



The dual role of scavenger receptor class A in development of diabetes in autoimmune NOD mice

Shimizu, Mami

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6276号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006276>

※ 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。



学 位 論 文 の 内 容 要 旨

The dual role of scavenger receptor class A in development of diabetes in autoimmune NOD mice

自己免疫性 NOD マウスでの糖尿病発症におけるスカベンジャー受容体クラス A の
二面的な役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌・総合内科学分野 総合内科学部門
(指導教員：小川 渉教授)

清水 まみ

【背景】1型糖尿病(T1D)は臓器特異的な自己免疫疾患として膵島炎が生じ膵β細胞が破壊され糖尿病が発症する。NOD マウスは1型糖尿病の自然発症モデルマウスである。免疫系の制御に重要な Th1/Th2 バランスの破綻が発症を誘導すると考えられており、T1D は、Foxp3 陽性の制御性T細胞に比べて活性化細胞である Th 1 細胞が優位となり発症に至る。T細胞の活性化や抑制には、樹状細胞やマクロファージの抗原提示細胞が重要である。それらの表面上に発現する SR-A(Scavenger Receptor class A(CD204))を欠損させた SR-A^{-/-} マウス(C57BL/6 background)では動脈硬化や易感染性を示すことが報告されているが、自己免疫での役割は明らかではない。また、SR-A は dsRNA の細胞表面上のレセプターである。大半の TLR(Toll-like receptor)シグナルは MyD88 を下流に有しているが、MyD88^{-/-} NOD マウスは糖尿病発症が完全に抑制される一方、MyD88 に無関係の TLR3^{-/-} NOD マウスでは発症は抑制されないことが報告されている。細胞外 dsRNA の認識における、細胞表面上の SR-A と dsRNA ウイルスの細胞内レセプターである TLR3 との関与について調べるために、TLR3 のリガンドで dsRNA アナログである poly(I:C)投与実験を行い、SR-A^{-/-} NOD マウスにおける SR-A 欠損の影響を検討した。

【目的】本研究では、SR-A^{-/-} マウスと NOD マウスを backcross を繰り返すことにより SR-A 遺伝子を欠損させた NOD マウスを作製し、poly(I:C)存在下と poly(I:C)非存在下での実験を行い、1型糖尿病における SR-A の役割を検討した。

【方法】SR-A^{-/-} NOD マウスにおいて以下の実験を行った。①CD204 の欠損を確認した。②脂質や CPR について比較した。③糖尿病発症率を追跡した。④10～15 週齢における膵島炎を単核球浸潤の程度によって分類し検討した。⑤8、12、16、20 週齢での Insulin autoantibody(IAA)を測定した。⑥脾細胞分画をフローサイトメトリーにて検討した。⑦脾細胞サイトカイン(IFN-γ、IL-17)産生量を ELISA 法を用いて検討した。⑧ウイルス感染を模倣するために poly(I:C)300μg を投与し糖尿病発症率の変化を比較した。⑨poly(I:C)100μg を投与し糖尿病発症率を比較した。⑩poly(I:C)投与群と非投与群の脾細胞分画を検討した。⑪in vitro で poly(I:C)存在下での骨髄由来樹状細胞(BMDC)のサイトカイン(TNF-α、IFN-β)産生量を測定した。

【結果】①SR-A 遺伝子の欠損、BMDC や腹腔内マクロファージでの SR-A 発現の欠損を確認した。②total cholesterol、LDL-C、triglyceride は有意差はみられず、CPR は NOD マウスの方が7週齢と25週齢で有意に減少していた。③NOD マウスでは40週齢までに90%が糖尿病を発症したが、SR-A^{-/-} NOD マウスでは50%の発症率であり発症は有意に抑制された。④10～15 週齢における膵島炎は有意に抑制されていた。⑤IAA 発現は低陽性率を示した。⑥CD4CD25 細胞、CD4Foxp3 細胞の割合に有意差はみられなかった。⑦IFN-γは有意に増加していた。IL-17 は有意差がなかった。⑧高用量 poly(I:C)投与により、糖尿病発症は早期に促進した。⑨自然発症では発症を抑制した SR-A^{-/-} NOD マウスへの低用量 poly(I:C)投与では自然発症に対してむしろ有意に発症促進した。⑩poly(I:C)投与群では、非投与群に比べて脾細胞における CD4CD25 細胞の有意な増加を認めた。⑪7～9 週齢の

BMDC における TNF- α 産生は、poly(I:C) 濃度依存性に増加を認めるも、IFN- β 産生は変化を認めなかった。

【考察】本研究は自然発症 1 型糖尿病モデルマウスにおける SR-A の役割を検討した最初の研究である。SR-A γ NOD マウスでは NOD マウスに比べて、発症率と膵島炎の有意な抑制を認めた。CPR については NOD マウスに対して有意な増加を認めており、CPR は膵島炎や糖尿病進行と逆相関し、この結果から SR-A γ NOD マウスにおける糖尿病発症抑制は膵島炎の抑制によるものであることを示した。自己免疫に関する SR-A の役割を検討するために IAA を測定した結果、SR-A γ NOD マウスでは有意に低発現であり、SR-A 欠損が NOD マウスにおける自己免疫に影響を及ぼすことを示した。

SR-A γ NOD マウスにおける糖尿病抑制の機序を調べるために脾細胞の phenotype、サイトカイン産生量を比較した。Th1 サイトカインである IFN- γ は通常、糖尿病発症に促進的に働くが、IFN- γ が CFA や BCG 投与では糖尿病抑制に作用するという報告がみられるように、SR-A γ NOD マウスにおいても IFN- γ は有意に増加していた。最近、糖尿病発症を促進すると言われている Th-17 細胞が産生する IL-17 の増加はみられなかった。さらには、CD4CD25 活性化細胞、CD4Foxp3 制御性細胞に有意差がみられなかつたことから、IFN- γ は抑制的に作用した可能性を示唆した。

次に、poly(I:C) 投与実験を行い、SR-A 欠損の影響を検討した。poly(I:C) 非存在下では発症抑制する SR-A γ NOD マウスでは、低用量 poly(I:C) 投与により発症抑制する NOD マウスに比べて、さらに発症が抑制されることを予測したが、結果はむしろ自然発症での NOD マウスと同程度に有意に促進した。制御性 T 細胞(Treg)欠損 NOD マウスに対してウイルス感染を模倣した poly(I:C)(200 μ g) 投与により劇症 1 型糖尿病様の発症促進を認めたという報告をもとに、我々は Treg を有する NOD マウスおよび SR-A γ NOD マウスに強度のウイルス感染を模倣して poly(I:C)(300 μ g) 投与を行った。興味深いことに、低用量投与では発症抑制する NOD マウスでは、自然発症の poly(I:C) 非投与群と同程度に発症促進し、poly(I:C) 投与 SR-A γ NOD マウスは poly(I:C) 非投与群に比べて、早期に、有意な発症促進を認めた。SR-A γ NOD マウスは、poly(I:C) 非投与群に比べて poly(I:C) 投与群で CD4CD25 細胞が増加していた。低用量投与では活性化 T 細胞と制御性 T 細胞の両方が増加するも、それらのバランスが維持されているために糖尿病発症が抑制されとの報告から推測すると、NOD マウスは、高用量投与により制御性 T 細胞に比べて活性化 T 細胞の割合が増加するために発症が促進するが、SR-A γ NOD マウスは、poly(I:C) 低用量投与でさえも、活性化 T 細胞の割合が増加し発症が促進したと考えられる。In vitro での SR-A γ NOD マウスにおける poly(I:C) 存在下 BMDC 由来 TNF- α 産生は dose dependent に有意に増加した。IFN- β 産生の変化はみられなかった。SR-A は TNF- α の suppressor であるという報告があり、TNF- α は早期投与では糖尿病発症を促進することから、SRA γ NOD マウスにおける poly(I:C) 存在下の BMDC 由来 TNF- α 増加と早期の poly(I:C) 投与による発症促進とは関与があること、さらに poly(I:C) が細胞表面上の SR-A と結合し細胞内の TLR3 経路を介した

TNF- α 産生に抑制的に作用することを示唆した。

さらに最近、別の細胞表面レセプターである raftlin を介した TLR3 RNA-sensing system が報告されていることから、我々は dsRNA シグナルの 3 つの経路があるという仮説を立てた。一つ目は細胞外の dsRNA が SR-A と結合した後 TLR3 へ negative signal を伝達する経路、二つ目は raftlin と結合した後 TLR3 へ positive signal を伝達する経路、そしてこれらを介して TNF- α 産生を誘導することとなる。三つ目は、TLR3 シグナルを介さずに MDA5 や RIG-I を介して IFN- β 産生を誘導する経路である。Poly(I:C) を投与した SRA γ NOD マウスでは、SR-A 欠損により SR-A から TLR3 への negative signal が伝達されず raftlin を介した TLR3 への positive signal が増強し TNF- α 産生が亢進したことにより、低用量 poly(I:C) 投与でさえも早期に糖尿病発症が促進したと考えた。NOD マウスにおいては、ウイルス感染下では、SR-A signal と raftlin signal のバランスが発症に重要な役割を果たし、強感染では raftlin signal が優位となり発症を促進させ、SR-A 欠損では、弱感染でも raftlin signal により発症が促進すると推測している。

【結論】我々の実験では、NOD マウスに比べて糖尿病発症が抑制される SR-A γ NOD マウスでは、高用量のみならず低用量 poly(I:C) 投与でさえも発症が促進した。この結果から、樹状細胞のような抗原提示細胞の表面上に存在する SR-A は、自然発症経過では糖尿病発症を促進するように作用し、軽度のウイルス感染下では防衛的に作用するといった二面的な作用を有しており、今後の T1D 治療において重要な役割を担う可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2476号	氏 名	清水 まみ
論文題目 Title of Dissertation	<p>The dual role of scavenger receptor class A in development of diabetes in autoimmune NOD mice</p> <p>自己免疫性NODマウスでの糖尿病発症におけるスカベンジャー受容体クラスAの二面的な役割</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 西 慎一 Chief Examiner</p> <p>副 査 林 祥剛 Vice-examiner</p> <p>副 査 森信晴雄 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

目的: 1型糖尿病(T1D)は発症にウイルス感染などが関与している推測されている。このT1Dの自然発症モデルマウスとしてNODマウスが知られている。このモデルでは免疫活性化細胞であるTh1細胞が優位となり発症すると考えられている。このNODマウスにおけるT1D発症機序を更に詳細に解明するために、本研究はSR-A(Scavenger Receptor class A(CD204)), TLR(Toll-like receptor)3の関与を検討した。

方法:

樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞表面上に発現するSR-Aを欠損させたSR-A^{-/-}マウス(C57BL/6 background)とNODマウスのバッククロスによりSR-A^{-/-}NODマウスを作成、糖尿病発症病態と免疫系細胞の反応状態を検討した。また、MyD88に無関係の活性化されるTLR3の関与について調べるために、TLR3のリガンドであるdsRNAアナログpoly(I:C)投与実験を行い、SR-A^{-/-}NODマウスにおけるSR-A欠損の影響を検討した。

結果:

1) total cholesterol, LDL-C, triglyceride には有意差はみられず、CPRはNODマウスの方が7週齢と25週齢で有意に減少していた。2) NODマウスでは40週齢までに90%が糖尿病を発症したが、SR-A^{-/-}NODマウスでは50%の発症率であり発症は有意に抑制された。3) 10～15週齢における膵島炎は有意に抑制されていた。4) IAA発現は低陽性率を示した。5) CD4CD25細胞, CD4Foxp3細胞の割合に有意差はみられなかった。6) IFN- γ は有意に増加していた。IL-17は有意差がなかった。7) 自然発症では糖尿病発症を抑制したSR-A^{-/-}NODマウスへの低用量poly(I:C)投与では自然発症に対してむしろ有意に発症促進した。8) 高用量poly(I:C)投与により、糖尿病発症は早期に促進した。9) Poly(I:C)投与群では、非投与群に比べて脾細胞におけるCD4CD25細胞の有意な増加を認めた。10) 7～9週齢のBMDCにおけるTNF- α 産生は、poly(I:C)濃度依存性に増加を認めるも、IFN- β 産生は変化を認めなかった。

考察:

SR-A^{-/-}NODマウスではNODマウスに比べて、糖尿病発症率と膵島炎の有意な抑制を認め、CPRはNODマウスに対して有意な増加、IAAもSR-A^{-/-}NODマウスでは有意に低発現であり、SR-A欠損がNODマウスにおける自己免疫に影響を及ぼし、糖尿病発症を抑制していると考えられた。

SR-A^{-/-}NODマウスにおける糖尿病抑制の機序を調べるために脾細胞のphenotype, サイトカイン産生量を比較した。CD4CD25活性化細胞, CD4Foxp3制御性細胞に有意差がみられなかった。Th1サイトカインであるIFN- γ は有意に増加していた。IFN- γ は通常、糖尿病発症に促進的に働くが、IFN- γ がCFAやBCG投与では糖尿病抑制に作用するという報告もある。SR-A^{-/-}NODマウスにおいては、IFN- γ は糖尿病発症に抑制的に作用した可能性が示唆された。

poly(I:C)投与実験では、低用量poly(I:C) (100 μ g)投与により糖尿病発症抑制がみられるNODマウスに比べ、SR-A^{-/-}NODマウスではさらに発症が抑制されることが予測されたが、結果はむしろ自然発症NODマウスと同程度に有意に促進した。高用量poly(I:C)(300 μ g)投与では、poly(I:C)非投与群に比べて、早期に有意な発症促進を認めた。SR-A^{-/-}NODマウスはpoly(I:C)非投与群に比べてpoly(I:C)投与群でCD4CD25細胞が増加していた。SR-A^{-/-}NODマウスは、poly(I:C)投与により、活性化T細胞の割合が増加し糖尿病発症が促進されたと考えられた。vitroでのpoly(I:C)投与による骨髄由来樹状細胞(BMDC)のTNF- α 産生は、NODマウスでは変化はみられなかったが、SR-A^{-/-}NODマウスではdose dependentに有意に増加した。IFN- β 産生の変化はいずれもみられなかった。

これまでの結果と最近の細胞表面レセプターraftlinに関する報告より次の3つの仮説活性化経路

を考えた。一つ目は細胞外の dsRNA が SR-A と結合した後 TLR3 へ negative signal を伝達する経路、二つ目は raftlin と結合した後 TLR3 へ positive signal を伝達する経路、そしてこれらを介して TNF- α 産生を誘導することとなる。三つ目は、TLR3 シグナルを介さずに MDA5 や RIG-I を介して IFN- α 産生を誘導する経路である。poly(I:C)投与 SR-A^{-/-} NOD マウスでは、SR-A 欠損により SR-A から TLR3 への negative signal が伝達されず raftlin からの positive signal が増強し、TNF- α 産生が亢進し、活性化 T 細胞が増加したことにより、低用量 poly(I:C)投与でさえも早期に発症が促進したと推測された。以上の結果から、樹状細胞のような抗原提示細胞の表面上に存在する SR-A は、ウイルス非感染時では発症促進に、感染時では抑制的に作用するといった二面的な作用を有する可能性があり、今後の T1D 治療において重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究は 1 型糖尿病(T1D)発症モデルマウス NOD マウスにおいて、免疫系細胞の SR-A と TLR-3 の機能を解析し、糖尿病発症機序について研究したものであるが、従来にない重要かつ新しい知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。