

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08529

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病の成因解明 -CD300eの関与と新規ウイルス感染関連因子の同定

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of beta cell destruction in fulminant type 1 diabetes with special reference to CD300e and viral infection related factors

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：劇症1型糖尿病患者と対照での末梢血単球におけるCD300e発現率、mean fluorointensity (MFI)を測定する方法を確立した。また、健康人由来iPS細胞および劇症1型糖尿病iPS細胞をインスリン陽性細胞に分化誘導させ、poly(I;C)トランスフェクションし、フローサイトメトリーにてインスリン陽性細胞のみ単離し、遺伝子発現を検討する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

劇症1型糖尿病の発症メカニズムとして想定されている免疫制御機構の異常とウイルス感染の関与について、その研究をCD300eやiPS細胞の観点からさらに前進させたことが本研究の学術的意義である。劇症1型糖尿病は、非常に急激に膵細胞が破壊され、それによる急激な血糖上昇と代謝異常が生命予後にも影響することから、成因解明を進めることは社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We have established a method for measuring the expression rate of CD300e and mean fluorointensity (MFI) in peripheral blood monocytes in patients with fulminant type 1 diabetes and healthy subjects as controls. In addition, healthy human-derived iPS cells and fulminant type 1 diabetic iPS cells were induced to differentiate into insulin-positive cells, poly(I;C)-transfected, and only insulin-positive cells were isolated by flow cytometry and gene expression was examined.

研究分野：内科学

キーワード：劇症1型糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症1型糖尿病は、日本より発信され、今日広く世界において疾患単位として認められている。疫学調査より、劇症1型糖尿病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ことが明らかにされ、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もあわせ、糖尿病の最重症型であることが明らかになっている。欧米においては、PD-1抗体薬投与後に発症する1型糖尿病が、劇症1型糖尿病に類似していることが報告され、世界的にも劇症1型糖尿病への注目が高まっていた。

劇症1型糖尿病の最も大きな特徴は膵細胞が非常に急激に破壊されることであるが、そのメカニズムとして、免疫制御機構の異常とウイルス感染の関与が想定されていた。

私どもが行った劇症1型糖尿病患者末梢血の網羅的な抗体解析の結果、劇症1型糖尿病患者の発症時の血清において、樹状細胞/マクロファージにおける免疫調節因子であるCD300eに対する抗体が存在することが明らかになった。さらにELISAによる抗体測定系で、血中抗CD300e抗体価が糖尿病発症時に高値を示すが、その後の経過で低下することが明らかになった。抗CD300e抗体は自己免疫性1型糖尿病や自己免疫性甲状腺疾患の患者血清においては上昇を認めず、劇症1型糖尿病発症時に特徴的であるが、発症機構への具体的な関与については、不明であった。

一方、私どもはほとんどの膵細胞が破壊されている劇症1型糖尿病において、患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を樹立、インスリン産生細胞を分化誘導し、疾患モデルとして確立し、膵細胞傷害機構の一端を明らかにしていた。すなわち、患者由来iPS細胞より分化誘導したインスリン産生細胞が、健常人由来iPS細胞より分化誘導したインスリン産生細胞に比べ、炎症性サイトカインを作用させた際にアポトーシスを起こしやすく、また発現している遺伝子も異なっていた。

以上が本研究の開始当時の背景である。

2. 研究の目的

「劇症1型糖尿病の膵細胞はどのようなメカニズムで急激に破壊されるのか」を明らかにすること、すなわち、研究代表者らが患者血清より見出した抗CD300e自己抗体の意義を明らかに

し、研究代表者らが確立した劇症 1 型糖尿病患者由来 iPS 細胞から作成した疾患モデルを用いて、新たな鍵分子を明らかにする、という二つの視点から、劇症 1 型糖尿病の成因の一部を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

(1) 劇症 1 型糖尿病患者単球を用いた CD300e の機能解析

劇症 1 型糖尿病患者の対照として、健常群、自己免疫性 1 型糖尿病患者群、2 型糖尿病患者群を設定する。被験者血液からマグネットビーズによる negative selection を行い、単球を CD45⁺CD14⁺細胞と定義して、CD300e 陽性細胞のフローサイトメトリーによる解析を行う。さらに単球を control IgG、抗 CD300e 抗体でコーティングしたプレート、LPS、スフィンゴミエリン、medium のみの条件下で培養し、上清中のサイトカイン濃度を測定し、遺伝子発現の変化を RT-PCR 法にて解析する。

(2) ウイルス感染症および 1 型糖尿病患者における血中抗 CD300e 抗体の測定

劇症 1 型糖尿病症例に対し、臨床経過が明確なインフルエンザをコントロール症例として、患者末梢血中の抗 CD300e 抗体を経時的に測定しウイルス感染の経過との関連を解析する。

(3) 患者 iPS 細胞由来膵 細胞モデルを用いた劇症 1 型糖尿病新規鍵分子の同定

劇症 1 型糖尿病患者から樹立した iPS 細胞をインスリン陽性細胞に分化させ、poly(I:C) を作用させる。ISG15, PKR, Mx, 2,5-OAS の発現を確認し、さらに発現遺伝子を網羅的に解析し、新規鍵分子を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) 劇症 1 型糖尿病患者単球を用いた CD300e の機能解析

まず、劇症 1 型糖尿病患者と、対照として、健常者、自己免疫性 1 型糖尿病患者、2 型糖尿病患者、各 14~25 名の、末梢血単球における CD300e 発現率、mean fluorescence intensity (MFI) を測定した。その結果、発現率は 77.9~99.1%、MFI は 600.6~1300.6 であった。

次に患者末梢血単核球あるいは単球を用いて、CD300e 抗体刺激下にて培養し、炎症性サイトカインの発現を検討する系を確立した。CD300e 抗体刺激の陽性対照群としてはスフィンゴミエリンを、陰性対照群としては IgG をそれぞれ用いた。健常者において、サイトカインの発現を検討したところ、TNF の発現上昇を認めた。

(2) ウイルス感染症および1型糖尿病患者における血中抗CD300e抗体の測定

急性期劇症1型糖尿病患者、インフルエンザ患者、健常者各3~4名の血清中CD300e抗体価を測定した。その結果、劇症1型糖尿病患者の抗体価が、インフルエンザ患者、健常者よりも高い傾向にあり、同抗体上昇の疾患特異性が一層裏付けられる結果が得られた。インフルエンザ患者が著しく減少したが、今後さらに検体数の増加を目指す必要がある。

(3) 患者iPS細胞由来膵細胞モデルを用いた劇症1型糖尿病新規鍵分子の同定

健常人由来iPS細胞および劇症1型糖尿病iPS細胞をINS陽性細胞に分化誘導させ、poly(I:C)トランスフェクションし、フローサイトメトリーにてINS陽性細胞のみ単離した。PD-L1、I型IFN、ウイルスレセプター、ISG15等の遺伝子発現を検討した。その結果、いずれにおいて健常人由来iPS細胞と劇症1型糖尿病iPS細胞で有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imagawa A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Two types of fulminant type 1 diabetes mellitus: Immune checkpoint inhibitor-related and conventional.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 917-919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13450	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 Imagawa A, Tachibana M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Fulminant type 1 diabetes: recent research progress and future prospects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetol Int.	6. 最初と最後の頁 336-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-020-00466-2	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 Hosokawa Y, Hanafusa T, Imagawa A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathogenesis of fulminant type 1 diabetes: Genes, viruses and the immune mechanism, and usefulness of patient-derived induced pluripotent stem cells for future research.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 1158-1164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13091.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Imagawa A, Hanafusa T.
2. 発表標題 FULMINANT TYPE 1 DIABETES
3. 学会等名 IDF Congress 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今川彰久
2. 発表標題 劇症 1 型糖尿病の最新知見と将来展望
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 Imagawa A.
2. 発表標題 Usefulness of patient-derived iPS cells in fulminant type 1 diabetes.
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology of Diabetes Society 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今川彰久
2. 発表標題 劇症 1 型糖尿病-抗PD-1抗体薬投与後発症例の委員会調査結果も含めて-
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

〔図書〕 計2件

1. 著者名 今川彰久 (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2151
3. 書名 今日の治療指針2021年度版 1 型糖尿病	

1. 著者名 今川彰久、花房俊昭（分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 3000
3. 書名 内科学書（改訂第9版） 1型糖尿病の病因	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	寺前 純吾 (TERASAKI Jungo) (90351395)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究 分担者	佐野 寛行 (SANO Hiroyuki) (20556435)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	
研究 分担者	細川 吉弥 (HOSOKAWA Yoshiya) (10814569)	大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤） (14401)	削除：2020年3月18日

	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 協力者	藤澤 玲子 (FUJISAWA Reiko)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	
研究 協力者	森本 貴子 (MORIMOTO Takako)	大阪医科大学・医学部・大学院生 (34401)	

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
---------	---------