

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10084

研究課題名(和文)1型糖尿病の誘発におけるICA69抗原の役割に関する研究

研究課題名(英文)Identifying the role of ICA69 in the induction of type 1 diabetes

研究代表者

田嶋 朝子(Tajima, Asako)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00328337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者において他の自己免疫疾患を併発する頻度は高いが、その発症機序を含め原因についてはまだ不明である。本研究では1型糖尿病の自己抗原の一つであるICA69に対する免疫寛容の破綻によって1型糖尿病の発症が促進されるか、また他の自己免疫疾患が誘発されるか否かを検討した。ICA69の発現を抑制した遺伝子組換えマウスにおいて、雌では野生型と比較しヘテロ欠損型が早期に糖尿病を発症した。エンドポイントでの糖尿病発症頻度は雌ではヘテロ欠損型が高かったが、雄では野生型が高かった。HE染色では糖尿病発症前から膵ランゲルハンス氏島へのリンパ球浸潤を認めたが、野生型とヘテロ欠損型とで明らかな差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病に複数の自己免疫疾患が発症しやすい原因や、自己免疫疾患がなぜ女性に多くみられるかに関してはまだ解明されていない部分が多い。これまでの研究により、ICA69が1型糖尿病を初めとする自己免疫疾患の発症に関与することや、ゴルジ体でのインスリン産生に関わることが報告されている。本研究は、ICA69に対する免疫寛容の破綻を人工的に引き起こし、1型糖尿病のみならず複数の自己免疫疾患の発症が誘導されるかを検証することを目的とした。これらの病態におけるICA69の役割を検討することは、APS2型、3型も含めた複数の自己免疫疾患の発症機序の解明に寄与すると思われる、学術的に大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Patients with type 1 diabetes develop other autoimmune disorders more frequently than those without diabetes, however, the pathophysiology remains unclear. Recent studies have indicated the failure of immune tolerance due to the suppression of antigen expression in the thymus as a possible mechanism for the development of autoimmunity. In this study, we have investigated whether ICA69, one of the autoantigens for type 1 diabetes, contributes in the acceleration of the onset of diabetes or in the induction of extrapancreatic autoimmune diseases. Earlier onset of diabetes was noted in the heterozygotic ICA69 knockout mice than in the wild type in female mice, while the male wild type mice developed hyperglycemia earlier than the heterozygotic ICA69 knockout mice. Hematoxylin and eosin stain showed a lymphocytic invasion of pancreatic islets even before the progression of hyperglycemia. There was no clear difference in the level of invasion between the wild type and the heterozygotes.

研究分野：小児科学

キーワード：1型糖尿病 自己免疫 ICA69

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病 (Type 1 Diabetes; T1D) などの組織特異性のある自己免疫疾患を持つ患者では、複数の自己免疫疾患を併発する頻度が他の患者よりも高い。これらの疾患において、T細胞が自己を非自己として認識し攻撃する原因として免疫機構を左右する MHC や CTLA-4 などの遺伝子の関与が示唆されてきたが、AIRE (AutoImmune REgulator gene) 遺伝子の変異が自己免疫性多腺性内分泌症候群 (APS) 1 型を引き起こすことが明らかにされた。胸腺髄質上皮細胞に発現し、胸腺内の自己抗原提示細胞における多数の組織特異的抗原の発現を制御している AIRE 遺伝子に変異が起こると、組織特異的抗原が発現しないため、胸腺内での T細胞発達段階において負の選択が機能せず、自己応答性 T細胞が淘汰されない。その結果、それらの細胞が目標臓器を破壊し自己免疫疾患を発症する。また、正常マウスを用いて胸腺におけるインスリン発現を特異的に抑制すると、自己免疫性糖尿病が自然発症することが解明されている。これらの結果から、自己免疫寛容を維持するためには、胸腺での自己抗原の発現が重要であることが示唆される。

ICA69 (Islet Cell Autoantigen 69) は Ica1 遺伝子に encode されている T1D の自己抗原の一つである。T1D 自然発症型モデルである NOD (non-obese diabetic) マウスでは、T1D 抵抗性のある C57BL/6 (B6) 系統マウスと比較し胸腺での ICA69 発現レベルが低下している。これは NOD マウスでは ICA69 応答性の胸腺細胞が負の選択により除去されないことにより、ICA69 を発現する組織に対して自己免疫性が獲得されないためと考えられる。また NOD マウスに ICA69 ペプチドを接種すると糖尿病の発症が促進され、また唾液腺におけるリンパ球浸潤がより重度になることを、さらに胸腺における ICA69 発現を抑制すると、ICA69 を発現する複数の組織において自己免疫反応が惹起されることが明らかにされ、T1D に関連する他の自己免疫疾患や自己免疫性多腺性内分泌症候群 2、3 型の発症機構の解明に繋がる可能性が示されている。本研究では、Ica1 遺伝子の発現を抑制した遺伝子組換え NOD マウス (ICA-NOD) を用いて、ICA69 に対する免疫寛容の破綻によって T1D 発症が促進されるか、また他の自己免疫疾患が誘発されるか否かを検討する。これまでに、ICA69 に対する免疫寛容の破綻と T1D および他の自己免疫疾患の誘発との関連を検討した研究は国内外で行われていない。

## 2. 研究の目的

T1D 患者において他の自己免疫疾患を併発する頻度は高いが、その発症機序を含めその原因についてはまだ明らかでない点が多い。自己免疫疾患において、自己応答性 T細胞が各組織を非自己として攻撃する要因として遺伝子の関与が示唆される一方で、胸腺内の自己抗原の発現が抑制されることにより自己応答性 T細胞が末梢で目標組織を破壊することもわかってきた。本研究では T1D 自己抗原の一つである ICA69 が、T1D や併発する他の自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たすことを、胸腺における免疫寛容の破綻という視点から検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### [対象]

C57BL/J 系統である NOD マウス (NOD/ShiLtJ) において Ica1 遺伝子をノックアウトし ICA69 が発現しなくなったマウス (ICA-NOD) を Allegheny Health Network, Institute of Cellular Therapeutics (米国ペンシルバニア州ピッツバーグ市) から譲り受け、国内で繁殖を継続した。本研究では NOD wild type をコントロールに用い、ヘテロ欠損型 (ICA-NOD del/wt) の雌雄を交配することにより得られる ICA69 ホモ欠損型 (ICA-NOD del/del) ヘテロ欠損型 (ICA-NOD del/wt) 及び正常型 (ICA-NOD wt/wt あるいは NOD wild type) を対象とした。

### [方法]

#### 1) 糖尿病発症時期の評価

生後 4-6 週目から 2 週間に一回を目安に、簡易血糖測定器で血糖を測定した。エンドポイントは 32 週あるいはマウスが死亡するまでとした。

#### 2) 各組織における炎症反応 (リンパ球浸潤) の評価

糖尿病を発症していないマウスから膵臓、甲状腺、唾液腺を採取し、ホルマリンに保存して組織固定した。この組織標本をプレパラートにし、ヘマトキシリン・エオジン染色したものを顕微鏡下で観察した。

#### 3) 免疫組織染色

膵臓、甲状腺、唾液腺および胸腺において CD45、CD4、CD8、インスリン、グルカゴン、EpCAM に対する抗体を用いて免疫染色を行い、目標とする細胞を確認した。

#### 4) 各組織における Ica1 遺伝子の mRNA 転写レベルの評価

膵臓、甲状腺、唾液腺、胸腺を採取し、RNA 抽出後に cDNA を合成した。この cDNA を用いてリアルタイム PCR で Ica1 遺伝子の発現を定量化し、ハウスキーピング遺伝子の発現量との比較に

より、組織間における検討を試みた。

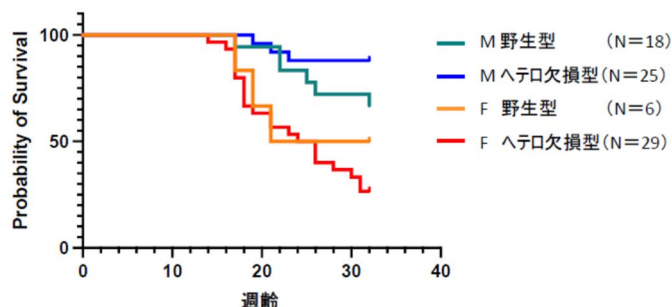
#### 4. 研究成果

##### 1) ICA-NOD マウスにおける糖尿病発症時期および発症頻度

マウスの交配には雄、雌共にヘテロ欠損型を用いた。出生した計 201 匹のマウスの内訳は野生型が 56 匹（雄：36 匹、雌 20 匹）、ヘテロ欠損型が 118 匹（雄：60 匹、雌 58 匹）、ホモ欠損型が 27 匹（雄：6 匹、雌 21 匹）であった。

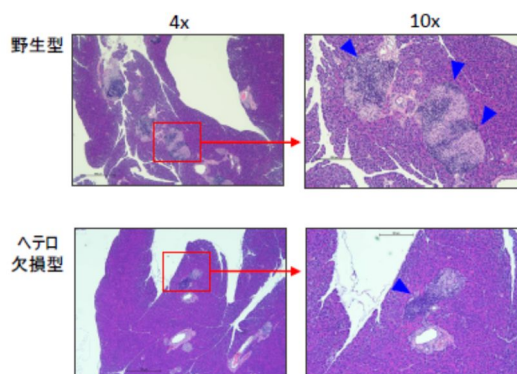
	M	F	計
野生型	36	20	56
ヘテロ欠損型	60	58	118
ホモ欠損型	6	21	27
合計	102	99	201

糖尿病発症時期および発症頻度を検討する際に、交配に用いたマウスや 32 週齢までに高血糖以外の原因で死亡したマウスは解析に使用しなかった。対象とした野生型マウス 24 匹（雄：18 匹、雌 6 匹）、ヘテロ欠損型（雄：25 匹、雌 29 匹）において、いずれの群においても雄と比較して雌の方が発症時期が早かった。またエンドポイントにおける糖尿病発症頻度は雌においてはヘテロ欠損型の方が高かったが、雄においては野生型の方が高かった。



##### 2) 膵臓および甲状腺におけるリンパ球浸潤の評価

週齢 12、20、30 の糖尿病未発症 ICA-NOD マウスの膵臓の組織標本に対して HE 染色を行った。その結果、糖尿病を発症していなくても膵ランゲルハンス氏島へのリンパ球浸潤がみられたが、同週齢における浸潤の程度は野生型とヘテロ欠損型とで明らかな差はなかった（下図）。また甲状腺におけるリンパ球浸潤は顕著でなかった。



##### 3) 免疫組織染色ならびに Ica1 遺伝子発現量については安定した結果が得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tajima A, Miyata I, Ida H, Trucco M, Fan Y
2. 発表標題 Thymic deletion of ICA69 induces autoimmune diabetes and other endocrine diseases
3. 学会等名 10th International Meeting of Pediatric Endocrinology (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------