

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03612

研究課題名(和文) MHC機能改変による自己免疫疾患の発症制御とその機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of autoimmune diseases

研究代表者

宮寺 浩子 (Miyadera, Hiroko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40361464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病は、T細胞が膵臓細胞(インスリン産生細胞)を攻撃し、細胞を脱落させることにより引き起こされる自己免疫疾患である。病態の進行により、細胞の大半を失うことになるため、発症機構の解明、病態の進行を抑制する方法の開発が必要である。本研究では、1型糖尿病を自然発症するモデルである、Non-obese diabetic (NOD) マウスを用いて1型糖尿病の発症機序の解明を目指した。具体的には、NODマウスの免疫関連遺伝子の特定の残基に変異を導入した変異導入マウスを作製し、各変異株について、1型糖尿病発症率を長期間(2年間)測定し、変異導入と1型糖尿病発症率との関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病の発症は遺伝的要因と環境要因の影響を受けるが、免疫応答の変化と自己免疫疾患の罹りやすさとの関係には不明な点が多く残されている。本研究では動物モデルの免疫系分子に変異を導入することにより、免疫分子の機能変化と1型糖尿病発症率との関係について明らかにした。この知見は、1型糖尿病の発症機序の解明につながるものであるだけでなく、他の様々な自己免疫疾患の発症機序の解明と予防法、治療法開発への手がかりを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Type 1 diabetes (T1D) occurs through autoimmune-mediated destruction of insulin-producing beta cells in pancreas. The mechanism through which the beta-cells are targeted by self-reactive T-cells have not been fully uncovered. To elucidate the mechanism of T1D, we used non-obese diabetic (NOD) mice, which spontaneously develop T1D, and generated mutant NOD mice that carried mutations in immune molecules. We followed the incidence of T1D for each mutant strain and analyzed immunological responses, to elucidate the relation between immunological function and T1D incidence.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：HLA MHC 1型糖尿病 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、T細胞が膵臓β細胞(インスリン産生細胞)を攻撃しβ細胞を脱落させることにより引き起こされる自己免疫疾患である。病態が進むとβ細胞の大半を失うことになるため、生涯に渡り血糖値コントロールとインスリン自己注射(またはインスリンポンプによる補充)が必要となる。乳幼児~青年期での発症例が多いことから予防・治療法の確立が望まれているが、根治治療法は確立されておらず、再生医療による治療(異種・同種膵島移植)の実用化に向けた努力が続けられている。1型糖尿病の発症は遺伝要因と環境要因の影響を受ける。遺伝要因のうち、最も強い影響を持つのが、ヒト白血球抗原(human leukocyte antigens (HLA))である。HLA遺伝子型のなかでも特定のアリルを持つと1型糖尿病の発症率が高くなるのが、日本人、欧米人、アフリカ系米国人など様々な集団で報告されている。具体的には、欧米人では *DR3-DQA1*05-DQB1*02*, *DR4-DQA1*03-DQB1*03:02*(欧米人)、日本人では *DR9-DQA1*03-DQB1*03:03*, *DR4-DQA1*03-DQB1*04* などの特定の *HLA-DR-DQ* ハプロタイプの頻度が患者群に多く、患者の約9割がこれらのハプロタイプのいずれかを持つ。しかし、これらの *HLA* が1型糖尿病を引き起こすメカニズムは明らかにされていない。

1型糖尿病を自然発症するモデル動物として、Non-obese diabetogenic (NOD)マウスが知られている。NODマウスを用いた先行研究はこれまでに非常に多数報告されており、なかでも、1990年代には、NODにMHC遺伝子を導入したトランスジェニック株が多数作成された。興味深いことに、これらのトランスジェニックマウスの多くでは、糖尿病発症が顕著に抑制されていた(Nishimoto et al. *Nature*, 1987; Miyazaki et al. *Nature*, 1990; Slattery et al. *Nature*, 1990; Lund et al. *Nature*, 1990; Singer et al. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993; Quartey-Papafio et al. *J. Immunol.* 1995, 他)。しかし、なぜ、これらのMHCをトランスジェンとして導入することで糖尿病発症が抑制されるのか、そのメカニズムは明らかにされていない。これらのトランスジェニックNODマウスでは、導入したMHCの発現量、発現細胞が本来のMHC発現部位(抗原提示細胞)とは異なっている。また、トランスジェン挿入部位の遺伝子構造、発現量の変化が表現型に直接、間接的に影響している可能性もある。これらの点も含め、1型糖尿病の発症機序を明らかにすることを目的として、本研究ではNODマウスに変異を導入した変異株を複数種類作成し、変異部位と糖尿病発症率との関係を明らかにすることとした。変異導入にはCRISPR/Cas9システムを用いた。

2. 研究の目的

特定の *HLA* が1型糖尿病を引き起こす仕組みを明らかにすることを目的として、1型糖尿病モデル(NODマウス)を用いた解析を行った。NODマウスはβ細胞に対する自己免疫応答により1型糖尿病を自然発症する系統であり、膵島炎の発症はMHCクラスII (*I-A^{g7}*)と強い関連がある。そのため、ヒトの1型糖尿病病態との類似性が高く1型糖尿病の病態解明、治療法開発に適している。NODマウスの免疫分子にさまざまな変異を導入した変異導入マウスを樹立することにより、免疫系の機能変化と糖尿病発症との関係を明らかにすることを第一の目的として、本研究を行った。得られた知見を基に、発症・抑制のメカニズムを解明し、ヒトの1型糖尿病のメカニズムと予防法開発を進めることを長期的な目標とした。

3. 研究の方法

1型糖尿病を高頻度に自然発症する系統である NOD マウスでの膵島炎発症は、MHC クラス II (I-A^{b7})と強い関連があることから、ヒトの1型糖尿病と類似した機序で1型糖尿病を発症すると考えられている。本研究では NOD マウスの免疫系分子を部分的に改変した変異導入マウスを樹立することとした。変異部位については、*in vitro*実験系(培養細胞系)での実験を用いて、機能改変に適切な部位を候補として選択し、この残基について、変異導入を行うこととした。

変異導入は CRISPR/Cas9 システム(Wang, et al. Cell 2013)を用いて行い、変異導入マウスの作成は分担者が実施した。変異導入部位近傍を切断標的領域とする sgRNA を合成し、Cas9 mRNA および標的部位の変異配列を持つ1本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)と共に、NOD マウス受精卵前核にマイクロインジェクションした。偽妊娠マウスに移植して得られた産仔から DNA を抽出し、塩基配列解析で変異の有無を確認し、目的の変異導入がなされたマウスをライン化した。部位特異的変異株(A, B, C, D 株)および、部分欠失株(E, F 株)を樹立し、各株について長期保存のための凍結胚の作製を行った。これらの各変異株の雌雄各群 15-40 匹について、1型糖尿病の発症率を二年間、測定した。各群について、replication 群を作成し、発症率の再現性を確認した。

1型糖尿病発症率の測定は、随時血糖値の測定により行い、血糖値が高い個体については尿糖値の測定を行った。免疫応答の解析(各リンパ球の割合の定量)をフローサイトメトリーにより行った。膵臓の免疫染色膵臓の免疫染色(抗インスリン抗体、抗 CD3 抗体等)により膵島へのリンパ球浸潤を定量化した。また、膵臓浸潤 T 細胞の配列解析および、細胞株を用いた変異タンパク質の機能解析を行った。

マウスゲノム中には、変異導入の標的部位と類似した配列が多く存在することから、樹立した変異導入株それぞれについて、Off-target 領域(上位 8 箇所)を PCR 増幅して塩基配列を確認した。標的部位のみならず、Off-target 領域への変異と1型糖尿病発症率との関係についても知見を得るため、Off-target 領域のみに変異を持つ変異株も樹立し、1型糖尿病の発症率測定を行った。

4. 研究成果

変異部位および、その組み合わせが異なる変異導入マウスを、これまでに主に 6 種類樹立した。このうち、欠失部位、Off-target への変異導入の種類が異なるものを分けて細分化した場合、樹立した変異株は合計 9 種類となる。このうち 5 種類の変異株について糖尿病発症率の測定を各 2 年間行った結果、変異導入と1型糖尿病発症率との関係を明らかにすることが出来た。また、膵臓に浸潤した T 細胞の配列についてレパトア解析を行った結果、特定の配列を持つ T 細胞が膵臓に集積することが明らかとなった。これらの結果について、現在、論文投稿準備中である。今後は、本研究で得られた知見をさらに発展させ、ヒトにおける自己免疫疾患発症機序の解明につながる基本的なメカニズムの解明を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮寺浩子	4. 巻 26
2. 論文標題 HLA-class II分子低安定性と自己免疫疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 472-477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮寺浩子
2. 発表標題 MHCの安定性と自己免疫疾患
3. 学会等名 第161回 日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮寺浩子
2. 発表標題 1型糖尿病を発症しない動物モデルの確立と発症抑制機序の解明
3. 学会等名 日本IDDMネットワーク サイエンスフォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡村 匡史 (Okamura Tadashi) (00333790)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長 (82610)	