

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02853

研究課題名(和文) ウイルス糖尿病感受性遺伝子の意義とそのメカニズム

研究課題名(英文) The significance and the mechanisms of virus-induced diabetes susceptibility genes

研究代表者

永淵 正法 (Nagafuchi, Seiho)

佐賀大学・医学部・特任教授

研究者番号：00150441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：DBA/2マウスに第2のウイルス糖尿病感受性遺伝子Stat2を同定した(BBRC 2020)。Tyk2およびStat2は、感受性系統マウス膵島細胞特異的にその遺伝子発現が低下し、感染後3日目糖尿病発症の時期に膵島組織には炎症、免疫に関わる細胞浸潤は乏しく、膵島細胞の破壊/消失が高度であった。ヒトTYK2遺伝子多型を有する2型糖尿病患者は、非肥満でインスリン抵抗性は低いものの、インスリン分泌が明らかに低下していることを見出した(Genes 2021)。このようなウイルス糖尿病感受性遺伝子に関する総説論文を発表した(Microorganisms 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マウスおよびヒトに共通するウイルス糖尿病感受性遺伝子を世界に先駆けて同定し、国際的なウイルス糖尿病研究にブレークスルーをもたらした極めて画期的かつ独創的な研究成果である。さらに、近い将来、ヒトのウイルス糖尿病発症機序を優れて模倣するウイルス糖尿病高感受性ヒト化マウスを作出することにより、糖尿病原因ウイルスを高感度に特定することが可能となる。その結果、科学的証拠に立脚したウイルス糖尿病予防ワクチン開発が、医学のみならず社会的にも加速され、ウイルス糖尿病の予防につながり、1型、2型いずれの糖尿病患者においても、その発症率の低下につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found second virus-induced diabetes susceptibility gene as Stat2 in virus-induced diabetes susceptible strain DBA/2 mouse. The expression level of the gene was significantly reduced restrictive in pancreatic beta-cells. The virus infected islets did not have inflammatory cell infiltrations at the time of extensive damage of beta cells at 3 days after infection.

We also found patients with type 2 diabetes, possessing polymorphisms of human virus-induced diabetes susceptibility gene: TYK2 promoter variant, present non-obese, reduced insulin resistant condition along with reduced insulin secretion activity. Review article regarding virus-induced susceptibility genes was published in microorganism in 2020.

研究分野：糖尿病学、ウイルス感染症免疫学

キーワード：糖尿病 ウイルス 感受性遺伝子 Tyrosine kinase 2 (Tyk2) Stat 膵島炎 インスリン

1. 研究開始当初の背景

2017年9月厚生労働省は日本人の糖尿病患者数が1000万人、予備軍も1000万人であると推計されると公表した。国際的には、2015年12月国際糖尿病連合(IDF)は、世界の糖尿病患者は2億9600万人、2040年には4億8800万人に達すると警鐘を鳴らしている (IDF Diabetes Atlas 2015)。

一般的に、いわゆる2型糖尿病は、社会の経済的な進展に伴う生活習慣病として、過食、肥満、運動不足、加齢の影響が大きいと理解されている。一方、1型糖尿病は、年間8万5000人発症、毎年3%ずつ発症率が上昇していると報告された (IDF Diabetes Atlas 2015)。すなわち、1型糖尿病は、主として宿主の遺伝要因に関わる自己免疫疾患の一つと考えられているが、世界的な1型糖尿病患者の増加は、宿主の遺伝要因のみでは説明できず、環境因子としてウイルス感染が原因の一つであることが強く示唆されている (Cold Spring Harb Perspect Med 2012)。ヒトでは、多くのウイルスが糖尿病発症に関与することが知られている (Diabetes and Viruses, Springer Pub. 2013)。なかでもエンテロウイルスに属するコクサッキーB群ウイルスが糖尿病発症に関する報告が相次いでいる (Hober et al. Nat Rev Endocrinol 2010) しかしながら、宿主の感受性要因に関する研究は乏しく、実験研究では、糖尿病誘発性の高い脳心筋炎ウイルス変異D株 (EMCV-D) の感受性遺伝子が単一であることが報告されていたが (Onodera & Notkins. Nature 1978)、長年にわたりその遺伝子は不明であった。

われわれは、そのウイルス糖尿病感受性遺伝子がインターフェロン (IFN) 受容体シグナル伝達分子である Tyrosine kinase 2 (Tyk2) の自然変異によることを証明したが、同時に、この Tyk2 遺伝子以外の未知の感受性遺伝子の存在も明らかになった (Nat Commun 2015)。一方、この知見をヒトのウイルス糖尿病感受性遺伝子研究に展開したところ、ヒトでも TYK2 遺伝子多型 (TYK2 promoter variant) が、1型糖尿病のみならず2型糖尿病のリスクであり、ウイルス糖尿病感受性遺伝子であると考えられる知見が得られた (EBioMedicine 2015, 2017)。

そこで、マウスとヒトに共通するウイルス糖尿病の発症に関わる Tyk2 について、まず、マウスにおける Tyk2 自然変異によるウイルス糖尿病発症促進のメカニズム、またヒト TYK2 遺伝子多型 (TYK2 promoter variant) の臨床的意義、特に2型糖尿病糖尿病における臨床的意義と病態との関連、さらに、未知のウイルス糖尿病感受性遺伝子の探索・同定、そしてその機序、臨床的意義の解明が必要である。

2. 研究の目的

- (1) ウイルス糖尿病の発症機構を宿主の感受性因子を検討する目的でマウスおよびヒトにおける未知のウイルス糖尿病感受性遺伝子の探索同定と、そのメカニズムの解明に取り組む。
- (2) ヒト TYK2 遺伝子多型 (TYK2 promoter variant) の2型糖尿病患者におけるリスクの意義を明らかにする。
- (3) ヒトにおける糖尿病原因ウイルスの重要な候補である臨床分離コクサッキーB群ウイルスを増殖させ、糖尿病誘発性の評価に必要な株を得る。
- (4) コクサッキーB群ウイルスの感染に対する感受性が高いマウス系統を得るために、ウイルス受容体を膵島細胞特異的に発現するマウスの作成に挑戦する。

3. 研究の方法

- (1) Tyk2 遺伝子の自然変異による膵島細胞におけるウイルス感染に対する抵抗性の低下を明らかにするために、膵島細胞における Tyk2 蛋白発現レベル、さら分離した膵島細胞におけるウイルスの増殖をインターフェロンの影響も含めて検討する。
- (2) Tyk2 遺伝子変異のない DBA/2 マウスにおける感受性遺伝子を同定するために、ウイ

ルス感染後の膵島細胞における遺伝子反応を抵抗性系統の C57Bl/6 マウスと比較検討する。ゲノムワイド、また候補遺伝子のネットワーク解析を行い、感受性に関わる重要な遺伝子を探索同定する。

- (3) ヒト *TYK2* 遺伝子多型 (*TYK2 promoter variant::ClinVer 440728*) の 2 型糖尿病患者における意義を検討するために、肥満度、インスリン分泌能、インスリン抵抗性などの項目について検討し、統計的な手法を駆使して、その意義を明らかにする。
- (4) ヒト糖尿病発症に関わるコクサッキーB 群ウイルスに対する感受性の高いモデルマウス作成のために、膵島細胞特異的にヒト CoxB ウイルスの受容体(hCAR)を発現するトランスジェニック(mouse-insulin promoter hCAR Tg)マウスの作成に挑戦し、確立できたマウスラインの hCXADR Tg マウスを用いて、膵島細胞における hCXADR 遺伝子の発現レベルを評価する。この知見を基にウイルス糖尿病高感受性マウス系統を樹立する。
- (5) 糖尿病を引き起こす最も有力な候補である CoxB (type 1~5)ウイルスが良く増殖することのできる培養細胞について、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa)、ヒト胎児肺線維芽細胞(HEL)、アフリカミドリサル細胞(Vero)で比較検討する。臨床分離 CoxB ウイルス 15 株を増殖させ、それぞれの株を得る。

4. 研究成果

- (1) *Tyk2* 遺伝子の自然変異による膵島細胞における *Tyk2* 蛋白の産生低下や膵島細胞特異的ウイルス感染に対する抵抗性の低下を明らかにすることができた。
- (2) *Tyk2* 遺伝子変異のない DBA/2 マウスにおいて、インターフェロンのシグナルを伝達する分子の一つである Stat(signal transducers and transcription) 2 遺伝子が膵島細胞特異的に遺伝子発現低下をきたしていることを明らかにし、第 2 のウイルス糖尿病感受性遺伝子とすることができた(BBRC 2020)。
- (3) ヒト *TYK2* 遺伝子多型 (*TYK2 promoter variant::ClinVer 440728*) が 2 型糖尿病患者において、肥満がなく、インスリン抵抗性は低く、インスリン分泌が低下していることに関与していることを明らかにした (Genes 2021)。
- (4) ヒト糖尿病発症に関わるコクサッキーB 群ウイルスはマウスへの感染性が低いことが判明したので、モデルマウス作成のために、膵島細胞特異的にヒト CoxB ウイルスの受容体(hCAR)を発現するトランスジェニック(mouse-insulin promoter hCAR Tg)マウスの作成に挑戦した。すでに 5 ラインの hCXADR Tg マウスを取得し、サザンブロットによるコピー数の測定、さらにそれぞれのラインの膵島細胞における hCXADR 遺伝子の発現レベルを評価した。その結果、ヒト膵島細胞における発現レベルと比較して、(1)低い、(2)ほぼ同等、(3)過剰、3 つのマウスラインを樹立することができた。
- (5) 糖尿病を引き起こす最も有力な候補である CoxB (type 1~5)ウイルスを、愛知県衛生研究所皆川洋子先生から分与していただいた。また、CoxB ウイルスが良く増殖することのできる培養細胞について、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa)、ヒト胎児肺線維芽細胞(HEL)、アフリカミドリサル細胞(Vero)で比較検討し、Vero 細胞がもっとも効率よくウイルスを増殖させうる知見が得られた。臨床分離 CoxB ウイルス 15 株は、Vero 細胞で増殖させ感染価を測定し、全ての株で、 10^8 pfu/ml レベルのウイルスが得られている。それぞれの株における糖尿病誘発性についての評価は今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori H, Takahashi H, Mine K, Higashimoto K, Inoue K, Kojima M, Kuroki S, Eguch T, Ono Y, Inuzuka S, Soejima H, Nagafuchi S, ;Anzai K.	4. 巻 12
2. 論文標題 TYK2 promoter variant is associated with impaired insulin secretion and lower insulin resistance in Japanese type 2 diabetes patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12030400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mine K, Yoshikai Y, Takahashi H, Mori H, Anzai K, Nagafuchi S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic susceptibility of the host in virus-induced diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8081133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mine, K.; Nagafuchi, S.; Hatano, S.; Tanaka, K.; Mori, H.; Takahashi, H.; Anzai, K.; Yoshikai, Y.	4. 巻 521
2. 論文標題 Impaired upregulation of Stat2 gene restrictive to pancreatic β -cells is responsible for virus-induced diabetes in DBA/2 mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 853-860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.193.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagafuchi, S.; Mine, K.; Takahashi, H.; Anzai, K.; Yoshikai, Y.	4. 巻 91(with Cover)
2. 論文標題 Viruses with masked pathogenicity and genetically susceptible hosts How to discover potentially pathogenic viruses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Med. Virol.	6. 最初と最後の頁 1365-1467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.25472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三根敬一朗、永淵正法、吉開泰信	4. 巻 別冊 内分泌症候群 (第3版)
2. 論文標題 ウイルス感染と糖尿病	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seiho Nagafuchi, Keiichiro Mine, Hirokazu Takahashi, Keizo Anzai, Yasunobu Yoshikai	4. 巻 未定
2. 論文標題 Viruses with masked pathogenicity and genetically susceptible hosts- How to discover potentially pathogenic viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiichiro Mine, Hirokazu Takahashi, Seiho Nagafuchi	4. 巻 32
2. 論文標題 Model Animal Mimicking Human Virus-induced Diabetes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.05.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 三根敬一朗、永淵正法、吉開泰信	4. 巻 第3版
2. 論文標題 ウイルス感染と糖尿病	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊 日本臨牀 内分泌症候群	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 三根敬一朗、森仁恵、高橋宏和、吉開泰信、安西慶三、永淵正法
2. 発表標題 EMC-Dウイルス誘発糖尿病におけるメスの感受性に関する検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mine K, Nagafuchi S, Mori, H, Takahashi K, Yoshikai Y, Anzai K.
2. 発表標題 Pancreatic beta cell specific reduced Stat2 gene expression is responsible for serving susceptibility to virus-induced diabetes in DBA/2 mice
3. 学会等名 55th ANNUAL MEETING EASD (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori H, Takahashi H, Mine M, Inoue K, Kojima M, Kuroki S, Ono Y, Inuzuka S, Nagafuchi S, Anzai K.
2. 発表標題 A Promoter Variant of TYK2, a Putative Virus-Induced Susceptibility Gene, Is Associated with Impaired Insulin Secretion and Nonobese Type2 Diabetes.
3. 学会等名 Food Security Heart & Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三根敬一朗、皆川洋子、永淵正法
2. 発表標題 ウイルス感染時にけるDBA/2マウス膵細胞の解析
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三根敬一朗、森仁恵、高橋宏和、吉開泰信、安西慶三、永淵正法
2. 発表標題 新規ウイルス糖尿病感受性遺伝子の同定と発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Mine, Seiho Nagafuchi, Hirokazu Takahashi, Yasunobu Yoshikai, Hitoe Mori, Yayoi Matsuda, Keizo Anzai
2. 発表標題 EMC-D virus-induced diabetes in DBA/2 mice
3. 学会等名 54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永淵正法
2. 発表標題 実験的ウイルス糖尿病研究の進歩とこれからの展開
3. 学会等名 第16回1型糖尿病研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永淵正法, 小島夫美子, 藤本秀士, 栗崎宏憲, 吉開泰信, 安西慶三, 三根敬一朗, 高橋宏和
2. 発表標題 ウイルス感染による糖尿病発症の遺伝的基盤
3. 学会等名 第56回糖尿病学会九州地方会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永淵正法, 小島夫美子, 藤本秀士, 栗崎宏憲, 吉開泰信, 安西慶三, 三根敬一朗, 高橋宏和
2. 発表標題 ヒトウイルス糖尿病感受性遺伝子多型 TYK2 promoter variant (TYK2PV) の同定とその意義
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永淵正法
2. 発表標題 未知のウイルス糖尿病感受性遺伝子の探索ーウイルス糖尿病予防ワクチン開発を目指してー
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三根敬一朗, 永淵正法, 南昌江, 岡田朗, 近藤しおり, 平川可南子, 日比生由美, 小島夫美子, 栗崎宏憲, 藤本秀士, 筒信隆, 横川泰, 吉開泰信, 森仁恵, 松田やよい, 高橋宏和, 安西慶三
2. 発表標題 TYK2 遺伝子多型, IgE, 抗GAD 抗体から考えられた日本人T1D 患者の特徴
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森仁恵, 高橋宏和, 三根敬一朗, 井上佳奈子, 松田やよい, 小野恭祐, 永淵正法, 安西慶三
2. 発表標題 2 型糖尿病のインスリン分泌能にTKY2 遺伝子多型が与える影響
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴山栄梨香, 森松恵美子, 小田真理, 古家成美, 北原奈美, 藤野みゆき, 三枝あずさ, 梅野守男, 永淵正法
2. 発表標題 デュラグルチド導入の契機・効果発揮の時系列が詳細に評価できた一例と12例の使用報告
3. 学会等名 第56回糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三根敬一朗, 森仁恵, 田中賢一, 畑野晋也, 高橋宏和, 吉開泰信, 安西慶三, 永淵正法
2. 発表標題 DBA/2 マウスにおけるウイルス性1型糖尿病感受性遺伝子の探索
3. 学会等名 第56回糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Websiteによる公開 タイトル：ウイルス糖尿病予防ワクチン開発プロジェクト サイト： http://diabetic-virus-action.net/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 宏和 (Takahashi Hirokazu) (20607783)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安西 慶三 (Anzai Keizo) (60258556)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関