

F. 健康危険情報
問題なし

G. 研究発表

1. 論文発表

永淵正法. ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病. 臨床と微生物 38(1):57-61, 2011.

永淵正法、栗崎宏憲、勝田仁. ウイルス感染の免疫防御と自己免疫. 臨床とウイルス 39(1):3-9, 2011.

Nagafuchi S, Kurisaki H, Katsuta H. Encephalomyocarditis virus. Chapter 5, In Diabetes and Viruses, Springer Publications, in press.

Shide K, Kameda T, Markovtsov V, Shimoda HK, Shimoda K, et al., R723, a selective JAK2 inhibitor, effectively treats JAK2V617F-induced murine myeloproliferative neoplasia. Blood 117:6866-6875, 2011.

Ishizaki, M., T. Akimoto, R. Muromoto, M. Shimoda, K. et al. Involvement of Tyk2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axis in vivo. J Immunol. 187(1):181-189, 2011.

Ishizaki, M., R. Muromoto, T. Akimoto, Y. Sekine, H. Shimoda, K. et al. Tyk2 deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. Int Immunol 23(9):575-582., 2011.

2. 学会発表

勝田仁、永淵正法. 20年以上インスリン分泌能が維持され膵β細胞の再生の可能性が示唆された1型糖尿病の1例. 第49回日本糖尿病学会九州地方会. 福岡. 2011. 10. 7.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
永淵正法、栗崎宏憲、勝田仁	ウイルス感染の免疫防御と自己免疫	臨床とウイルス	39(1)	3-9	2011
永淵正法	ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病.	臨床と微生物	38(1)	57-61	2011
Seiho Nagafuchi, Hironori Kurisaki, Hitoshi Katsuta	Encephalomyocarditis virus	Diabetes and Viruses	Chapter 5		in press
Shide K. Kameda T, Markovtsov V, Shimoda HK, Shimoda K, et al.,	R723, a selective JAK2 inhibitor, effectively treats JAK2V617F-induced murine myeloproliferative neoplasma.	Blood	117	6866-6875	2011
Ishizaki, M., T. Akimoto, R. Muromoto, M. Shimoda, K. et al.	Involvement of Tyk2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axis in vivo.	J Immunol.	187(1)	181-189	2011
Ishizaki, M., R. Muromoto, T. Akimoto, Y. Sekine, H. Shimoda, K. et al.	Tyk2 deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice.	Int Immunol	23(9)	575-582	2011

ウイルス感染の免疫防御と自己免疫

永淵正法, 栗崎宏憲, 勝田 仁 九州大学大学院 医学研究院 保健学部門

【論文要旨】

ウイルス感染症に対して、宿主は、まず物理的、化学的障壁、次に自然免疫、引き続いて、獲得免疫のメカニズムにより対抗している。このような防御機構は、いわゆる炎症をきたし、程度の差はあれ、しばしば組織障害をもたらすが、通常は、免疫応答の終息、組織修復機転により回復する。近年の免疫学の進歩は自然免疫における病原体のパターン認識機構 (PAMPs: pathogen associated molecular patterns), また、獲得免疫においては、ウイルスを始めとする細胞内寄生体に対抗する Th1 反応、寄生虫に対応する Th2 反応に加えて細胞外細菌に好中球応答を誘導する Th17 反応、さらに免疫応答制御に関する調節性 T 細胞 (Treg) の存在を明らかにしてきた。免疫応答調節機構の破綻は、過剰な免疫反応による組織障害に関することも明らかとなってきた。さらにウイルス感染細胞が傷害され、免疫機序により排除されるメカニズムは、自己に対する反応でもあるため、ウイルス感染を契機として自己免疫反応が誘導されることは想像に難くない。幸い、生体は多くのシステムで自己応答の発生を多重に制御している。自己免疫疾患は、この制御機構の単一もしくは複数の障害が重なることで発症すると考えられる。ここでは、ウイルス感染防御機構について概説し、さらに自己免疫応答誘導機構とその制御について述べる。

1. はじめに

ウイルス感染に対しては、まず、皮膚、粘膜などの物理的障壁とそれぞれ汗腺、粘液、などの分泌物における病原体の洗浄、化学的障害による排除機構が働く (図1)。この第一線の障壁を突破すれば、いわゆる自然免疫が働く¹⁾。近年の自然免疫に関する進歩は、病原体を非特異的に捕捉するのみでなく、パターンで判読するメカニズムの存在を明らかとしてきた。すなわち、それぞれの病原体について、進化の過程で保存されている pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を対象として認識する宿主の防御システムが存在している。その認識は、

パターン認識レセプター (pattern recognition receptors: PRRs) が行い、免疫シグナルを伝達することにより病原体に対抗する免疫応答の重要な位置を占めていることが明示されている。PRRs には、Toll-like receptors (TLRs), RNA helicase RIG-I-like receptors (RLRs), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs), cytosolic DNA sensor などが知られている (図2)²⁾。

このような PRRs を介する経路はインターフェロン (図3) をはじめとするさまざまなサイトカイン応答を惹起し、ウイルスの増殖抑制に作用するとともにマクロファージを活性化し、ウイルスの貪食処理を担う。同時にこの応答はウイルス感染を契機とする場合、主として

Protective immunity against viral infection and autoimmune diseases

Seiho NAGAFUCHI, Hironori KURISAKI, Hitoshi KATSUTA, Department of Medical Science and Technology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

別刷請求先: 永淵正法 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学大学院 医学研究院・保健学部門

検査技術科学分野・病態情報学講座, 九州大学院 内科

Tel/Fax: 092-642-6731 E-mail: nagafuchi@shs.kyushu-u.ac.jp

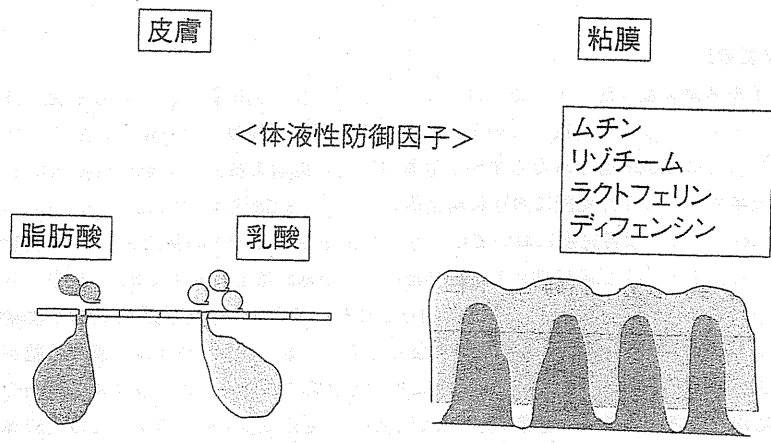


図1 生体防御の物理的, 化学的障壁

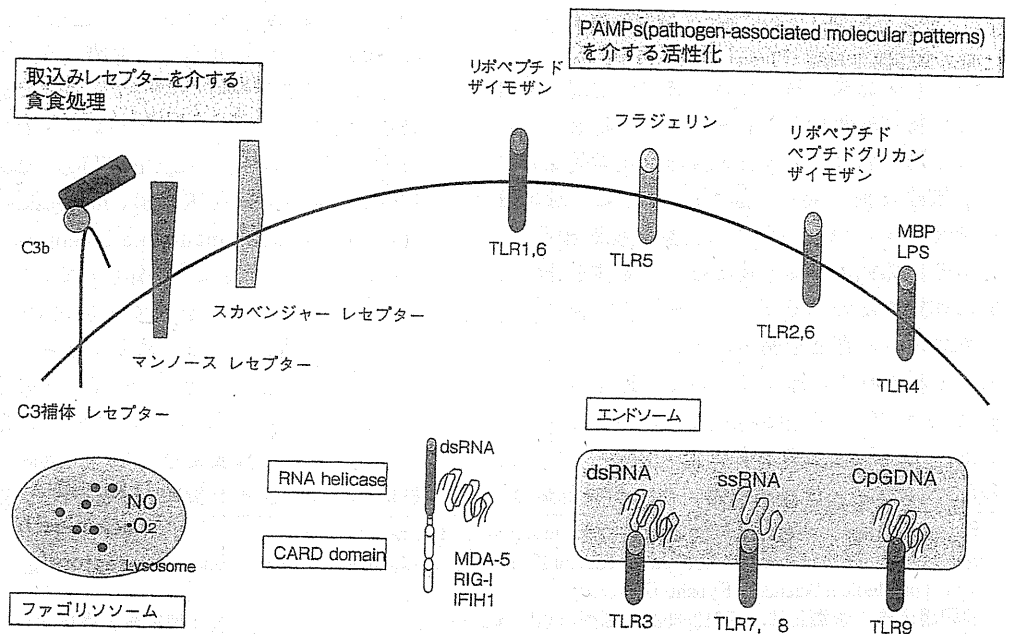


図2 自然免疫における非特異的および病原体パターン認識レセプター

IL-2により誘導される Th1反応を惹起することによりマクロファージの活性化, あるいは, 細胞傷害性 T細胞, IgG 抗体産生をもたらす (図4)³⁻⁵⁾. 補体は異物認識, レクチン経路による活性化, 抗体による活性化, ADCC (抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)⁶⁾などを介して, エンベロープを有するウイルスの溶解反応, ウ

イルス感染細胞の破壊, あるいは炎症反応の惹起によるウイルス排除に作用する. このような免疫応答は, ウイルス感染が終息することによる抗原刺激の減少, 活性化された免疫系の抑制, 免疫調節機構による抑制などにより, 速やかに抑制され, 沈静化する.

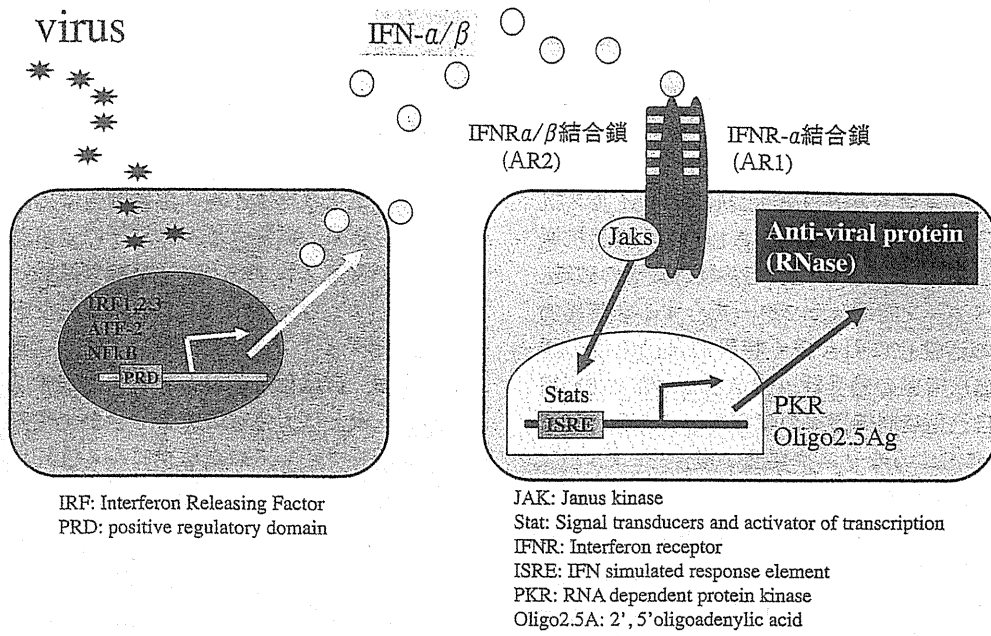


図3 インターフェロンの誘導と抗ウイルス活性の発揮

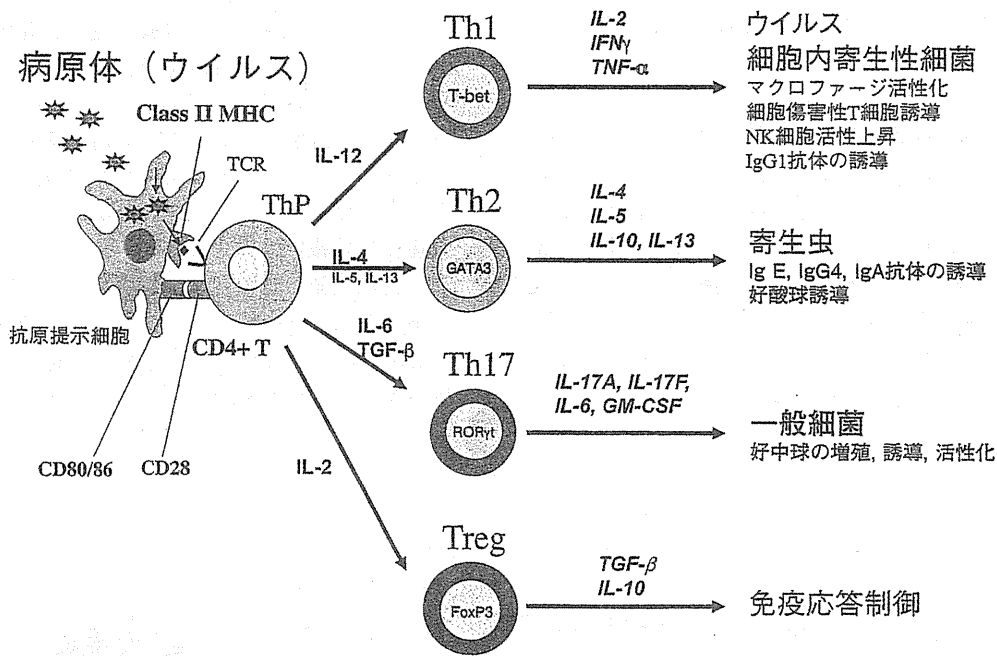


図4 生体防御システムにおける獲得免疫の種類とその意義

2. ウイルス感染による自己免疫糖尿病誘発あるいは抑制メカニズム

ウイルス感染が契機となって特異的自己免疫が誘導されるメカニズムにはいくつかの要因がある。列挙すると (1) 自己抗原とウイルス抗原の分子相同性, (2) 隠蔽されている自己抗原の表出誘導, (3) 自己免疫応答制御機構の破綻, (4) パターン認識レセプターを介する非特異的免疫の活性化に引き続く特異的自己免疫の誘導, (5) 宿主の感受性 (HLA タイプ), (6) 宿主の自己免疫制御機構の障害などである。実際には、このようなリスク要因が複合的に働いて、自己免疫反応の誘導をもたらすのではないかと考えられる^{7,8)}。

I. 特異的自己免疫応答の活性化

(1) ウイルスと自己細胞抗原の分子相同性

ギラン・バレー症候群では、細菌である *Campylobacter jejuni* と、宿主の末梢神経 GM1 ganglioside の分子相同性を誘因として、その発症に関することは良く知られているが、ウイルス抗原と自己細胞抗原が交差することによる自己免疫応答惹起の直接の証拠は乏しい^{7,9)}。

一方、ウイルスは、偏性細胞内寄生体であるため、増殖するためには、宿主の複製機能が必要とする。その過程で、初期の核酸合成酵素などの早期抗原 (Early Antigen) は細胞表面に表出され、ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の標的となり、ウイルス感染細胞は排除される。その結果、成熟ウイルス粒子の完成前に細胞機能が障害され、ウイルス増殖が抑制される。このことは、ウイルス抗原に対する免疫応答であるが結果として自己肝細胞の障害に働くため、一面、自己免疫応答と類似する臨床像を呈しうる。例えば、持続的感染をきたす代表疾患である肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎、あるいは自己免疫性肝炎も肝臓細胞を傷害することにおいては同一の臨床像を呈し、その鑑別は困難である (図 5)。臨床的には自己抗体の有無が重要な鑑別点になるが、同時に存在し、合併と診断すべきかどうか苦慮する場合もある。サイトメガロウイルスの慢性感染に伴う自己免疫糖尿病の報告は興味深い¹⁰⁾。

(2) 自己抗原の遊離とその認識

前述したようにウイルス感染細胞の傷害により隠蔽されている自己抗原の表出誘導や自己抗原の遊離は、その後の自己反応性の惹起に働く

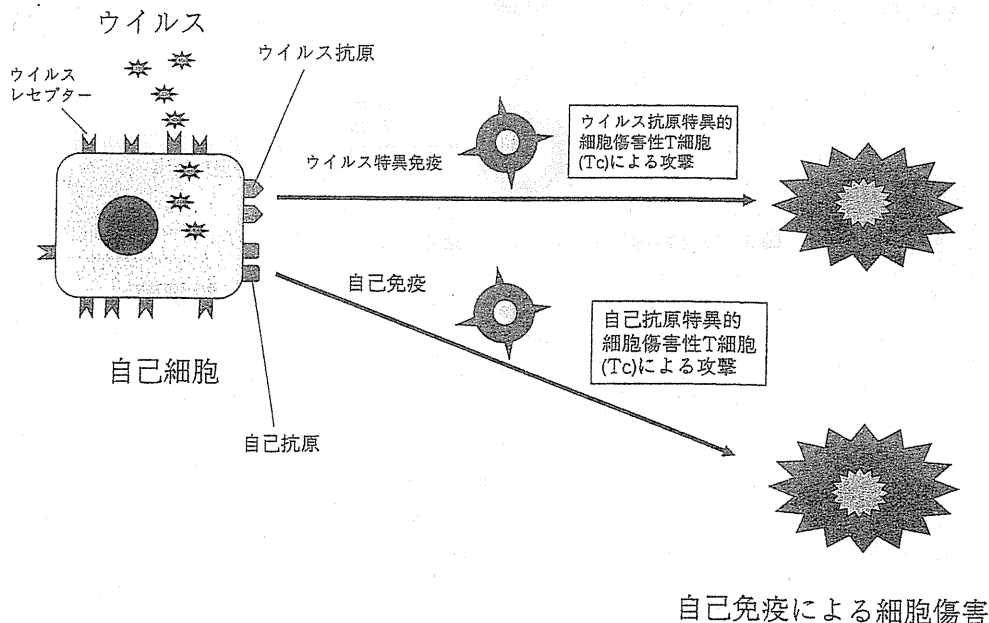


図5 ウイルス感染による細胞傷害と自己免疫の誘導

ことは容易に考えられる。そもそも自己反応性 T 細胞、あるいは B 細胞は、生体に少数であるが存在していることは良く知られているので、ウイルス感染細胞破溶解による自己抗原の提示により、このような非活性化状態の自己免疫反応が、より強く、かつ継続して活性化されることは十分にありうる。ただし、その場合、自己免疫応答制御機構の障害、あるいは破綻が伴って、はじめて自己免疫病の発症につながるのであろう。

(3) 自己免疫応答制御機構の破綻

自己反応性は、さまざまなメカニズムで制御されている。最近の免疫学のトピックとして、中枢性の自己免疫反応性 T 細胞の除去に働く自己免疫調節遺伝子 AIRE の同定と、末梢における自己反応性を制御する Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ 調節性 T 細胞 (Treg) の発見は、この分野に目覚ましい進歩をもたらした^{11,12)}。AIRE 欠損でもたらされる臓器特異的自己免疫の標的臓器は、一般に、副腎、副甲状腺が中心であるが¹³⁾、興味深いことに HLA タイプが 1 型糖尿病感受性であれば、1 型糖尿病を合併し、1 型糖尿病抵抗性では、むしろ典型的なアジソン病と副甲状腺機能低下の臨床像を呈する¹⁴⁾。一方、Treg の欠損では、むしろ 1 型糖尿病は主徴の 1 つである¹²⁾。このことは、自己免疫糖尿病発症制御には Treg による末梢性の免疫応答調節がより重要であることを示唆している。すなわち、自己免疫病の表現型には宿主の HLA, AIRE, Treg などの要因が複雑に関与することが示唆される。

一方、ウイルス感染に伴い β 細胞が破壊され少数の自己反応 T 細胞が活性化されても、制御性 T 細胞による反応抑制以前に、活性化 T 細胞応答は、いくつかの活性化後制御メカニズムにより、その過剰な反応は抑制されている。T 細胞の活性化後のアポトーシス誘導に働く分子としては、既知の Fas に加えて programmed cell death-1 (PD-1) 抗原の重要性が強調されている⁷⁾。また、細胞内シグナル伝達制御に関しては、suppressor of cytokine signaling (SOCS) などの分子が同定され、将来の治療への応用も期待されている¹⁵⁾。さらに最近、種々の自己免疫疾患に B 細胞除去療法が有用であることが示

され、われわれが過去に報告した 1 型糖尿病に関する実験研究とともに、B 細胞による免疫応答調節の意義も注目されつつある(図 6)^{7,16-18)}。

(4) ウイルスによる自然免疫応答の活性化を介する自己免疫応答の誘導

従来、病原体から生体を守るシステムとしては、非特異的な病原体の取り込みと処理、インターフェロンの誘導などを自然免疫とし(図 2, 3)、特異的な免疫応答を獲得免疫として捉えていた(図 4)。

自然免疫が自己免疫病発症に関与するもっとも良い臨床的な証拠は、C 型肝炎治療のためのインターフェロン投与によって自己免疫糖尿病発症例が蓄積されていることであり、本誌で及川先生らが詳述されている¹⁹⁾。また、実験的にも、糖尿病抵抗性の BBR ラットは、Kilham rat virus 感染後、後述の病原体パターン認識機構である Toll-like receptor (TLR) 9 シグナルを介する自己免疫の誘導により、自己免疫糖尿病を発症する²⁰⁾。最近、自然免疫に関する PPR のうち、IFIH1 (interferon induced helicase C, domain 1) の多型が 1 型糖尿病と関連あることが報告されている²¹⁾。この多型が感受性を決定するのか、あるいは抵抗性に関与するのかの詳細は今後の研究課題であろう。

II. 自己免疫誘導の抑制

ウイルス感染がむしろ自己免疫の発症を抑制することがありうることは旧くから知られていた²²⁾。最近、Filippi らは、Coxsackie B3 ウイルスあるいは lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) を自己免疫糖尿病モデル動物である NOD マウスに感染させたところ糖尿病の発症が遅延し、その原因として、リンパ球における programmed cell death-1 ligand 1 (PD-L1) の発現が上昇することによる PD-1 表出 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の増殖抑制に加えて、CD4⁺ CD25⁺ Treg の増加がもたらされるとする興味深い研究を報告している²³⁾。すなわち、本研究は、ウイルス感染が調節性 T 細胞を障害することにより、1 型糖尿病が誘発されるリスクが存在する一方、調節性 T 細胞を増加させることにより 1 型糖尿病発症を阻止しうることを示しており、ウイルス感染が宿主免疫機構に及ぼす影響

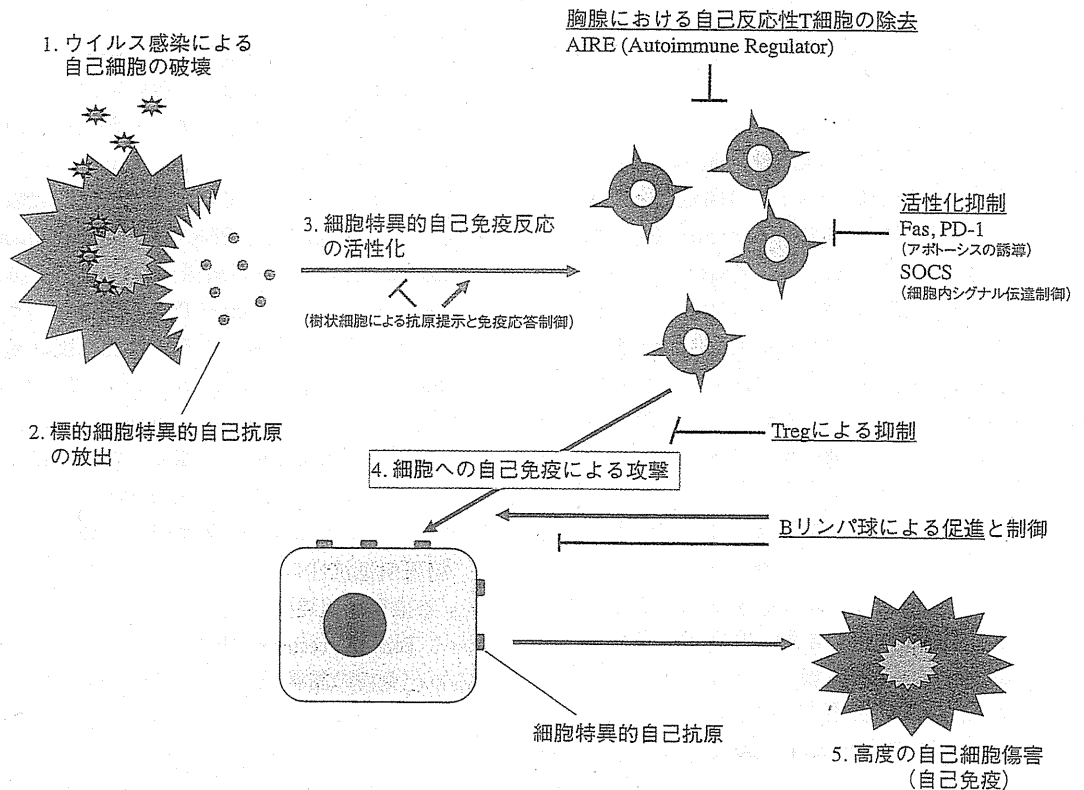


図6 ウイルス感染による自己免疫の誘導とその制御機構

の多面性を理解する上でも興味深い知見である。

3. おわりに

ウイルス感染と自己免疫病の関連は、充分ありうるものの、その直接の証拠は乏しいのが現状である。もし、あるウイルスが自己免疫病の原因であることが判明すればワクチンによる自己免疫疾患の予防が可能となるであろう。ただし、現時点では、自己免疫疾患の症例について、ウイルス感染を契機として発症したことを証明することは困難である。そもそも、本稿で述べて来たように、自己免疫応答は多くのメカニズムで、多重に制御されている。ウイルス感染によって惹起された自己免疫応答が制御され、終息するのか、あるいは、臨床的な自己免疫につながるのかは、さまざまな免疫制御メカニズム、感受性要因が複合して関与するのではないかと推測される (図6)。ただし、ウイルスが自己細胞に感染することが自己免疫反応誘導のトリ

ガーとなりうることは疑いの余地がない。今後の研究の進展がウイルス感染と自己免疫病の関連の全貌を明らかにすることを期待したい。

参考文献

- 1) 永淵正法：感染症成立の背景解析とその対策。日本皮膚科学会雑誌 117：759-765, 2007
- 2) Takeuchi O, Akira S：Innate immunity to virus infection. Immunol Rev 227：75-86, 2009
- 3) Komatsu T, Ireland DD, Reiss CS：IL-12 and viral infection. Cytokine Growth Fact Rev 9：277-285, 1998
- 4) Nagafuchi S, Oda H, Mori R, Taniguchi T：Mechanism of acquired resistance to herpes simplex virus infection as studied in nude mice. J gen Virol 44：715-723, 1979
- 5) Nagafuchi S, Hayashida I, Higa K, Wada T, Mori R：Role of Lyt-1 positive immune T cells in recovery from herpes simplex virus infection in mice.

- Microbiol Immunol 26 : 359-362, 1982
- 6) Hayashida I, Nagafuchi S, Hayashi Y, Kino Y, Mori R, Oda H, Ohtomo N, Tashiro A : Mechanism of antibody mediated protection against herpes simplex virus infection in mice : Requirement of Fc portion of antibody. Microbiol Immunol 26 : 497-509, 1982
 - 7) 永淵正法, 塚本 浩, 新納宏昭, 小林隆志 : 自己免疫疾患と炎症. 細胞工学 29(9) : 769-775, 2010
 - 8) Chervonsky AV : Influence of microbial environment on autoimmunity. Nat Immunol 11 : 28-33, 2010
 - 9) Christen U, Hintermann E, Holdener M, von Herrath MG : Viral triggers for autoimmunity : Is the "glasso molecular mimicry" half full or half empty? J Autoimmu 34 : 38-44, 2010
 - 10) Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW : Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. Lancet 2 : 1-4, 1988
 - 11) Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N : Positional cloning of the APECED gene. Nat Genet 17 : 393-398, 1997
 - 12) Sakaguchi S : Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 6 : 345-352, 2005
 - 13) Eisenbarth GS, Gottlieb PA : Autoimmune polyendocrine syndromes. N Engl J Med 350 : 2068-2079, 2004
 - 14) Kogawa K, Kudoh J, Nagafuchi S, Ohga S, Katsuta H, Ishibashi H, Harada M, Hara T, Shimizu N : Distinct clinical phenotype and immunoreactivity in Japanese siblings with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS-1) associated with compound heterozygous novel AIRE gene mutations. Clin Immunol 103 : 277-283, 2002
 - 15) Yoshimura A, Naka T, Kubo M : SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nat Rev Immunol 7 : 454-65, 2007
 - 16) Dörner T, Radbruch A, Burmester GR : B-cell-directed therapies for autoimmune disease. Nat Rev Rheumatol 5, 433-441, 2009
 - 17) Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K : Rituximab, B-lymphocyte depletion, and beta-cell function. N Engl J Med 362 : 761, 2010
 - 18) Nagafuchi S : The role of B cells in regulating the magnitude of immune response. Microbiol Immunol 54 : 487-490, 2010
 - 19) 及川洋一, 鳥田 朗 : インターフェロンと1型糖尿病 臨床とウイルス 39(1) : 10-19, 2011
 - 20) Zipris D, Lien E, Nair A, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA : TLR9-signalling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. J Immunol 178 : 693-701, 2007
 - 21) Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG, Todd JA : A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (*IFIH1*) region. Nat Genet 38 : 617-619, 2006
 - 22) Oldstone MB : Prevention of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection, Science 239 : 500-502, 1988
 - 23) Filippi CM, Estes EA, Oldham JE, von Herrath MG : Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. J Clin Invest 119 : 1515-1523, 2009

ウイルス糖尿病と 自己免疫性1型糖尿病

NAGAFUCHI SEIHO

永淵正法

©九州大学医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学

要旨 多くの臨床的あるいは基礎的研究からウイルスが糖尿病発症の原因であることが強く示唆されているが、決定的な証拠は乏しい。ウイルス感染症による糖尿病発症機構の解明には、ウイルスと宿主要因のいずれをも明らかにすることが必要である。

はじめに

ウイルス感染症が糖尿病の発症要因の一つとして注目されつつある^{1,2)}。歴史的にも、糖尿病発症の原因として、重症のウイルス感染症に伴う全身臓器障害の膵病変として膵島にウイルスが存在することが、しばしば報告されている³⁾。さらに、最近、急性ウイルス感染を伴い発症した1型糖尿病、特に膵炎を伴う劇症1型糖尿病でウイルスが原因であるとする傍証が蓄積されている⁴⁾。また、実験研究では、脳心筋炎(EMC)ウイルスを用いて、糖尿病誘発性の高い変異株(EMC-D)ウイルスの特性、感染防御、膵島細胞障害のメカニズムなど、基礎的研究の知見が蓄積されている^{5,6)}。このように多くの臨床的あるいは基礎的研究からウイルスが糖尿病発症の原因であることが強く示唆されるが、臨床的に分離されたウイルスが実験動物に糖尿病を誘発したことを証明した報告はまれである(表1)。今回は糖尿病の発症原因としてのウイルス感染を、感染防御システム障害や自己免疫誘導のトリガーとして考えながら議論したい。

■糖尿病の病因としてのウイルスの位置づけ

ウイルスによる糖尿病は、日本糖尿病学会の分類では二次性糖尿病の「他の疾患、条件に伴うもの」の「(5) 感染症」に分類されている(表2)。すなわち、風疹ウイルス(先天性風疹)、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルスなどが糖尿病の原因になりうると認識されている(表1)。なかでも、先天性風疹児に併発する糖尿病は、ウイルス原因説の有力な根拠である。一方、1型糖尿病では、自己免疫で発症するタイプAと、特発性と称するタイプB分類に分類されているが、タイプBの原因の主な候補としてウイルスがあげられる。1型糖尿病の約20%、そのサブタイプである急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に発熱、上気道炎など風邪症状を伴うことから、いわゆる風邪ウイルスが1型糖尿病発症の原因であることが疑われている(表1)。

表1 糖尿病ウイルス原因説と候補ウイルス

糖尿病ウイルス原因説の根拠	候補ウイルス
1. 重症の全身ウイルス感染症では血糖が上昇し、膵島にウイルスが存在することが繰り返し報告されてきた。	ヒト コクサッキーウイルス (エンテロウイルス) A型肝炎ウイルス 風疹ウイルス ムンプスウイルス ロタウイルス サイトメガロウイルス ヒトヘルペスウイルス6
2. 1型糖尿病の約20%、そのサブタイプである急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に、発熱、上気道炎など風邪症状を伴い、膵島にウイルスが存在することが報告されている。	
3. 実験的に、特殊なウイルス株を用いて、糖尿病を誘発できる。	動物 コクサッキーウイルス 脳筋炎ウイルス レオウイルス
*ただし、ヒトから分離されたウイルスが実験動物で糖尿病を発症することを証明した報告は乏しい(コホの三原則が満たされていない)。	

文献1)より

表2 糖尿病の成因分類

I. 1型	膵島β細胞の破壊、通常は絶対的インスリン不足に至る
A.	自己免疫性
B.	特発性
II. 2型	インスリン分泌低下を主体とするものと、インスリン抵抗性が主体で、それにインスリンの相対的不足を伴うものなどがある
III. その他の特定の機序、疾患によるもの	
A.	遺伝因子として遺伝子異常が同定されたもの
B.	他の疾患、条件に伴うもの
IV.	妊娠糖尿病

■ウイルスに対する感染防御システム

ウイルス感染の抵抗性にかかわる第一線の防御は物理的、化学的障壁である皮膚粘膜である。皮膚粘膜は洗浄作用のある物理的なバリアであるのみでなく、汗や粘液中には、それぞれ乳酸や脂肪酸、ムチン、リゾチーム、ラクトフェリン、ディフェンシンなどが含まれ、洗浄作用のみならず抗ウイルス作用を発揮する。

次に、自然免疫と称される、食食、インターフェロンなどによるウイルス増殖抑制があげられる。ウイルスは、病原体関連分子パターン(pathogen

associated molecular pattern : PAMP) を認識する PRR (pattern recognition receptor) によって捕捉され、その刺激によって誘導される interferon releasing factor によって活発に遺伝子が発現し、インターフェロンが産生され、細胞外に放出される。遊離したインターフェロンは、インターフェロンレセプターに結合し、その刺激により JAK-Stat 経路を介して RNase などの抗ウイルス因子が産生されることによって抗ウイルス活性が発揮される⁷⁾。さらに、PRR を発現している樹状細胞がウイルス抗原を処理して T 細胞に提示することにより、ウイルス感染防御の主体を担う Th1 タイプの免疫応答が惹起される。Th1 反応は IL-12 によって誘導される転写因子 T-bet の作用により T 細胞から IL-2, interferon γ (IFN γ), tumor necrosis factor- β (TNF- β) が分泌され、活性化マクロファージや細胞傷害性 T 細胞などの細胞性免疫と、主要な IgG 抗体を誘導することによりウイルス感染を制御する⁸⁾。一方、C 型肝炎のインターフェロン治療中に膵島細胞に自己免疫が誘導される(膵島細胞自己抗体)ことにより 1 型糖尿病が発症することもよく知られていて、免疫応答の二面性、すなわち生体を守ることと、むしろ障害に傾くこともありうる事が理解できる⁹⁾。

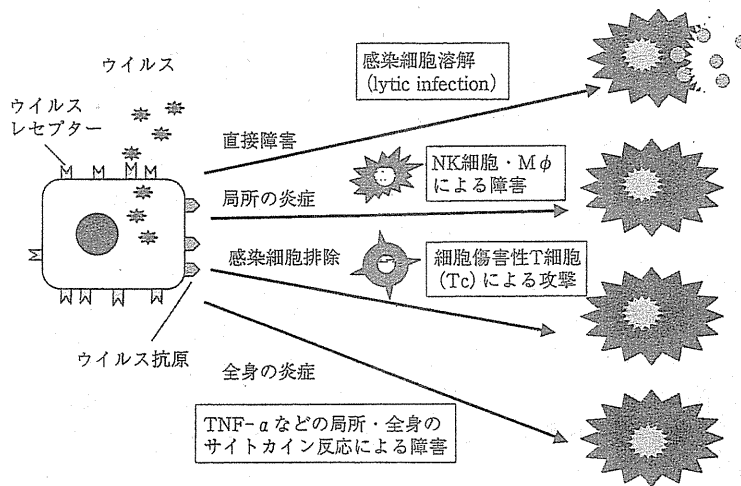


図 1a ウイルス感染によって惹起される膵島細胞障害のメカニズム

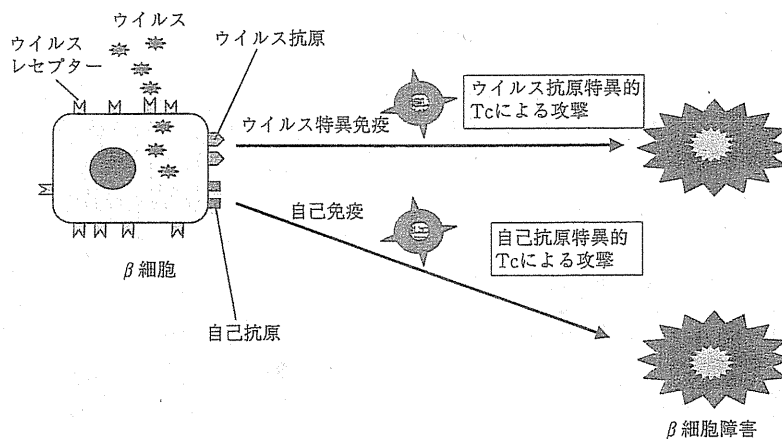


図 1b ウイルス感染細胞に対するウイルス特異的あるいは自己抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導

■ウイルスによる膵島細胞障害と糖尿病発症

ウイルス感染症が糖尿病を誘発する過程には、多くのメカニズムが想定される。具体的には、①ウイルスによる直接障害、②ウイルス感染細胞に対する特異的あるいは非特異的免疫機序による障害、③惹起された炎症細胞が放出する細胞傷害性物質による障害、などが考えられる (図 1a)。さらに、④ウイルス感染を契機として膵島β細胞特異的自己免疫が誘導されることもありうる¹⁰⁾。

■ウイルス感染をトリガーとした特異的自己免疫応答の活性化とその制御

1. ウイルス感染防御と自己免疫応答

ウイルス感染細胞は、偏性細胞内寄生体であるため、その増殖に宿主の複製機能を必要とする。その過程で、初期の核酸合成酵素などの早期抗原 (early antigen) は細胞表面に表出され、通常ウイルス特異的であるため、ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の標的となり、ウイルス感染細胞を障害排除する。その結果、成熟ウイルス粒子

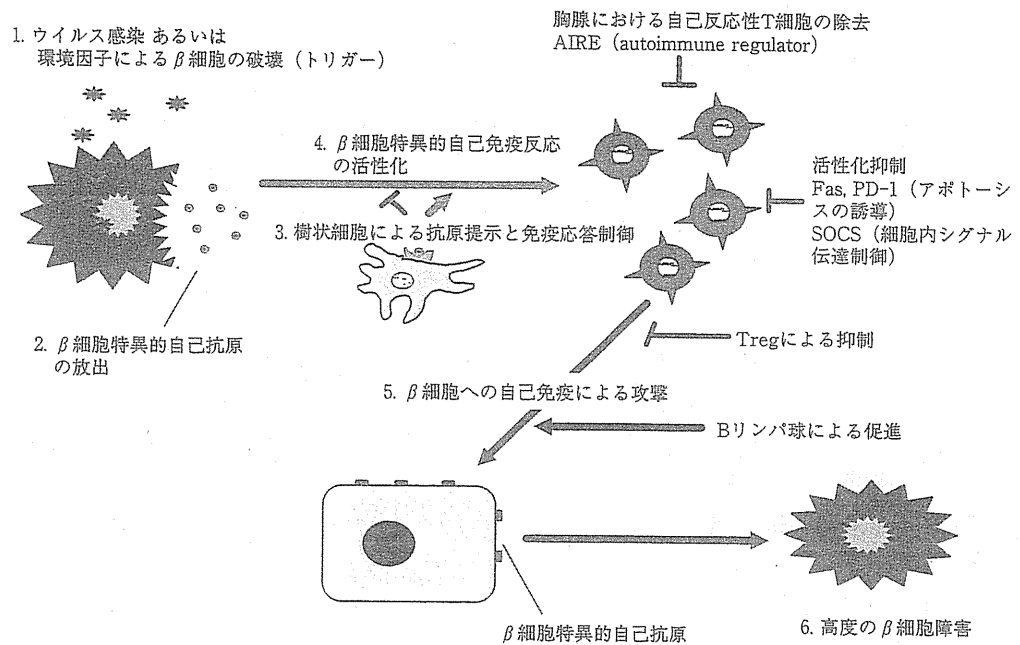


図2 ウイルス感染をトリガーとした膵島β細胞に対する自己免疫の誘導とその制御機構

の完成前に細胞機能が障害され、ウイルス増殖が抑制される。このことは、ウイルス抗原に対する免疫応答であるが、結果として自己細胞の障害に働くため、一面、自己免疫応答と類似する臨床像を呈しうる (図 1b)。例えば、持続的感染をきたす代表疾患である肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎、あるいは自己免疫性肝炎も肝細胞を障害することは同一の臨床像を呈し、その鑑別は困難である。膵島感染細胞に対する免疫応答にも同様のことが生じる可能性がある。慢性ウイルス感染としては、サイトメガロウイルス再活性化と免疫的膵島細胞障害は、そのよいモデルであると考えられる¹¹⁾。

2. 自己抗原の遊離とその認識

前述したようにウイルス感染細胞の障害により隠蔽されている自己抗原の表出誘導や自己抗原の遊離は、その後の自己反応性の惹起に働くことは容易に考えられる。そもそも自己反応性 T 細胞、あるいはβ細胞は、生体に少数であるが存在して

いることはよく知られているので、ウイルス感染細胞障害による自己抗原の提示により、このような非活性化状態の自己免疫反応がより強く、かつ継続して活性化されることは十分にありうる。ただし、その場合、自己免疫応答制御機構の障害、あるいは破綻が伴って初めて自己免疫糖尿病の発症につながるであろう。

3. 自己免疫応答制御機構の破綻と1型糖尿病

自己反応性は、様々なメカニズムで制御されている。最近の免疫学のトピックとして、中枢性の自己反応性 T 細胞の除去に働く自己免疫調節遺伝子 AIRE の同定と、末梢における自己反応性を制御する $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+ \text{CD4}^+$ 調節性 T 細胞 (Treg) の発見は、この分野に目覚ましい進歩をもたらした^{12,13)}。AIRE 遺伝子変異によりカンジダ症と臓器特異的の自己免疫が生じる。自己免疫の標的臓器は、一般に、副腎、副甲状腺が中心であるが、HLA タイプが1型糖尿病感受性であれば、1型糖尿病を合併し、1型糖尿病抵抗性では、む

しる典型的なアジソン病と副甲状腺機能低下の臨床像を呈する¹⁴⁾。一方, Treg の欠損では, むしろ 1 型糖尿病は主徴の一つである¹³⁾。このことは, Treg による末梢性の免疫応答調節が自己免疫糖尿病発症制御に, より重要であることを示唆している。

上述のウイルス感染に伴い β 細胞が破壊され, 少数の自己反応性 T 細胞が活性化されても, 制御性 T 細胞による反応抑制以前に, 活性化 T 細胞応答は, いくつかの活性化後制御メカニズムにより, その過剰な反応は抑制されている。T 細胞の活性化後のアポトーシス誘導に働く分子としては, 既知の Fas に加えて programmed cell death-1 (PD-1) 抗原の重要性が強調されている。また, 細胞内シグナル伝達制御に関しては, suppressor of cytokine signaling (SOCS) などの分子が同定され, 将来の治療への応用も期待されている¹⁵⁾。さらに最近, 臨床的に 1 型糖尿病の発症早期に β 細胞除去療法が有用であることが示され, 今後の展開が期待されている^{16,17)} (図 2)。

おわりに

パンデミックと称されるほど, 世界的に増加している糖尿病は, 生活習慣の問題も含め, 様々な要因が蓄積されるため発症することを考えれば, ウイルス感染が環境因子として糖尿病誘発の危険因子の一つでありうることは想像に難くない。確かに, これまでの臨床的あるいは基礎的研究から, ウイルス感染が糖尿病の直接の原因あるいは間接的誘因であることは十分ありうると推測されるが, その証拠は乏しいのが現状である。もし, あるウイルスが糖尿病誘発の要因の一つであることが判明すれば, ワクチンによる予防が可能となるであろう。ただし, 現時点では, ウイルス感染を契機にして糖尿病を発症した症例について, ウイルス感染が原因であることを証明することは困難である。まず, 膵島細胞に親和性が高いウイルスを同定するような, ウイルスの糖尿病誘発性検定システムの開発が喫緊の課題であると考えられる。

- 1) 永淵正法: 糖尿病発症に関するウイルス感染症-糖尿病ウイルス原因説-. 月刊糖尿病 1(1): 144-151, 2009.
- 2) Vehik K, Dabelea D: The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes Metab Res Rev* 26: 2010, in press.
- 3) Jenson AB, Rosenberg HS, Notkins AL: Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections. *Lancet* 2: 354-358, 1980.
- 4) 今川彰久, 花房俊昭: 劇症 1 型糖尿病. 月刊糖尿病 1(6): 55-60, 2009.
- 5) Yoon JW: The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Current Top Microbiol Immunol* 164: 95-123, 1990.
- 6) Kounoue E, Izumi K, Ogawa S *et al.*: The significance of T cells, B cells, antibodies and macrophages against encephalomyocarditis (EMC)-D virus-induced diabetes in mice. *Arch Virol* 153: 1223-1231, 2008.
- 7) Takeuchi O, Akira S: Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227: 75-86, 2009.
- 8) 永淵正法, 塚本 浩, 新納宏昭ほか: 自己免疫疾患と炎症. 細胞工学 29: 769-775, 2010.
- 9) 及川洋一, 島田 朗: インターフェロン治療と 1 型糖尿病. 臨床とウイルス 38: 2010, 印刷中
- 10) 永淵正法, 近藤しおり: 自己免疫性 1 型糖尿病とウイルス感染. *Diabetes Frontier* 21: 314-319, 2010.
- 11) Pak CY, Eun HM, McArthur RG *et al.*: Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2: 1-4, 1988.
- 12) Nagamine K, Peterson P, Scott HD *et al.*: Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17: 393-398, 1997.
- 13) Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352, 2005.
- 14) Kogawa K, Kudoh J, Nagafuchi S *et al.*: Distinct clinical phenotype and immunoreactivity in Japanese siblings with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS-1) associated with compound heterozygous novel AIRE gene mutations. *Clin Immunol* 103: 277-283, 2002.
- 15) Yoshimura A, Naka T, Kubo M: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7: 454-465, 2007.
- 16) Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H *et al.*: Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 361: 2143-2152, 2009.
- 17) Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K: Rituximab, B-lymphocyte depletion, and beta-cell function. *N Engl J Med* 362: 761, 2010.

Chapter 5 Encephalomyocarditis Virus

[AU1] **Seiho Nagafuchi, Hironori Kurisaki, and Hitoshi Katsuta**

Introduction

Accumulating evidence has suggested a viral origin of type 1 diabetes development. Historical study has indicated the presence of certain viruses including coxsackie virus, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, and rubella virus in patients with fatal viral infections associated with pancreatic islet cell damage (Jenson et al. 1980), suggesting that many viruses have potent diabetes inducers. Recent advances in the field have focused on the enteroviral infection as the most possible candidate virus to induce type 1 diabetes associated with immunopathologic reaction (Clements et al. 1995; Hanafusa and Imagawa 2008; Tauriainen et al. 2011; Richardson et al. 2011).

Encephalomyocarditis (EMC) virus has provided the most useful animal model for virus-induced type 1 diabetes (Jun and Yoon 2001). Development of diabetes depends on many factors including virus strain, challenge dose, host factors such as sex, immunoprotective function, inflammatory responses with macrophages, cytokines, chemokines and chemical mediators (Jun and Yoon 2001). Autoimmunity induction is not likely to operate in this model, though a hit-and-run event cannot be excluded. The clarification of the pathogenesis of EMC virus-induced diabetes will not only promote a better understanding of the mechanisms of virus-induced diabetes, but also enhance the protection strategy against virus-induced diabetes. The history and pathogenesis of EMC virus-induced diabetes are described, and the future aspects of the significance of this animal model of virus-induced diabetes are discussed.

S. Nagafuchi, M.D., Ph.D. (✉) • H. Kurisaki • H. Katsuta
Department of Medical Science and Technology, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan
e-mail: nagafuchi@shs.kyushu-u.ac.jp

A. Toniolo (ed.), *Diabetes and Viruses*. DOI 10.1007/978-1-4614-4051-2_5,
© Springer Science+Business Media New York 2012

25 The EMC Virus

26 Encephalomyocarditis virus belongs to the Picornaviridae family, as enteroviruses
 27 including coxsackie virus, genus cardiovirus, unenveloped, icosahedral structure
 28 (Fig. 5.1a) consisting of four capsid proteins (VP1~4), surrounding a core of
 29 ssRNA, moderately resistant to acidic pH (Racaniello 2007). The virion contains
 30 one molecule of positive sense, ssRNA, about 7.8 kb in size, containing a single
 31 open reading frame (ORF) (Fig. 5.1b) (Racaniello 2007). The virus can be grown in
 32 a tissue culture well with a one step replication time of about 8 h (Fig. 5.1c), and can
 33 infect rodents, usually producing systemic infection representing encephalitis and
 34 myocarditis. The virus rarely infects humans. Craighead and McLane (1968) first
 35 found that the M variant of the EMC virus certainly induced diabetes in several
 36 susceptible strains of male mice. Later, Yoon et al. (1980) isolated the highly diabe-
 37 togenic D variant of EMC virus and the non-diabetogenic B strain of the EMC
 38 virus, by the plaque clone purification method. EMC-D virus produces diabetes in
 39 over 90% of infected susceptible strain of mice, while EMC-B virus did not induce
 40 diabetes in any strain of mice (Yoon et al. 1980). The susceptibility depends on the
 41 strain of mice and sex, namely only male mice are susceptible to the virus (Ross
 42 et al. 1975; Yoon et al. 1980; Huber et al. 1985). These findings accelerated the
 43 study of viral genetic factors to enhance the induction of diabetes in susceptible
 44 animals as well as research on pathogenesis (Fig. 5.2).

[AU2]

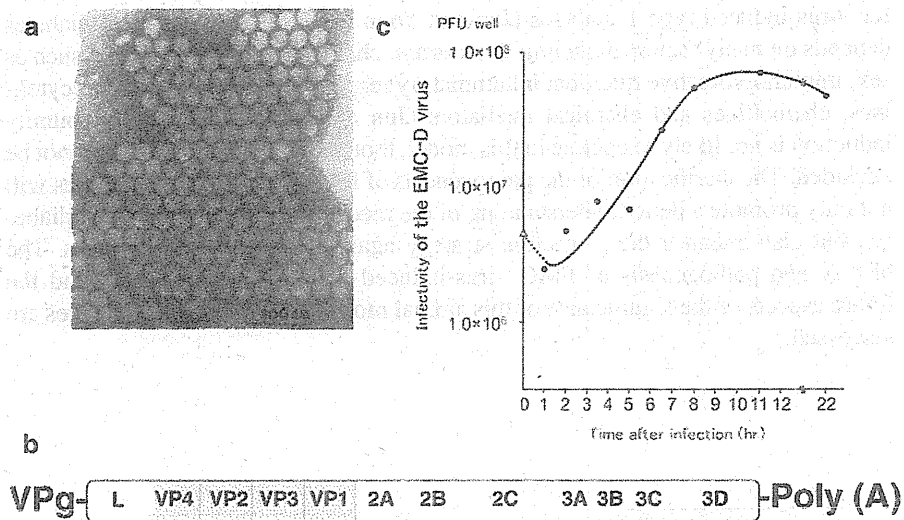


Fig. 5.1 Characteristics of encephalomyocarditis. (a) Negative stain of EMC-D virus. Courtesy of Dr. Yuji Ueki and Emeritus Professor Kazunobu Amako, Kyushu University. (b) Growth curve of EMC-D virus in mouse embryonic fibroblasts. (c) Genomic structure of EMC virus

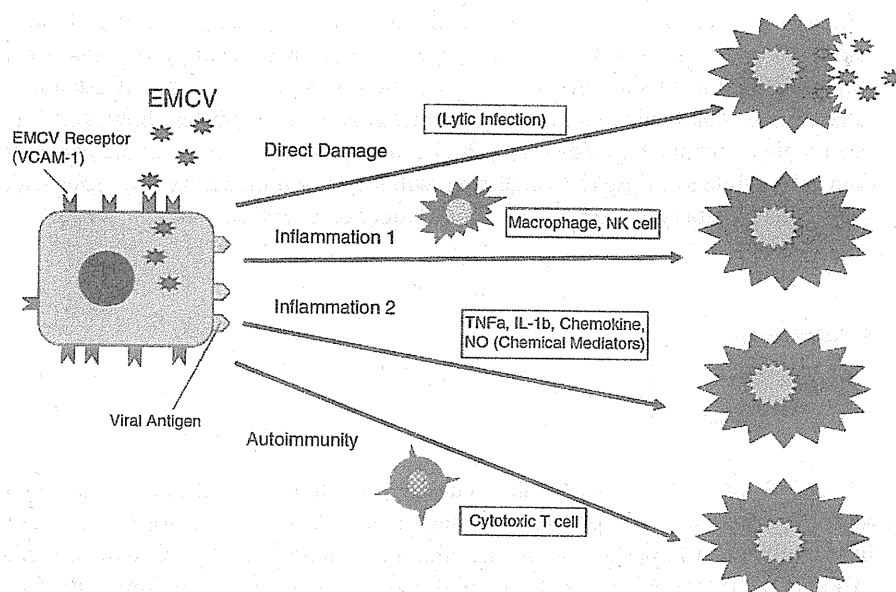


Fig. 5.2 Mechanisms of pancreatic β -cell damage due to EMCV infection

Pathogenesis of EMC Virus-Induced Diabetes

45

EMC Virus

46

[AU3]

The differing diabetogenicity among EMC viruses has been noted to be dependent on the genetic variation. First, the M variant of EMC virus was obtained as highly diabetogenic, and later the diabetogenic EMC-D virus and the non-diabetogenic B variant were isolated, respectively (Craighead and MacLane 1964; Yoon et al. 1980). Although EMC-D virus and EMC-B virus could not be distinguished by either neutralization assay or competitive radioimmunoassay (Yoon et al. 1980), examination of the complete nucleotide sequences of the genomes of both variants showed that they were different in only 14 nucleotide positions (Eun et al. 1988; Bae et al. 1989). Further molecular analysis by generating mutant viruses revealed that a "G" base at position 3155 ([GCC] Ala-776) is common to all diabetogenic variants, while an "A" base at the same position ([ACC] Thr-776) is common to all non-diabetogenic variants (Bae and Yoon 1993). Therefore, only one amino acid, alanine (776th amino acid on the polyprotein), is essential for the diabetogenicity of the EMC virus (Bae and Yoon 1993). These beautiful studies revealed that the single point mutation of "A" to "G" at position 3155 (Thr-776 to Ala-776) are critical to operate as the diabetogenic EMC virus (Jun et al. 1997). It was found that a change from Thr-776 to Ala-776 reduced the hydrophilicity of the region by 37%,

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64 which may increase the efficiency of viral attachment to pancreatic beta cells (Kang
65 and Yoon 1993; Jun et al. 1997, 1998), suggesting that the significance of the genetic
66 difference had been supposed to influence the effectiveness of the attachment for
67 beta cells. A challenge dose is not critical for inducing diabetes; however, it has
68 been indicated that a high dose (10^5) PFU challenge destroys directly the pancreatic
69 beta cells, while low dose (10^2) challenge will induce inflammatory responses which
70 may damage beta cells (Yoon et al. 1980; Huber et al. 1985).

71 Protection

72 *Innate Immunity*

73 Since the EMC virus-induced diabetes develops within 3 days after infection, innate
74 immunity, such as macrophages, interferons, and early inflammatory responses, is
75 likely to be most important for determining the outcome after EMC virus infection
76 (Yoon et al. 1980). Recent advances in the immunology of innate immunity found
77 the significance of pattern recognition receptors (PRRs) directed against pathogen-
78 associated molecular patterns (PAMPs) (Takeuchi and Akira 2009). They include
79 toll-like receptors (TLR), and intracellular helicase such as melanocyte differentia-
80 tion antigen (MDA) 5 for picornavirus retinoic acid inducible gene (RIG) I, and
81 interferon induced with the helicase C domain 1 (IFIH1) for paramyxovirus. It was
82 reported that polymorphism of the IFIH1 gene is associated with type 1 diabetes
83 (Smyth et al. 2006), although it remains uncertain whether this may be associated
84 with the viral infection. In EMC virus infection, TLR 3, 7, 8, and MDA-5 function
85 as receptors, mediating the signal transduction pathway, inducing cellular activation
86 including interferon production (Takeuchi and Akira 2009). McCartney et al. (2011)
87 reported that MDA5 and TLR3 are both required to prevent diabetes in mice infected
88 with EMC-D virus. Infection of *Tlr3*^{-/-} mice caused diabetes due to impaired IFN-I
89 responses and virus-induced β -cell damage rather than T-cell-mediated autoimmu-
90 nity (McCartney et al. 2011). Mice lacking just one copy of MDA5 developed tran-
91 sient hyperglycemia when infected with EMCV-D, whereas homozygous
92 *MDA5*^{-/-} mice developed severe cardiac pathology (McCartney et al. 2011). TLR3
93 and MDA5 controlled EMC-D virus infection and diabetes by acting in hematopoi-
94 etic and stromal cells, respectively, inducing IFN-I responses at kinetically distinct
95 time points (McCartney et al. 2011). They conclude that optimal functioning of
96 viral sensors and prompt IFN-I responses are required to prevent diabetes in this
97 animal model, suggesting the significance of PRR-dependent innate immunity acti-
98 vation (McCartney et al. 2011).

99 Regarding the role of interferon, conflicting data in this model have been reported
100 (Kaptur et al. 1989; Hirasawa et al. 1995). One study reported that interferon may
101 worsen the EMC-D virus-induced diabetes (Kaptur et al. 1989), and others point to

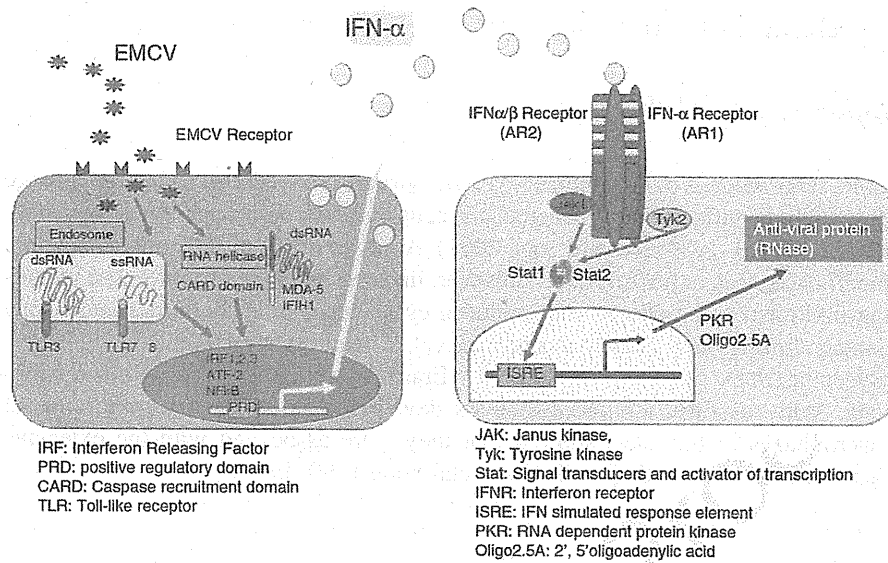


Fig. 5.3 Interferon production following EMCV infection and induction of anti-viral substances by interferon receptor signaling pathway

the significance of protective role of interferon (Hirasawa et al. 1995; McCartney et al. 2011). Possibly the challenge dose of EMC-D virus may alter the protective and/or pathogenic role of interferon in this model (Fig. 5.3).

Adaptive Immunity

[AU4]

Because EMC virus-induced diabetes develops as early as 3–5 days after infection, acquired and/or adaptive immunity did not likely play an important role (Yoon et al. 1980; Kounoue et al. 2008). Susceptibility to EMC-D virus-induced diabetes is not controlled by the MHC type, and passive transfer of lymphocytes from mice made diabetic mice with EMC-D virus into normal mice failed to produce diabetes (Yoon et al. 1985). In addition, T-cell-deficient nude mice, B-cell-deficient (muMT) mice, or both T-cell- and B-cell-deficient Rag-2 knockout mice could resist against EMC-D virus-induced diabetes (Kounoue et al. 2008), indicating that adaptive immunity did not affect the outcome of virus-induced diabetes. On the other hand, adoptively transferred antibody to the EMC virus was effective when given before and within 36 h after infection (Kounoue et al. 2008), suggesting that early adoptive antibody transfer or vaccination before infection may work to protect against EMC virus-induced diabetes.

119 **Accelerating Factors**120 ***Inflammatory Cells***

121 EMC virus belongs to the group of cytolytic viruses, and therefore a large challenge
122 dose with the virus destroys pancreatic β -cells extensively enough to lead to diabe-
123 tes (Yoon et al. 1980; Jun and Yoon 2001). At lower doses of infection, pancreatic
124 β -cell damage is rather minimal. However, induced inflammatory response includ-
125 ing infiltrated macrophages and produced cytokines and chemical mediators may
126 damage further the β -cells to a reduced level of insulin secretion, leading to hyper-
127 glycemia (Baek and Yoon 1990, 1991; Hirasawa et al. 1997). Indeed histopatho-
128 logic study of EMCV-induced animals developing insulinitis with infiltration of
129 macrophages to the islets showed that they were associated with the extensive
130 destruction of pancreatic β -cells (Baek and Yoon 1990, 1991).

131 **Cytokines, Chemokines, and Chemical Mediators**

132 Interleukin-1 and tumor necrosis factor (TNF) α were suggested to function as key
133 mediators of pancreatic beta-cell destruction, inducing DNA fragmentation
134 (Hirasawa et al. 1997; Rabinovitch et al. 1994). Nitric oxide may work as a damag-
135 ing factor to worsen the deterioration of pancreatic β -cell function (Fehsel et al.
136 1993). Infiltrated macrophages may be responsible to produce those cytotoxic
137 mediators (Hirasawa et al. 1997). Recently, it was reported that the CXCR3 ligand
138 CXCL10 was produced by enterovirus-infected pancreatic β -cells, attracting cyto-
139 toxic T cells and macrophages, expressing CXCR3, associated with the induction of
140 insulinitis, leading to β -cell damage (Tanaka et al. 2009).

141 **Other Chemicals**

142 Streptozoin and alloxan are well-known diabetogenic substances, inducing DNA
143 strand breaks and poly ADP ribose synthetase, which lead to the lack of ATP in
144 pancreatic β -cells, resulting in extensive β -cell damage (Yamamoto et al. 1981).
145 Some possible chemicals exist in the environment such as streptozoin, which is a
146 compound of nitrourea and glucose; ta streptoxocin-like substance may be gener- [AU5]
147 ated reacting with nitrosamines in food and water, and glucose. In addition, alloxan
148 can be derived from uric acid in the purine metabolism pathway by oxidation with
149 superoxide substance (Santos et al. 1999). The produced alloxan would possibly
150 work as a β -cell-specific cytotoxic chemical. Although these possible chemicals to
151 induce β -cell damage have not been proved to operate in the environment, it should
152 be noticed that they may work as a risk factor in addition to viral infection.