

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06403

研究課題名(和文)1型糖尿病でのスカベンジャー受容体SR-AとTLR4のクロストークの役割の解明

研究課題名(英文)The crosstalk between SR-A and TLR4 on dendritic cells influences the development of type 1 diabetes.

研究代表者

清水 まみ(Shimizu, Mami)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10757313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、1型糖尿病発症との関連が指摘されている腸内細菌に対して、樹状細胞(DC)に発現するスカベンジャー受容体SR-Aとグラム陰性桿菌の感知センサーであるTLR4との関連を解明しT1D発症予防法へと発展させることを目標としたものである。自然発症モデルとサイクロホスファミド(CY)誘導モデルにおいて、TLR4のagonistをSR-A欠損NODマウスとNODマウスに投与しT1D発症の推移を検討した。NODマウスおよびそのCYモデルへのLPS投与によりともに糖尿病発症率の有意な抑制を認めた。SR-A欠損NODマウスおよびそのCYモデルへのLPS投与では現時点では明らかな発症抑制は認めていない。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that the development of type 1 diabetes would be associated with commensal bacteria. So the aim of this study was to examine the association between scavenger receptor A (SR-A) and Toll-like receptor 4 (TLR4) as a sensor of the gram-negative rod on dendritic cells and to establish a new immunological preventative and therapeutic strategy for type 1 diabetes. First, lipopolysaccharide (LPS) as a ligand of TLR4 was administered to female NOD mice and cyclophosphamide (CY) -induced diabetes model in male NOD mice. Second, LPS was administered to SR-A KO NOD mice and CY-induced diabetes model in SR-A KO NOD mice. As a result, LPS administration prevented diabetes onset in female NOD mice and CY-induce diabetes model in male NOD mice, but not in SR-A KO situations. Flow cytometric analysis suggested that the Foxp3 regulatory T cells might play a pivotal role in the mechanism of LPS tolerance.

研究分野：1型糖尿病

キーワード：1型糖尿病 SR-A 腸内細菌 TLR4

1. 研究開始当初の背景

我々は、SR-A 欠損 NOD マウスでは 1 型糖尿病発症を抑制する一方、dsRNA ウイルス感染を模倣した高用量の poly(I:C) の投与では、SR-A 欠損 NOD マウスも NOD マウスと同程度に 1 型糖尿病(T1D)を発症することを見出した。以上より、TLR3 の上流に SR-A が存在し、かつ、TLR3 の上流に SR-A 以外の分子も存在する可能性を報告した。

2. 研究の目的

近年、1 型糖尿病(T1D)発症との関連が指摘されている腸内細菌に対して、樹状細胞(DC)に発現するスカベンジャー受容体 SR-A とグラム陰性桿菌の感知センサーである TLR4 との関連を解明し T1D 発症予防法へと発展させることを目標としたものである。TLR4 は LPS(Lipopolysaccharide)を agonist とするグラム陰性桿菌感染の感知センサーであると同時に、脂肪酸の感知センサーでもある。一方、SR-A も両者をリガンドであることより、DC 表面上に発現する SR-A 分子と TLR4 分子とのクロストークが、免疫系と代謝系の連関“Immunometabolism”において果たす役割を SR-A 欠損 NOD マウスを用いて解明したいと考えた。DC 上の感知センサーである SR-A と TLR4 を介した免疫系と代謝系の連関“Immunometabolism”がいかに病態と関連するかを研究し、最終的に慢性炎症性疾患に対する治療に応用することを目指している。

3. 研究の方法

SR-A-TLR シグナルにおいて、TLR3 と同様に、下流に MyD88 を有さない TLR4(一部の経路)へのシグナルが存在すると考え、自然発症モデルとサイクロホスファミド(CY)誘導モデルにおいて、TLR4 の agonist である LPS や抗体を、SR-A 欠損 NOD マウスと NOD マウスに投与し T1D 発症の推移を検討した。また、SR-A 欠損 NOD マウスと NOD マウスの CY 誘導モデルへの LPS 投与群と非投与群での糖尿病発症率を比較検討した。また、組織学検討にて自己免疫による膵島炎の評価を行ない、また、そのメカニズム解析のために Flow cytometry にて細胞分画の比較や ELISA にて炎症性サイトカイン産生を比較検討した。

4. 研究成果

TLR4 agonist の LPS 投与実験では、NOD マウスの自然発症モデルおよび CY モデルへの LPS 投与群と非投与群での糖尿病発症率を比較し、ともに LPS 投与群で発症率の有意な抑制を認めた。組織学的検討では、LPS 投与群で著明な膵島炎の抑制を認め、Flow cytometry にて制御性 T 細胞の増加を認め、発症抑制に大いに寄与していることを見出した。さらに、ELISA による炎症性サイトカイン産生では、LPS 投与群で炎症性サイトカイン産生の抑制を認めた。一方、SR-A 欠損 NOD マウスの自然発症モデルおよび CY モデルへの LPS 投与実験では、LPS 投与群で現時点では明らかな発症抑制は認めない。以上より、SR-A の有無により、LPS 投与による結果が異なることが明らかになった。つまり、SR-A 存在状態では LPS 投与シグナルが T1D 発症抑制に作用するが、SR-A 非存在状態では 1 型糖尿病発症抑制に作用しないことが示唆される。LPS シグナルは TLR4 を介した作用と SR-A を介した作用が重要である可能性が示唆され、これは国内外で初めて示されたものであり、非常に貴重な知見であると考えられる。また、DC 上の感知センサーである SR-A と TLR4 を介した免疫系と代謝系の連関“Immunometabolism”病態と関連することが示唆され、T1D 治療のみならず慢性炎症性疾患に対する治療に応用できる可能性が開かれたものと考えられる。

意な抑制を認めた。組織学的検討では、LPS 投与群で著明な膵島炎の抑制を認め、Flow cytometry にて制御性 T 細胞の増加を認め、発症抑制に大いに寄与していることを見出した。さらに、ELISA による炎症性サイトカイン産生では、LPS 投与群で炎症性サイトカイン産生の抑制を認めた。一方、SR-A 欠損 NOD マウスの自然発症モデルおよび CY モデルへの LPS 投与実験では、LPS 投与群で現時点では明らかな発症抑制は認めない。以上より、SR-A の有無により、LPS 投与による結果が異なることが明らかになった。つまり、SR-A 存在状態では LPS 投与シグナルが T1D 発症抑制に作用するが、SR-A 非存在状態では 1 型糖尿病発症抑制に作用しないことが示唆される。LPS シグナルは TLR4 を介した作用と SR-A を介した作用が重要である可能性が示唆され、これは国内外で初めて示されたものであり、非常に貴重な知見であると考えられる。また、DC 上の感知センサーである SR-A と TLR4 を介した免疫系と代謝系の連関“Immunometabolism”病態と関連することが示唆され、T1D 治療のみならず慢性炎症性疾患に対する治療に応用できる可能性が開かれたものと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

若藤 諒、清水まみ、その他

NOD-lpr/lpr マウスにおける免疫寛容破綻の誘導の試み

第 14 回 1 型糖尿病研究会

2016.11.6

ルネッサンスリゾートナルト(徳島県・鳴門市鳴門町)

田上加奈子、清水まみ、その他

Lipopolysaccharide 投与による 1 型糖尿病モデルにおける CD8 陽性 T 細胞への影響の検討

第 14 回 1 型糖尿病研究会

2016.11.6

ルネッサンスリゾートナルト(徳島県・鳴門市鳴門町)

井上雄斗、清水まみ、その他
CY投与SR-A KO NODマウスにおけるCY投与後の
脾細胞分画の推移の検討
第 14 回 1 型糖尿病研究会
2016.11.6
ルネッサンスリゾートナルト (徳島県・鳴門
市鳴門町)

西川みな帆、清水まみ、その他
CY投与NODマウスにおけるLPS投与による1型
糖尿病発症抑制の検討
第 14 回 1 型糖尿病研究会
2016.11.6
ルネッサンスリゾートナルト (徳島県・鳴門
市鳴門町)

井上雄斗、清水まみ、その他
CY 投与モデルマウスにおける SR-A 欠損によ
る 1 型糖尿病発症への影響
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会
2016.5.21
国立京都国際会館 (京都府・京都市左京区宝
ヶ池)

若藤 諒、清水 まみ、その他
poly(I:C) の 早 期 高 用 量 投 与 に よ る
NOD-Ipr/Ipr マウスの免疫寛容破綻の誘導
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会
2016.5.21
国立京都国際会館 (京都府・京都市左京区宝
ヶ池)

井上 雄斗、清水 まみ、その他
SR-A KO NOD マウスのサイクロホスファミ
ド投与モデルにおける 1 型糖尿病発症抑制の
検討
第 13 回 1 型糖尿病研究会
2015.10.31
TKP ガーデンシティ PREMIUM 神保町(東京都・
千代田区)

若藤 諒、清水 まみ、その他
NOD-Ipr/Ipr マウスにおける高用量 poly
(I:C)投与による免疫寛容破綻の誘導
第 13 回 1 型糖尿病研究会
2015.10.31
TKP ガーデンシティ PREMIUM 神保町(東京都・
千代田区)

井上 雄斗、清水 まみ、その他
サイクロホスファミド投与 SR A KO NOD マ
ウスにおける 1 型糖尿病発症の検討
第 58 回日本糖尿病学会年次集会
2015.5.21
ぱしふいっくびいなす(山口県・下関市)

[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：
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

清水 まみ (SHIMIZU, Mami)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：10757313

(2) 研究分担者

安田 尚史 (YASUDA, Hisafumi)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号： 50403233

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

井上 雄斗 (INOUE, Yuto)

若藤 諒 (WAKAFUJI, Ryo)

田上 加奈子 (TAGAMI, Kanako)

西川 みな帆 (NISHIKAWA, Minaho)

以上、神戸大学・大学院保健学研究科・博士
前期課程

勝田 敦美 (KATSUTA, Atsumi)

神戸大学・大学院医学研究科・研究助手