

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09429

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病患者膵より同定された2種のウイルスによる 細胞傷害機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of beta cell destruction by DNA and RNA viruses identified in the pancreases of patients with fulminant type 1 diabetes

研究代表者

今川 彰久 (Imagawa, Akihisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80373108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNAであるサイトメガロウイルス再活性化を伴い発症した劇症1型糖尿病患者膵組織を解析し、細胞傷害の鍵分子候補としてウイルス受容体ZBP1、RIG-Iと型1IFN産生に必須のIRF3を同定した。また、劇症1型糖尿病のin vitro治療モデルとして、健康人由来iPS細胞由来インスリン陽性細胞へのRNAウイルスの擬似感染によりアポトーシスが亢進、それがGLP1受容体作動薬により抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified ZBP1 and RIG-I (virus receptors) and IRF3 (transcription factor for type I interferon production) as candidate key molecules by the analysis of pancreas specimens of a fulminant type 1 diabetic patient with cytomegalovirus reactivation. We also established in vitro treatment model of fulminant type 1 diabetes by using insulin positive cells induced from healthy individuals-derived iPS cells and identified GLP-1 receptor agonist as a candidate drug which could reduce apoptosis and beta cell destruction.

研究分野：内科学

キーワード：劇症1型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象となる劇症1型糖尿病は、研究者らも参加し、日本糖尿病学会（劇症型糖尿病調査研究委員会）により施行された疫学調査により確立され、今日広く世界において疾患単位として認められている。

本疾患は日本人においては急性発症1型糖尿病の約20%が分類される主要なサブタイプであり、発症時に診断が遅れると死亡する症例も存在する予後不良の糖尿病であること、他の1型糖尿病に比べて細小血管合併症が進行しやすいことなどが臨床的な特徴である。

本疾患の成因としては、ウイルス感染との関連が示唆されている。すなわち、患者脾へのウイルス感染とそれに引き続いて生じる免疫応答の過程で細胞が短時間にほぼ完全に破壊されて糖尿病を発症すると考えられる。ウイルス感染を示唆する所見として、例えば、発症時における患者血中ウイルス抗体価の上昇があげられ、エンテロウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、など複数のウイルス抗体価上昇が報告されている。このように発症への関与が示唆されるウイルスは多様であると推察されるが、中でもエンテロウイルスについての研究が先行していた。すなわち、患者血清におけるエンテロウイルスIg-A抗体価の上昇、患者脾におけるエンテロウイルスRNAやエンテロウイルス由来蛋白の存在などが報告されていた。しかし、発症の鍵となる分子を含め、その詳細な発症機序は不明と考えられていた。

一方で、日本糖尿病学会と日本皮膚科学会

の共同調査により薬剤性過敏症症候群（Drug induced hypersensitivity syndrome; DIHS）の発症後に劇症1型糖尿病を発症した症例の調査が行われ、その発症率が一般の劇症1型糖尿病の発症率に比べ非常に高いことが報告された。薬剤性過敏症症候群は比較的限られた薬剤投与2~6週間後に発熱、肝障害、腎障害、異型リンパ球出現などに加え、ヒトヘルペスウイルス6の再活性化、時にはヒトサイトメガロウイルスの再活性化を認めることが特徴である。

さらに研究者らは、このような症例の剖検脾組織を検討する機会を得た。当該症例においては臨床的にサイトメガロウイルス感染が示唆されたが、剖検脾組織においても脾島内にサイトメガロウイルスの存在が確認され、細胞傷害へのサイトメガロウイルスの関与が示唆された。

そこで研究者らは、サイトメガロウイルス感染に伴う劇症1型糖尿病の発症メカニズムを分析し、エンテロウイルス感染に伴う劇症1型糖尿病で想定されている発症メカニズムとの類似点・相違点を明らかにすることにより、劇症1型糖尿病の発症機構の全体像を明らかにするという着想に至った。

これが本研究の開始当時の背景である。

2. 研究の目的

本研究では、ヘルペス（科）ウイルスの感染/再活性化後に発症した劇症1型糖尿病の剖検脾組織を解析し、併行してエンテロウイルス細胞感染モデルと相互の知見を共有す

ることにより 細胞傷害の分子機構を明らかにし、それを応用した *in vitro* 治療モデルを構築することを目的とした。

3 . 研究の方法

(1) サイトメガロウイルス感染劇症 1 型糖尿病膵組織の免疫組織化学的解析

DNA ウイルスであるヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の再活性化を伴う薬剤性過敏症候群を発症後に劇症 1 型糖尿病を発症した患者剖検膵を解析する。

ウイルス抗体と膵ホルモン抗体との二重染色を行い、ウイルス感染細胞の局在を明らかにする。ウイルス受容体およびそのシグナル分子の発現と局在を明らかにする。 / 細胞面積を計測、マクロファージ、T リンパ球、などの炎症細胞の膵島への浸潤を評価する。

(2) エンテロウイルス 細胞感染モデルによる *in vitro* 治療モデルの確立

RNA (エンテロ) ウイルス感染を模倣する Polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) を MIN6 細胞あるいは健常人由来 iPS 細胞より分化誘導して得られたインスリン陽性細胞に導入する。得られた細胞の遺伝子発現変化およびアポトーシス亢進の有無を明らかにし、またこのアポトーシスが Exendin 4 により抑制されるか否かを検討する。

(3) iPS 細胞由来インスリン産生細胞を用いた新規鍵分子の同定

劇症 1 型糖尿病患者由来 iPS 細胞より分化

誘導して得られたインスリン陽性細胞においてウイルス感染時に上昇することが確認されている炎症性サイトカインを投与し、アポトーシス亢進の有無を検討する。また、発現遺伝子の網羅的な解析を行い、発症への関与が推定される新規鍵分子を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) ヘルペスウイルス感染劇症 1 型糖尿病膵組織の免疫組織化学的解析

薬剤性過敏症候群発症後に劇症 1 型糖尿病を発症した患者の剖検膵を解析した。

膵 細胞の著明な減少を認めた。HCMV 陽性膵島では多数の T 細胞、マクロファージの浸潤を認めた。膵 細胞、膵外分泌細胞に HCMV 感染を、HCMV 感染細胞に ZBP1 (DNA ウイルスレセプター)、RIG-I (RNA ウイルスレセプター) の発現を認め、一部の 細胞にも DAI、RIG-I の発現を認めた。さらに 型 IFN 産生に必須の転写因子である IRF3 (Interferon regulatory factor 3) が約半数の HCMV 陽性細胞と HCMV 陽性膵島内の一部の 細胞に発現していることを明らかにした。これらの分子は劇症 1 型糖尿病における膵 細胞傷害の鍵分子であることが示唆された。

(2) エンテロウイルス 細胞感染モデルによる *in vitro* 治療モデルの確立

MIN6 細胞に polyI:C をトランスフェクションし、RNA ウイルス感染時に上昇するサイトカイン・ケモカイン (1 型 IFN、CXCL10、Fas) やウイルス受容体 (TLR3、RIG-I、MDA5、LGP2) 、

1 型 IFN を介した抗ウイルス経路 (ISG15, Mx1, OAS1, PKR) の遺伝子発現上昇および Caspase3 活性上昇、TUNEL 陽性細胞数の増加を確認した。

また、PolyI:C を健常人由来 iPS 細胞から誘導したインスリン陽性細胞に対してトランスフェクションし、IFN 発現の増加および TUNEL 陽性細胞数増加を確認した。

さらに、上記トランスフェクションの前後で Exendin 4 を投与し、MIN6 細胞におけるサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現抑制、MIN6 細胞とヒト iPS 細胞から誘導したインスリン陽性細胞におけるアポトーシス抑制が起こることを明らかにした。

(3) iPS 細胞由来インスリン産生細胞を用いた新規鍵分子の同定

劇症 1 型糖尿病患者の皮膚線維芽細胞にエピソーマルベクター法により 6 つの初期化因子 (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28* and *p53-shRNA*) を導入することにより iPS 細胞を樹立した。この劇症 1 型糖尿病患者由来 iPS 細胞より分化誘導して得られたインスリン陽性細胞において、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β) を投与し、健常人由来 iPS 細胞に比しアポトーシス (活性型カスパーゼ 3 陽性細胞) の亢進を明らかにした。また、網羅的遺伝子解析により、複数のアポトーシス関連遺伝子の発現亢進・低下や、*CH25H* など抗ウイルス遺伝子の発現低下を明らかにした。*CH25H* は劇症 1 型糖尿病治療における新たな鍵分子であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hosokawa Y, Toyoda T, Fukui K, Baden MY, Funato M, Kondo Y, Sudo T, Iwahashi H, Kishida M, Okada C, Watanabe A, Asaka I, Osafune K, Imagawa A, Shimomura I. Insulin-producing cells derived from 'induced pluripotent stem cells' of patients with fulminant type 1 diabetes: Vulnerability to cytokine insults and increased expression of apoptosis-related genes. *J Diabetes Investig.* 2018; 9: 481-493. 査読有 doi:10.1111/jdi.12727.
2. Yoneda S, Imagawa A, Fukui K, Uno S, Kozawa J, Sakai M, Yumioka T, Iwahashi H, Shimomura I. A histological study of fulminant type 1 diabetes mellitus related to human cytomegalovirus reactivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(7):2394-2400. 査読有 doi: 10.1210/jc.2016-4029.
3. Baden MY, Fukui K, Hosokawa Y, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I. Examination of a Viral Infection Mimetic Model in Human iPS Cell-Derived Insulin-Producing Cells and the Anti-Apoptotic Effect of GLP-1 Analogue. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144606. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0144606.

[学会発表] (計 10 件)

1. 今川 彰久 シンポジウム「1型糖尿病 update 2017」劇症1型糖尿病 up date -免疫チェックポイント阻害薬投与後発症例の委員会調査報告も含めて- 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 2017
2. 細川 吉弥, 福井 健司, 馬殿 恵, 豊田 太郎, 渡辺 亮, 長船 健二, 岩橋 博見, 今川 彰久, 下村 伊一郎 劇症1型糖尿病 iPS 細胞由来膵 細胞で発現が低下する ch25h 遺伝子の機能解析 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 2017
3. 米田 祥, 今川 彰久, 他 劇症1型糖尿病発症から4年経過した症例における剖検膵の免疫組織化学的検討 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 2017
4. 今川 彰久, 花房 俊昭 シンポジウム「1型糖尿病の成因と治療」劇症1型糖尿病の成因と治療 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都、2016
5. 米田 祥, 今川 彰久, 宇野 彩, 福井 健司, 小澤 純二, 弓岡 稔貴, 坂井 誠, 岩橋 博見, 下村 伊一郎 薬剤性過敏症症候群に劇症1型糖尿病を合併した症例における剖検膵組織(第3報) IRF3 に注目した検討 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016
6. 細川 吉弥, 豊田 太郎, 福井 健司, 馬殿 恵, 須藤 智美, 岩橋 博見, 岸田 真里菜, 岡田 千尋, 渡辺 亮, 浅香 勲, 長船 健二, 今川 彰久, 下村 伊一郎 劇症1型糖尿病患者由来 iPS 細胞を用いた膵 細胞傷害機構の解明 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016
7. 馬殿 恵, 福井 健司, 細川 吉弥, 小澤 純二, 岩橋 博見, 今川 彰久, 下村 伊一郎 ヒト iPS 細胞から誘導したインスリン陽性細胞におけるウイルス感染模倣モデルを用いた膵 細胞傷害機構の解析 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016
8. 米田 祥, 今川 彰久, 宇野 彩, 福井 健司, 小澤 純二, 弓岡 稔貴, 坂井 誠, 岩橋 博見, 下村 伊一郎 薬剤性過敏症症候群に劇症1型糖尿病を合併した症例における剖検膵の組織学的検討(第2報) 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015
9. 馬殿 恵, 福井 健司, 細川 吉弥, 小澤 純二, 岩橋 博見, 今川 彰久, 下村 伊一郎 ウイルス感染模倣モデルを用いた膵 細胞傷害機構の解析 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015
10. 今川 彰久, 花房 俊昭 シンポジウム「1型糖尿病のすべて」劇症1型糖尿病の最新知見 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015

[図書] (計 2 件)

1. 今川 彰久 1型糖尿病 今日の治療指針 2017年度版 (医学書院、東京) p689-691,

2017

2. 細川 吉弥, 今川 彰久 劇症1型糖尿病の疾患概念、成因、臨床的特徴 日本臨床 (0047-1852)74 巻増刊1 新時代の臨床糖尿病学(上) Page308-313(2016.02)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今川 彰久 (IMAGAWA Akihisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80373108

(2) 研究分担者

岩橋 博見 (IWAHASHI Hiromi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60397627

福井 健司 (FUKUI Kenji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60513009

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

米田 祥 (YONEDA Sho)

細川 吉弥 (HOSOKAWA Yoshiya)

馬殿 恵 (BADEN Megu)