

[島根県立大学短期大学部松江キャンパス研究紀要 Vol. 52 13～19 (2014)]

# 母体環境の違いによる 1型糖尿病モデルマウス仔の病態進行への影響 第1報 ～膵島炎の組織学的解析～

籠橋 有紀子<sup>1</sup> 大谷 浩<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>島根県立大学短期大学部健康栄養学科 <sup>2</sup>島根大学医学部解剖学講座)

The effect of maternal environment for the development of insulinitis in NOD mice.

Yukiko KAGOHASHI, Hiroki OTANI

キーワード：母体環境 膵島炎 NODマウス

Key words: Maternal environment, Insulinitis, NOD mice

## SUMMARY

Type 1 diabetes results from the destruction of pancreatic  $\beta$ -cells that is controlled by both genetic and environmental factors. The maternal environment has been suggested to be important in the development of diabetes. To assess the role of maternal factors in the development of insulinitis and overt diabetes, we transplanted pre-implantation stage embryos of nonobese diabetic (NOD) mice, a model of type 1 diabetes, into the uterus of each recipient. Recipients were ICR and DBA/2J mice without diabetic genetic predisposition, and NOD mice without overt diabetes during the experiment; offspring were designated as NOD/ICR, NOD/DBA, and NOD/NOD, respectively; unmanipulated NOD offspring were also examined. In the present histopathological study, it was observed that insulinitis was still present at 40 weeks of age in nondiabetic NOD/ICR and NOD/DBA offspring and that their  $\beta$ -cell mass was larger than in nondiabetic NOD/NOD offspring. The insulinitis at 40 weeks after birth that is tolerated might be established by a change in maternal environment caused by transplantation. The present study suggests that altered maternal factors modify the immune response to islets, which in turn might affect the pathogenic course from insulinitis to overt diabetes.

## 1. はじめに

1型糖尿病は、インスリンを分泌する膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞が自分自身の免疫細胞の浸潤によって破壊され(膵島炎)、インスリンの絶対的不

足により発症する臓器特異的自己免疫疾患と考えられている<sup>1-3)</sup>。欧米では日本の約10倍以上の発症率を認める国が多く、さらに5歳以下の幼児の発症を中心に世界中で1型糖尿病患者の増加していること

も報告されている<sup>4-5)</sup>。欧米では、子供の生活や生命を脅かす疾患として社会的な認知度も高く、最も精力的に研究されている自己免疫疾患の一つである<sup>1-3)</sup>。一卵性双生児の研究により、尿中に糖が出現する顕性糖尿病を発症する以前に、自己免疫反応が潜在的に数年間進行することが報告されて以来、1型糖尿病を予知予防しようとする研究が世界中で続けられてきている<sup>1-3)</sup>。疾患感受性遺伝子の同定やインスリン自己抗体などの測定など、ある程度の予知が可能になりつつあるが、それに対して確実な有効な予防法および治療法の確立には至っていない。また、一卵性双生児における1型糖尿病の発症一致率は約30%に過ぎないことから、環境因子の重要性が示唆されている。環境因子としては、食餌、環境中の化学物質、ウイルスなどが挙げられる。複合的な要因の可能性も含め、未知の糖尿病誘発物質が存在している可能性は否定できない<sup>6-11)</sup>。

ヒトにおいては、母乳保育が1型糖尿病の発症を予防する効果があることが報告されており、我々のこれまでの研究結果においても、胎盤および母乳を介した母子間での物質移行の存在が1型糖尿病発症過程に影響する可能性が示唆されている<sup>7, 8, 11)</sup>。

1型糖尿病モデル動物であるNon-Obese Diabetic (NOD) マウスは、代表的な自然発症1型糖尿病モデルである。これまでほとんどの1型糖尿病におけるヒトへの臨床研究は、NODマウスの実験結果に基づいているものが多い。倫理的、技術的にヒト1型糖尿病患者に対しては不可能なことを検証でき、膵島炎が始まる前、膵島炎進行中、糖尿病発症時、発症後等、どの時期でも検索や介入が可能であり、1型糖尿病のみならず自己免疫疾患の研究に多大に寄与してきた<sup>6)</sup>。

我々は胚子移植法により、ヒト1型糖尿病モデル動物であるNODマウス初期胚を、糖尿病を発症しないICRマウスの子宮内に移植して成長させた仔の顕性糖尿病発症率について検討した<sup>8, 11)</sup>。その結果、糖尿病を発症しないICRマウスの母体環境(子宮内)で発生した仔はNODマウスの子宮内へ移植して得た仔と比較して、顕性糖尿病の発症が著しく抑制された。また、糖尿病を発症しない子宮内環境を他系

統のDBA/2Jとしても、類似した結果を得た。しかしながら、生後5週齢における膵島炎の程度は顕性糖尿病が抑制された群でより進行するという逆説的な結果を得た。したがって、本研究では、離乳前(胎児期および新生児・乳児期)に糖尿病を発症しない母体環境において成長したNODマウス仔の顕性糖尿病発症前後の膵島炎の状態を、NODマウスの母体環境において発生したNODマウス仔と組織病理学的解析を用いて比較することにより、顕性糖尿病発症個体および未発症個体の病態の違いについて検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) 動物

ヒト1型糖尿病モデル動物NODマウス雌および雄、ICRマウス、DBA/2Jマウス(日本クレア)を使用した。日本クレアより購入後、島根大学医学部実験動物施設および島根県立大学短期大学部動物実験委員会の規則に基づき飼育した。本研究は、島根大学医学部実験動物委員会および島根県立大学短期大学部実験動物委員会の承認を受けた。本実験施設におけるNODマウスの顕性糖尿病発症率は、マウス用通常食摂取群は25週で37%、40週で約70%であった。

### 2) 動物用飼料

マウス用通常食は先行研究よりMF(オリエンタル酵母)を用いた<sup>12)</sup>。

### 3) 胚子移植法について

NODマウス初期胚を8細胞期にて採取し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で胚盤胞まで発生させたのち、仮親の子宮内に移植した。糖尿病を発症しないICRマウスの子宮内に移植して出生後、その母獣に継続して授乳させ成長させた仔(NOD/ICR)、およびDBA/2Jマウスの子宮内に移植して成長させた仔(NOD/DBA)、NODマウスの子宮内に移植して成長させた仔(NOD/NOD)を得た。胚子移植法により生まれたNOD/ICR、NOD/DBA、NOD/NOD、胚子移植を行わず、本来の母獣から生まれて授乳をされたNODマウス、ICRマウスと、顕性糖尿病を発症したNOD/NOD、NOD(以下NOD/NOD DM、NOD

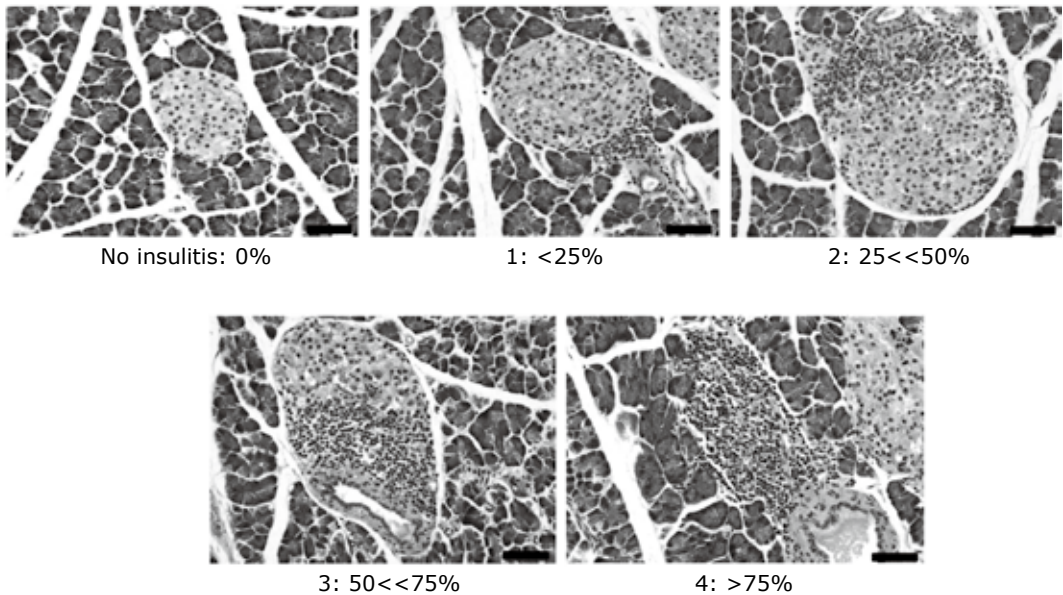


図1. 膵島炎の程度の5段階評価

膵臓のランゲルハンス島に浸潤するリンパ球の様子を観察し、その程度を5段階に分けて評価（No insulitis, <25%, 25<<50%, 50<<75%, >75%）した。それぞれの段階における膵島炎の数を計測し、全体の膵島数のうち出現膵島中のリンパ球浸潤膵島の割合を評価し、Ridit analysis（有意水準 $T>1.96$ ）により統計処理を行った。（Scale bar : 50  $\mu\text{m}$ ）

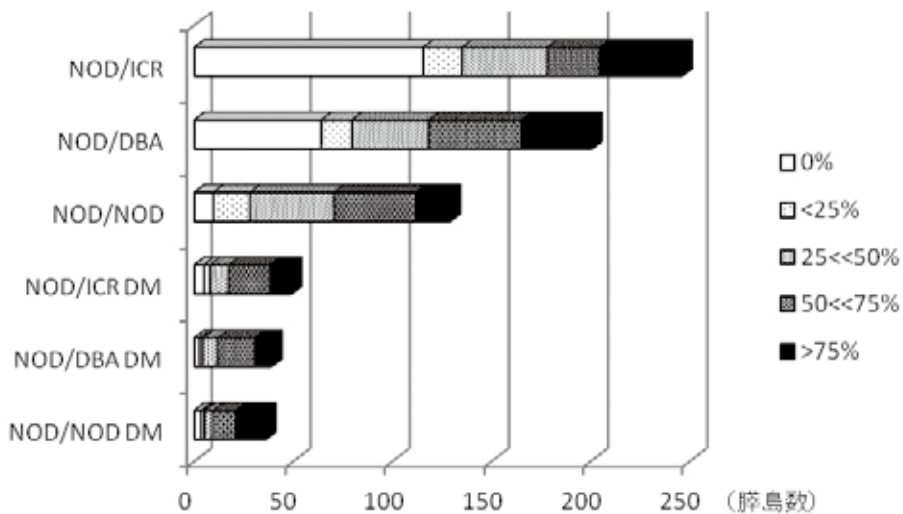
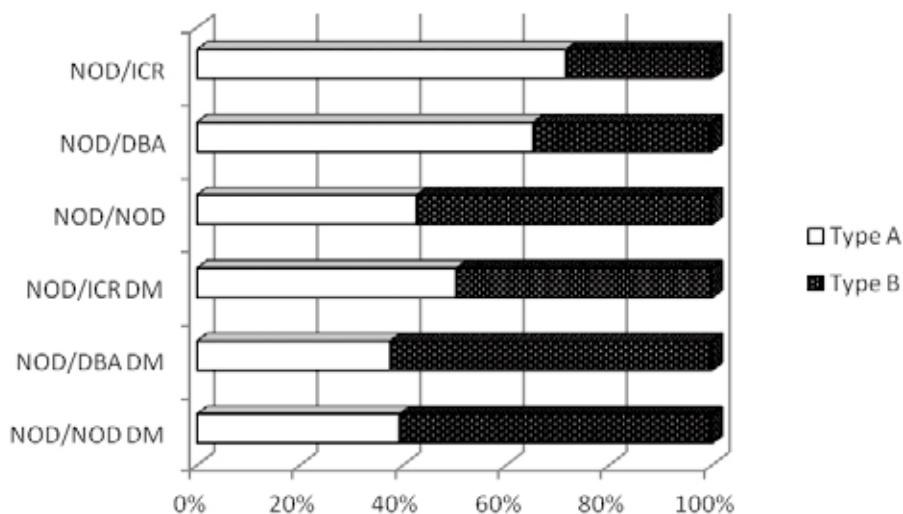
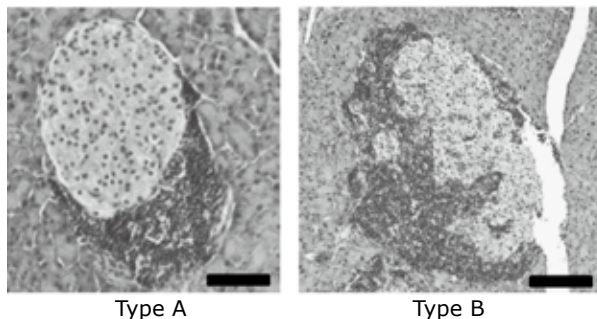


図2. 顕性糖尿病発症前後の膵島数および膵島炎の程度

生後40週令前後における顕性糖尿病未発症のNOD/ICR、NOD/DBAは、膵島数が多く、大きさも大きい（直径約280  $\mu\text{m}$ ）。浸潤の程度が軽く、全く浸潤していない膵島も多かった。同じく未発症のNOD/NODは、膵島数が少なく、大きさも小さい（直径約170  $\mu\text{m}$ ）。浸潤の程度が重く、全く浸潤していない膵島もあるが極めて小さく、NOD/ICR、NOD/DBAと比較しても膵島の数自体が減少していた。DMは糖尿病発症後の個体であることを示している。NOD/NOD、NOD/ICR、NOD/DBAともに糖尿病発症後の個体においては膵島数が少なく、あっても浸潤の程度がきわめて重い。顕性糖尿病未発症の個体の膵島数の約10分の1程度に膵島が減少している。中でも、未浸潤の膵島（0%）の減少程度が著しい。

**図3. 膵島へのリンパ球の浸潤様式**

大きく分けて2つの様式が認められた。リンパ球がきれいに並んで浸潤し境界が明瞭なもの (Type A)。リンパ球の浸潤がランダムな方向へ向かう境界が不明瞭なもの (Type B)。(Scale bar : 50 μm)



**図4. 顕性糖尿病発症前後におけるリンパ球の浸潤様式の割合**

NOD/ICR、NOD/DBAは、Type Aの膵島が多く認められ、NOD/NODおよび顕性糖尿病を発症したマウスは、Type Bの膵島が多く認められた。

DMとする) について、顕性糖尿病発症前後の病態を比較検討した。

4) 顕性糖尿病発症の確認と発症後の病態の検討

生後10週齢より、尿糖検出紙 (プレテスト 3aII : 和光純薬) を用いて、尿糖値を確認した。尿糖値 200 mg/dl以上の個体を顕性糖尿病発症個体とした。一群につき10-14個体について、顕性糖尿病発症後のインスリン非投与下における尿糖値を比較検討し

た。

5) 膵臓組織の観察による膵島炎症頻度の検討

顕性糖尿病発症前後のマウス個体を安楽死後、膵臓を採取した。10%バッファーホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋後、5 μmにて連続切片を作成し、膵島中のリンパ球浸潤膵島の割合を計測した。リンパ球が未浸潤および浸潤した膵島数を計測し、浸潤膵島については浸潤面積の比率により5段階に

分けて評価し、統計処理を行い、膵島炎の進行程度を2群間で比較検討した(図2)。また、浸潤の様式について観察を行い、2つのタイプに分類した。リンパ球がきれいに並んで膵島の周囲から浸潤し、境界が明瞭なものをType Aとし、リンパ球が1ヶ所または数ヶ所で膵島の内部に浸潤し境界が不明瞭なものをType Bに分類し、それぞれの割合を求めた(図3)。

#### 6) 統計処理

統計解析ソフトSPSS15.0を用いた。膵臓切片の観察による病態の検討については、Ridit analysis(有意水準 $T > 1.96$ )<sup>13)</sup>により比較検討を行った。

### 3. 結果

#### 1) 膵島数・浸潤の程度・大きさについて

NOD/ICR、NOD/DBAは、各1匹以外のほとんどの個体が顕性糖尿病を発症せず、未発症個体については、同じく未発症のNOD/NODマウスと比較して膵島数が多く、浸潤の程度が軽く、全く浸潤していない膵島も多く認められた(図2)。また、NOD/ICR、NOD/DBAともに、膵島の直径が平均して約280  $\mu\text{m}$ あり、NOD/NODおよび移植操作を行わないNODマウスの膵島(直径約170  $\mu\text{m}$ )と比較して大きいことが観察された。また、膵島が2~3個密集し、融合しているものも認められた。NOD/NODは、顕性糖尿病未発症個体であっても、生後40週令前後には全膵島数が少なく、浸潤の程度が重い上、浸潤が認められない膵島もあるが、その数は極めて少なく、直径の極小さいもののみが観察された(図2)。NOD/NODのうち顕性糖尿病を発症した個体は、全体の70%に達しており、その全ての個体において膵島数がわずかとなっており、残存しているものも浸潤の程度がきわめて重かった(図2)。また、NOD/ICRおよびNOD/DBAの顕性糖尿病発症個体はそれぞれ1匹のみであったが、膵島数はNOD/NODと同様に50個未満となり、膵島炎の程度も進行していた。また、膵島の大きさも非常に小さく、リンパ球がほとんど膵島を覆い隠すような像が多くみられ、未浸潤のものであっても、100  $\mu\text{m}$ 未満の極小の膵島が観察された。

#### 2) 浸潤の様式について

リンパ球浸潤の様式を検討したところ、リンパ球が膵島の周囲を囲むようにしてきれいに並んで浸潤し、境界が明瞭なType A(図3)、リンパ球が1ヶ所または数ヶ所で膵島組織の奥まで浸潤している境界が不明瞭なType B(図3)の2種類が認められた。NOD/ICR、NOD/DBAの顕性糖尿病未発症の個体は、Type Aの膵島の割合が多く認められた(図4)。また、顕性糖尿病未発症のNOD/NODや、顕性糖尿病を発症したNOD/ICR、NOD/DBA、NOD/NODマウスは、Type Bの膵島の割合が多く認められた(図4)。

### 4. 考察

胚子移植法を用いて、離乳前(胎児期および新生児・乳児期)の母体環境が異なるNODマウス仔の1型糖尿病発症前後の病態の違いについて、組織病理学的な見地から、詳細に検討した。

我々がこれまで行った研究から<sup>8, 11)</sup>、NODマウスの受精卵を、糖尿病を発症しない母獣に受精卵を移植し生まれた仔には、免疫染色の結果からインスリンを分泌する $\beta$ 細胞は正常に機能していることが示唆されている。膵島にリンパ球が浸潤して $\beta$ 細胞が破壊されても、残りの $\beta$ 細胞で十分なインスリン分泌を保つことができ、顕性糖尿病を発症しなかったことが考えられる。NODマウスの受精卵を異なる母獣NODマウスに移植して出生した個体および移植操作を行わずに出生したNOD個体においては、 $\beta$ 細胞の免疫染色の結果から、インスリンを分泌する $\beta$ 細胞が残っていない膵島もあったことから、インスリン分泌が絶対的に不足したために顕性糖尿病を発症したと推察された。

本研究においては、顕性糖尿病の発症前後における $\beta$ 細胞の数および浸潤程度について詳細に観察し、残存数およびその形態を定量的に解析した。その結果、母体環境の違いにより仔の顕性糖尿病発症前後の膵島数に明らかな違いが認められた。また、膵島がある程度残されていても、膵島の大きさやリンパ球浸潤の程度に大きな違いが生じていることが明らかとなった。顕性糖尿病を発症したマウスは、ある程度の膵島数が残存しているにも関わらず、そ

の膵島にはリンパ球の浸潤が認められるものが多く程度も進行していた。したがって、実質的には、 $\beta$ 細胞が破壊され、残存している未浸潤の膵島は極小で $\beta$ 細胞自体の数はわずかであることから、膵島数の違い以上に $\beta$ 細胞数およびインスリン分泌量に違いが生じていることが推察できる。すなわち、顕性糖尿病発症個体は、膵島 $\beta$ 細胞自体の絶対数が非常に少ないことにより、インスリンの絶対的不足に陥るために、顕性糖尿病を発症していることが分かる。

顕性糖尿病の発症は、もともと存在する膵島 $\beta$ 細胞の十分の一以下に $\beta$ 細胞が減少してしまうことにより起こるとされている<sup>14)</sup>。 $\beta$ 細胞の破壊による細胞量はNODマウスにおいて生後3週令から徐々に減少し始め、顕性糖尿病を発症しその後も減少し続ける。しかしながら、個体によって異なることも示唆されており、糖尿病発症マーカーである自己抗体の出現程度による違いとも考えられている<sup>15-17)</sup>。本研究において顕性糖尿病を発症したマウスに多く見られた浸潤の仕方が不明瞭な膵島は、膵島の周りからだけでなく内部からもリンパ球の浸潤が進行している可能性があると考えられ、したがって、NOD/NODマウスにおいては、NOD/ICR、NOD/DBAと比較して、膵島へのリンパ球浸潤が急速に進むことが示唆された。リンパ球の浸潤の仕方が明瞭なものが多いNOD/ICR、NOD/DBAでは膵島へのリンパ球の浸潤が緩やかに進行する可能性が考えられ、その理由として、NOD/NODと比較した際に内部に進行しにくい要因が存在する、あるいは、NOD/NODにおいてリンパ球浸潤が内部に進行しやすい要因が存在する両方の可能性が考えられる。

以上の結果より、離乳前の胎児期および新生児・乳児期に遺伝的に糖尿病を発症しない母体環境において成長したNODマウスは、膵島炎を発症するのにも関わらず、その後の膵島の破壊が母体環境および、何らかの二次的要因により抑えられ、インスリン分泌が保たれるため、糖尿病発症率が著しく抑えられると考えられる。また、発症した膵島炎が刺激となり膵島の細胞増殖が引き起こされた可能性、および膵島へのリンパ球の浸潤を抑制している可能性が示唆された。同様の膵島の代償性肥大は、我々の

これまでの研究の中で、多価不飽和脂肪酸を摂取させたNODマウスにおいても認められている<sup>18)</sup>。今後は、その現象に関わる要因についての検討が必要であると考えられる。

## 5. 謝辞

本稿作成にあたり、お世話になった島根大学医学部解剖学教室の武田裕美子氏に感謝の意を表す。

なお、本研究の一部は科学研究費補助金(22791012)および平成25年度の島根県立大学短期大学部特別研究費の助成を受けている。

## 6. 引用文献

1. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2002;1(3):146-155.
2. Itoh M. Immunological aspects of diabetes mellitus: prospects for pharmacological modification. *Pharmacol Ther* 2004;4(10):351-406.
3. Dotta F, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: a predictable autoimmune disease with interindividual variation in the rate of beta cell destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 2008;41(1):S85-S95.
4. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*. 2006; 23: 857-66.
5. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373: 2027-33
6. Chaparro RJ, Diloranzo TP. An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010; 6(6):939-55.
7. Kagohashi Y, Abiru N, Kobayashi M, Hashimoto M,

- Shido O, Otani H. Maternal dietary n-6/n-3 fatty acid ratio affects type 1 diabetes development in the offspring of non-obese diabetic mice. *Congenit Anom.* 2010; 50(4): 212-20.
8. Kagohashi Y, Udagawa J, Moriyama K, Otani H. Maternal environment affects endogenous virus induction in the offspring of type 1 diabetes model non-obese diabetic mice. *Congenit Anom.* 2005; 45(3): 80-4.
9. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010; 39(2):419-46.
10. Mikael Knip and Olli Simell. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a007690.
11. Kagohashi Y, Udagawa J, Abiru N, Kobayashi M, Moriyama K, Otani H. Maternal factors in a model of type 1 diabetes differentially affect the development of insulinitis and overt diabetes in offspring. *Diabetes.* 2005 Jul; 54(7): 2026-31.
12. The National Academy of Science: Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Washington, DC, National Academy Press 1995
13. Sermeus W, Delesie L Redit analysis on ordinal data. *West J Nurs Res* 1996;18:351-359.
14. Longo DL, Fauci As, Kasper DL, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine 18ed McGraw-Hill Professional 2011.
15. Akirav E, Kushner JA, Herold KC. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes* 2008; 57(11):2883-2888.
16. Atkinson MA. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes: Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a007641.
17. Peter Arvan, Massimo Pietropaolo, David Ostrov, and Christopher J. Rhodes Islet Autoantigens: Structure, Function, Localization, and Regulation *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2: a007658.
18. Kagohashi Y, Otani H. Diet with a low n-6/n-3 essential fatty acid ratio when started immediately after the onset of overt diabetes prolongs survival of type 1 diabetes model NOD mice. *Congenit Anom.* 2010 ; 50(4):226-31.

(受稿 平成25年11月29日, 受理 平成25年12月12日)