

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591319

研究課題名(和文) CD28ノックアウトNODマウスを用いた緩徐進行1型糖尿病のモデル動物の開発

研究課題名(英文) Development of slowly progressive type 1 diabetes animal models using the CD28 knock-out NOD mouse

研究代表者

小林 哲郎 (Kobayashi, Tetsuro)

公益財団法人冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：30113442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物を作成するため、CD28 knock-out NODマウスにpoly I:Cの少量投与や膵管上皮のhyperplasia再現を目的にZein-oleic acid-linoleic acids(ZOAL)の膵管内逆行性注入などを行った。poly I:C投与実験では膵外分泌腺の軽度の炎症を起こすことに成功したが、糖尿病の発症促進には至らなかった。一方、ZOAL注入CD28 knock-outマウスでは広汎な外分泌腺の炎症と膵島炎の増強、糖尿病の発症促進を認めた。

研究成果の概要(英文)：The characteristic pathological features of autopsied pancreas of SPIDDM were CD8+ T cell and CD68+ macrophages to the atrophied exocrine pancreas. Sixty percent of SPIDDM pancreas had pancreatic ductal hyperplasia/metaplasia with obstructive pancreatitis ($p < 0.01$ vs. non-diabetic controls). To establish an animal model of SPIDDM, the effect of poly I:C multiple intraperitoneal injection (poly I:C model) or intra-pancreatic ductal injection of Zein-oleic acid-linoleic acids (ZOAL) (ZOAL model) to CD28 knock-out NOD mice was examined. ZOAL model showed marked pancreatic exocrine inflammation composed of CD8+ and CD68+ cells and high occurrence of diabetes, while poly I:C model showed slight exocrine pancreatic inflammation without enhanced occurrence of diabetes. Conclusion: We could established ZOAL NOD mice model, which resembles with human SPIDDM.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 緩徐1型糖尿病 NODマウス CD28

1. 研究開始当初の背景

緩徐進行1型糖尿病(SPIDDM)は発症当初は2型糖尿病の病態を示し、膵島関連自己抗体(GAD抗体、IA-2抗体、ICAなど)が持続陽性で数年かけて、β細胞が完全廃絶する1型糖尿病のサブタイプである。膵病変は膵島内もしくは周囲へのCD8+T細胞、マクロファージの浸潤と膵外分泌腺領域への同様な免疫担当細胞の浸潤が特徴である。(Kobayashi et al., Diabe Res Clin Pract, Suppl S95-S99, 1994)しかしウイルス感染症と自然免疫に関する所見(innate immuneカスケード)、ひきつづいておこる獲得免疫の反応系、マクロファージ、T cellさらにchemokine/cytokineカスケードの膵局所での発現に関しては明らかでなかった。最近我々は、劇症1型糖尿病とSPIDDMの膵所見を比較検討する過程において、SPIDDMではinnate immuneカスケードの関与は弱く、むしろ免疫調整性T細胞(Treg、Th17+Hybrid Treg)の機能低下がウイルス感染症後の自己免疫反応に関与すること、さらに自己免疫にリンクしたβ細胞の再生に関係するregenerating gene(Reg)-1α(Reg-Iα)(Terazono et al., Diabetologia 33: 250-252, 1990)の発現亢進がみられる成績を得た。(Aida et al., PLoS One 9: e95110, 2014)(図1)。SPIDDMのβ細胞障害さらにはβ細胞の保護治療に関して研究を進めるにはモデル動物の作成が必要と考えるに至った。

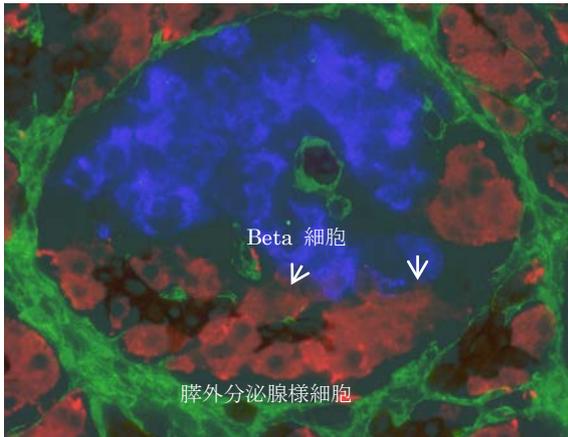


図1. 我々の発見したREG-Iαを発現する膵島β細胞に接する膵外分泌腺様細胞(矢印. 赤)

2. 研究の目的

SPIDDMの予防や原因療法の確立を視野に入れ、(1)ヒトSPIDDM膵局所の病変の特徴を明らかにし、(2)この所見に基づいたSPIDDMのモデル動物の作成を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒトにおける膵組織での検討

SPIDDM患者(n=10)、劇症1型糖尿病患者(n=3)、2型糖尿病患者(n=15)、および非糖尿病患者(n=29)の剖検膵を使用して病理組織学的検討を行った。すなわち、これらの切片を使用して、

自然免疫および獲得免疫に係るカスケード分子、ケモカイン/サイトカイン、REG-Iα発現とβ細胞の再生所見を、SPIDDMと劇症1型糖尿病を対比しつつ検討した。

(a)膵管病変の検討

SPIDDM例は慢性膵炎様病変を示すので、膵管病変(特にductal hyperplasiaもしくはmetaplasia)の有無、膵島炎との関係、膵島抗体との関係を検討した。

(b)自然免疫

パターン認識受容体(pattern recognition receptor: PRP)として、TLR3、TLR4、TLR7、TLR9などのTLR family、RIG-I、MDA5、LGP2などのRIG-I-like receptor(RLR)が膵島細胞、膵島浸潤細胞に検出されるか検討した。

(c)獲得免疫

a)のプロセスにより発現が誘発される獲得免疫の各種分子であるインターフェロンα/β、MHC-class I、class II、インターフェロンγ、IL-18、IL-12、CXCL10、IL-17などのサイトカイン・ケモカインの発現状態を検討した。膵島への浸潤している細胞のphenotypeを明らかにするため、樹状細胞やマクロファージのマーカーとしてCD11c、CD1a、CD68、CD303など、T細胞のマーカーとしてCD3、CD4、CD8、CD56、CD57、CD86、制御性T細胞(Treg)のマーカーとしてFoxP3などの抗体を用いて免疫染色した。また、β細胞がアポトーシスを起こす機序を検討するため、Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、perforinなどの発現を検討した。

(d)REG-Iαの発現

REG-Iαの特異抗体を用いて膵組織でのREG-Iα分子の発現を検討した。予備実験では劇症1型糖尿病患者に特異的にREG-Iαの発現が膵島周囲の膵外分泌腺様細胞にみられたが、この所見がSPIDDM例でも認めるか否かを検討した。

(2)緩徐進行1型糖尿病の動物モデルの確立

平成24年度の上記3-(1)の検討でヒトSPIDDM膵の大きな特徴の一つは膵管のductal hyperplasia/metaplasiaによる膵管内圧上昇が関係することが判明したので、CD28欠損NODマウスにpoly I:Cの投与だけでなく、膵管閉塞のモデルであるzein-oleic acid-linoleic acide(ZOAL)(Kataoka et al., Pancreas 16: 289, 1998)の膵管内逆行性注入による実験も追加した。

(a)CD28 knock-out NODマウスへのpoly I:CもしくはZOALの投与

poly I:Cの投与を5, 10, 20, 50ug/g body weightとし、6週令、12週令のCD28 knock-out NODマウスに投与期間を5日、10日、14日のいずれかの単回投与もしくは3回投与した。随時血糖値を2日おきに測定し、糖尿病の発症を検討した。ZOAL注入実験はメチレンブルー+ZOAL液を0.05ml/100g体重を肝門部より膵管に注入した。糖尿病の発症する時期、発症様式お

よび膵所見(外分泌腺組織への CD8+T 細胞、マクロファージの浸潤、膵島の緩徐な破壊と膵島炎)を検討した。

(b) モデル動物の緩徐進行 1 型糖尿病としての phenotype の確認

上記 a) の病変および REG-I α の膵での発現亢進と β 細胞の再生所見がヒトの場合と同様に起こっているか、その phenotype を確認した。再生マーカーとして核内での Ki67 発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト緩徐進行 1 型糖尿病膵の特徴

10 例の GAD 抗体陽性 SPIDDM 例の膵組織を検討したところ、6 例(60%)に pancreatic ductal hyperplasia/metaplasia (PDH) を認めた。この頻度は対照の 2 型糖尿病膵では 6.6%に陽性、および非糖尿病膵で 3.4%に陽性と比べ有意に高頻度であった(図 2)。さらにこの病変により膵管内のムチン陽性物質の閉塞が起こり閉塞性膵炎(obstructive pancreatitis)が起こっている特徴的所見をみとめた。他に 4 例も PDH はみられなかったが膵管の拡大、膵管の慢性炎症を示す periductal fibrosis が認められ 10 例に共通する所見は、obstructive pancreatitis であることが判明した。

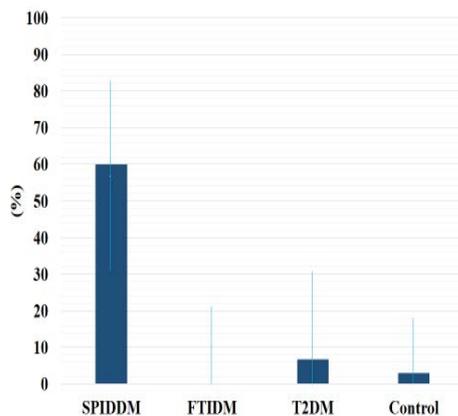


図 2 膵管上皮の hyperplasia の頻度

(95%信頼限界)。

$p=0.0004$ SPIDDM vs Control, $p=0.0068$

SPIDDM vs. T2DM.

さらに膵島に浸潤する免疫細胞の分画をみたところ、CD68+マクロファージ数が最も多く、CD8 陽性 T 細胞がこれに続いた。膵外分泌に浸潤する免疫細胞、なかでも CD68+細胞と GAD 抗体価は有意な相関が認められた(図 3)。また、CD8 陽性 T 細胞は罹病期間が長くなるにつれ増加した。(p<0.02)

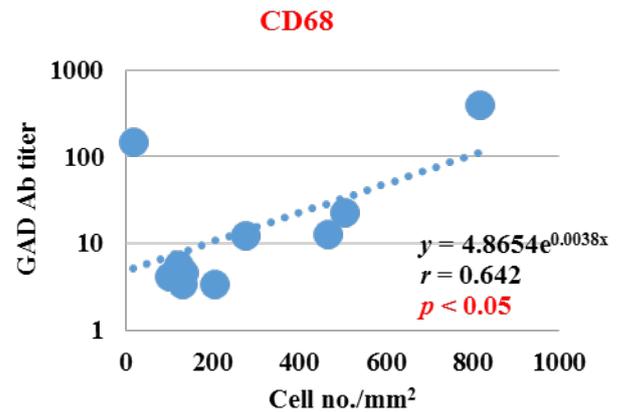


図 3. 膵外分泌腺組織に浸潤した CD68 陽性細胞数と患者 GAD 抗体の抗体価の相関。

以上により、PDH により膵液のうっ滞と膵管内在の上昇が膵外分泌組織の炎症を惹起し obstructive pancreatitis が起こり、次いでこの炎症が膵島におよび膵島炎に波及し β 細胞破壊と自己抗体(GAD 抗体など)の出現をきたす経路(bystander effect)が示唆された。他の腸管免疫(特に細菌の浸入)などによる炎症がさらに加わるのか、PDH のみで上記に経過が活性化するのか否かは今後の研究課題であり、検討を進めたい。

尚、本研究の成果は 2015 年度日本糖尿病学会総会シンポジウムで発表され、欧文論文として投稿される。

SPIDDM 膵ではウイルスに対する反応を示す PRP センサーの発現亢進は見られなかった。さらに獲得免疫の所見である、膵島 β 細胞における MHC-class I の発現亢進、アポトーシスのマーカーの Caspase 3 の発現が認められた。CD3、CD8、CD68 陽性細胞の膵島と膵外分泌腺部への浸潤亢進が認められた。

SPIDDM 膵では REG-I α 分子が、劇症例と同じく、膵島周囲の外分泌腺様細胞群(ATLANTIS)に強発現し、 β 細胞の再生所見(Ki67 染色)が著明にみられた。これらの所見の一部は欧文論文として発表された。(Aida et al., PLoS One 9: e95110, 2014)

(2) CD28 欠損 NOD マウス膵管への ZOAL 逆行性投与および poly I:C 投与

ZOAL 投与により経時的に膵組織をみたところ、投与 2 日目より、膵外分泌腺組織および膵島への単核級の浸潤をみとめ、投与後 14 日目が浸潤細胞数の増加のピークをみとめた。その分画は CD3、CD8、CD68 などであり、膵外分泌組織と膵島内に浸潤したサブセットの細胞数は相関がみられた。さらに対照となる生食注入 CD28 欠損 NOD マウスの糖尿病発症に比べより早期で高度な膵島炎を認めた。以上の成績は ZOAL は CD28 欠損 NOD マウス膵管の閉塞を起こし、免疫的機序により、強い膵島炎と β 細胞破壊を起こして

いることが示唆された。一方、Poly I:C 腹腔投与実験では、対照とした生食投与と比べ、膵島炎の強度、糖尿病の発症頻度に有意な差を認めなかった。

結論

1. 本研究によりヒト SPIDDM の膵病変が膵管の病変(ductal hyperplasia)による閉塞機転による obstructive pancreatitis と関連していることが明らかとなった。この知見はユニークであり、2015 年日本糖尿病学会シンポジウムで発表され、欧文論文として投稿される。

2. 緩徐進行 1 型糖尿病のモデル動物として ZOAL 膵管内投与、CD28 欠損 NOD マウスが最も類似していることが明らかとなった。膵島炎の程度が高度である点がヒト SPIDDM と若干異なる点であり、今後さらなる免疫学的特徴づけ、モデル動物としての意義の検討を行っていく。

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 6 件)

- ① Nishida Y, Aida K, Kihara M, Kobayashi T. Antibody-validated proteins in inflamed islets of fulminant type 1 diabetes profiled by laser-capture microdissection followed by mass spectrometry. PLOS ONE 査読有、9: e107664, 2014.
DOI: 10.1371/journal.pone.0107664.
eCollection 2014.
- ② Aida K, Saitoh S, Nishida Y, Yokota S, Ohno S, Mao X, Akiyama D, Tanaka S, Awata T, Shimada A, Oikawa Y, Shimura H, Furuya F, Takizawa S, Ichijo M, Ichijo S, Itakura J, Fujii H, Hashiguchi A, Takasawa S, Endo T, Kobayashi T. Distinct cell clusters touching islet cells induce islet cell replication in association with over-expression of regenerating gene (REG) protein in fulminant type 1 diabetes. PLOS ONE 査読有、9: e95110, 2014.
DOI: 10.1371/journal.pone.0095110.
eCollection 2014.
- ③ Tanaka S, Aida K, Nishida Y, Kobayashi T. Pathophysiological mechanisms involving aggressive islet cell destruction in fulminant type 1 diabetes. Endocr J 査読有、60 : 837-845, 2013

<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/endocrj/>

- ④ Endo T, Kobayashi T. Immunization of mice with a newly identified thyroid-stimulating hormone receptor splice variant induces Graves'-like disease. J Autoimmun 査読有、43 : 18-25, 2013.
DOI: 10.1016/j.jaut.2013.02.004. Epub 2013 Mar 26.
- ⑤ Furuya F, Shimura H, Asami K, Ichijo S, Takahashi K, Kaneshige M, Oikawa Y, Aida K, Endo T, Kobayashi T. Ligand-bound thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic acinar cells into insulin-producing cells. J Biol Chem 査読有、288 : 16155-16166, 2013.
DOI: 10.1074/jbc.M112.438192. Epub 2013 Apr 17.
- ⑥ Onuma H, Tohyama M, Imagawa A, Hanafusa T, Kobayashi T, Kano Y, Ohashi J, Hashimoto K, Osawa H, Makino H. High frequency of HLA B62 in fulminant type 1 diabetes with the drug-induced hypersensitivity syndrome. J Clin Endocrinol Metab 査読有、97 : E2277-E2281, 2012.
DOI: 10.1210/jc.2012-2054. Epub 2012 Oct 15.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 小林哲郎、会田薫、西田頼子、島田朗、八木橋操六、栗田卓也。緩徐進行 1 型糖尿病の膵病変。第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 2015 年 5 月 21-24 日、山口県下関市。
- ② 会田薫、齊藤成、西田頼子、横田貞記、大野伸一、茅暁陽、秋山大一郎、高沢伸、小林哲郎。劇症 1 型糖尿病の膵島内に存在する Reg-1 α を強発現する腺房細胞様細胞。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22-24 日、大阪府大阪市。
- ③ 小林哲郎、田中昌一郎、会田薫。1 型糖尿病の成因 最先端研究はどこまで解明されたか緩徐進行 1 型糖尿病の成因と診断基準。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 2014 年 5 月 22-24 日、大阪府大阪市。
- ④ 小林哲郎、会田薫、西田頼子、田中昌一郎。緩徐進行 1 型糖尿病の成因。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム(招待講演) 2013 年 5 月 16-18 日、熊本県熊本市。

- ⑤ 西田頼子、会田薫、田中昌一郎、小林哲郎。
劇症1型糖尿病膝島のプロテオミクス解析。
第56回日本糖尿病学会年次学術集会2013
年5月16-18日、熊本県熊本市。
- ⑥ Furuya F, Shimura H, Haraguchi T, Endo T,
Kobayashi T. Association of cardio-ankie
vascular index with diabetes mellitus related
peripheral arterial disease in chronic
hemodialysis patients. 15th International
Congress of Endocrinology 2012年5月5-9
日, Genova, Italy.
- ⑦ Furuya F, Shimura H, Endo T, Kobayashi T.
Ligand bound-thyroid hormone
receptor contributes to reprogramming of
pancreatic exocrine cells to insulin-producing
cells via induction of Ngn3 and MafA. 15th
International Congress of Endocrinology 2012
年5月5-9日, Genova, Italy.
- ⑧ 田中昌一郎、滝澤壮一、一條昌志、志村浩
己、倭英司、宮崎純一、小林哲郎。筋組織
へのアミラーゼ遺伝子導入に伴う膵組織
所見や膵内分泌能への影響に関する検討。
第55回日本糖尿病学会年次学術集会2012
年5月17-19日、神奈川県横浜市。
- ⑨ 一條昌志、志村浩己、滝澤壮一、古屋文彦、
田中昌一郎、会田薫、遠藤登代志、小林哲郎。
膵β細胞におけるIFNγ発現についての
検討。第55回日本糖尿病学会年次学術
集会2012年5月17-19日、神奈川県横浜
市。
- ⑩ 会田薫、西田頼子、田中昌一郎、丸山太郎、
島田朗、栗田卓也、小林哲郎。1型糖尿病
の成因(緩徐進行1型糖尿病と劇症1型糖尿
病)。第55回日本糖尿病学会年次学術集会
2012年5月17-19日、神奈川県横浜市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://okiken.tokyo>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小林 哲郎 (Tetsuro Kobayashi)
公益財団法人 冲中記念成人病研究所
その他の部局等・研究員
研究者番号：30113442

(2) 研究分担者
會田 薫 (Kaoru Aida)
山梨大学・総合研究部 准教授
研究者番号：50184015

一條 昌志 (Masashi Ichijo)
山梨大学・総合研究部 助教
研究者番号：50436854

滝澤 壮一 (Souichi Takizawa)
山梨大学・総合研究部 助教
研究者番号：80456467