド)のN末端またはC末端にシステイン残基を付与し、キャリアタンパク質のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応さ

10

20

30

40

50

せることもできる。

【0027】

抗原ペプチドは、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射、皮内注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばウサギ、ヤギ、ウシ、ニワトリ、マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウマ、ラクダ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなどが挙げられるが、モノクローナル抗体作製には一般にマウス、ラット、ウサギ等が好ましく用いられる。

10

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから血清抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓又はリンパ節を摘出し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、固相化した抗原ペプチドと抗血清とを反応させた後、固相に結合した抗原ペプチド特異的抗体を、放射性物質や酵素で標識した免疫動物種の抗体に対する抗体により検出することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature), 256巻, 495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

20

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0028】

融合細胞(ハイブリドーマ)の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別及び育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業(株)）又はハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬(株)）などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。

30

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、抗原ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる抗体産生細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）又はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した抗原ペプチド等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

40

【0029】

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相又はプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0030】

50

上記の抗体がポリクローナル抗体である場合、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、前記のペプチドとキャリアタンパク質との複合体を、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫し、該免疫動物から該抗原に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

温血動物を免疫するために用いられるハプテンとキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類及びキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、KLH等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合で結合させる方法が用いられる。

又、ハプテンとキャリアタンパク質のカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水、母乳、卵などから採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0031】

本発明の自己抗体に対する二次抗体としては、例えば、該抗体に対する二次抗体やアプタマーなどが挙げられる。本発明の自己抗体に対するアプタマーは、自体公知のSELEX技術により取得することができる。一方、本発明の自己抗体に対する二次抗体は、該自己抗体またはそのフラグメント（例、F(ab')₂、Fab）を免疫原として、上記の「本発明の自己抗体が認識するペプチド」に記載の方法に従って取得することができる。免疫原として用いる抗体のサブクラスとしては、IgG1、IgG2b およびIgG2cなどが挙げられるが、IgG2bが好ましい。尚、SELEX法や動物の免疫に供する本発明の自己抗体は、1型糖尿病患者由来の血清、血漿などから、前記のペプチドに対するアフィニティーを利用して単離することができる。得られる自己抗体をペプシンやパバインで消化することにより、所望のフラグメントを得ることができる。

【0032】

本発明の検査方法は、特に制限されるべきものではなく、被験試料中の自己抗体量に対応した抗原、抗体もしくは抗原-抗体複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗体を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する免疫学的測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法、サンドイッチ法、ウェスタンブロットティング、SPR、比濁法等が好適に用いられる。

【0033】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系

10

20

30

40

50

を用いることもできる。

【0034】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

【0035】

サンドイッチ法においては、自己抗体が認識する不溶化したペプチドに被験者由来の試料を反応させ（1次反応）、さらに該自己抗体に対する標識二次抗体もしくは標識抗原を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の量（活性）を測定することにより、試料中の本発明の自己抗体量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。

【0036】

競合法では、被験者由来の試料中の自己抗体と、同じ抗原を認識する標識抗体とを抗原ペプチドに対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗体（F）と、抗原と結合した標識抗体（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、試料中の自己抗体量を定量する。

イムノメトリック法では、被験者由来の試料の自己抗体と、同じ抗原を認識する固相化抗体とを一定量の標識化抗原に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、試料中の自己抗体と過剰量の標識化抗原とを反応させ、次に固相化抗体を加え未反応の標識化抗原を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し試料中の自己抗体量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被験者由来の試料中の自己抗体量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0037】

あるいは、表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いて、市販のセンサーチップ（例、Biacore製）の表面上に、常法に従って自己抗体が認識するペプチドを固定化し、これに被験者由来の試料を接触させた後、該センサーチップに特定の波長の光を特定の角度から照射し、共鳴角度の変化を指標にして、固定化したペプチドへの自己抗体の結合の有無を判定することができる。あるいはまた、自己抗体が認識するペプチドを上記したような質量分析計に適合し得るプローブの表面上に固定化し、該プローブ上の該ペプチドに試料を接触させ、該ペプチドに捕捉された試料成分を質量分析にかけ、該ペプチドを認識する自己抗体の分子量に相当するピークを検出する方法などによっても、本発明の自己抗体の測定が可能である。

【0038】

上記のいずれかの方法により測定された被験者由来の試料中の本発明の自己抗体のレベルが、健常者由来の対照試料中の該マーカーのレベルに比べて有意に上昇している場合、被験者は1型糖尿病に罹患している可能性が高いあるいは将来的に罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0039】

既に1型糖尿病を発症している患者に対して本発明の検査方法を適用する場合は、1型糖尿病患者から時系列で試料を採取し、各試料における本発明の自己抗体の発現の経時変化を調べることにより行うことが好ましい。試料の採取間隔は特に限定されないが、患者のQOLを損なわない範囲でできるだけ頻繁にサンプリングすることが望ましい。これらのマーカーのレベルが経時的に減少した場合には、該患者における1型糖尿病の病態が改善されている可能性が高いと判定することができる。

【0040】

さらに、上記時系列的なサンプリングによる1型糖尿病の検査方法は、前回サンプリン

10

20

30

40

50

グと今回サンプリングとの間に、被験者である患者対して該疾患の治療措置が講じられた場合に、当該措置による治療効果を評価するのに用いることができる。即ち、治療の前後にサンプリングした試料について、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められると判定された場合に、当該治療の効果があったと評価することができる。一方、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められない、あるいはさらに悪化していると判定された場合には、当該治療の効果がなかったと評価することができる。

【0041】

2. 1型糖尿病の予防または治療用ワクチン

後述する実施例の通り、本発明の自己抗体のエピトープとはアミノ酸配列が異なるGFAPの部分ペプチドをワクチンとして用いることによって、NODマウスにおける血中Cペプチドレベルの減少および膵島へのT細胞浸潤を抑制し、1型糖尿病の発症を遅延させることができた。従って、本発明はまた、以下の(1)～(3)のいずれかの物質を含む1型糖尿病および1型糖尿病が関連する疾患の予防または治療用ワクチン(以下、本発明のワクチン)：

(1) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列からなるペプチド；

(2) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；および

(3) 上記(1)または(2)のペプチドを発現し得る発現ベクターを提供するものである。

【0042】

本発明のワクチンの予防または治療対象疾患は、1型糖尿病に加えて、1型糖尿病が関連する疾患を含む。1型糖尿病が関連する疾患としては、例えば、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、高インスリン血症、肥満等が挙げられる。

【0043】

本発明のワクチンの投与対象は、本発明の検査方法の被験者と同じであってよい。なお、本発明のワクチンが投与される場合、該ワクチンに含まれる物質は投与対象由来の物質(すなわち、ヒトに投与する場合、該ワクチンはヒト由来の物質であり、マウスに投与する場合、該ワクチンはマウス由来の物質である)であることが好ましい。

【0044】

本発明のワクチンに含まれる物質は、

(1) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列からなるペプチド；

(2) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列または非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；および

(3) 上記(1)または(2)のペプチドを発現し得る発現ベクターからなる群より選ばれる物質である。

【0045】

本発明のワクチンに含まれる上記(1)のペプチド(以下、上記(2)のペプチドと併せて、本発明のペプチド)は、GFAPのアミノ酸配列の部分配列である。上記(1)のペプチドとしては、ヒトの場合、ヒトGFAPアミノ酸配列(配列番号：11)のアミノ酸番号417～430に該当する配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。また、該部分配列は、例えば配列番号：3で表されるヌクレオチド配列によってコードされる。さらに、上記(1)のペプチドとしては、非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列からなるペプチドも好ましく挙げることができる。非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列としては、本明細書中の配列番号：4に開示されたアミノ酸配列の情報や、公知の配列データベースを利用して、適切なプライマーやプローブを設計し、RT-PCRやブラークハイブリダイゼーション等の通常

10

20

30

40

50

の遺伝子工学的手法を用いて容易に取得することが出来る。例えば、ヒトGFAPの部分配列である配列番号：4に対応する、マウスGFAPアミノ酸配列（配列番号：12）の部分配列は、配列番号：10で表されるアミノ酸配列として挙げることができ、該部分配列は、例えば配列番号：9で表されるヌクレオチド配列にコードされる。また、ここで非ヒト哺乳動物とは上記した哺乳動物からヒトを除く哺乳動物である。

【0046】

また、本発明のワクチンは、天然に存在するGFAPの変異体または多型（1～数アミノ酸の置換、欠失、挿入等）を有するGFAPを有する対象に対しても用いることができる。従って、本発明のワクチンに含まれる上記（2）のペプチドとしては、GFAPアミノ酸配列の部分配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。そのようなペプチドとしては、ヒトの場合、配列番号：4で表されるアミノ酸配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドも含まれる。該アミノ酸配列としては、例えば、(1)配列番号：4に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：4に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号：4に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：4に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が、1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個））が含まれ、その中でも、(1)配列番号：4に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、および(2)配列番号：4に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列が好ましく挙げられる。また、上記（2）のペプチドとしては、非ヒト哺乳動物において配列番号：4に対応するアミノ酸配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドも好ましく挙げることができる。そのようなペプチドとしては、マウスの場合、配列番号：10で表されるアミノ酸配列において1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドも含まれる。該アミノ酸配列としては、例えば、(1)配列番号：10に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：10に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3)配列番号：10に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：10に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列（この場合、変異したアミノ酸の総和が、1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個））が含まれ、その中でも、(1)配列番号：10に示されるアミノ酸配列中の1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、および(2)配列番号：10に示されるアミノ酸配列に1又は数個（好ましくは1～数（2～5）個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列が好ましく挙げられる。

【0047】

「アミノ酸残基の欠失、置換、挿入又は付加」としては、本発明の検査方法において記載したアミノ酸配列の欠失、置換、挿入又は付加に関する記載に従ってよい。

【0048】

本発明のペプチドは、付加的なアミノ酸を含んでいてもよい。このようなアミノ酸付加は、該ペプチドがGFAPに対する特異的免疫反応を誘導する限り許容される。付加されるアミノ酸配列は、特に限定されないが、例えばペプチドの検出や精製等を容易にならしめる

ためのタグを挙げることが出来る。タグとしては、Flagタグ、ヒスチジンタグ、c-Mycタグ、HAタグ、AUIタグ、GSTタグ、MBPタグ、蛍光タンパク質タグ（例えばGFP、YFP、RFP、CFP、BFP等）、イムノグロブリンFcタグ等を例示することが出来る。アミノ酸配列が付加される位置は、本発明のペプチドのN末端及び／又はC末端である。

【0049】

本発明のペプチドに用いられるアミノ酸はL体、D体およびDL体を包含するものであるが、通常、L体であることが好ましい。これらのペプチドは、通常のペプチド合成法によって合成され本発明に供することが出来るが、本発明においては製造方法・合成方法、調達方法等については、特に限定されない。

【0050】

上記（3）の発現ベクターにおいては、上述の（1）又は（2）のペプチドをコードするヌクレオチド（DNA又はRNA、好ましくはDNA）が、投与対象である哺乳動物の細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターの下流に機能的に連結されている。即ち、（3）の発現ベクターは、プロモーターの制御下で、転写産物として（1）又は（2）のペプチドを発現し得る。（3）の発現ベクターを哺乳動物に投与することにより、該哺乳動物の体内において（1）又は（2）のペプチドが産生され、該哺乳動物に（1）又は（2）のペプチドに対する特異的免疫反応が誘導される。

使用されるプロモーターは、投与対象である哺乳動物の細胞内で機能し得るものであれば特に制限はない。プロモーターとしては、p o l I系プロモーター、p o l I I系プロモーター、p o l I I I系プロモーター等を使用することができる。具体的には、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR等のウイルスプロモーター、 β -アクチン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーター等が用いられる。

【0051】

上記（3）の発現ベクターは、好ましくは上述の（1）又は（2）のペプチドをコードするヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）をさらに含有することもできる。

【0052】

本発明において発現ベクターに使用されるベクターの種類は特に制限されないが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、ウイルスベクター、プラスミドベクター等を挙げることが出来る。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等が挙げられる。製造及び取り扱いの容易性や経済性を考慮すると、プラスミドベクターが好ましく用いられる。

【0053】

本発明のワクチンは、上記（1）若しくは（2）のペプチド又は（3）の発現ベクターに加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含む医薬組成物として提供され得る。

【0054】

医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリド等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0055】

さらに、本発明のワクチンが上記（3）の発現ベクターの場合、該発現ベクターの細胞内への導入を促進するために、本発明のワクチンは更に核酸導入用試薬を含むことができ

10

20

30

40

50

る。発現ベクターとしてウイルスベクターを使用する場合には、遺伝子導入試薬としてはレトロネクチン、ファイブロネクチン、ポリブレン等を用いることができる。また、発現ベクターとしてプラスミドベクターを使用する場合には、リポフェクチン、リポフェクタミン (lipofectamine)、DOGS (トランスフェクタム)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ (エチレンイミン) (PEI) 等の陽イオン性脂質を用いることが出来る。

【0056】

本発明のワクチンは、上記 (1) 若しくは (2) のペプチド又は (3) の発現ベクターによってコードされるペプチドの免疫原性を高めるために、キャリアタンパク質をさらに含むことが好ましい。キャリアタンパク質は、一般には、分子量が小さいために免疫原性を有さない分子に結合して免疫原性を付与する物質であり、当技術分野で公知である。キャリアタンパク質の例としては、牛血清アルブミン (BSA)、ウサギ血清アルブミン (RSA)、オボアルブミン (OVA)、スカシ貝ヘモシアニン (KLH)、チログロブリン (TG)、免疫グロブリン等などが好ましく挙げられる。特に好ましいキャリアタンパク質は、スカシ貝ヘモシアニン (KLH) である。上記 (3) の発現ベクターの場合は、上記 (1) または (2) のペプチドをコードするヌクレオチドに、該キャリアタンパク質をコードするヌクレオチドが連結されていてよい。

【0057】

本発明のワクチンはまた、製薬上許容可能で且つ活性成分と相溶性であるアジュバントをさらに含有することが好ましい。アジュバントは、一般には、宿主の免疫応答を非特異的に増強する物質であり、多数の種々のアジュバントが当技術分野で公知である。アジュバントの例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-L-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (MTP-PE)、Quil A (登録商標)、リゾレシチン、サポニン誘導体、プルロニックポリオール、モンタニド ISA-50 (Seppic, Paris, France)、Bayol (登録商標) および Markol (登録商標)。

【0058】

本発明のワクチンは、経口又は非経口的に哺乳動物に対して投与することが出来る。ポリペプチドや発現ベクターは、胃の中で分解され得るので、非経口的に投与することが好ましい。経口投与に好適な製剤としては、液剤、カプセル剤、サシェ剤、錠剤、懸濁液剤、乳剤等を挙げることができる。非経口的な投与 (例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など) に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

【0059】

医薬組成物中の有効成分の含有量は、通常、医薬組成物全体の約 0.1 ~ 100 重量%、好ましくは約 1 ~ 99 重量%、さらに好ましくは約 10 ~ 90 重量% 程度である。

本発明のワクチンの投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態等によって異なるが、有効成分が上記 (1) 又は (2) のペプチドの場合は、通常成人 1 人当たりポリペプチドを、一回当たり 1 µg ~ 1000 µg の範囲、好ましくは 20 µg ~ 100 µg の範囲で、通常 4 週間から 12 週間に亘って、2 回から 3 回投与し、抗体価が低下した場合にはその都度 1 回追加投与する。有効成分が上記 (3) の発現ベクターの場合は、通常成人 1 人当

10

20

30

40

50

たり発現ベクターを、一回当たり $1\text{ }\mu\text{g}\sim 1000\text{ }\mu\text{g}$ の範囲、好ましくは $20\text{ }\mu\text{g}\sim 100\text{ }\mu\text{g}$ の範囲で、通常4週間から12週間に亘って、2回から3回投与し、抗体価が低下した場合にはその都度1回追加投与する。

【0060】

本発明のワクチンを哺乳動物へ投与することにより、T細胞分化がTh1からTh2にシフトし、血中Cペプチドレベルの減少および膵島へのT細胞浸潤が抑制され、結果として1型糖尿病および1型糖尿病が関連する疾患に対する予防または治療効果が発揮される。

【0061】

また本発明は、本発明のワクチンの1または2以上の成分を包含する、1または2以上の容器からなるキットを提供する。本発明のキットを用いることによって、1型糖尿病およびその関連疾患を予防することができ、またはその症状を治療もしくは軽減することができる。

【実施例】

【0062】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0063】

動物研究と免疫

9週齢の雌NOD/ShiLtJマウス(n=30)をCharles River (Japan)から購入し、温度および光サイクル調節施設で飼育し、自由に餌と水を摂取させた。マウスは、グルコメーター(Sanwa Kagaku Kenkyusho, Japan)による2日連続の随時グルコース濃度が 250ng/dl より大きかった場合に、糖尿病マウスであると診断した。免疫前に、ペプチド溶液を等量の完全／不完全フロイントアジュバント(CFA/IFA; Wako, Japan)と混合した。ワクチン群では、0, 2, 4及び42週目に $50\text{ }\mu\text{g}$ のGFAPペプチド(C4)をNODマウス(n=6)に皮下注射した。KLHコントロール群では、等量のフロイントアジュバントと混合した等量のKLHを注射した。生理食塩水コントロール群では、等量の生理食塩水を注射した。血清を尾静脈から回収し、ELISAで免疫ペプチドに対する抗体価を測定した。

【0064】

ワクチンの設計と合成

高抗原性解析に基づき、発明者らはマウスGFAPタンパク質から4つのペプチド：C1ペプチド(79-87aa;配列番号:5), C2ペプチド(102-110aa;配列番号:6), C3ペプチド(276-284aa;配列番号:8), C4ペプチド(414-427aa;配列番号:10)を選択した。候補抗原配列のN末端にBSAをコンジュゲートし、合成ペプチドを逆相HPLC(Peptide Institute Inc., Osaka, Japan.)で精製した(>98%純度)。

【0065】

ELISAアッセイ

抗体価アッセイにおいて、ELISAプレート(MaxiSorp Nunc, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan)を $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の候補GFAPペプチド(上記4種類)、 $5\text{ }\mu\text{g}$ の組換えGFAPタンパク質(Cusabio, China)または $2\text{ }\mu\text{g}$ の組換えGAD65タンパク質(Abnova Taiwan)で炭酸バッファー中 4°C 、一晚コートした。ペプチドは予めキャリアタンパク質BSA(Peptide Institute Inc., Japan)にコンジュゲートした。全ウェルを3%スキムミルク含有PBSでブロッキングした後、血清をブロッキングバッファーで100倍から325,000倍に希釈した。プレートを血清と共にインキュベーション(4°C 一晚)し、洗浄した後、プレートをマウスIgG特異的HRPコンジュゲート抗体(GE Healthcare.UK)で室温、2時間培養した。なお、IgGサブクラス決定アッセイでは、抗マウスIgサブクラス特異的HRPコンジュゲート抗体(IgG1, IgG2b およびIgG2c)を用いた。PBSでプレートを洗浄後、パーオキシダーゼ発色基質である、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB; Sigma Aldrich)で発色させ、0.5N硫酸を用いて反応を終結させた。マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Inc., Japan)を用いて450nmにおける吸光度を測定した。最大半量抗体価は、それぞれの試料の希釈範囲内における最大値に従って決定した。

10

20

30

40

50

【0066】

ペプチドアッセイおよび組織学的解析

Cペプチドアッセイでは、 $100\mu\text{l}$ のWorking Strength Conjugate を16時間絶食NODマウス由来の $10\mu\text{l}$ 血清と各ウェル(96 well plate Mouse C peptide ELISA, ALPCO,.U.S)中で2時間、室温で混合した。TMB基質と停止溶液でインキュベーション後、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Inc., Japan)で450nmにおける吸光度を測定した。組織学的解析では、膵臓を回収し、4%ホルマリンで一晩固定し、パラフィンに埋包し、 $4\mu\text{m}$ 切片にスライスし、ヘマトキシリン・エオシン(HE)で染色した。各マウス(n=3)では、マウス毎に少なくとも35の膵島を解析した。染色はWeaver, D.J.,et al,. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 167, 586-592 (2001)に記載の方法に従って解析した。正常膵島：T細胞浸潤なし、膵島炎前：膵島へのT細胞浸潤、膵島炎：ほぼ100%の膵島へのT細胞浸潤

10

【0067】

ELISPOTアッセイ

96ウェルELISPOTプレート(Millipore, Japan)を抗マウスIFN- α キャプチャー抗体または抗マウスIL-4キャプチャー抗体で4℃、一晩コートした。インキュベーション後、プレートを0.05% Tween 20含有PBS(PBS-T)で洗浄し、1%BSAおよび5%スクロースを含むPBSでブロッキングした。次いで、マウス由来の脾細胞懸濁液をプレートに加え(10^6 細胞/ウェル)、GFAP(C3あるいはC4)ペプチド、GFAPタンパク質、GAD65タンパク質、KLHおよびPHAを $10\mu\text{g/ml}$ で37℃、48時間、刺激した。インキュベーション後、プレートをPBS-Tで洗浄した。ウェルをビオチン化抗マウスIFN- α 抗体またはビオチン化抗マウスIL-4抗体で4℃、一晩インキュベートし、PBS-Tで洗浄した。ストレプトアビジン-APを各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。PBS-Tで洗浄後、プレートをBCIP/NBT溶液で30分間、室温でインキュベートした。最後に、プレートを水で洗浄し、室温で風乾させ、着色点の数を解剖顕微鏡(Leica LMD6500, Germany)を用いてカウントした。

20

【0068】

統計解析

全データは、平均値±標準誤差として表した。2群間の差は対応のない両側スチューデントのt検定(the unpaired 2-tailed Student's t-test)を用いて検証した。自己抗体価とCペプチド間の相関は、対応のない両側ピアソン相関解析(the unpaired 2-tailed Pearson correlation analysis)を用いて検証した。2群以上が関わるデータセットは、Prism GraphPadバージョン5.01(GraphPad Software Inc.)を用いてターキーのポストホック試験(Tukey's post-hoc test)で検証した。統計的差異は、 $P<0.05$ の時に有意であるとみなした。

30

【0069】

実施例1 NODマウスにおけるGFAPとCペプチドの関連

NODマウスは1型糖尿病モデルマウスとして知られている。発明者らは、9週齢からの雌NODマウス(n=30)における1型糖尿病の発症の状況を評価した(図1A)。随時血中グルコースレベルが2日連続250mg/mlより大きい場合に、NODマウスは糖尿病を発症したと判断した。その結果、NODマウスにおける糖尿病の発症は18週齢から確認できた。また、発明者らは、30週齢ではほぼ半分以上のマウスが糖尿病になっていることを確認した。これまでに、NODマウスでは週齢依存的に自己抗原GFAPに対する抗体が増加することが報告されていたため、発明者らは抗GFAP抗体に着目し、9週齢からのNODマウスにおける抗GFAP抗体産生を評価し、1型糖尿病に関連する公知の自己抗原GAD65に対する抗体産生と比較した。その結果、抗GFAP抗体は時間依存的に増加した(図2A)。同様に、抗GAD65抗体も時間依存的に増加した(図2B)。しかし、21および25週齢の抗GFAP抗体の増加倍率は、27週齢時のグルコースレベルと相関は見られなかった(図3A)。同様に、21および25週齢の抗GAD65抗体の増加倍率も、27週齢時のグルコースレベルと相関は見られなかった(図3B)。

40

次に発明者らは、抗GFAP抗体、抗GAD65抗体と β 細胞機能を反映するCペプチド分泌との関連性を検証した。その結果、糖尿病群と非糖尿病群を区別せずに25週齢の全NODマウス

50

で検証した場合、抗GFAP抗体、抗GAD65抗体の産生と空腹時Cペプチド分泌は相関しなかった(図4A, B)。さらに、25週齢の全NODマウスを糖尿病群(DM; グルコースレベルが250mg/mlより大きい)と非糖尿病群(non-DM; グルコースレベルが250mg/ml以下)に分けて検証した。糖尿病群では、抗GFAP抗体、抗GAD65抗体の産生と空腹時Cペプチド分泌は逆相関を示した(図4C, D)。一方、非糖尿病群では、抗GFAP抗体、抗GAD65抗体の産生と空腹時Cペプチド分泌は相関しなかった(図4E, F)。これらの結果は、糖尿病マウスのCペプチド分泌の減少に抗GFAP抗体および抗GAD65抗体が関与している可能性を示す。

【0070】

実施例2 抗GFAP抗体の検出による1型糖尿病の発症予測

NODマウスにおいて抗GFAP抗体および抗GAD65抗体を糖尿病の予測マーカーとして使用し
10
うるかを評価するために、17, 21及び25週齢で上記抗体が陽性(9週齢のNODマウスの上記
抗体価に比べて、17, 21及び25週齢における抗体価が2倍以上)であったマウスが、30週
齢時点で糖尿病を発症しているか否かについて調査した。マウスは、グルコメーター(San
wa Kagaku Kenkyusho, Japan)による2日連続の随時グルコース濃度が250ng/dlより大きか
った場合に、糖尿病マウスであると診断した。その結果、17週齢で抗GFAP抗体陽性と判断
されたマウスのうち30%、21または25週齢で抗GFAP抗体陽性と判断されたNODマウスの
うち約70%が糖尿病を発症した(図5A)。これらの結果は、抗GFAP抗体はNODマウスに
おける糖尿病発症の鋭敏なマーカーであることを示している。また同様に、抗GAD65抗体
20
が陽性であったNODマウスについて検証し、17週齢で抗GAD65抗体陽性と判断されたマウ
スのうち約20%、25週齢で抗GAD65抗体陽性と判断されたマウスのうち43%が糖尿病を
発症した(図5B)。さらに、21週齢または25週齢において抗GFAP抗体と抗GAD65抗体が陽
性と判断されたNODマウスは、約35%が糖尿病を発症した(図5C)。本結果は、抗GFAP
抗体と抗GAD65抗体は1型糖尿病の発症と相関する点で一致していたが、抗GFAP抗体の方が
より鋭敏であることを示す。また、1型糖尿病発症と抗GFAP抗体と抗GAD65抗体が陰性マ
ウスとの間の関連性は、時間依存的に弱まった(図5D)。これらの結果は、抗GFAP抗体と
抗GAD65抗体がNODマウスにおける1型糖尿病発症の信頼性のある予測マーカーであるこ
を示すものである。

【0071】

実施例3 GFAPワクチンの抗原配列の選択とスクリーニング

発明者らは、NODマウスの抗GFAP抗体をさらに解析し、GFAPの3次元構造予測に基づき、
30
マウスGFAPのB細胞エピトープとして4つの候補ペプチド(C1ペプチド、C2ペプチド、C3ペ
プチド、C4ペプチド)を選択した。28週齢のNODマウスにおいて、抗GFAP抗体は主にC3ペ
プチドに対して結合した(図6A)。この結果は、抗GFAP抗体は主にC3ペプチドエリアに結
合することを示唆している。さらに、発明者らはELISAアッセイを用いてC3ペプチドに結
合しうる抗GFAP抗体のIgGサブクラスを検証した。NODマウスの全長GFAPタンパク質に結合
する抗GFAP抗体を検証した結果(図1B)と同様に、C3ペプチドに結合する抗GFAP抗体のI
gG2bの割合はIgG1(希釈1:100)より大きかった(図6B)。この結果は、C3ペプチドを抗原
とする抗体がTh1型に分化したT細胞と関連していることを示しており、1型糖尿病発症と
の関連が示唆される。

【0072】

実施例4 GFAPワクチンによるNODマウスの1型糖尿病の調節

発明者らは、NODマウスに対する免疫寛容を誘導するために治療用GFAPワクチンを設計
した。1型糖尿病はT細胞依存的な組織特異的自己免疫疾患である一方、B細胞から産生さ
れる抗体により膵β細胞が傷害される可能性も否定できていないため、NODマウスで上昇
しているC3ペプチドの抗原配列を避けてC4ペプチドを選択した。さらに発明者らは、C4ペ
プチドに免疫反応をTh2方向へシフトさせるKLHをコンジュゲートしたペプチドワクチン(G
FAPワクチン)を設計した。該ワクチンを9週齢の雌NODマウス(n=6)に、2週間ごとに3回投
与した。マウス毎に50μgのペプチドをフロイントアジュバントと組み合わせて投与した
。GFAPワクチンに対する抗体産生はELISA力価アッセイによって評価した。GFAPワクチン
で免疫されたNODマウス中では誘導された抗体が顕著に増加したが、KLHワクチンや生理食
50

塩水を投与されたマウスでは抗GFAP抗体の上昇は確認できなかった。さらに、上昇した抗体力価は30週齢で最大に達した(図7A)。抗体価を減弱させないために、42週齢時点でGFAPワクチンでNODマウスを再ブーストした結果、抗体価は再上昇した。

NODマウスの1型糖尿病の発症に対するGFAPワクチンの効果を検証するために、発明者らは、生理食塩水、GFAPワクチンまたはKLHワクチンで処理されたマウス群の糖尿病発症(グルコースレベルが250mg/mlより大きい)を評価した。図7Bに示されるように、生理食塩水で処理したマウスのほとんどは糖尿病を発症したが、GFAPワクチンまたはKLHワクチンは、52週齢のNODマウスの糖尿病発症を完全に抑制した。さらに、37週齢のNODマウスの血清中の空腹時Cペプチドレベルは、GFAPワクチンまたはKLHワクチンで免疫したマウスに比べて有意に少なかった(図8A)。これらの結果から、GFAPワクチンまたはKLHワクチンはNODマウスの1型糖尿病の発症を効果的に遅らせることが分かった。また、GFAPワクチンが膵島炎を効果的に抑制することができるか否かを検証するために、発明者らは膵島の組織学的解析を行った。GFAPワクチンを投与されたNODマウスは、生理食塩水やKLHワクチンを投与されたマウスに比べて、T細胞の浸潤が有意に抑制された(図8B)。これらの結果から、GFAPワクチンが、膵島へのT細胞の浸潤の抑制することでNODマウスの糖尿病の症状を有意に改善することが示唆された。また興味深いことに、KLHワクチンを投与された30週齢のNODマウスでは、GFAPワクチンを投与されたマウスに比べて、T細胞の浸潤の程度が有意に大きかったが、KLHワクチン群とGFAPワクチン群の糖尿病の症状に顕著な差異は確認できなかった。

【0073】

実施例5 GFAPワクチンによるTh1偏重からTh2偏重への免疫応答のシフト

1型糖尿病や他の自己免疫疾患におけるT細胞応答は、Th1リンパ球によって調節されている。そこで、発明者らはELISPOTアッセイを用いて1型糖尿病を発症したNODマウスおよび1型糖尿病を発症していないNODマウスのT細胞活性を評価した(図9)。C3ペプチド(276-284aa)、組換えGFAP(全長)、および組換えGAD65(全長)による刺激はそれぞれ、IL-4よりIFN- γ を産生する脾臓細胞を有意に増加させた。すなわち、IFN- γ 有意な活性化が認められたことから、これらの刺激が1型糖尿病で認められるT細胞応答であるTh1リンパ球の活性化を促すことが分かった。次に、GFAPワクチンによって誘導された抗体の結合部位を確認するために、発明者らは、C1ペプチド、C2ペプチド、C3ペプチドまたはC4ペプチドが固定されたELISAアッセイを用いて、GFAPワクチンを投与されたNODマウス由来の抗GFAP抗体を評価した。GFAPワクチンで免疫されたマウスにおいて、C4ペプチドに結合する抗体が、他の3つのペプチドに結合する抗体に比べて有意に増加した(図8C)。また興味深いことに、C4ペプチドを用いてワクチンで免疫したにも関わらず、その周辺の抗原であるC1、C2、C3ペプチドに対する抗体も増加していた(antibody spreading) KLHワクチンまたは生理食塩水を投与されたNODマウスでは、C3ペプチドに対する抗体の産生がC1ペプチド、C2ペプチド、C4ペプチドに対する抗体よりも非常に大きかった。さらに、C3ペプチドに対する自己抗体は、生理食塩水群よりもKLHワクチンで免疫されたマウスで有意に減少した。これらの結果は、KLHワクチンによる糖尿病の発症抑制は細胞毒性抗体(C3ペプチドに対する自己抗体)の減少によるものであったことを示唆した。さらに、GFAPワクチンがNODマウスにおけるT細胞応答をシフトさせるか否かを検証するために、発明者らは、IgGサブクラスELISAアッセイおよびELISPOTアッセイを用いてT細胞の分化を評価した。IgGサブクラス解析では、GFAPワクチンは、IgG2bやIgG2c産生よりも強くIgG1産生を誘導した(図8D)。膵臓の β 細胞を病理学的に確認したところ、GFAPワクチン群ではinsulinitisあるいはpre-insulinitisの β 細胞の障害が低下していた(図8B、図10A)。図10Bに示される通り、KLHによる刺激はGFAPワクチンで免疫されたマウスの脾臓細胞からのIL-4およびIFN- γ の産生を誘導し、ELISPOTアッセイにおいてIL-4の有意な産生を生じさせた。GFAPペプチド(C4)は、非刺激群と比較してT細胞応答を誘導しなかった。さらに、KLHワクチンで免疫したNODマウスでは、KLH刺激後にIL-4およびIFN- γ の産生が有意に誘導された(図10C)。これらの結果は、GFAPワクチンはT細胞応答をTh1偏重から、より無害で、保護効果のある、Th2偏重にシフトさせることを示唆する。全体として、これらの結果から、GFAP

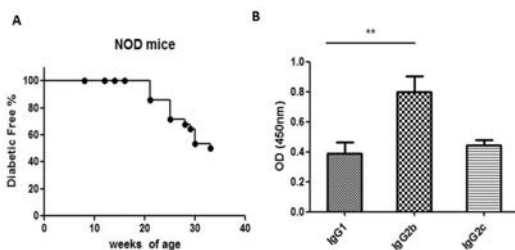
ワクチンは1型糖尿病の発症を有意に遅延させ、脾臓細胞中においてTh1からTh2へT細胞応答をシフトさせることによってCペプチドの減少を抑制していることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

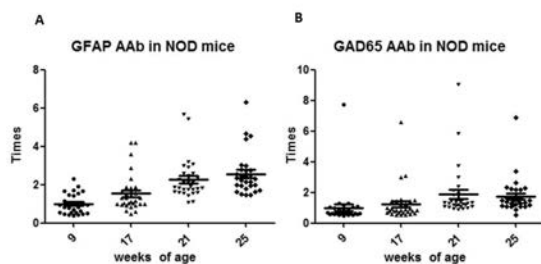
【0074】

GFAPの特定のアミノ酸配列を認識する自己抗体を被験者の試料から検出することにより、被験者が1型糖尿病を発症しているかあるいは将来的に発症するかを精度よく判断することができる。また、GFAPの特定のアミノ酸配列をワクチンとして用いることによって、T細胞反応性を抑制し、Th1偏重からTh2偏重のT細胞分化を誘導することによって、1型糖尿病および1型糖尿病に関連する疾患の発症を予防または治療できる。

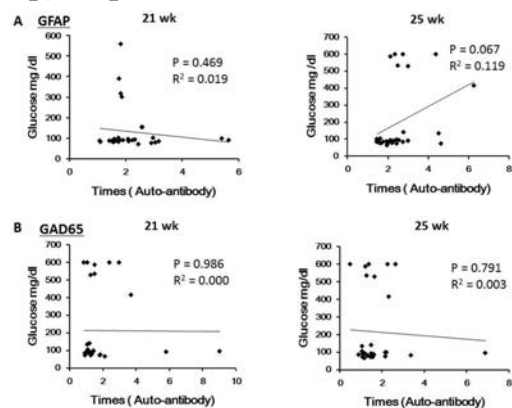
【図1】



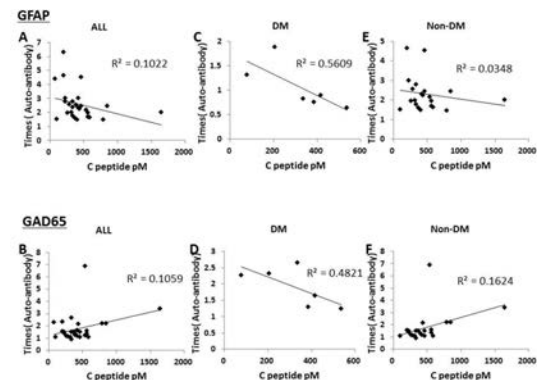
【図2】



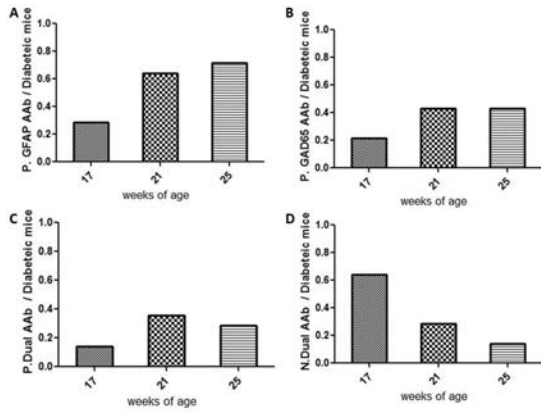
【図3】



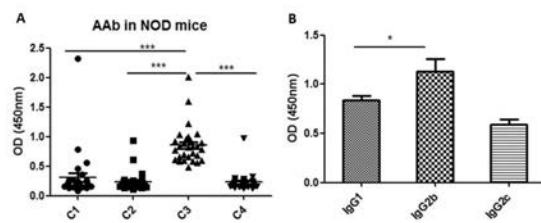
【図4】



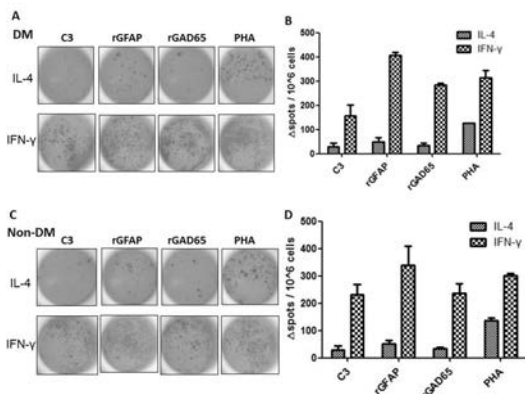
【図 5】



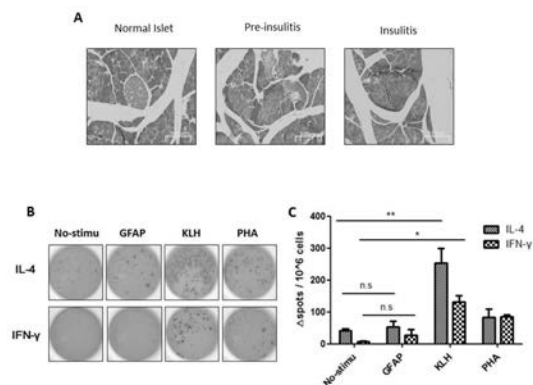
【図 6】



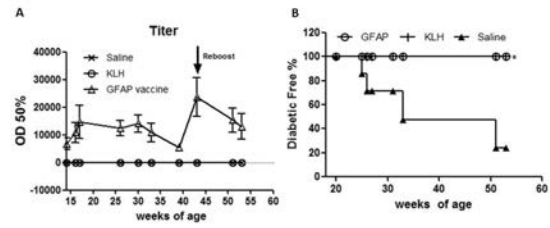
【図 9】



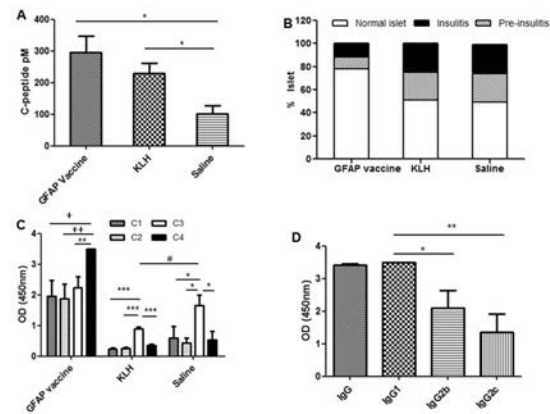
【図 10】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2017040544000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/235 (2006.01)	A 6 1 K 39/235	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
	C 0 7 K 14/47	

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 中神 啓徳
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 森下 竜一
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 郡山 弘
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA37 FB03
4C085 AA03 AA08 AA38 BB11 CC03 CC21 EE01 EE05 EE06 FF13
FF18 FF24 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
4H045 CA40 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	新型1型糖尿病生物标志物和新型治疗性疫苗		
公开(公告)号	JP2017040544A	公开(公告)日	2017-02-23
申请号	JP2015162065	申请日	2015-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	中神啓徳 森下 竜一 郡山 弘		
发明人	中神 啓徳 森下 竜一 郡山 弘		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61P3/10 A61K39/21 A61K39/235 A61K39/39 G01N33/50 C07K14/47		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N A61K39/00.H A61K39/12 A61P3/10 A61K39/21 A61K39/235 A61K39/39 A61K39/00.G G01N33/50.Z C07K14/47 G01N33/53.NZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA37 2G045/FB03 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/EE06 4C085/FF13 4C085/FF18 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供检查1型糖尿病的方法和预防或治疗1型糖尿病的疫苗。解决方案：提供了一种用于检查1型糖尿病的方法，其包括从来自受试者的样品测量以下（1）或（2）的自身抗体：（1）针对由SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列构成的肽的自身抗体或在非人哺乳动物中由对应于SEQ ID NO：2的氨基酸序列构成的肽，和（2）如SEQ ID NO：2所示在肽或非人类哺乳动物包含氨基酸序列ID NO序列：在对应于2种，1或数个氨基酸残基的氨基酸序列中取代，缺失，针对肽的自身抗体由.....组成插入或在氨基酸序列中添加。

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2017-40544
(P2017-40544A)

(43) 公開日
平成29年2月23日 (2017. 2. 23)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 K 39/21 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/12

A 6 1 P 3/10

A 6 1 K 39/21

Z N A N

H

テーマコード (参考)

2 G 0 4 5

4 C 0 8 5

4 H 0 4 5

審査請求 未請求

請求項の数 8 O L (全 24 頁)

最終頁に続く

(21) 出願番号
(22) 出願日

特願2015-162065 (P2015-162065)
平成27年8月19日 (2015. 8. 19)

(71) 出願人

504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘1番1号

(74) 代理人

弁理士 高島 一
100080791

(74) 代理人

弁理士 土井 京子
100125070

(74) 代理人

弁理士 鎌田 光宣
100136629

(74) 代理人

弁理士 田村 弥栄子
100121212

(74) 代理人

弁理士 田村 弥栄子
100117743

(74) 代理人

弁理士 村田 美由紀
100163658

(74) 代理人

弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1 型糖尿病の新規バイオマーカーおよび新規治療用ワクチン