

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21591149
研究課題名（和文）	モデルマウスを用いた劇症 1 型糖尿病治療法の開発
研究課題名（英文）	Development of the treatment for fulminant type1 diabetes using the model mouse
研究代表者	
	花房 俊昭 (Hanafusa Toshiaki)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	60164886

研究成果の概要（和文）：本研究は、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が劇症 1 型糖尿病モデルである脳心筋炎ウイルス感染マウスの糖尿病発症を抑制することを明らかにした。そのメカニズムとして、exendin-4 がマクロファージの膵島浸潤を抑制し、さらに脳心筋炎ウイルス感染マクロファージの TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 発現を抑制したことが、膵 β 細胞の破壊を著明に軽減させたと考えられた。本研究によって、劇症 1 型糖尿病の治療において、マクロファージ由来の TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 発現抑制が重要な治療の標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study has shown that exendin-4 suppresses the onset of encephalomyocarditis virus (EMCV) induced diabetes, which is a model of fulminant type 1 diabetes. Exendin-4 markedly reduced β cell destruction by inhibiting the infiltration of macrophages into the islets and the expression of EMCV infected macrophage derived chemical mediators, TNF- α , IL-1 β and iNOS. Our study clarified that it could be an important strategy to suppress macrophage activation in the treatment of fulminant type1 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：劇症1型糖尿病 encephalomyocarditis virus GLP-1 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

ヒトの劇症1型糖尿病は、急激かつ完全なβ細胞破壊を特徴とする1型糖尿病の一亜型である。本邦では急性発症1型糖尿病の20%をこの劇症型が占めており、病態解明は重要な課題である。

約70%の症例で感冒様症状を認めること、発症直後不幸にして死亡した症例の剖検膵組織において、エンテロウイルス抗原が検出され、かつマクロファージを主体とする膵島細胞浸潤が認められたという報告などからウイルス感染との関連性が指摘されるようになったが、その原因・発症機序は未だ明らかでない。encephalomyocarditis (EMC) ウイルスは感受性マウスに感染後、数日中に完全なβ細胞破壊を惹起し、糖尿病を発症させる。私たちは同マウスを詳細に検討した結果、劇症1型糖尿病のモデル動物と位置づけ、その病態解明を目的に研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、劇症1型糖尿病のモデル動物を作成し、発症の全経過を再現し、これを解析することにより、β細胞傷害に関与する分子を明らかにすることを目的とする。さらに、それらの因子を阻害することにより、発症予防または治療効果が得られるかを明らかにし、劇症1型糖尿病の新規治療の可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

膵β細胞への抗アポトーシス効果を有する消化管ホルモン、GLP-1の受容体作動薬であるexendin-4がウイルス感染による膵β細胞破壊に有用であると仮説を立て、以下の研究を行った。

(1) モデルマウスでのexendin-4の有用性の検討

EMCVを疾患感受性マウス(DBA/2)に感染させ、糖尿病を発症させ、ウイルス感染後14日間の病状を観察した。その際、exendin-4をウイルス感染の2日前から10日間、種々の用量で腹腔内投与し、血糖値、糖尿病発症率、死亡率への影響を検討する。コントロール群として、PBSをウイルス感染の2日前から10日間腹腔内投与する群を設定した。

(2) ウイルス感染後の組織学的検討

(1)における組織学的評価を行うため、感染後48、72、96、120時間での膵臓を摘出し、インスリン抗体で膵β細胞を、Mac-2抗体でマクロファージを染色し、画像解析を行った。

(3) exendin-4の膵β細胞に対する抗アポトーシス効果の評価

膵β細胞株を培養し、staurosporineにてアポトーシスを誘導した。その際、培養液中にexendin-4が存在する場合としない場合とでアポトーシスの程度に差が生じるか、フローサイトメトリーを用いたアポトーシスアッセイで評価した。

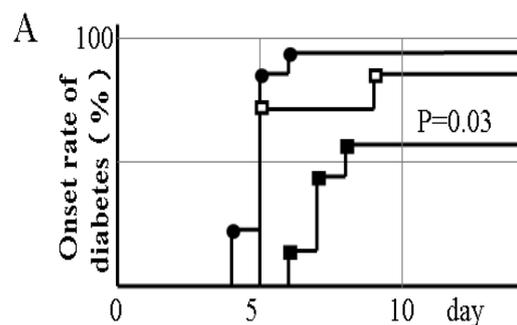
(4) マクロファージに対するexendin-4の影響の検討

培養マクロファージを、EMCVに感染させ、マクロファージ由来のケミカルメディエーターの発現に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) Exendin-4投与群は、コントロール群(非投与群)に比べて、経過中の血糖上昇を用量依存的に有意に抑制し、糖尿病の発症率も有意に低下させた。死亡率は、有意差はなかった。

図A ウイルス感染後の糖尿病発症率



● 高用量 exendin-4 □ 低用量 exendin-4
■ コントロール

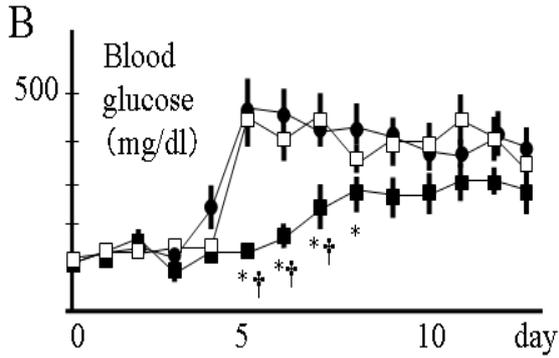


図 B ウイルス感染後の血糖値変動
 ●高用量 exendin-4 □低用量 exendin-4
 ■コントロール

(2) Exendin-4 投与群は、コントロール群と比較して、有意に膵β細胞の破壊を抑制しただけでなく、マクロファージの浸潤も軽減させた。

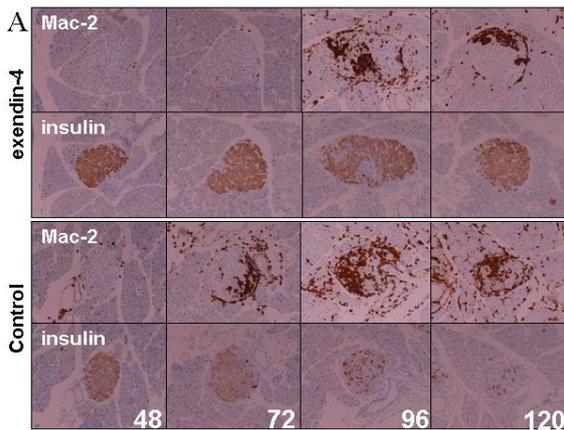


図 A 48 時間から 120 時間での組織学的変化

(3) Exendin-4 は膵β細胞のアポトーシスを有意に抑制した。

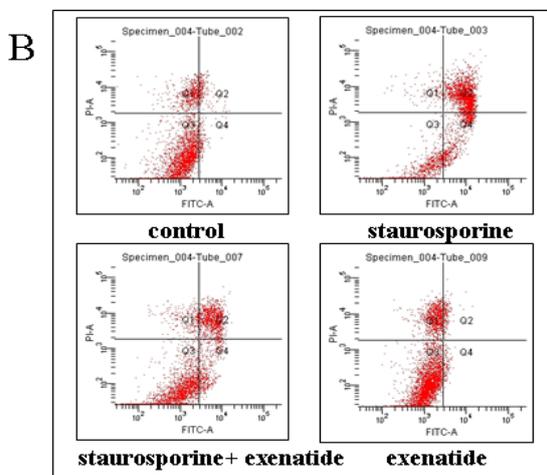


図 B 膵β細胞を4つの条件で培養した際のアポトーシスの程度の評価。

横軸は annexinV-FITC、縦軸は PI。
 左上：通常培地
 右上：staurosporine 添加によるアポトーシス強制導入
 左下：staurosporin + exendin-4 添加
 右下：exendin-4 添加
 staurosporin によって誘導されるアポトーシスを exendin-4 が抑制した。

(4) EMCV はマクロファージに感染すると、TNF- α 、IL-1 β 、iNOS の発現が増加するが、exendin-4 存在下においてはそれらが有意に抑制された。

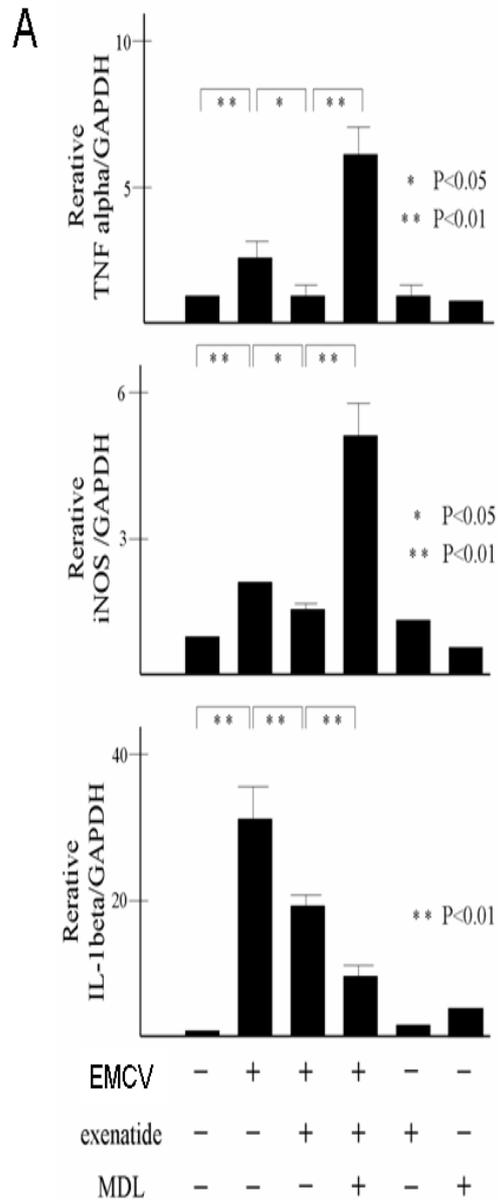


図 A リアルタイム PCR による各種培養条件下におけるマクロファージの TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 遺伝子発現解析

過去の研究で、TNF- α 、IL-1 β 、iNOS の中和により、膵 β 細胞破壊を抑制することが証明されている。前述の結果と合わせると、exendin-4はEMCV感染による膵 β 細胞破壊を、マクロファージからのTNF- α 、IL-1 β 、iNOS発現・分泌を抑えることで抑制させることが示唆された。

また、exendin-4による膵 β 細胞保護効果(抗アポトーシス効果)も重要であると考えられた。

一方で、これらの結果は、劇症1型糖尿病の膵 β 細胞破壊は、マクロファージ由来のTNF- α 、IL-1 β 、iNOSをはじめとするケミカルメディエーターが重要な役割を果たしていることを示唆し、これらが治療のターゲットになりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Sano H, Hirano-Kuwata S, Ueda H, Terasaki J, Hanafusa T.

Low CTLA-4 expression in CD4+ helper T-cells in patients with fulminant type 1 diabetes. *Immunol Lett.* 2011 Sep 30;139(1-2):80-6. Epub 2011 May 17. 査読有り

② Sano H, Terasaki J, Mishiba Y, Imagawa A, Hanafusa T.

Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses pancreatic β -cell destruction induced by encephalomyocarditis virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 21;404(3):756-61. Epub 2010 Dec 7. 査読有り

③ 佐野寛行・花房俊昭

特集:インクレチン製剤-基礎と臨床「膵島移植の際にインクレチン製剤は？」
肥満と糖尿病 2010年7.8号 Vol09-No.4 p 575-579

査読無し

④ 佐野寛行 花房俊昭

1型糖尿病になるのはなぜか(原因・機序)
からだの科学261号「糖尿病のすべて」
春日雅人編(2009.4)p24-28
査読無し

[学会発表] (計3件)

① 佐野寛行

糖尿病治療 UP TO DATE 2011年11月25日 大阪
脳心筋炎(EMC)ウイルスによって誘導される膵 β 細胞破壊に対するexendin-4の効果

② 佐野寛行

新時代の糖尿病治療
第268回 臨床心臓病研修会 2011年11月19日 大阪

③ 佐野寛行、寺前純吾、長谷田文孝、堤千春、大西峰樹、三柴裕子、今川彰久、花房俊昭

Exendin-4はEMCウイルスによる膵 β 細胞破壊を抑制する
第54回 日本糖尿病学会年次学術集会
2011年5月19~21 札幌

[図書] (計1件)

① 長谷田文孝 佐野寛行 寺前純吾 花房俊昭

羊土社 糖尿病学イラストレイテッド 春日雅人編 1型糖尿病における膵 β 細胞障害の分子機構 p52-62
2012年-3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花房 俊昭 (Hanafusa Toshiaki)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：60164886

(2) 研究分担者

佐野 寛行 (Sano Hiroyuki)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：20556435