

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590880

研究課題名(和文) 1型糖尿病免疫寛容モデルでの樹状細胞の病原体感知センサーの役割と臨床応用の検討

研究課題名(英文) The role of dsRNA sensor in dendritic cells in a tolerized model of Type 1 diabetes

研究代表者

安田 尚史 (YASUDA, HISAFUMI)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：50403233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、1型糖尿病(T1D)モデルマウスであるNODマウスへの抗Fas抗体投与によるT1D発症の完全抑制、また、免疫寛容マウスであるFas欠損NOD-lprマウスの骨髄由来樹状細胞(DC)によるT1D発症の完全抑制を見出した。そこで、NODマウスにDCの病原体感知センサーであるTLR3のagonistであるpoly(I:C)の低用量投与でNODマウスの糖尿病発症を抑制、高用量投与で糖尿病発症を促進することを示した。また、抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウスでも高用量poly(I:C)で免疫寛容の破綻を来しT1D発症を誘導した。以上より、病原体感知センサーのT1D発症における重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：We found that administration of anti-Fas Ab completely suppressed diabetic onset in NOD mice as a type 1 diabetic mouse model. In addition, administration of bone marrow derived dendritic cells from Fas-deficient NOD-lpr mice which is diabetes-free also completely protected from diabetes onset in NOD mice. To evaluate the role of TLR3 as dsRNA sensor of dendritic cells, administration of poly(I:C) as TLR3 agonist in NOD mice was performed firstly. Low dose of poly(I:C) suppressed diabetes onset in NOD mice, whereas high dose of poly(I:C) accelerated diabetes onset in NOD mice. Next, to evaluate the role of TLR3 in a tolerized mouse model of type 1 diabetes, administration of high dose of poly(I:C) was performed in tolerized mice. Surprisingly, we found that high dose of poly(I:C) induced diabetes and broke tolerance in tolerized NOD mice treated with anti-Fas Ab. We demonstrated the importance of dsRNA sensor in the development of type 1 diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：1型糖尿病 免疫寛容 病原体感知センサー 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで1型糖尿病(T1D)モデルマウスであるNODマウスに対して、抗Fas抗体投与によりT1D発症を完全に抑制し、また、免疫寛容マウスであるFas欠損NOD-Iprマウスの骨髄由来樹状細胞(DC)投与によりT1D発症を完全に抑制することを見出してきた。近年、T1Dと細菌やウイルス感染等の関連が示唆されている中で、樹状細胞の病原体感知センサーである病原体感知分子である各種のToll-like receptor (TLR)を欠損させることによりT1D発症に影響を及ぼすことが報告されるようになってきた。

2. 研究の目的

臓器特異的の自己免疫疾患の代表である1型糖尿病(T1D)において、我々はこれまでの研究によりいくつかの動物実験系ではT1Dに対して免疫寛容を誘導できることを示してきた。そこで今回の研究は、それらの免疫寛容モデルを用いて、樹状細胞(DC)の病原体感知センサーである病原体感知分子の観点から免疫寛容機構の解明を試み、ワクチン療法などの免疫療法としてT1D治療へ臨床応用することを目指したものである。さらに、T1Dの免疫寛容におけるDCの病原体感知センサーの役割に関して得られた成果が、他の自己免疫疾患の免疫寛容の誘導に加えて、敗血症や肥満、動脈硬化など病原体感知センサーの関与が示唆される全身性内科疾患の有効な治療法開発に結びつくことを最終的な目標としている。

3. 研究の方法

- (1) 1型糖尿病(T1D)のモデルマウスであるNODマウスにDCの病原体感知センサーであるToll-like receptor 3(TLR3)のagonistでdsRNAのアナログであるpoly(I:C)をRNAウイルス感染を模倣して低用量で投与することで、NODマウスの糖尿病発症を誘導できるかどうかを検討した。また、高用量で投与することで糖尿病発症を誘導できるかどうかも検討した。
- (2) DCやT細胞の表面分子であるFasに対する抗Fas抗体をNODマウスに投与すると、NODマウスでの糖尿病発症は完全に抑制され免疫寛容が誘導される。この抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウスに対して、同様に、低用量と高用量のpoly(I:C)を投与することで免疫寛容の破綻を来し糖尿病発症を誘導できるかどうかを検討した。

糖尿病発症の有無を検討するとともに、脾細胞や膵リンパ節細胞での構成する細胞分画をFlow cytometerを用いて解析poly(I:C)低用量投与NODマウス群、poly(I:C)高用量投与NODマウス群、及び抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウス群へpoly(I:C)低用量及び高用量投与群におけるeffector T細胞やTreg誘導効果を検討した。

1. CD3T細胞、CD4T細胞、CD8T細胞、B細胞、樹状細胞などの比率の検討
2. CD4CD25陽性T細胞、Foxp3陽性T細胞などの存在の有無と比率の検討

脾細胞や膵リンパ節細胞でのサイトカイン分泌能をELISAを用いて解析poly(I:C)低用量投与NODマウス群、poly(I:C)高用量投与NODマウス群、及び抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウス群へpoly(I:C)低用量及び高用量投与群におけるIFN- γ やIL-17及び抑制性サイトカインであるIL-4やIL-10産生の増加の有無を検討した。

膵 β 細胞の組織学的検討(H-E染色、免疫染色)

poly(I:C)低用量投与NODマウス群、poly(I:C)高用量投与NODマウス群、及び抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウス群へpoly(I:C)低用量及び高用量投与群における膵島炎の有無を組織学的にH-E染色と免疫染色で検討した。

4. 研究成果

- (1) NODマウスにDCの病原体感知センサーであるTLR3のagonistであるpoly(I:C)を低用量でNODマウスに投与すると、糖尿病発症が抑制されることを見出した。また、高用量でNODマウスに投与すると自然経過のNODマウスと同様に糖尿病発症を促進することを見出した。細胞分画の結果より、低用量投与ではeffector T細胞に増してTreg細胞の増加が示唆されたが、高用量投与ではTreg細胞の増加に増してeffector T細胞の増加が示唆された。サイトカイン分泌の検討でもpoly(I:C)高用量投与で同様の結果が示唆された。また、組織学的検討でも、poly(I:C)高用量投与でeffector T細胞による膵島炎の悪化と残存細胞の減

少が認められた。以上より、そのメカニズムとして、poly(I:C)低用量投与では樹状細胞上のTLR3を介して、effector T細胞に増してTreg細胞の増加を誘導し、高用量投与ではTreg細胞の増加に増してeffector T細胞の増加を誘導することが考えられた。

- (2) 抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウスにDCの病原体感知センサーであるTLR3のagonistであるpoly(I:C)を低用量ではなく高用量で投与すると、免疫寛容が破綻し糖尿病発症が誘導されることを見出した。細胞分画の結果より、低用量投与と比較して高用量投与では、Treg細胞の増加に増してeffector T細胞の増加が示唆された。サイトカイン分泌の検討でもpoly(I:C)高用量投与で同様の結果が示唆された。また、組織学的検討でも、poly(I:C)高用量投与でeffector T細胞による膵島炎の悪化と残存細胞の減少が認められた。以上より、そのメカニズムとして、抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウスにおいても、poly(I:C)の高用量投与では、樹状細胞上のLR3を介して、Treg細胞の増加に増してeffector T細胞の増加を誘導することが考えられた。

我々は、1型糖尿病(T1D)モデルマウスであるNODマウスへの抗Fas抗体投与によるT1D発症の完全抑制、また、免疫寛容マウスであるFas欠損NOD-Iprマウスの骨髄由来樹状細胞(DC)によるT1D発症の完全抑制を見出した。そこで、まずNODマウスにDCの病原体感知センサーであるTLR3のagonistであるpoly(I:C)の低用量投与でNODマウスの糖尿病発症を抑制、高用量投与で糖尿病発症を促進することを示した。また、抗Fas抗体投与免疫寛容NODマウスにおいても、高用量poly(I:C)では免疫寛容の破綻を来しT1D発症を誘導することを見出した。以上より、病原体感知センサーのT1D発症における重要性を示した。

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. Yasuda H, Nagata M, Moriyama H, Kobayashi H, Akisaki T, Ueda H, Hara K,

Yokono K.

Development of fulminant Type 1 diabetes with thrombocytopenia after influenza vaccination: a case report. **Diabet Med** 2012, 29(1):88-9. (査読有)

2. Hara K, Yasuda H, Arai T, Miyoshi S, Kubokawa O, Mori H, Akisaki T, Kido Y, Yokono K, Akita H.

A case of an elderly patient with slowly progressive type 1 diabetes who developed severe nonocclusive mesenteric ischemia without predisposing events.

Intern Med 2012, 51(9):1065-8. (査読有)

3. Tai N, Yasuda H, Zhang L, Rodriguez-Pinto D, Yokono K, Wong FS, Sherwin R, Nagata M, Wen L. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice.

Clin Immunol 2011, 139(3):336-49. (査読有)

4. Sasaki H, Yasuda H, Moriyama H, Nakamura A, Shimizu M, Arai T, Nagata M, Hara K, Yokono K.

Acceleration of autoimmune diabetes in Rheb-congenic NOD mice with -cell-specific mTORC1 activation.

Biochem Biophys Res Commun 2011, 408(2):306-11. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. 中村友昭、廣田勇士、中島進介、西本祐希、安田尚史、松本逸平、具英成、坂口一彦、小川渉
CGMによる膵腎同時移植後患者の血糖変動の検討。
第41回日本膵・膵島移植研究会
2014.3.9 名古屋。

2. 清水まみ、安田尚史、勝田敦美、高橋和真、原 賢太、永田正男、横野浩一
1 型糖尿病関連マウスにおける poly(I:C) 投与による 1 型糖尿病発症の検討。
第 11 回 1 型糖尿病研究会。
2013.10.26. 軽井沢。
3. 安田尚史、勝田敦美、清水まみ、佐々木弘智、原賢太、秋田穂束、横野浩一
FasL-Fas シグナルの 1 型糖尿病発症における役割の検討。
第 8 回加齢医学研究会。
2013.1.19. 名古屋。
4. 清水まみ、安田尚史、勝田敦美、中村 晃、佐々木弘智、永田正男、原 賢太、高橋和真、横野浩一
NOD マウスにおける 1 型糖尿病発症に関連する SR-A の役割の検討。
第 10 回 1 型糖尿病研究会。
2012.11.3. 唐津。
5. 清水まみ、安田尚史、中村 晃、勝田敦美、佐々木弘智、荒井隆志、永田正男、原 賢太、高橋和真、横野浩一
poly(I:C) 投与 SR-A KO NOD マウスでの 1 型糖尿病発症の検討。
第 55 回日本糖尿病学会総会。
2012.5.18. 横浜。
6. 清水まみ、安田尚史、中村 晃、勝田敦美、佐々木弘智、荒井隆志、永田正男、原 賢太、横野浩一
Modified LDL がリガンドである SR-A の 1 型糖尿病発症への影響。
第 7 回加齢医学研究会。
2012.1.21. 名古屋。
7. 清水まみ、安田尚史、森山啓明、中村 晃、勝田敦美、花野智苗、佐々木弘智、荒井隆志、永田正男、原 賢太、横野浩一
1 型糖尿病発症における MSR-A の役割の検討。
第 9 回 1 型糖尿病研究会。
2011.10.30. 大磯。
8. 佐々木弘智、安田尚史、森山啓明、清水まみ、中村 晃、荒井隆志、永田正男、原 賢太、横野浩一
膵 細胞特異的 Rheb 過剰発現 NOD マウスにおける 1 型糖尿病発症の検討。
第 54 回日本糖尿病学会総会。
2011.5.21. 札幌。

〔図書〕(計 2 件)

1. 安田 尚史. インスリン抗体.
臨床検査データブック LAB
DATA2013-2014(監修 高久史磨 編集 黒

川 清、春日雅人、北村 聖) 330, 2013.

2. 安田尚史、横野浩一.
注意を要するインスリン依存状態の治療
高齢 1 型糖尿病の管理.
別冊プラクティス プリットル糖尿病の
病態と治療・管理のコツ - 進化する治
療・広がる未来 - 101-7, 2012.

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 尚史 (HISAFUMI YASUDA)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：50403233

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：