

佐藤 剛 論文内容の要旨

主 論 文

CHOP deletion does not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse

CHOP 遺伝子欠損 NOD マウスを用いた、1 型糖尿病発症機序への小胞体ストレスの関与の検討

佐藤剛、阿比留教生、古林正和、周紅波、中村寛、厨源平、中村英樹、永山雄二、川崎英二、山崎浩則、L Yu, G.S. Eisenbarth, 荒木栄一、森正敬、親泊政一、江口勝美

Apoptosis (16 卷 4 号, 438-48, 2011 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：川上 純教授)

緒 言

膵β細胞はインスリン分泌のために発達した小胞体を有しており、近年、2型糖尿病、および遺伝性糖尿病の、β細胞の機能不全に小胞体ストレス応答が関与することが報告されている。CHOPは、小胞体ストレス応答においてKeyとなる転写因子であり、CHOPを欠損した2型糖尿病モデル動物では、糖尿病発症が抑制される。一方、1型糖尿病の膵β細胞障害機構には、サイトカインによるβ細胞アポトーシス誘導が重要であり、*in vitro*の系において、NOやサイトカインが、β細胞に過剰な小胞体ストレス応答を誘導し、CHOPを介してアポトーシスきたす可能性が示唆されている。今回我々は、CHOP遺伝子欠損NODマウスの作製し、CHOPを介した小胞体応答が、1型糖尿病発症のβ細胞アポトーシスに、関与するののかについて、*in vivo*の系を用いて検討した。

対象と方法

C57BL/6 background CHOP欠損マウスを、1型糖尿病モデル；NODマウスに、戻し交配を繰り返し、speed congenic法により第10世代でCHOP遺伝子ヘテロ欠損NODマウスを作製した。同マウスの兄妹交配により、CHOP遺伝子ホモ欠損NODマウス(*NOD. Chop*^{-/-})及び野生型マウス(*wt*)のラインを確立し、両群の糖尿病累積発症率、膵島炎レベル、インスリン自己抗体(IAA)の発現を比較検討した。糖尿病発症後の野生型NODマウス由来の脾細胞およびCD8⁺細胞除去後の脾細胞を、放射線照射した*NOD. Chop*^{-/-}、*wt*マウスに養子移入し、その後の発症率を検討した。膵島のアポトーシス細胞頻度はTUNEL染色により算出した。マウスより分離した膵島細胞における

小胞体ストレス関連分子 (CHOP, Bip, PERK, IRE1, JNK1, JNK2, Caspase12) の mRNA の発現を real time RT-PCR にて定量的に解析した。

結 果

雌性 *NOD. Chop*^{-/-}、*wt* の両群で、15 週齢からの糖尿病発症を認め、雄性マウスでは、24 週齢より発症を認めた。50 週齢まで観察し、雌性及び雄性ともに、両群の累積発症率に有意差を認めなかった。12、20 週齢の雌性 *NOD. Chop*^{-/-}、*wt* 両群の膵島炎レベルに有意差を認めなかった。一方、IAA の発現では、特に早期 (8 週齢) の *NOD. Chop*^{-/-} では、自己抗体価、および陽性頻度が *wt* に比し、有意に低値であった。糖尿病 NOD マウスをドナーとした脾細胞の養子移入では、CD8⁺細胞除去の有無に関わらず、*NOD. Chop*^{-/-}、*wt* 両群レシピエントの糖尿病発症に有意差を認めなかった。膵島細胞のアポトーシス頻度は、自然発症及び養子移入の系において、*NOD. Chop*^{-/-}、*wt* 両群に有意差を認めなかった。小胞体ストレス関連分子の mRNA の発現は、*NOD. Chop*^{-/-}由来の分離膵島細胞とコントロールマウス (*wt*、NOD SCID) 間で、有意差を認めなかった。

考 察

本研究は、かつて *in vitro* の系において報告された、CHOP を介した小胞体ストレス応答の、1 型糖尿病における β 細胞アポトーシスへの関与を、CHOP 遺伝子欠損 NOD マウスを用い、*in vivo* の系で検証した実験である。CHOP 欠損 NOD マウスの糖尿病累積発症率、膵島炎レベル、膵島細胞のアポトーシス頻度は野生型マウスとほぼ同等であり、CHOP が 1 型糖尿病モデルマウスの β 細胞アポトーシスにとって必須ではないことが証明された。今回、CHOP 遺伝子欠損が影響を与えなかった原因として、*in vivo* では、1 型糖尿病の病態に重要な CD8⁺T 細胞による β 細胞障害機構や、別の小胞体ストレス誘導アポトーシス経路による代償機構の関与が考えられた。我々の検討では、CD8⁺細胞を除去した養子移入の系においても、CHOP 遺伝子欠損の影響は確認されなかった。また CHOP 欠損 NOD マウスにおける、JNK、Caspase12 などの他の小胞体ストレス誘導アポトーシス関連分子の、膵島発現増強も確認されなかった。以上の結果より、*in vitro* において認められた、1 型糖尿病の β 細胞アポトーシスへの小胞体ストレス応答の関与は、*in vivo* では再現できなかった。

一方、今回、早期の自己抗体発現に、血清 IgG 発現とは独立したかたちで、CHOP 遺伝子が促進的に関与していることが明らかとなり、液性免疫を中心とした自己免疫機序への、小胞体ストレス応答の関与が示唆された。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。