

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591321

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病発症における自然免疫の役割と発症予防に関する研究

研究課題名(英文) The role of innate immunity in the pathogenesis of fulminant type 1 diabetes.

研究代表者

會田 薫 (AIDA, Kaoru)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：50184015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は劇症1型糖尿病(FT1D) 膵にエンテロウイルス蛋白の存在を証明してきた。本研究では、FT1D患者および非糖尿病患者の膵島においてプロテオミクス解析を行い、発現蛋白を網羅的に検討した。その結果、FT1D膵島に特異的に発現している蛋白 38種、非糖尿病膵島にのみ発現している蛋白 107種、両者に発現している蛋白 155種を同定した。これらの中には炎症性サイトカインによって誘導されるものが多く含まれており、細胞の破壊と修復に関わる多くの免疫カスケードが判明した。これらは、FT1Dの病因がウイルス感染であることを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：We showed the presence of enterovirus proteins in the patients pancreas from the fulminant type 1 diabetes (FT1D). In this project, Proteins expressed in the islets of enterovirus-associated fulminant type 1 diabetes (FT1DM) with extensive insulinitis were identified by laser-capture microdissection mass spectrometry using formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic tissues. The cellular localization of selected proteins was validated immunohistochemically. Thirty-eight proteins were identified solely in FT1DM islets, most of which have not been previously linked to type 1 diabetes. Those are proteins involved in successive signaling in innate/adaptive immunity, migratory activity-related proteins and proteins related to virus replication and cell proliferation. The identified FT1DM-characterizing proteins include those involved in aggressive beta cell destruction

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：劇症1型糖尿病 自然免疫 ウイルス感染 エンテロウイルス

1. 研究開始当初の背景

劇症1型糖尿病は急激に著明な高血糖とケトアシドーシスで発症する糖尿病であり、病因は不明である。我々は、これまでに、劇症1型糖尿病患者膵組織を用いて、エンテロウイルス感染が発症の重要な契機となることを報告した。

2. 研究の目的

本研究においては、劇症1型糖尿病の病態をより明らかにし、早期診断を確立し、発症ごく早期に抗体療法を行うことの可能性を追求する。このために、緩徐進行1型糖尿病など対比しつつ、劇症1型糖尿病の血清、患者膵組織にて、特にウイルス感染後の自然免疫の活性化状態、下流のシグナル伝達系を詳細に検討し、早期診断のマーカーとなるものを検索する。また、劇症1型糖尿病の疾患モデルを確立し、我々が劇症1型糖尿病患者で上昇していることを見いだした CXCL10 を抗体で中和することにより、抗体治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 劇症1型糖尿病患者の膵組織を自己免疫性急性発症1型糖尿病、2型糖尿病および非糖尿病者の膵組織と比較しつつ、免疫組織学的に自然免疫機構の各経路の発現・活性化状態を検討する。

我々は、既に多くの糖尿病膵組織を収集している。これら膵組織を、ウイルス RNA レセプター、下流の転写因子、サイトカイン・ケモカイン、樹状細胞やマクロファージのマーカー、T細胞のマーカー、制御性T細胞 (Treg) のマーカーの抗体 (詳細は後述) を用いて免疫染色する。また、細胞がアポトーシスを起こす機序、細胞の増殖の程度を検討する。これらの分子の発現は免疫組織学的に検討するのみならず、パラフィン切片から RNA を抽出して、real-time PCR にて mRNA レベルでの発現も検討する。

(2) 劇症1型糖尿病患者血清をはじめ、各種病型の患者血清を用いて、エンテロウイルス mRNA の検出を行うと同時に、免疫機構の活性化状態を検討し、病態解明、早期診断、早期治療への方策を検討する。

我々は全国の先生方のご協力のもと、多くの患者血清を収集保存している。

これら患者血清からウイルス RNA を分離抽出し、RT-PCR にて enterovirus の mRNA を検出する。

劇症1型の他各種病型患者の血清中の cytokine/chemokine (後述) を網羅的に測定し、患者の臨床経過と対比することにより、

劇症1型糖尿病発症における免疫機構・病態を明らかにし、診断的価値を検討する。また、膵組織における発現と比較検討する。

(3) マウスを用いて劇症1型糖尿病モデル動物を確立し、発症機構を検討し、抗体治療を試みる。

これまで、抑制性T細胞 Treg は1型糖尿病の発症に重要な役割をはたしていると考えられるが、詳細は不明である。我々は劇症1型糖尿病膵では、Treg 細胞がまったく存在しないことを報告した (Aida, et al. Diabetes 60:884, 2011)。さらに、我々は最近、Treg 細胞を欠損する CD28 knock-out マウスに TLR3 の ligand である poly I:C を投与することによりウイルス感染に似た状態を作り出し、これにより超早期に糖尿病を発症し、劇症1型糖尿病のモデルになりうることを見いだした (未発表)。この系を確立し、ヒト劇症1型糖尿病と対比しつつ検討を行う。

我々は劇症1型糖尿病患者で血清 CXCL10 濃度が上昇していることを報告しているので、このモデルマウスに CXCL10 抗体を投与することにより、感染シグナル伝達をブロックし、糖尿病の発症予防ないし軽減できるかを検討する。また、(2)において、疾患特異性の高い新たな cytokine/chemokine が発見されれば、その抗体も用いる。

4. 研究成果

劇症1型糖尿病は著明な高血糖とケトアシドーシスが突然に発症し、きわめて短時間で重篤化する1型糖尿病のサブタイプの1つであり、その病因は明らかではない。我々は、劇症1型糖尿病膵を免疫組織学的に検討し、膵島におけるエンテロウイルス蛋白の存在を証明してきた。

さらにその病因を明らかにするため、劇症1型糖尿病患者および非糖尿病患者の膵島から laser microdissection/mass spectrometry を用いたプロテオミクス解析を行い、網羅的に検討した。その結果、劇症1型糖尿病膵島に特異的に発現している蛋白 38種、非糖尿病膵島にのみ発現している蛋白 107種、両者に発現している蛋白 155種を同定した。そして、これらの蛋白の抗体をもちいて、劇症1型糖尿病膵島における発現を、非糖尿病患者、2型糖尿病、緩徐進行1型糖尿病患者の膵を対照として免疫組織学的に validation を行った。その結果、自然免疫・獲得免疫やその後のシグナル伝達に参与するものとして、proteasome activator complex subunit 1 (PSME1)、tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS)、SAM domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1)、HLA-C、STAT1、ribosomal protein

L15 (RPL15)、serpin B6 (SERPINB6)などがみられた。免疫担当細胞の活性化・移動・浸潤に関与するものとして、plastin-2 (LCP1)、Ras GTPase-activating-like protein (IQGAP1)、moesin (MSN)、lamin B-1 (LMNB1)、などが浸潤細胞に発現していた。また、ウイルス感染・ウイルス増殖に関与するものとしてprobable ATP-dependent RNA helicase DEAD box helicase 5 (DDX5)、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRNP1)、などが見られた。これらの中には炎症性サイトカインによって誘導されるものが多く含まれており、細胞の破壊と修復に関わる多くの免疫カスケードが判明した。これらは、劇症1型糖尿病の病因がウイルス感染であることを強く示唆している。

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 16 件)

- 1) Antibody-validated proteins in inflamed islets of fulminant type 1 diabetes profiled by laser-capture microdissection followed by mass spectrometry. Nishida Y, Aida K, Kihara M, Kobayashi T. PLoS One. 2014 Oct 16;9(10):e107664. 査読の有
- 2) Diagnostic criteria for acute-onset type 1 diabetes mellitus: Report of the Committee of Japan Diabetes Society on the Research of Fulminant and Acute-onset Type 1 Diabetes Mellitus. Kawasaki E, Maruyama T, Imagawa A, Awata T, Ikegami H, Uchigata Y, Osawa H, Kawabata Y, Kobayashi T, Shimada A, Shimizu I, Takahashi K, Nagata M, Makino H, Hanafusa T. J Diabetes Investig. 2014 Feb 12;5(1):115-8. 査読の有
- 3) 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. 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. PLoS One. 2014 Apr 23;9(4):e95110. 査読の有
- 4) A low-frequency GLIS3 variant associated with resistance to Japanese type 1 diabetes. Takuya Awata, Hisakuni Yamashita, Susumu Kurihara, Tomoko Morishita-Ohkubo, Yumi Miyashita, Shigehiro Katayama, Eiji Kawasaki, Shoichiro Tanaka, Hiroshi Ikegami, Taro Maruyama, Akira Shimada, Kazuma Takahashi, Yumiko Kawabata, Tetsuro Kobayashi, Nao Nishida, Yoriko Mawatari. Biochemical and Biophysical Research Communications 437:521-525, 2013 査読の有
- 5) Pathophysiological mechanisms involving aggressive islet cell destruction in fulminant type 1 diabetes. Shoichiro Tanaka, Kaoru Aida, Yoriko Nishida, Tetsuro Kobayashi. Endocrine Journal 60:83-91, 2013. 査読の有
- 6) Ligand-bound thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic acinar cells into insulin-producing cells. Fumihiko Furuya, Hiroki Shimura, Keiichi Asami, Sayaka Ichizyo, Kazuya Takahashi, Masahiro Kaneshige, Kaoru Aida, Toyoshi Endo, Tetsuro Kobayashi. J Biol Chem 288:16155-16166, 2013. 査読の有
- 7) High frequency of HLA B62 in fulminant type 1 diabetes with the drug-induced hypersensitivity syndrome. Hiroshi Onuma, Mikiko Tohyama, Akihisa Imagawa, Toshiaki Hanafusa, Tetsuro Kobayashi, Yoko Kano, Jun Ohashi, Koji Hashimoto, Haruhiko Osawa, Hideichi Makino. J Clin Endocrinol Metab 97:E2277-E2281, 2012. 査読の有
- 8) Reports of the Committee of the Japan Diabetes Society on the Research of Fulminant and Acute-onset Type 1 Diabetes Mellitus: New diagnostic criteria of fulminant type 1 diabetes (2012). Akihisa Imagawa, Toshiaki Hanafusa, Takuya Awata, Hiroshi Ikegami, Yasuko Uchigata, Haruhiko Osawa, Eiji Kawasaki, Yumiko Kawabata, Tetsuro Kobayashi, Akira Shimada, Ikki Shimizu, Kazuma Takahashi, Masao Nagata, Hideichi Makino, Taro Maruyama. Diabetology International 3:179-183, 2012. 査読の有
- 9) Prevalence and predictive factors of diabetes in hepatitis virus positive

liver cirrhosis with fasting plasma glucose level of <126 mg/dL. Matsumoto N, Arase Y, Seko Y, Imai N, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saito S, Suzuki, Ikeda K, Kumada H, Kaoru AIDA, Tetsuro Kobayashi. Hepatology Research 42:558-563, 2012. 査読の有

- 10) 1型糖尿病 成因、診断、予防と治療 小林哲郎, 会田薫, 田中昌一郎 SRL 宝函 35 巻 1 号 Page26-36(2014.04). 査読の有
- 11) SPIDDM(緩徐進行 1 型糖尿病)の診断と治療は? 小林哲郎. レジデントノート 16 巻 17 号 Page3166-3170 (2015.02). 査読の有
- 12) 日本先進糖尿病治療研究会による CSII および CGM に関するステートメント 小林哲郎, 難波光義, 黒田暁生, 松久宗英, 山田研太郎, 今村洋一, 金重勝博, 浜口朋也, 川村智行, 佐藤譲, 高橋和真, 丸山太郎, 西村理明, 勝野朋幸, 楠宜樹, 清水一紀, 柳澤克之, 栗田卓也, 雨宮伸, 日本先進糖尿病治療研究会. 糖尿病 57 巻 6 号 Page403-415(2014.06). 査読の有
- 13) 理想的なインスリン治療とは? 1 型糖尿病. 田中昌一郎, 小林哲郎. Diabetes Contemporary 1 巻 1 号 Page26-31(2014.03). 査読の有
- 14) 1 型糖尿病の発症予防. 小林哲郎. 内分泌・糖尿病・代謝内科 38 巻 3 号 Page265-268(2014.03). 査読の有
- 15) 急性発症 1 型糖尿病の診断基準 (2012) の策定 — 1 型糖尿病調査研究委員会 (劇症および急性発症 1 型糖尿病分化会) 報告—. 川崎英二, 丸山太郎, 今川彰久, 栗田卓也, 池上博司, 内潟安子, 大澤春彦, 川畑由美子, 小林哲郎, 島田朗, 清水一紀, 高橋和真, 永田正男, 牧野英一, 花房俊昭 糖尿病 56:584-589, 2013. 査読の有
- 16) 1 型糖尿病調査研究委員会報告 劇症 1 型糖尿病の新しい診断基準(2012). 今川彰久, 花房俊昭, 栗田卓也, 池上博司, 内潟安子, 大澤春彦, 川崎英二, 川畑由美子, 小林哲郎, 島田朗, 清水一紀, 高橋和真, 永田正男, 牧野英一, 丸山太郎 糖尿病 55:815-820, 2012. 査読の有

[学会発表](計 30 件)

- 1) デグルデク 1 日 2 回投与が必要であった 1 型糖尿病の 2 例. 石井俊史, 会田薫, 金重勝博, 田中昌一郎, 古屋文彦, 滝澤壮一, 一條昌志, 一條沙耶花, 張磨則之,

小林哲郎, 北村健一郎. 第 52 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 2015 年 1 月 24 日 横浜

- 2) 腹腔鏡下スリーブ・バイパス手術が有効であった中等度肥満 2 型糖尿病の一例. 滝澤壮一, 一條沙耶花, 岡村綾子, 張磨則之, 笠間和典, 小林哲郎, 北村健一郎. 第 52 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 2015 年 1 月 24 日 横浜
- 3) 西田頼子, 会田薫, 齋藤成, 横田貞記, 大野伸一, Xiayang Mao, 秋山大一郎, 高沢伸, 小林哲郎. 膵島内に存在する腺房細胞様細胞群(ATLANTIS)は REG1 α を強く発現し、劇症 1 型糖尿病において膵島内分泌細胞増殖に關与する. 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー 2014 年 7 月 10 日 - 12 日 河口湖
- 4) 原井望, 古屋文彦, 志村浩己, 原口和貴, 会田薫. 維持透析患者における、皮膚自家蛍光を用いた皮下 AGE の定量化と心血管病変発症の關連の検討. 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー 2014 年 7 月 10 日 - 12 日 河口湖
- 5) Fumihiko Furuya, Kazuya Takahashi, Hiroki Shimura, Sayaka Ichizyo, Tetsuro Kobayashi. Ligand-Bound Thyroid Hormone Receptor β Induces Cancer Cell Cycle Arrest. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo 2014 年 6 月 21 日 - 24 日 Chicago, USA
- 6) Kazuya Takahashi, Fumihiko Furuya, Hiroki Shimura, Tetsuro Kobayashi. Impair Oxidative Endoplasmic Reticulum stress Response Caused By Deficiency of Thyroid Hormone Receptor α . The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo 2014 年 6 月 21 日 - 24 日 Chicago, USA
- 7) 会田薫, 齋藤成, 西田頼子, 横田貞記, 大野伸一, 茅曉陽, 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 を強発現する腺房細胞様細胞(ATLANTIS). 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22 日 - 24 日 大阪
- 8) 田中昌一郎, 小林哲郎, 会田薫. 低抗体価 GAD 抗体陽性や IA-2 抗体単独陽性の 2 型糖尿病ではインスリン治療による膵細胞保護効果が期待できる. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22 日 - 24 日 大阪
- 9) 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したか 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 2014年5月22日 - 24日 大阪
- 10) 栗原進, 波多雅子, 皆川晃伸, 片山茂裕, 島田朗, 小林哲郎, 風間要一郎, 丹羽正孝, 松田昌文, 粟田卓也. インスリン非依存 GAD 抗体陽性糖尿病における DPP-4 阻害薬シタグリプチンの有効性の検討 SPAN-S(第2報). 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 2014年5月22日 - 24日 大阪
- 11) 梶尾裕, 中條大輔, 安田和基, 春日雅人, 花房俊昭, 今川彰久, 池上博司, 大澤春彦, 川崎英二, 粟田卓也, 高橋和真, 小林哲郎, 島田朗, 安田尚史. 日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(TIDE-J)(第2報). 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 2014年5月22日 - 24日 大阪
- 12) 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が1型糖尿病の病態に及ぼす影響の検討第57回日本糖尿病学会年次学術集会 2014年5月22日 - 24日 大阪
- 13) 一條昌志, 金重勝博, 小林哲郎. 当院で経験したAlstrom症候群により糖尿病を発症した3症例の比較検討. 第51回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 2014年1月23日 横浜
- 14) 張磨則之, 滝澤壮一, 一條沙耶花, 岡村綾子, 金重勝博, 太田一保, 小林哲郎. 心不全と糖尿病による入院で発見され手術治療で著明な耐糖能改善をみた先端巨大症の1例 第51回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 2014年1月23日 横浜
- 15) 古屋文彦, 高橋和也, 秋山大一郎, 淺川智香子, 横道洋司, 原口和貴, 山縣然太郎, 小林哲郎. 維持血液透析患者における心血管イベント発症予測因子としての血中NGAL値の有用性 第51回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 2014年1月23日 横浜
- 16) 小石佐和子, 会田薫, 宮崎朝子, 志村浩己, 小林哲郎. 急性発症した1型糖尿病で低血糖を繰り返し汎下垂体機能低下症の診断に至った1例 第51回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 2014年1月23日 横浜
- 17) 一條沙耶花, 会田薫, 張磨則之, 滝澤壮一, 一條昌志, 太田一保, 遠藤登代志, 小林哲郎. 劇症1型糖尿病患者の咽頭ぬぐい液から単純ヘルペスウイルスが検出された1例. 第51回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 2014年1月23日 横浜
- 18) 西田頼子, 会田薫, 田中昌一郎, 小林哲郎. 劇症1型糖尿病膵島のプロテオミクス解析 第11回1型糖尿病研究会 2013年10月26日 - 27日 軽井沢
- 19) 齊藤成, 大野伸彦, 齊藤百合花, 寺田信生, 会田薫, 藤井秀樹, 小林哲郎, 大野伸一. ヒト膵臓ランゲルハンス島における免疫組織化学染色と電顕像の比較検討. 第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2013年9月27日 東京
- 20) 小林哲郎. 1型糖尿病の成因と発症進展阻止 第19回日本小児・思春期糖尿病研究会年次学術集会 2013年7月14日 東京
- 21) 岡村綾子, 古屋文彦, 秋山大一郎, 志村浩己, 小林哲郎. 早期糖尿病腎症患者におけるDPPIV阻害剤の微量アルブミン尿の減少効果. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本
- 22) 一條昌志, 志村浩己, 古屋文彦, 一條沙耶花, 滝澤壮一, 田中昌一郎, 会田薫, 遠藤登代志, 小林哲郎. 膵細胞における小胞体ストレスは, IFN- γ 産生を介してアポトーシスを誘導する. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本
- 23) 淺川智香子, 古屋文彦, 志村浩己, 高橋和也, 秋山大一郎, 本杉愛, 名取悦子, 飯野美代, 原口和貴, 小林哲郎. 糖尿病を基礎疾患とする維持血液透析患者における血中NGAL値と心血管疾患危険因子の検討 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本
- 24) 長澤薫, 西村明洋, 石黒喜美子, 大久保実, 中西幸二, 小林哲郎, 森保道. 高齢者1型糖尿病患者における最近の血糖コントロールと腎症進展に関する検討 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本
- 25) 高橋和也, 古屋文彦, 志村浩己, 遠藤登代志, 小林哲郎. 小胞体ストレス下にある膵細胞において, 甲状腺ホルモン受容体は抗アポトーシス作用を有する. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本
- 26) 池袋香織, 栗原進, 波多野雅子, 皆川晃伸, 片山茂裕, 島田朗, 小林哲郎, 丹羽正孝, 松田昌文, 粟田卓也. インスリン非依存 GAD 抗体陽性糖尿病における DPP-4 阻害薬シタグリプチンの有効性の検討(SPAN-S 第1報) . 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日 - 18日 熊本

- 27) 岩本龍哉、今川彰久、岩橋博見、前田法一、船橋徹、下村伊一郎、小林哲郎、花房俊昭. 劇症1型糖尿病患者における血清アディポネクチン濃度の検討. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日-18日 熊本
- 28) 花房俊昭、今川彰久、池上博司、大澤春彦、川崎英二、粟田卓也、高橋和眞、小林哲郎、安田和基、梶尾裕、春日雅人. 日本人1型糖尿病の包括的データベースの構築と臨床研究への展開(第1報). 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日-18日 熊本
- 29) 西田頼子、会田薫、田中昌一郎、小林哲郎. 劇症1型糖尿病膵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日-18日 熊本
- 30) 滝澤壮一、志村浩己、花井俊一郎、田中昌一郎、保坂嘉之、遠藤登代志、小林哲郎. 自己免疫性膵炎を合併した抗IA-2抗体単独陽性の緩徐進行1型糖尿病の1例. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日-18日 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

會田 薫 (AIDA, Kaoru)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：50184015

(2) 研究分担者

小林 哲郎 (KOBAYASHI, Tetsuro)
公益財団法人沖中記念成人病研究所・研究室・研究員
研究者番号：30113442