

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28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：2010～2011
課題番号：22890112
研究課題名（和文） インクレチンとインスリンシグナルペプチドを用いた1型糖尿病の免疫寛容の誘導
研究課題名（英文） Induction of immune tolerance in type 1 diabetes by incretin and insulin signal peptide
研究代表者
荒井 隆志（TAKASHI ARAI）
神戸大学・医学部附属病院・医学研究員
研究者番号：10582009

研究成果の概要（和文）：新規糖尿病発症 NOD マウスに対して、human GLP-1 analog(インクレチン)あるいはインスリンシグナルペプチド L7-24 と CFA の併用投与では糖尿病状態からの改善効果を認めた。また、NY8.3NOD マウスへの CFA 単独投与やインクレチンとの併用投与では糖尿病発症の遅延を認めた。以上より、インクレチンあるいはインスリンシグナルペプチド L7-24 と CFA の併用にて1型糖尿病の免疫寛容を誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Administration of incretin (human GLP-1 analog) or insulin signal peptide L7-24 with CFA improved diabetes in newly diabetic NOD mice. Administration of CFA with or without incretin delayed diabetes onset in diabetes-accelerating NY8.3 NOD mice. These results suggested that immune tolerance in type 1 diabetes might be induced by incretin or insulin signal peptide L7-24 with CFA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：

1型糖尿病、インクレチン、インスリンシグナルペプチド、NY8.3NOD マウス、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病(T1D)では Th1 細胞が疾患発

症に重要である一方、制御性 T 細胞 (Treg) が疾患発症抑制に重要であると

されている。樹状細胞(DC)は抗原提示細胞のひとつとされ、T細胞に抗原提示することによりT細胞を活性化させて種々の免疫反応を惹起させる働きを有しており、T細胞バランスを調節できる鍵となる細胞である。われわれは制御性DCはTreg誘導に重要と考えている。一方、インクレチンは消化管由来ホルモン(GIP, GLP-1)で、ブドウ糖依存性に消化管から分泌し血糖降下作用が期待できるとともに、細胞増殖の亢進とアポトーシスの抑制を介して膵・細胞量の増加促進する可能性が報告されている。さらに、プレプロインスリンのシグナルペプチドL7-24がT1DのモデルマウスであるNOD(Non obese diabetic)マウスの糖尿病発症抑制と発症後の治療に有効で、機序としてTregの誘導と膵島の再生の可能性のあることをわれわれは報告した。そこで、われわれが報告したプレプロインスリンのシグナルペプチドL7-24投与の効果、インクレチン投与による膵・細胞の再生、保護効果、さらにわれわれが見出した制御性DCによるTreg誘導効果を併用することにより、Tregのexpansionを惹起して一連の抗原特異的な免疫寛容が誘導することで膵・細胞を再生、保護できる可能性を考えて行った。

2. 研究の目的

今回の研究は、インスリンのシグナルペプチドによる成果と現在までの制御性樹状細胞(DC)の研究成果に加え、Treg誘導や膵・細胞の再生、保護も期待できるインクレチンを用いることで、制御性DCの特徴を最大限に活用するとともに、T1Dにおける再生医療への応用を目指したものである。本研究は慢性難治性疾患である自己免疫疾患としてのT1Dに対して、制御性DCを介したTreg誘導とインクレチン(リラグリチド(human GLP-1 analog))を用いた膵島の再生、および両方の可能性を秘めたインスリンのシグナルペプチドL7-24による成果の併用を試み、自己免疫反応を抑制するTreg誘導と膵島の再生を図ることを目的とし

て行なった。

3. 研究の方法

- (1) 新規糖尿病発症 NOD マウスに対して、骨髄由来制御性DC単独投与、リラグリチド(human GLP-1 analog)単独投与、インスリンシグナルペプチド L7-24 の単独投与及びその併用投与、あるいはCFA(complete Freud adjuvant)の単独及びその併用投与を行い、糖尿病状態からの改善の有無を確認した。
- (2) 自己反応性 CD8 陽性 T 細胞により糖尿病発症が促進される NY8.3NOD マウスにて、骨髄由来制御性DC単独投与、インスリンシグナルペプチド L7-24 の単独投与及び併用投与、あるいはCFAの単独及びその併用投与を行い、糖尿病状態からの改善の有無の確認を試みた。

改善が得られた際には、

①細胞や膵リンパ節細胞での細胞表面マーカーをFACSを用いて解析

骨髄由来制御性DC単独投与、リラグリチド(human GLP-1 analog)単独投与、インスリンシグナルペプチドL7-24の単独投与及びその併用投与、あるいはCFA(complete Freud adjuvant)の単独及びその併用投与によるTreg誘導効果を検討。

1. CD4CD25 制御性 T 細胞、CD8 制御性 T 細胞、Foxp3 陽性 T 細胞の存在の有無と比率の検討

2. CD11c DC の制御性マーカーの解析 (B220, CD45RB, HLAclassII, CD80, CD86, CD103 など)

②膵細胞や膵リンパ節細胞でのサイトカイン分泌能をELISAを用いて解析

抑制性サイトカインであるIL-4やIL-10, TGF- β の分泌の増加の有無を検討。

③膵・細胞の組織学的検討(H-E染色、免疫染色)

リラグリチド(human GLP-1 analog)単独投与、インスリンシグナルペプチドL7-24の単独投与及びその併用投与、あるいは

CFA(complete Freud adjuvant)の単独及びその併用投与による膵島炎の有無を組織学的に検討し、さらに膵・細胞量の増加効果を検討。

4. 研究成果

(1) 新規糖尿病発症NODマウスに対して、骨髄由来制御性DC投与では糖尿病状態からの改善は困難であることが示唆された。しかしながら、リラグリチド(human GLP-1 analog)単独投与、インスリンシグナルペプチドL7-24の単独投与及びその併用投与、あるいはCFAの単独及びその併用投与では、糖尿病状態からの改善が可能で免疫寛容を誘導する可能性が見出された。特にリラグリチド(human GLP-1 analog)とCFAの併用投与やインスリンシグナルペプチドL7-24とCFAの併用投与では糖尿病状態からの改善効果が著明であった。そのメカニズムとして、自己免疫反応を抑制するTregの誘導と膵島の再生が示唆された。

(2) 自己反応性CD8陽性T細胞により糖尿病発症が促進されるNY8.3NODマウスにて、骨髄由来制御性DC投与では糖尿病発症抑制が困難であることが示唆された。また、インスリンシグナルペプチドL7-24の単独投与にても、糖尿病発症抑制が困難である可能性が示唆された。一方、NY8.3NODマウスの自然発症では15週齢ではメスでは70%以上の発症率を示したのに対して、CFA単独投与、さらにはCFAとリラグリチド(human GLP-1 analog)の併用投与では、糖尿病発症を明らかに遅延し、自己反応性CD8陽性T細胞の自己膵β細胞傷害を抑制する可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Sasaki H, Yasuda H, Moriyama H, Nakamura A, Shimizu M, Arai T, Nagata

M, Hara K, Yokono K.

Acceleration of autoimmune diabetes in Rheb-congenic NOD mice with β -cell-specific mTORC1 activation.

Biochem Biophys Res Commun 2011, 408(2):306-11.

(査読有)

2. Arai T, Moriyama H, Shimizu M, Sasaki H, Kishi M, Okumachi Y, Yasuda H, Hara K, Yokono K, Nagata M.

Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice.

Clin Immunol. 2010, 136(1):74-82.

(査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 清水まみ, 安田尚史, 中村 晃, 勝田敦美, 佐々木弘智, 荒井隆志, 永田正男, 原 賢太, 横野浩一
Modified LDL がリガンドである SR-A の 1 型糖尿病発症への影響.
第 7 回加齢医学研究会.
2012. 1. 21. 名古屋.

2. 清水まみ, 安田尚史, 森山啓明, 中村 晃, 勝田敦美, 花野智苗, 佐々木弘智, 荒井隆志, 永田正男, 原 賢太, 横野浩一
1 型糖尿病発症における MSR-A の役割の検討.
第 9 回 1 型糖尿病研究会.
2011. 10. 30. 大磯.

3. 佐々木弘智, 安田尚史, 森山啓明, 清水まみ, 中村 晃, 荒井隆志, 永田正男, 原 賢太, 横野浩一
膵β細胞特異的 Rheb 過剰発現 NOD マウスにおける 1 型糖尿病発症の検討.
第 54 回日本糖尿病学会総会.
2011. 5. 21. 札幌.

4. 荒井隆志, 安田尚史, 世戸博之, 北村龍義, 井手 茜, 明寄太一, 平岡栄治, 金澤健司, 原 賢太, 秋田穂束, 横野浩一
壊死性虚血性腸炎の術後に肺塞栓と持続

する菌血症を来たした1型糖尿病の一例.
第47回日本糖尿病学会近畿地方会.
2010.11.13. 大阪.

5. 佐々木弘智, 森山啓明, 安田尚史, 清水まみ, 中村 晃, 荒井隆志, 原 賢太, 永田正男, 横野浩一
膵β細胞における Rheb 過剰発現によって誘導される mTORC1 経路活性化が NOD マウスに及ぼす影響.
第8回1型糖尿病研究会.
2010.10.10. 長崎.
6. 荒井隆志, 黒田祥二, 来住 稔, 奥町恭代, 安田尚史, 森山啓明, 原 賢太, 永田正男, 森田須美春, 横野浩一
高齢者の細菌感染症におけるプロカルシトニンキットの有用性.
第52回日本老年医学会総会.
2010.6.25. 神戸.
7. 佐々木弘智, 森山啓明, 清水まみ, 中村 晃, 荒井隆志, 来住 稔, 濱田水鈴, 奥町恭代, 安田尚史, 原 賢太, 永田正男, 横野浩一
膵β細胞 mTORC1 経路活性化による NOD マウス糖尿病発症に対する影響. 第53回日本糖尿病学会総会.
2010.5.29. 岡山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 隆志 (TAKASHI ARAI)
神戸大学医学部附属病院・医学研究員
研究者番号: 10582009

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし