



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

佐々木, 弘智

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5386

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005386>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

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

膵 β 細胞特異的 Rheb 過剰発現による mTORC1 活性化 NOD マウスでの
自己免疫糖尿病の発症促進

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
総合内科学
(指導教員: 秋田 穂東教授)

佐々木 弘智

【背景】1 型糖尿病は膵 β 細胞を標的とした自己免疫疾患であり、インスリンの絶対的欠乏を特徴とする。インスリンは唯一の血糖を下げるホルモンとして 1 型糖尿病の治療において必要不可欠である。その一方で、内因性インスリンは 1 型糖尿病の自己免疫の primary antigen と考えられており、1 型糖尿病モデルマウスの NOD マウスへのインスリンやその一部のペプチドの接種により糖尿病発症抑制を来す事が報告され、人へのワクチン療法としての応用も検討されている。また最近では、1 型糖尿病においても膵島の再生は起こっているがそれを大きく上回る自己免疫性の β 細胞破壊が糖尿病発症に至らしめるとも報告されている。

近年、インスリンが関与する β 細胞成長調整のメカニズムが注目され、PI3K 等を介して DNA の転写・翻訳などに関与する細胞内分子カスケードが明らかになってきている。mechanistic target of rapamycin (mTOR) はその細胞内分子カスケードの重要な因子として研究されており、the protein Ras homolog enriched in brain (Rheb) は、mTOR complex 1 (mTORC1) 経路を強く刺激し、細胞成長調節に重要な役割を担っている。我々はこれまでに膵 β 細胞特異的に Rheb を過剰発現させたトランスジェニックマウス (C57BL/6^{Rheb}) を作製し、mTORC1 経路の活性化により膵 β 細胞量が増加し、高脂肪食負荷による 2 型糖尿病モデルや少量・頻回 STZ 投与によって誘導される 1 型糖尿病モデルにおける高血糖が抑制されることを報告した。

【目的】本研究では C57BL/6^{Rheb} マウスと NOD マウスを戻し交配にて膵 β 細胞特異的に Rheb を過剰発現させた NOD^{Rheb} マウスを作製し、mTORC1 経路の活性化による β 細胞量増加効果が自己免疫糖尿病発症にいかに関与するのかを遺伝子発現量の異なる 2 系統で検討した。

【方法】2 系統 (R3, 20) NOD^{Rheb} マウスにおいて以下の実験を行った。1. 1 型糖尿病疾患感受性遺伝子である idd 遺伝子が NOD 化していることをマイクロサテライトマーカーを用いた speed congenic 法で確認した。2. 膵島における導入遺伝子 (FLAG-Rheb) の発現とそれに伴う mTORC1 の活性化および膵島の形態を比較した。3. 遺伝子発現量の異なる 2 系統の NOD^{Rheb} マウスにおける糖尿病発症率を確認した。4. 膵島への単核球浸潤の程度を 5 週齢と 12 週齢で比較した。膵島炎 (insulinitis) の程度を細胞浸潤の程度によって、0: 正常 1: peri (0~25%) 2: invasive (25~50%) 3: severe (>50%) の 4 群にわけ、insulinitis score を検討した。5. 12 週齢においてインスリン自己抗体 (IAA) を測定した。6. 発症直後のマウスに対し complete Freund's adjuvant (CFA) 単独投与および CFA + ヒト glucagon-like peptide-1 (GLP-1) アナログ併用投与によって高血糖の改善が得られるか比較検討した。

【結果】1. R3 系統では BC8、R20 系統では BC6 にて idd 遺伝子 1~26 がすべて NOD 化していることを確認した。2. NOD^{Rheb} マウスにおいて Western blot と免疫染色により膵島に FLAG-Rheb 蛋白が発現していることを確認し、また NOD マウスと比べて S6 蛋白リン酸化のより強い染色が認められた。以上より、NOD^{Rheb} において Rheb 過剰発現により mTORC1 経路が活性化されていることが確認された。また 5 週齢にて NOD^{Rheb} マウスで

は NOD マウスと比較して膵島の増大を認めた。3. 糖尿病発症を 35 週まで経時的に観察した結果、遺伝子発現量の少ない R3 系統では、NOD^{Rheb} マウス: 84%(21/25)、NOD マウス: 55%(11/20)が発症し、発症週齢中間値はそれぞれ 24 週、34 週であり、NOD^{Rheb} マウスで統計学的に有意に糖尿病発症の促進を認めた($p=0.0342$, log-rank test)。一方、遺伝子発現量の多い R20 系統では、NOD^{Rheb} マウス: 79%(19/24)、NOD マウス: 68%(13/19)が発症し、発症週齢中間値はそれぞれ 22 週、25 週で、有意差は認めないが NOD^{Rheb} マウスの糖尿病発症促進傾向を認めた。4. R3 系統で膵島炎の程度を比較した結果、5 週齢では両群ともほとんど膵島炎は認められなかったが、12 週齢において NOD^{Rheb} 膵島への有意な単核球浸潤の増悪を認め、severe insulinitis の有意な増加を認めた($p=0.0411$, Mann-Whitney U test)。5. R3 系統において 12 週齢で IAA 検出の程度を比較すると、NOD^{Rheb} マウスでは有意に高発現を示した ($p=0.0418$, Mann-Whitney U test)。6. 糖尿病発症直後の R3 系統 NOD^{Rheb} マウスへの CFA 単独投与では、一匹で血糖正常化を認めた(1/5)のみで有意な血糖改善効果を認めなかった。R20 系統への CFA 単独あるいは CFA+ヒト GLP-1 アナログ併用投与では、NOD マウスで 4 匹で血糖正常化を認めた(4/8)のに対し、NOD^{Rheb} マウスでは血糖正常化を全く認めなかった(0/9)。

【考察】本研究は 1 型糖尿病において mTORC1 カスケードの中の Rheb に焦点を当てた最初の研究である。C57BL/6^{Rheb} マウスにおいて高脂肪食負荷による 2 型糖尿病モデル高血糖や少量・頻回 STZ 投与による 1 型糖尿病モデル高血糖を抑制したことより、自然発症 1 型糖尿病モデルである NOD マウスにおいても、我々は当初 Rheb 過剰発現が mTORC1 経路を活性化しそれに伴い β 細胞の増大を誘導することで、 β 細胞の破壊と増大のバランスを β 細胞の増大を優位にし、糖尿病発症を抑制すると考えた。結果は糖尿病発症の促進傾向を示し、特に R3 系統で有意に著明であった。R3 系統 12 週齢 NOD^{Rheb} マウスにおいてより重度の膵島炎や IAA の出現亢進が認められ、NOD^{Rheb} 膵島において自己免疫反応の亢進を裏付ける結果となった。以上のように、予想に反して自然発症 1 型糖尿病モデルマウスにおいては、Rheb 過剰発現は発症抑制ではなくむしろ促進することを見出した。非自己免疫モデルでは β 細胞への Rheb 過剰発現によって、 β 細胞増大・インスリン分泌亢進効果により、高血糖の抑制を示した。一方、自己免疫モデルでは少量・頻回 STZ 投与によるモデルでは糖尿病発症が抑制されたのに対して、自然発症モデルでは発症が促進され、Rheb 過剰発現による糖尿病発症が異なる結果を示したことは非常に興味深い。一つの推測として、 β 細胞傷害の主体が前者ではマクロファージ、後者では T 細胞であること、すなわち我々が以前に報告したように細胞傷害性は T 細胞の方が強いことが影響していると考えられる。

Rheb 同様 mTORC1 経路を刺激する活性化因子に insulin receptor substrate(IRS)-2 が存在する。IRS-2 は PI3-K の上流に位置し、この IRS-2 を β 細胞に特異的に過剰発現させた NOD マウス (NOD^{IRS-2}) では糖尿病発症抑制が報告されている。このマウスは β 細胞の増

大とインスリン分泌亢進、さらに β 細胞再生を示し、糖尿病の発症の遅延と抑制を認めた。一方、Rheb には細胞増大作用は示すものの細胞再生効果は確認できなかった。以上より、細胞再生を伴わない増大効果は、自己免疫糖尿病モデルにおいては標的抗原に対する自己免疫反応の増強を誘導し、糖尿病発症を促進させた可能性が示唆された。

免疫療法の観点から Faustman 等は CFA による膵島に対する effector 細胞の自己免疫反応の抑制を、さらに Singh 等は β 細胞再生を報告しており、CFA による NOD マウスの糖尿病抑制に 2 つの機序が報告されている。今回我々は発症直後 NOD マウスおよび NOD^{Rheb} マウスへの CFA 皮下注により膵島への免疫細胞浸潤の抑制と β 細胞再生を、さらに Rheb による細胞増大効果により、NOD マウスと比較して血糖改善効果を期待した。また、 β 細胞再生効果が報告されている GLP-1 アナログと CFA の併用による相乗効果を期待した。しかしながら、R20 系統への CFA 単独あるいは CFA+ヒト GLP-1 アナログ併用投与では、NOD マウスで 50%で血糖正常化を認めたのに対し、NOD^{Rheb} マウスでは血糖正常化を全く認めず、NOD^{Rheb} マウスでは R3 と R20 の合計でも 1 匹しか血糖正常化が得られなかった(1/14)。この結果より、CFA や GLP-1 による effector 細胞抑制効果や膵島再生効果が、NOD^{Rheb} マウスにおける強力な自己免疫反応を上回れなかった可能性が示唆された。

【結論】2 型糖尿病においては、Rheb による β 細胞増大効果によって発症抑制が認められるが、自然発症 1 型糖尿病モデルにおいてはむしろ発症は促進されることを見出した。このことは今後の 1 型糖尿病の発症抑制治療にとって重要な情報を我々に与えてくれた。すなわち、 β 細胞の増大効果のみではむしろ標的抗原に対する自己免疫反応の増強のみを誘導し、そこに β 細胞の再生促進を伴わなければ 1 型糖尿病発症はむしろ促進する可能性が示され、 β 細胞の破壊と再生のバランスにおいていかに破壊を抑制し再生を誘導するかが重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2218号	氏 名	佐々木 弘智
論文題目 Title of Dissertation	<p>膵β細胞特異的 Rheb 過剰発現による mTORC1 活性化 NOD マウスでの自己免疫糖尿病の発症促進</p> <p>Acceleration of autoimmune diabetes in Rheb-congenic NOD mice with β-cell-specific mTORC1 activation</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 清野 進 Vice-examiner 副 査 錦織 千穂子 Vice-examiner</p>		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【背景】近年、インスリンが関与するβ細胞成長調整のメカニズムが注目され、PI3K等を介してDNAの転写・翻訳などに関与する細胞内分子カスケードが明らかになってきている。mechanistic target of rapamycin (mTOR)はその細胞内分子カスケードの重要な因子として研究されており、the protein Ras homolog enriched in brain (Rheb)は、mTOR complex1 (mTORC1)経路を強く刺激し、細胞成長調節に重要な役割を担っている。本研究ではC57BL/6RhebマウスとNODマウスを交配にて膵β細胞特異的にRhebを過剰発現させたNODRhebマウスを作製し、mTORC1経路の活性化によるβ細胞量増加効果が自己免疫糖尿病発症にいかに関与するのかを遺伝子発現量の異なる2系統で検討した。

【結果】1. R3系統では、BC8 R20系統ではBC6にてidd遺伝子がすべてNOD化していることを確認した。2. NODRhebマウスにおいてWestern blotと免疫染色によりRheb過剰発現によりmTORC1経路が活性化されていることが確認された。3. 糖尿病発症を3.5週まで経時的に観察した結果、遺伝子発現量の少ないR3系統では、NODRhebマウスで統計学的に有意に糖尿病発症の促進を認めた。一方、遺伝子発現量の多いR20系統では、有意差は認めないがNODRhebマウスの糖尿病発症促進傾向を認めた。4. R3系統で膵島炎の程度を比較した結果、5週齢では両群ともほとんど膵島炎は認められなかったが、12週齢においてNODRheb膵島への有意な単核球浸潤の増悪を認め、severe insulinitisの有意な増加を認めた。5. R3系統において12週齢でIAA検出の程度を比較すると、NODRhebマウスでは有意に高発現を示した。6. 糖尿病発症直後のR3系統NODRhebマウスへのCFA単独投与で

は、有意な血糖改善効果を認めなかった。R20系統へCFA単独あるいはCFA+ヒトGLP-1アナログ併用投与では、NODマウスで4匹で血糖正常化を認めた(4/8)のに対し、NODRhebマウスでは血糖正常化を全く認めなかった(0/9)。

【考察】C57BL/6Rhebマウスにおいて高脂肪食負荷による2型糖尿病モデル高血糖や少量・頻回STZ投与による1型糖尿病モデル高血糖を抑制したことより、自然発症1型糖尿病モデルであるNODマウスにおいても、糖尿病発症を抑制すると考えた。しかしながら、予想に反して自然発症1型糖尿病モデルマウスにおいては、Rheb過剰発現は発症抑制ではなくむしろ促進することを見出した。2型糖尿病においては、Rhebによる β 細胞増大効果によって発症抑制が認められるが、自然発症1型糖尿病モデルにおいてはむしろ発症は促進されることを見出した。このことは今後の1型糖尿病の発症抑制治療にとって重要な情報を我々に与えてくれた。すなわち、 β 細胞の増大効果のみではむしろ標的抗原に対する自己免疫反応の増強のみを誘導し、そこに β 細胞の再生促進を伴わなければ型糖尿病発症はむしろ促進する可能性が示され、 β 細胞の破壊と再生のバランスにおいていかに破壊を抑制し再生を誘導するかが重要であることが示唆された。

本研究は1型糖尿病においてmTORC1カスケードの中のRhebに焦点を当てた最初の研究である。従来解明されていなかった β 細胞の肥大、再生の過程に於ける、Rhebの役割を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。