

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 25 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：若手研究B  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791036  
 研究課題名（和文） IRF-4 (interferon regulatory factor-4) を標的とした 1 型糖尿病の新規治療の開発  
 研究課題名（英文） Development of new therapy for type 1 diabetes targeting for IRF-4 (interferon regulatory factor-4)  
 研究代表者  
 赤澤 諭 (AKAZAWA SATORU)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究協力員  
 研究者番号：50549409

## 研究成果の概要（和文）：

IRF-4 を介した 1 型糖尿病の治療開発を目的として、IRF-4 欠損 NOD マウスの作成・解析を行った。IRF4 ホモ欠損 NOD マウスのみではなく、ヘテロ欠損 NOD マウスにおいても、自己免疫性糖尿病・膵島炎・インスリン自己抗体の産生の強い抑制が認められた。養子移入実験では CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞の両サブセットのエフェクター機能に IRF4 が必須であることが証明された。IRF4 の発現は CD4<sup>+</sup>細胞において memory T 細胞や IL-17 産生細胞の低下と関連した。また、CD8<sup>+</sup>T 細胞ではエフェクター分子である Granzyme B の発現低下と関連した。IRF4 は NOD マウスの自己免疫性糖尿病の病態において T 細胞のエフェクター機能に必須であり、ヒト 1 型糖尿病の治療標的として重要な分子である可能性を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

To investigate the effectiveness of IRF4 targeting therapy in type 1 diabetes, we generated IRF4 deficient NOD mouse and investigated the phenotypes. We found that progression of autoimmune diabetes / insulinitis / autoinsulin antibody were completely suppressed in IRF4<sup>-/-</sup> NOD mice, also significantly suppressed in heterozygous (IRF4<sup>+/-</sup> NOD) mice. Adoptive transfer study with combined CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets exhibited that IRF4 is essential for effector functions in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Less IRF4 expression was associated with reduction of memory T cells and IL-17 producing CD4<sup>+</sup> T cells, as well as Granzyme B producing cells in CD8<sup>+</sup> T cells. We documented IRF4 is essential for effector function of T cells in autoimmune diabetes in NOD mouse and IRF4 is possible target for prevention for human type 1 diabetes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：1 型糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は全糖尿病の 10-15% を占め、比較的若年者に発症し、高率に合併症を引き起こす難病である。病態の主因は膵β細胞が特異的に破壊される自己免疫疾患である。根治療

法として、近年、インスリン依存状態となった患者に対する移植(膵島移植・膵臓移植)療法がすすめられているが、自己免疫学的機序の再活性化による再発が問題であり(Diabetes. 2010), 1 型糖尿病の根治を目指した治療方法の開発には自己免疫の制御が不

可欠と考えられる。

1型糖尿病はT細胞主体の自己免疫疾患であり、T細胞を標的とした治療法、中でもT細胞サブセットに特異的な治療法の開発が望まれる。IL-17/IL-21を産生するCD4陽性T細胞(Th17)は、動物実験において関節リウマチ(CIA)、多発性硬化症(EAE)において、その重要性が報告されているが、NODマウスにおいてもIL-17抗体投与やIL-21R遺伝子欠損マウスでの糖尿病発症抑制が報告された(Diabetes. 2009)(PANS,2008)。また、IL-17欠損NODマウスの検討により、明らかな発症遅延を確認した。これらのことから、Th17はNODマウス発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

Th17の分化にはIRF-4を介した機序が大きく関与していることが報告されている。IRF-4のリン酸化はTh17の分化・成熟(IL-17/IL-21の産生)に必須であり、リン酸化酵素がROCK2であることが報告された。ROCK2阻害薬がIRF-4の活性化/リン酸化を阻害しTh17分化成熟を抑制することで、自己免疫疾患抑制に働くことが示されており、同様の自己免疫疾患である1型糖尿病でも同様の有効性が期待される可能性を有している(J Clin Invest. 2010)。以上のことから、私達はIRF4を治療目標とした1型糖尿病の発症・進展予防を目的として、以下の研究を予定した。

## 2. 研究の目的

1) IRF-4遺伝子欠損NODマウスを作製し、そのphenotypeの解析により、自然発症1型糖尿病へのIRF-4の関与を検討する。

2) NODマウスに対しRho阻害薬(fasudil)を経口投与し、その治療効果を検討する。

## 3. 研究の方法

B6バックグラウンドIRF4ノックアウトマウスとNODマウスの15世代の戻し交配により、IRF4ホモ欠損(IRF-4<sup>+/+</sup>NOD)、ヘテロ欠損(IRF-4<sup>+/-</sup>NOD)、野生型NODマウス(IRF-4<sup>-/-</sup>NOD)を作成した。(第6世代で疾患感受性遺伝子Iddが1-14まで組み込まれていることを確認し、第14世代で第13番染色体においても、87%以上がNODバックグラウンドとなっていることを確認した。作成した上記の各3群のマウスを用いて以下の実験を行った。

1) 臨床的なフェノタイプ解析として、各群の累積糖尿病発症率(12-50週齢)、膵島炎(18週齢)、インスリン自己抗体(12週齢)の測定を行った。

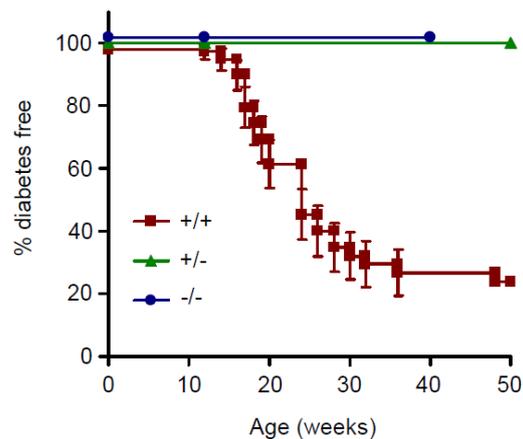
2) 免疫学的フェノタイプ解析として、各群において、脾細胞を用いて以下の実験を行った。リンパ球分画の測定、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞におけるIRF4の発現の測定、CD4<sup>+</sup>T細胞におけるメモリーT細胞・制御性T細胞・IFN $\gamma$ /IL-17産生細胞の測定を行った。また、CD8<sup>+</sup>T細胞においては抗CD3抗体存在下で誘導されるGranzymeB/Perforinの測定を行った。

3) T細胞のeffector機能をin vivoで評価する方法として、養子移入実験を行った。各群のマウス(10-12週齢)より得られた脾細胞より、制御性T細胞を除去後にT細胞を分離、NOD-SCIDマウス(10週齢)へ移入し、移入後50日まで糖尿病の急速誘導を観察することで、T細胞のeffector機能を評価した。

4) Rho阻害薬(ファスジル)をNODマウスに投与し臨床的フェノタイプの観察を行い、Rho阻害薬の自己免疫性糖尿病への臨床応用を検討した。具体的には、NODマウスを用いて、Fasudil投与群・コントロール群において比較検討を行った。Fasudil投与群は4-8週(10匹)・12-16週(10匹)・4-16週(10匹)の3群に分け、それぞれのコントロール群(10匹)と累積糖尿病発症率において比較検討を行った。Fasudil投与は以前の報告例(J Clin Invest. 2010 ;120(9):3280-95.)を参照し、投与時、体重測定・飲水量測定を毎日測定しながら、給水より100mg/kg/dayを投与した。

## 4. 研究成果

### 1) 臨床的フェノタイプ解析



【図1】

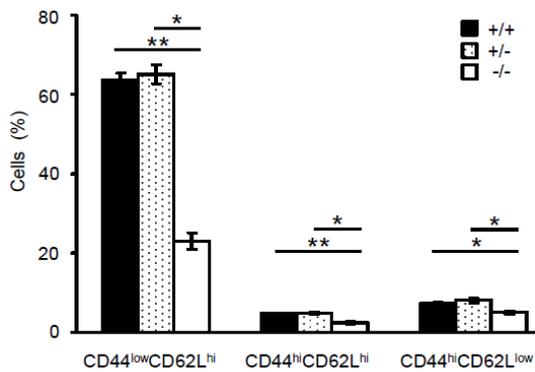
累積糖尿病発症率の検討では、野生型では50週齢までに80%に糖尿病が発症したが、ヘテロ/ホモ欠損マウスでは認められなかった。(図1)インスリン自己抗体は、野生型では40%に陽性であったが、ヘテロ/ホモ欠損マウス

スでは全例が陰性であった。膵島炎の組織学的な評価では、野生型では 80%の膵島に強い単核球の浸潤を認めたが、ヘテロ欠損マウスでは 3%と若干のみであり、ホモ欠損 NOD マウスでは膵島炎はまったく認められなかった。

## 2) 免疫学的フェノタイプ解析

抗 CD3 抗体で 36 時間刺激した後に誘導される IRF4 の発現を評価では、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞ともに、野生型と比較してヘテロ欠損 NOD マウスでは、IRF4 の発現低下が認められた。(relative MFI: IRF4<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell 39.0±0.3 vs IRF4<sup>+/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell 25.5±1.0, p<0.01, n=5 per group) (relative MFI: IRF4<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell 30.2±1.2 vs IRF4<sup>+/-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell 18.5±0.9, p<0.01, n=5 per group) IRF4 の発現低下に伴い、脾細胞数の増加、血清 IgG の低下を認め、特にホモ欠損 NOD マウスでは IgG の産生はまったく認められなかった。リンパ球分画ではホモ欠損 NOD マウスにおいてのみ、CD4<sup>+</sup>T 細胞分画の有意な軽度増加、CD8<sup>+</sup>T 細胞分画の軽度減少が認められた。

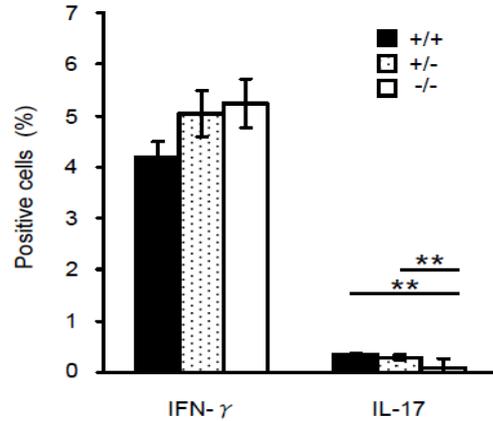
ホモ欠損マウスでは central memory と effector memory T 細胞の低下を認め、CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化障害と関連がある可能性が考えられた。(図 2) 制御性 T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 細胞) の比率は IRF4 の発現に伴い有意に低下した。(IRF4<sup>+/+</sup> 9.7±0.4% vs IRF4<sup>+/-</sup> 7.8±0.2% vs IRF4<sup>-/-</sup> 4.3±0.2%, p<0.01)



【図 2】

PMA と Ionomycin で 5 時間刺激後に、CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN $\gamma$  / IL17 の産生測定を行った。IFN $\gamma$  は野生型/ヘテロ欠損/ホモ欠損 NOD で変化を認めないのに対し (IRF4<sup>+/+</sup> 4.19±0.29%, IRF4<sup>+/-</sup> 5.04±0.46%, IRF4<sup>-/-</sup> 5.24±0.48%, n=5 per group), IL17 の産生はホモ欠損でのみ強く低下した (IRF4<sup>+/+</sup>

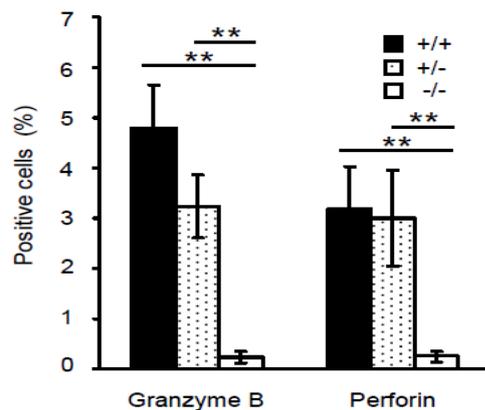
0.34±0.05%, IRF4<sup>+/-</sup> 0.30±0.02%, IRF4<sup>-/-</sup> 0.09±0.04%, n=5 per group) (IRF4<sup>+/+</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01; IRF4<sup>+/-</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01) (Fig. 5C) (図 3)



【図 3】

各群のマウスから CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離し抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で 48 時間刺激後、IL-2 存在下で 72 時間培養し、Granzyme B と perforin の発現を評価した。

ホモ欠損マウスでは他の群と比較して Granzyme B / perforin の高度の産生障害を認めた (Granzyme B: IRF4<sup>+/+</sup> 4.78±0.86%, IRF4<sup>+/-</sup> 3.24±0.63%, IRF4<sup>-/-</sup> 0.23±0.12%, n=5 per group) (IRF4<sup>+/+</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01; IRF4<sup>+/-</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01) (perforin: IRF4<sup>+/+</sup> 3.19±0.82%, IRF4<sup>+/-</sup> 3.00±0.95%, IRF4<sup>-/-</sup> 0.24±0.09%, n=5 per group) (IRF4<sup>+/+</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01; IRF4<sup>+/-</sup> vs IRF4<sup>-/-</sup>, p<0.01) (図 4)



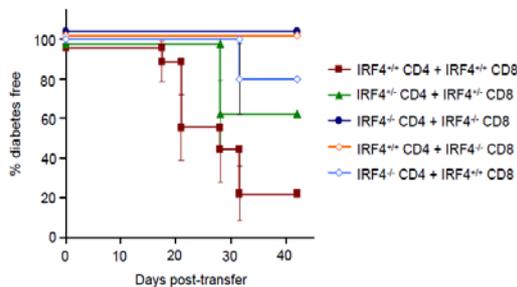
【図 4】

## 3) NOD-SCID マウスへの養子移入実験

野生型/IRF4<sup>-/-</sup> ヘテロ欠損/ホモ欠損 NOD マウスから得られた脾細胞を、制御性 T 細胞を

除去後に、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離し、NOD-SCID マウスに移入し、誘導される糖尿病を観察した。

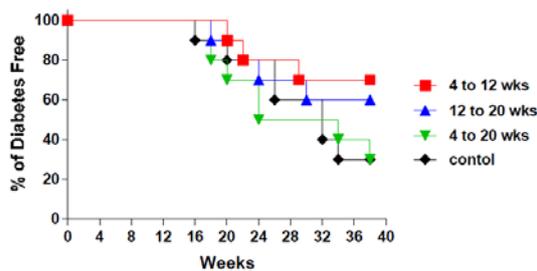
野生型の T 細胞を移入した群では 80%に糖尿病が急速に誘導されるのに対し、ヘテロ欠損 NOD マウスから移入した群では 40%と抑制傾向を認め、ホモ欠損 NOD マウスから移入した群では誘導されなかった。(図 5) また、CD8<sup>+</sup>T 細胞が野生型の群では 20%のみで糖尿病が誘導され、CD4<sup>+</sup>T 細胞のみが野生型の群では糖尿病は誘導されなかった。(図 5)



【図 5】

#### 4) NOD マウスへのファスジル投与実験

ファスジル 4-12 週投与群と 12-20 週投与群ではコントロール群と比較して、累積糖尿病発症率の抑制傾向が認められたものの、有意差は認められなかった。(図 6)



【図 6】

#### 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 3 件)

① 赤澤諭, 阿比留教生, 古林正和, 厨源平 (他 3 名)、IRF-4 欠損 NOD マウスにおける T 細胞依存性膵島炎および糖尿病の抑制、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 19 日、神奈川県横浜市

② Satoru Akazawa, Norio Abiru, Genpi Kuriya, Tsuyoshi Satoh, Masakazu Kobayashi, Interferon regulatory factor 4 silencing suppresses type 1 diabetes in the non-obese diabetic mice, 12<sup>th</sup> International Conference on the Immunology of Diabetes, June 17, 2012, Victoria, Canada.

③ 赤澤諭, 阿比留教生, 古林正和(他 3 名)、IRF4 欠損 NOD マウスにおける糖尿病の完全抑制、第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2013 年 2 月 22 日、東京都千代田区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

赤澤 諭 (AKAZAWA SATORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・**研究協力員**

研究者番号：50549409

##### (2) 研究分担者

阿比留 教生 (ABIRU NORIO)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：00380981

古林 正和 (KOBAYASHI MASAKAZU)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：00380874

厨 源平 (GENPEI KURIYA)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：50457579

中村 寛 (NAKAMURA KAN)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：70530426

##### (3) 連携研究者

該当なし