

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 25 年 5 月 27 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：2011～2012

課題番号：23890114

 研究課題名（和文） mTOR依存性膵β細胞量増加と自己免疫促進をきたすNOD^{Rheb}での自己免疫制御

 研究課題名（英文） Regulation of autoimmunity in NOD^{Rheb} mice that represent increase of mTOR-dependent pancreatic β-cells and acceleration of autoimmune destruction.

研究代表者 佐々木 弘智 (HIROTOMO SASAKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20610736

研究成果の概要（和文）：

膵島の再生を期待した新規糖尿病発症NOD^{Rheb}マウス及びNODマウスへのインクレチン製剤 (human GLP-1 analog リラグリチド) 単独投与では、NODマウスでは糖尿病の改善効果を認めたものの、NOD^{Rheb}マウス (R3:発症促進) ではほとんど糖尿病の改善を認めず糖尿病状態からの改善は困難であることが示唆された。さらにリラグリチドとCFA (complete Freund adjuvant) との併用投与では、現在まですべてのNODマウスで糖尿病が改善した。一方、NOD^{Rheb}マウスでは、糖尿病からの改善をきたす制御性Tregの誘導や膵島の再生は認めず、検討した限りでは糖尿病の改善を認めなかった。NOD^{Rheb}マウスの周産期における糖尿病発症促進の有無の検討では、NODマウスと比較して出産1カ月以内の糖尿病発症を顕著に認め、かつ出産回数が少なかった。また、NOD^{Rheb}マウスの自然発症の推移と比較しても糖尿病発症の促進傾向が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Administration of incretin (human GLP-1 analog) with or without CFA improved diabetes in newly diabetic NOD mice, but not in newly diabetic NOD^{Rheb} mice (R3 lines), which accelerate diabetes progression. Newly diabetic NOD^{Rheb} mice represented no induction of Treg into pancreatic islets and no islet regeneration. In addition, NOD^{Rheb} mice showed more increased diabetes onset than NOD mice during the perinatal period and more decreased delivery. NOD^{Rheb} mice also showed more accelerated diabetes progression than NOD mice after delivery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・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、CFA、妊娠、NOD^{Rheb}マウス

1. 研究開始当初の背景

RhebによるmTORC1経路活性化による膵β細胞量の増加が1型糖尿病(T1D)発症を抑制さ

せるという仮説に基づいた先行研究では、予測に反して、膵β細胞量増加をきたす NOD^{Rheb} マウスは、T1D 発症を促進させた。

機序として、Rheb 依存性 mTORC1 経路活性化による膵β細胞量の増加がむしろ自己抗原としての内因性インスリンへの免疫反応を増強させたことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、膵島再生が期待されるインクレチン製剤などを用いて、糖尿病発症直後の NOD^{Rheb} マウス及び NOD マウスへの投与により糖尿病の改善が得られるかどうか、また、その際には膵島の再生や細胞抑制性 T 細胞を介した細胞傷害性 T 細胞の抑制がみられるかどうかを検討した。

また、妊娠中には膵β細胞量増加を認めることより、膵β細胞量増加と自己免疫促進をきたす NOD^{Rheb} マウスが、妊娠に際して膵β細胞量増加を来たすことで糖尿病発症を抑制することになるのか、膵β細胞量増加に伴いやはり膵β細胞量を標的とする自己免疫反応の増強を来たし糖尿病発症をさらに増強することになるのかを検討することで、妊娠に関連した T1D のモデルになりうるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 新規糖尿病発症 NOD マウスに対して、骨髄由来制御性樹状細胞(DC)単独投与、インクレチン製剤(human GLP-1 analog リラグリチド)単独投与、インスリンシグナルペプチド L7-24 の単独投与、CFA(complete Freund adjuvant)の単独投与、およびそれらとの併用投与を行い、糖尿病状態からの改善の有無の確認を試みた。

(2) 新規糖尿病発症 NOD^{Rheb} マウスに対して、骨髄由来制御性 DC 単独投与、インクレチン製剤(human GLP-1 analog リラグリチド)単独投与、インスリンシグナルペプチド L7-24 の単独投与、CFA の単独投与、およびそれらとの併用投与を行い、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脾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、CFA の単独投与、およびそれらとの併用投与による

Treg 誘導効果を検討した。

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脾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)

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、
CFA の単独投与、
およびそれらと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した。

(3) 膵β細胞量増加と自己免疫促進をきたす NOD^{Rheb} マウスが、妊娠に際して膵β細胞量増加を来たすことで糖尿病発症を抑制することになるのか、膵β細胞量増加に伴いやはり膵β細胞量を標的とする自己免疫反応の増強を来たし糖尿病発症をさらに増強することになるのかを、糖尿病発症時期と出産日との関連、
出産回数及び糖尿病自然発症の推移と
妊娠出産マウスの糖尿病発症の推移を比較検討した。

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示唆された。

特にリラグリチドと 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) 新規糖尿病発症NOD^{Rheb}マウスに対し、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、CFA単独投与、さらにはCFAとリラグリチドの併用投与では、糖尿病発症が若干遅延する傾向はみられたものの有意には発症の遅延は認められなかった。検討の結果、糖尿病からの改善をきたす制御性Tregの誘導や膵島の再生は認めず、糖尿病の改善を認めなかった。

以上より新規糖尿病発症NOD^{Rheb}マウスに対しては有意に自己膵β細胞傷害を抑制することはできなかった。

(3) 膵β細胞量増加と自己免疫促進をきたすNOD^{Rheb}マウスが、妊娠に際して膵β細胞量増加に伴い膵β細胞量を標的とする自己免疫反応の増強を来たし糖尿病発症をさらに増強するか検討した。

糖尿病発症時期は
出産日から1カ月以内に多かった、出産回数は2回までであった、糖尿病自然発症の推移と比較して、妊娠出産マウスの糖尿病は早期に発症する傾向を認めた。

以上より、自己免疫の素因を有する場合は、妊娠に際しての膵β細胞量増加は自己免疫反応の増強を来たし糖尿病発症をさらに促進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1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
• -cell-specific mTORC1 activation.
Biochem Biophys Res Commun 2011,
408(2):306-11.

(査読有)

[学会発表] (計8件)

① 安田尚史, 勝田敦美, 清水まみ, 佐々木弘智, 原賢太, 秋田穂束, 横野浩一
FasL-Fasシグナルの1型糖尿病発症における役割の検討.

第8回加齢医学研究会.
2013.1.19. 名古屋.

② 清水まみ, 安田尚史, 勝田敦美, 中村 晃, 佐々木弘智, 永田正男, 原 賢太, 高橋和真, 横野浩一

NODマウスにおける1型糖尿病発症に関連するSR-Aの役割の検討.

第10回1型糖尿病研究会.
2012.11.3. 唐津.

③ 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, 高橋和真, 横野浩一

poly(I:C)投与SR-A KO NODマウスでの1型糖尿病発症の検討.

第55回日本糖尿病学会総会.
2012.5.18. 横浜.

④ 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.

⑤ 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.

⑥ 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.

⑦ 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.

⑧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

佐々木 弘智 (HIROTOMO SASAKI)
神戸大学・医学研究科・医学研究員
研究者番号：20610736

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし