

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591334

研究課題名(和文) エフェクター細胞を標的とした1型糖尿病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of effector cell-targeted treatment for the inhibition of type 1 diabetes

研究代表者

阿比留 教生 (ABIRU, Noriio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：00380981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、エフェクター細胞を標的にした1型糖尿病治療開発のため、CD4+、CD8+T細胞のエフェクター分子；IFN-gamma/IL-17、Granzyme B、およびエフェクター細胞の転写因子；IRF4を欠損するNODマウスを複製した。IL-17とIFN-gamma受容体のダブル欠損NODマウスは、糖尿病発症抑制を認めたが(p<0.05)。Granzyme B欠損NODマウスは、野生型マウスと有意差を認めなかった。IRF4遺伝子は、ホモ欠損だけでなくヘテロ欠損マウスにおいて完全な糖尿病抑制を認めた。以上より、転写因子を標的とした治療開発の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the candidate molecules for the development of the effector cell-targeted treatment for the inhibition of type 1 diabetes, we have developed IL-17/IFN-gamma receptor-double-deficient, Granzyme B-deficient, IRF4-deficient NOD mice. IL-17/IFN-gamma R double-deficiency significantly suppressed the development of diabetes, while independent deletion of IL-17 or IFN-gammaR did not alter the disease susceptibility in NOD mice. Granzyme B-deficient NOD mice spontaneously developed diabetes with similar kinetics to wild-type NOD mice. Diabetes/insulinitis and autoantibody production were completely suppressed in IRF4-deficient heterozygous as well as homozygous NOD mice. These suggest that the an IRF4-targeted strategy may be useful for modulating autoimmunity in type 1 diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：1型糖尿病 NODマウス T細胞 サイトカイン IRF4 グランザイムB

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病のエフェクター細胞

1型糖尿病の主たる病態は、膵島内に免疫細胞が浸潤する膵島炎を基礎に、膵細胞が特異的に破壊される自己免疫疾患である。膵島に浸潤する主たる免疫細胞は、膵島破壊に関連するエフェクター細胞と、過剰な免疫反応を抑制する制御性T細胞に分類される。エフェクター細胞として、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、抗原提示細胞群(B細胞、樹状細胞、マクロファージなど)などが重要であり、その中でもT細胞が病態の中心と考えられてきた。また、近年リンパ球特異的転写因子として、Interferon regulatory factor(IRF)が、自然免疫や適応免疫の担当細胞の分化成熟や活性化に不可欠な作用を有していることが明らかとなった。

(1) 1型糖尿病とCD4⁺T細胞

1型糖尿病は、これまでCD4⁺T細胞のサブタイプの中で、IFN- γ を主に産生するTh1主体の自己免疫疾患と考えられてきたが、他の自己免疫疾患においてIL-17を産生するTh17の重要性が報告された。しかし、NODマウスにおいて、IFN- γ 、あるいはIL-17遺伝子を単独で欠損させても累積糖尿病発症率の抑制を認めない。

(2) 1型糖尿病とCD8⁺T細胞

CD8⁺T細胞は、細胞障害機序の一つとして、重要な1型糖尿病のエフェクター細胞であり、そのエフェクター分子の一つとして、perforin/Granzyme Bを介した細胞アポトーシスの誘導が注目されている。NODマウスにおいて、perforin遺伝子を欠損させると自然発症糖尿病が抑制されるが、Granzyme B遺伝子欠損マウスの解析の報告はない。

(3) 1型糖尿病と転写因子

1型糖尿病の重要なエフェクター細胞である、T細胞、B細胞、樹状細胞の分化増殖を司る転写因子として、IRF4の重要性を示唆する報告がなされたが、その重要性について直接証明した研究報告はない。

2. 研究の目的

我々は、1型糖尿病のエフェクター細胞を標的にした治療開発を目的として、その治療標的となる、エフェクター分子、転写因子を欠損させたNODマウスを作製し、自己抗体産生、膵島炎/糖尿病進展を抑制しうるかどうかについて検討した。

3. 研究の方法

我々は、自然発症1型糖尿病モデルマウスであるNODマウスを用いた検討を行った。候補分子として、

(1) CD4⁺T細胞エフェクターサイトカイン

IL-17遺伝子およびIFN- γ 受容体遺伝子に注目し、IL-17遺伝子欠損NODマウスとIFN- γ 受容体遺伝子欠損NODマウスを交配し、ダブル欠損NODマウスを作製し、phenotypeを、IL-17遺伝子欠損NODマウスと野生型

NODマウスと比較検討した。

(2) CD8⁺T細胞エフェクター分子

Granzyme B遺伝子に注目し、C57/Bl6バックグラウンドの、Granzyme B遺伝子欠損マウスとNODマウスの戻し交配を繰り返し、NODバックグラウンド Granzyme B遺伝子欠損マウスを作製し、その phenotype を検討した。

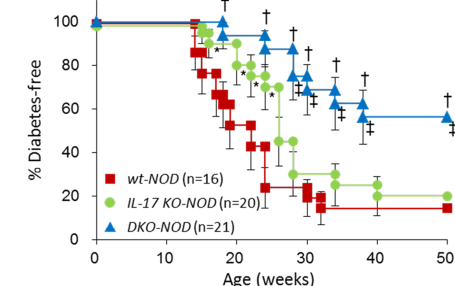
(3) エフェクター細胞分化転写因子

IRF4遺伝子に注目し、C57/Bl6バックグラウンドの、IRF4遺伝子欠損マウスとNODマウスの戻し交配を繰り返し、NODバックグラウンド遺伝子 IRF4遺伝子欠損マウスを作製し、その phenotype を検討した。

4. 研究成果

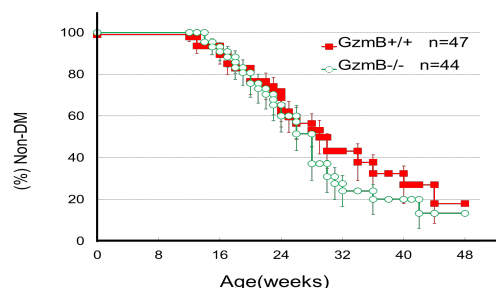
(1)IL-17 遺伝子 IFN- γ 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウス

IL-17遺伝子欠損NODマウスは、野生型NODマウスと比較すると、24週齢までの糖尿病発症遅延認められたが、50週齢までの累積発症率は、ほぼ同等であった。一方、IL-17/IFN- γ 受容体ダブル欠損NODマウスは、野生型マウスだけでなく、IL-17欠損NODマウスと比較しても、長期間の糖尿病発症抑制を認めた(p<0.05)。以上より、IL-17/IFN- γ の両サイトカインが協調してエフェクター機能を発揮している可能性が示唆された。12週齢のダブル欠損NODマウスでは、脾細胞、リンパ節のリンパ球減少を認め、T細胞、B細胞数が他の群に比して約半数であり、制御性T細胞(Tregs)分画が有意に増加していた。



(2)GranzymeB 遺伝子欠損 NOD マウス

Granzyme B(GzmB)欠損NODマウスは、野生型マウスと比較して有意差を認めず、同様の生存曲線を示した。また、エフェクター細胞の養子移入の実験では、GzmB欠損NOD由来の細胞移入と、野生型由来の細胞移入で、糖尿病進展に有意差を認めなかったことから、GzmB遺伝子はエフェクター細胞機能に、影響を与えていないと考えられた。



(3)IRF4 遺伝子欠損 NOD マウス

糖尿病発症ならびに自己抗体産生は、IRF4 遺伝子ホモ欠損 NOD マウスだけでなくヘテロ欠損マウスにおいて完全に抑制された。膵島炎は IRF4 ホモ欠損 NOD マウスでは完全に抑制され、ヘテロ欠損マウスも高度に抑制された。エフェクター T 細胞の養子移入の実験系では、IRF4 発現の用量依存性に糖尿病誘導能を認めた。

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 8 件)

安井順一, 川崎英二, 原口 愛, 池岡俊幸, 植木郁子, 赤澤 諭, 堀江一郎, 古林正和, 阿比留教生, 山崎浩則, 川上 純. 発症時に複数の膵島関連自己抗体の同時出現を認めた急性発症 1 型糖尿病の 1 例月刊糖尿病医学出版. 査読有, 57(2), 2014, 108-112
J Yasui, M Nakahara, M Shimamura, T Kurashige, A Yasui, N Abiru, A Kawakami, Y Nagayama. Minor contribution of cytotoxic t lymphocyte antigen 4 and programmed cell death 1 ligand 1 in immune tolerance against mouse thyrotropin receptor in mice. Acta Medica Nagasakiensia 査読有, 59(1), 2014, 13-17

E Kawasaki, M Tanaka, M Miwa, N Abiru, A Kawakami. Novel enzyme-linked immunosorbent assay for bivalent ZnT8 autoantibodies. Acta Diabetol. 査読有, 51(3), 2014, 429-434
E Kawasaki, J Yasui, M Tsurumaru, H Takashima, T Ikeoka, F Mori, S Akazawa, I Ueki, M Kobayashi, H Kuwahara, N Abiru, H Yamasaki, A Kawakami. Sequential elevation of autoantibodies to thyroglobulin and glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. World J Diabetes. 査読無, 4(5), 2014, 429-434

G Kuriya, T Uchida, S Akazawa, M Kobayashi, K Nakamura, T Satoh, I Horie, E Kawasaki, H Yamasaki, L Yu, Y Iwakura, H Sasaki, Y Nagayama, A Kawakami, N Abiru. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. Diabetologia. 査読有, 56(8), 2013, 1773-1780

M Kobayashi, C Kaneko-Koike, N Abiru, T Uchida, S Akazawa, K Nakamura, G Kuriya, T Satoh, H Ida, E Kawasaki, H Yamasaki, Y Nagayama, H Sasaki, A Kawakami. Genetic deletion of granzyme B does not confer resistance to the

development of spontaneous diabetes in non-obese diabetic mice. Clin Exp Immunol. 査読有, 173(3), 2013, 411-418
M Nakahara, K Johnson, A Eckstein, R Taguchi, M Yamada, N Abiru, Y Nagayama. Adoptive transfer of antithyrotropin receptor (TSHR) autoimmunity from TSHR knockout mice to athymic nude mice. Endocrinology. 査読有, 153(4), 2012, 2034-2043
Y Nagayama, M Nakahara, M Shimamura, I Horie, K Arima, N Abiru. Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. 査読有, 168(3), 2012, 268-273

[学会発表](計 18 件)

赤澤 諭: IL17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおけるリンパ球の phenotype 解析. 第 29 回日本肥満動物学会年次学術総会 一般口演 : 平成 27 年 2 月 13 日, 芝蘭会館(京都府・京都市)

阿比留教生: エフェクター細胞を標的にした 1 型糖尿病発症抑制の試み ~ 遺伝子欠損 NOD マウスの解析を中心に ~ 第 12 回 1 型糖尿病研究会 シンポジスト: 平成 26 年 11 月 1 日, いーぐれひめじ(兵庫県・姫路市)

古林正和: IL-17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおけるリンパ球の phenotype 解析 第 12 回 1 型糖尿病研究会 一般口演: 平成 26 年 11 月 1 日, いーぐれひめじ(兵庫県・姫路市)

赤澤 諭: IL-17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおけるリンパ球 phenotype の経時的変化 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 一般口演 平成 26 年 5 月 21 日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

赤澤 諭: IRF4 遺伝子欠損マウス NOD マウスにおける自己免疫性糖尿病の抑制 第 11 回 1 型糖尿病研究会 一般口演 平成 25 年 10 月 26 日, 軽井沢プリンスホテル(軽井沢・長野)

阿比留教生: IL-17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損マウスにおける糖尿病発症抑制 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 ポスター 平成 25 年 5 月 16 日, ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)

赤澤 諭: IRF4 遺伝子欠損マウスにおける自己免疫性糖尿病の完全抑制 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 一般口演 平成 25 年 5 月 16 日, ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)

赤澤 諭: Interferon regulatory

factor-4(IRF-4)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 一般口演 平成 25 年 2 月 22 日, JA 共済 ビル(東京都・東京)

阿比留教生: IL-17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおける糖尿病発症抑制の相乗効果 第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会 年次学術集会 一般口演 平成 25 年 2 月 22 日, JA 共済 ビル(東京都・東京)

赤澤 諭: IRF-4 欠損マウスにおける自己免疫糖尿病の完全抑制 第 10 回 1 型糖尿病研究会 一般口演 平成 24 年 11 月 3 日, 唐津文化体育館文化ホール (佐賀県・唐津市)

内田隆寛: IL-17/IFN- 受容体遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおける糖尿病発生抑制 第 10 回 1 型糖尿病研究会 一般口演 平成 24 年 11 月 3 日, 唐津文化体育館文化ホール (佐賀県・唐津市)

阿比留教生: 「1 型糖尿病発症の発症予防は可能か - 発症メカニズムと intervention の試み -」第 50 回日本糖尿病学会九州地方会 シンポジスト 平成 24 年 10 月 19 日, ホテルマリタール創世 (久留米市・福岡県)

古林正和: Generic Deletion of Granzyme B Done Not Confer Resistance to the Development of Spontaneous Diabetes in NOD Mice. FOCiS 2012 ポスター 平成 24 年 6 月 20 日, Vancouver (Canada)

古林正和: Generic Deletion of Granzyme B Done Not Confer Resistance to the Development of Spontaneous Diabetes in NOD Mice. 12th International

Conference on the Immunology of Diabetes ポスター 平成 24 年 6 月 15 日, Victoria (Canada)

赤澤 諭: Interferon regulatory factor 4 silencing suppresses type 1 diabetes in the non-obese diabetic mice. 12th

International Conference on the Immunology of Diabetes ポスター 平成 24 年 6 月 15 日, Victoria (Canada)

厨 源平: IL-17/IFN-gamma receptor double-knockout significantly suppresses The development of diabetes compared to the IL-17 single-knockout in the NOD mouse. 12th International Conference on

the Immunology of Diabetes ポスター 平成 24 年 6 月 15 日, Victoria (Canada)

内田隆寛: IL - 17/IFN- R 遺伝子ダブル欠損 NOD マウスにおける糖尿病進展抑制 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 一般口演 平成 24 年 5 月 17 日, パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川)

赤澤 諭: IRF - 4 欠損 NOD マウスにおける T 細胞依存性膵島炎及び糖尿病の抑制 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 一般口演 平成 24 年 5 月 17 日, パシフィ

コ横浜 (横浜市・神奈川)

〔図書〕(計 2 件)

阿比留教生, 医学出版, 月刊糖尿病, 2015, 13-19

古林正和, 阿比留教生, 日本臨床社, 最新臨床糖尿病学, 2012, 352-345

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿比留教生 (ABIRU, Norio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

准教授

研究者番号: 00380981

(2) 研究分担者

赤澤 諭 (AKAZAWA, Satoru)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号: 50549409

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: