

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591362

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病の成因－患者分析より新たに見出された2分子の病態学的意義の解明

研究課題名(英文) Etiology of fulminant type 1 diabetes mellitus

研究代表者

今川 彰久 (IMAGAWA, AKIHISA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80373108

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)：本研究では、鍵分子がほとんど明らかにされていない劇症1型糖尿病において、1)ウイルス感染の下流に位置するISG15、2)NK細胞活性化レセプターKLRC3の細胞傷害における意義を検討した。マウス膵細胞株MIN6細胞において、ISG15を過剰発現あるいはノックダウンし、ISG15が細胞傷害性サイトカインなどによるアポトーシスを抑制することを明らかにした。また、劇症1型糖尿病末梢血NK細胞において、KLRC3 (NKG2E) とそのヘテロダイマー(CD94)の遺伝子発現低下を明らかにした。以上、劇症1型糖尿病の細胞傷害の分子機構において、ISG15とKLRC3の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to determine the significance of ISG15, which is induced by viral infection, and KLRC3, which is known as an activating receptor of NK cells in the development of fulminant type 1 diabetes mellitus. We found that ISG15 acted as an inhibitor of apoptosis by inflammatory cytokines by using overexpression and knockdown methods in MIN6 cells, mouse beta cell line. We also found that the gene expressions of KLRC3 (NKG2E) and CD94, its heterodimer, were reduced in peripheral NK cells of fulminant type 1 diabetic patients. Overall, we have clarified two candidates of key molecules in the beta cell destruction of fulminant type 1 diabetes.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：1型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象とする劇症1型糖尿病は、私どもが発見・確立した新しい疾患単位である。さらに日本糖尿病学会に劇症型糖尿病調査委員会を設置していただき、全国的な疫学調査を行い、劇症1型糖尿病は日本人1型糖尿病の約20%をしめる重要なサブタイプであること、発症時に診断が遅れると死亡する症例も存在する予後不良の糖尿病であることを明らかにした。また、劇症1型糖尿病においては発症時から内因性インスリン分泌能が枯渇しているため、強化インスリン治療を行っても細小血管合併症が進行しやすいことを明らかにした。以上のことから、劇症1型糖尿病は糖尿病の最重症型と位置付けることができる。

劇症1型糖尿病の当初より、その発症原因として、ウイルス感染の関与を想定されてきた。その根拠は、急激な発症経過、70%以上の症例に認められる先行感染症状、ウイルス感染に伴って発症した症例の報告、広範囲のエンテロウイルスに反応するIgA抗体価の上昇などである。私どもは発症直後に死亡した患者膵組織を分析し、エンテロウイルスの存在を直接証明するとともに、ウイルス受容体(Toll-like receptor 3)の発現増強、マクロファージとTリンパ球の浸潤を中心とした膵島炎の存在を明らかにした。しかし、その細胞傷害機構の解明は緒についたばかりであった。

私どもは、ウイルス感染の後、I型インターフェロンにより誘導される蛋白を免疫組織化学的に検討した結果、ISG15(interferon stimulating gene 15)が、患者膵の中でも膵島領域に特異的に発現しており、一部は膵β細胞に発現していることを見出していた。これらのことから、ISG15が劇症1型糖尿病発症に関与する鍵分子であり、同時に治療応用の可能性を有する分子であるという仮説に至った。

これとは別に、私どもは慢性期の劇症1型糖尿病患者末梢血白血球に発現する遺伝子をマイクロアレイ Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 44k (Design ID: 014850)を用いた網羅的解析に供した。Volcano plot 解析を行い、健常者および1A型糖尿病に比し、発現が変動している遺伝子を抽出したところ、劇症1型糖尿病においては、KLRC3(killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3)遺伝子の発現が低下していることを見出していた。KLRC3遺伝子は、免疫調節への関与が予想されることなどから、その発現低下が劇症1型糖尿病の発症に関与しているという仮説に至った。

これらがISG15およびKLRC3という2分子の病態生理学的意義を明らかにするという研究を開始した背景であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、劇症1型糖尿病において、1)ウイルス感染下流に位置し、β細胞に発現するISG15および、2)患者末梢血で遺伝子発現が低下するKLRC3のβ細胞傷害における意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ISG15の検討

マウス膵β細胞株であるMIN6細胞およびマウス単離膵島におけるISG15の発現をRT-PCR法およびウエスタンブロットにより評価した。さらにMIN6細胞においてアデノウイルスベクターを用いてISG15を過剰発現させ、細胞傷害性サイトカイン(IFN γ + IL-1 β , TNF α)、酸化ストレス因子H $_2$ O $_2$ を添加、Caspase3/7活性およびアネキシンVにてアポトーシスを評価した。

また、アデノウイルスベクターにSiRNAを組み込み、ISG15をノックダウンさせるベクターを作成、MIN6細胞にインターフェロン

α を用いて、ISG15 の発現を誘導し、このベクターを作用させ、同じく炎症性サイトカインによるアポトーシスについて検討した。

さらに劇症 1 型糖尿病により近似した検討を行うため、ポリイノシンポリシチジン酸 (polyinosinic polycytidylic acid、PIC) を MIN6 細胞に導入する系、ヒト iPS 細胞株より膵 β 細胞を分化誘導し、ウイルス感染を近似する系を構築を試みた。

(2) KLRC3 の検討

対象を 1 型糖尿病患者 30 名 (劇症 1 型糖尿病 15 名、1A 型糖尿病 15 名) と健常対照 20 名とした。全ての 1 型糖尿病患者はインスリン治療を行い、採血時にケトーシスを認めなかった。末梢血 NK 細胞における遺伝子発現は RT-PCR にて評価した。末梢血単核球中の NK 細胞の割合は CD3 抗体、CD56 抗体を用いてフローサイトメトリーにて評価した。

4 . 研究成果

(1) ISG15 の検討

MIN6 細胞およびマウス単離膵島における検討では、IFN α 添加前は ISG15 の発現をほとんど認めなかったが、IFN α 添加により上昇した。このことは RT-PCR においても、ウエスタンブロット法においても確認された。また、遊離 ISG15 および ISG15 結合蛋白についても同様の結果が得られた。MIN6 細胞において、アデノウイルスを用いて ISG15 を過剰発現させたものに細胞障害性サイトカイン IFN γ + IL-18 を添加するとコントロールに比べカスパーゼ 3/7 活性が有意に減少し、FACS ではアポトーシス陽性細胞とされるアネキシン V 陽性、PI 陰性細胞の割合が減少した。カスパーゼ 3/7 活性で示されるアポトーシスの抑制は、同じく炎症性サイトカインである TNF α 、酸化ストレス因子 H₂O₂ でも同様に認められた。

一方で ISG15 をノックダウンしたものに

IFN γ + IL-18 を添加するとコントロールに比べカスパーゼ 3/7 活性が有意に増加し、アネキシン V 陽性、PI 陰性細胞の割合が増加した。また、TNF α および H₂O₂ 添加では、コントロールに比べ、ISG15 をノックダウンさせたものでカスパーゼ 3/7 活性が高い傾向を認めた。

以上より ISG15 は細胞傷害性サイトカインおよび酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することが示唆された。

劇症 1 型糖尿病において推定される病態として、ウイルス感染によりマクロファージや T 細胞が膵島に浸潤し、IFN γ 、IL-18 などの細胞傷害性サイトカインが放出されることによって β 細胞破壊が起きることが想定される。これに対し、ウイルス感染により誘導された I 型インターフェロンによりさらに誘導される ISG15 がこれらサイトカインによる傷害に対し防御的な働きをすることが示唆された。これは既報の細胞株を用いた ISG15 はウイルス感染に対して防御的な働きをもつという報告に矛盾しない結果であると思われた。(Yoshikawa A et al. Endocrine J 2014)

PIC を MIN6 細胞に導入した系でも、IFN α 、IFN β および ISG15 mRNA 発現上昇を明らかにした。同時に、CXCL10 などケモカイン、ウイルス受容体、抗ウイルス蛋白の mRNA 発現上昇も明らかになった。また、TUNEL 陽性細胞数の増加等アポトーシスの亢進を認めた。以上より、より直接的にウイルス感染が膵 β 細胞内でサイトカイン産生、アポトーシス誘導を引き起こし、膵 β 細胞傷害をきたす機序の一部を明らかにしえた。また、ヒト iPS 細胞株より、Sox17 陽性内胚葉細胞、PDX1 陽性膵前駆細胞を経て、インスリン陽性細胞を誘導する 3 段階の誘導法によりインスリン産生細胞を分化誘導する系を構築しえた (投稿準備中)。

(2) KLRC3 の検討

末梢血単核球から NK 細胞を分離し、NK 細胞における遺伝子発現を RT-PCR にて検討したところ、劇症 1 型糖尿病において健常対照と比較して KLRC3 (NKG2E) の発現が有意に低下していた。さらに、KLRC3 とヘテロダイマーを形成する CD94 の遺伝子発現が有意に低下するが、他の KLRC ファミリーの KLRC1, KLRC2 や NKG2D (KLRK1) の遺伝子発現は有意差がないことを明らかにした。また末梢血単核球中の NK 細胞の割合をフローサイトメトリーにて評価したところ、劇症 1 型糖尿病において健常対照と比較して NK 細胞の割合が有意に低下していた。劇症 1 型糖尿病患者のうち、発症時に発熱を認めた患者においては、末梢血単核球中の NK 細胞の割合が低いほど、発症時における発熱から高血糖症状出現までの期間が有意に短かった。以上の結果から、劇症 1 型糖尿病において NK 細胞活性化レセプター KLRC3 の発現低下によりウイルス感染に対する免疫反応の異常を来し、発症に関与することが示唆された (Nakata S et al. Immunol lett 2013)。

今回の研究では、鍵分子がほとんど明らかにされていなかった劇症 1 型糖尿病の細胞傷害の分子機構において、初めてそれらのうち 2 つを明らかにしえた。今後、これらの成果を応用した劇症 1 型糖尿病における詳細な細胞傷害の分子機構が明らかになることが期待される。また、ISG15 については治療応用につながることを期待される。

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 7 件)

1. Yoshikawa A, Imagawa A, Nakata S, Fukui K, Kuroda Y, Miyata Y, Sato Y, Hanafusa T, Matsuoka TA, Kaneto H, Iwahashi H, Shimomura I. Interferon

stimulated gene 15 has an anti-apoptotic effect on MIN6 cells. *Endocr J*.

2014;61(9):883-90. 査読有 doi:

<http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0219>

2. Nakata S, Imagawa A, Miyata Y, Yoshikawa, Kozawa J, Okita K, Funahashi T, Nakamura S, Matsubara K, Iwahashi H, Shimomura I. Low gene expression levels of activating receptors of natural killer cells (NKG2E and CD94) in patients with fulminant type 1 diabetes. *Immunol Lett*. 2013;156(1-2):149-55. 査読有 doi:10.1016/j.imlet.2013.10.004.
3. 今川 彰久 劇症 1 型糖尿病の成因 医学のあゆみ 252(5):435-9, 2015 www.ishiyaku.co.jp 査読無
4. 徳永あゆみ, 今川 彰久 劇症 1 型糖尿病の病態と成因 最新医学 70(3 月増刊号):541-548, 2015 www.saishin-igaku.co.jp 査読無
5. Imagawa A (15 名中 1 番), Hanafusa T (同 2 番) et al. : New Diagnostic Criteria of Fulminant Type 1 Diabetes Mellitus (2012). *Diabetol Int*. 2012;3(4):179-183. doi:10.1007/s13340-012-0098-3 査読有
6. Imagawa A (15 名中 1 番), Hanafusa T (同 2 番) et al. : New Diagnostic Criteria of Fulminant Type 1 Diabetes Mellitus (2012). *J Diabetes Invest*. 2012;3(6):536-539. doi:10.1111/jdi.12024 査読有
7. 今川 彰久 (15 名中 1 番), 花房俊昭 (同 2 番) 他 劇症 1 型糖尿病の新しい診断基準(2012) *糖尿病* 55(10):815-820, 2012. <http://www.jds.or.jp> 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 今川 彰久 : シンポジウム「1 型糖尿病の

- 自然史と治療介入」「劇症1型糖尿病の病態と治療」第49回糖尿病学の進歩、岡山全日空ホテル(岡山市) 2/20, 2015
2. 今川彰久:教育講演「劇症1型糖尿病」第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月24日、大阪国際会議場(大阪市)
 3. 今川彰久:シンポジウム「1型糖尿病の成因—最先端研究はどこまで解明したか—」劇症1型糖尿病の成因 第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月23日、大阪国際会議場(大阪市)
 4. 芳川 篤志, 今川 彰久, 他 劇症1型糖尿病患者膵島領域に発現する蛋白の同定(第三報) ISG15 の機能解析 第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日、大阪国際会議場(大阪市)
 5. 今川彰久:レクチャー「劇症1型糖尿病の診断と治療 up to date」第48回糖尿病学の進歩、札幌コンベンションセンター(札幌市) 3/7, 2014
 6. 今川彰久:シンポジウム「1型糖尿病の成因と治療」劇症1型糖尿病の成因 第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月17日、メルパルク熊本(熊本市)
 7. 中田信輔, 今川彰久, 他:1型糖尿病における末梢血発現遺伝子プロファイルの解析(第二報)第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本市国際交流会館(熊本市)
 8. 芳川篤志, 今川彰久, 他:劇症1型糖尿病患者膵島領域に発現する蛋白の同定(第二報)~ISG15 の機能解析~:第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本市国際交流会館(熊本市)
 9. 今川彰久:レクチャー「劇症1型糖尿病の現在」第47回糖尿病学の進歩、四日市市文化会館(四日市市) 2/16, 2013
 10. 今川彰久:特別講演 鑑別が必要な1型糖尿病の3病型 ~劇症1型糖尿病を中心に 第55回臨床検査医学会近畿地方会、京都国際会館(京都市) 2012.12.1
 11. Imagawa A. Symposium Type 1 diabetes “Fulminant type 1 diabetes-New insights of its etiology”. The 9th International Diabetes Federation -Western Pacific Region Congress/The 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto, Japan, Nov. 25, 2012.
 12. Imagawa A. Plenary lecture “Etiology of type 1 diabetes -Lessons from pancreas biopsy and autopsy” International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, Science School of Physicians 2012. September 1st, 2012, Kyoto, Japan
 13. 今川彰久:シンポジウム「1型糖尿病の成因」劇症1型糖尿病の成因 第55回日本糖尿病学会年次学術集会、パシフィコ横浜(横浜市) 5/19, 2012
 14. 今川彰久:教育講演「劇症1型糖尿病の理解はここまで進んだ」第55回日本糖尿病学会年次学術集会、パシフィコ横浜(横浜市) 5/19, 2012
- 〔図書〕(計3件)
1. Imagawa A, Hanafusa T. Fulminant diabetes in Japan. In Virus and Diabetes. Taylor KW, Hyoty H, Toniolo A, Zuckerman AJ ed. Springer, USA. pp219-232. ISBN: 978-1-4614-0405-5 (2012.8.9)
 2. 今川彰久 1型糖尿病とその亜型 糖尿病学の進歩 2012(日本糖尿病学会編、診断と治療社、東京) p10-14
 3. 今川彰久 1型糖尿病 今日の治療指針 2013年度版 (医学書院、東京)

pp634-636, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今川 彰久 (IMAGAWA Akihisa)

大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80373108

(2)研究分担者 なし ()

(3)連携研究者

花房 俊昭 (HANAFUSA Toshiaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：60164886

(4)研究協力者

福井 健司 (FUKUI Kenji)

中田 信輔 (NAKATA Shinsuke)

芳川 篤志 (YOSHIKAWA Atsushi)

細川 吉弥 (HOSOKAWA Yoshiya)

馬殿 恵 (BADEN Megu)