



NODマウス膵ラ島細胞におけるICAM-1の発現とその膵β細胞破壊における意義

八木, 規夫

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1302

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001302>

※ 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。



氏名・(本籍)	八木規夫 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第910号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年3月31日
学位論文題目	NODマウス膵ラ島細胞におけるICAM-1の発現とその膵β細胞破壊における意義

審査委員	主査 教授 春日雅人
	教授 佐藤茂秋 教授 前田盛

論文内容の要旨

<緒言>

個体の発生、分化には細胞間の接着が必要であり、この現象は接着分子により仲介される。近年、炎症性疾患、自己免疫疾患の発症機構に関して、これら接着分子の役割が重要視されてきている。ICAM-1はIgGスーパーファミリーに属する接着分子の一つで、接着分子LFA-1をカウンターレセプターとし、その発現が活性化リンパ球、抗原提示細胞、血管内皮細胞などに認められる糖蛋白であり、細胞間、特にTリンパ球の接着ならびに情報伝達を補助するなど数多くの生体内の免疫応答に関与している。

今回、I型(インスリン依存型)糖尿病のモデル動物であるNODマウス膵ラ島におけるICAM-1の発現を組織学的に検索し、次いでNODマウスの膵ラ島浸潤単核細胞よりCD8陽性の膵β細胞特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)をクローン化し、このCTLの膵β細胞破壊におけるICAM-1/LFA-1 pathwayの関与について検討した。

<方法>

(1) NODマウス膵組織におけるICAM-1(及びLFA-1)の免疫組織学的検討

NODマウス膵ラ島周囲におけるICAM-1の発現を免疫組織化学的に検討するため、20週齢NODマウスをパラホルムアルデヒドにて還流固定後、膵臓を摘出して凍結切片を作製し1次抗体抗ICAM-1ラットモノクローナル抗体(KAT-1)、2次抗体HRP標識抗ラットIgG抗体を用い、DABにて発色させ光学顕微鏡にて顕鏡した。電顕にて観察するため、切片をカコジル酸バッファーにて固定し、QY-1で処理後、エボン封埋し、薄切切片をLKBウルトラトームのダイヤモンドナイフで作製し電子顕微鏡で観察した。

(2) サイトカイン刺激によるMIN6N8a細胞のICAM-1発現

NODマウス膵β細胞由来のインスリノーマ細胞株MIN6N8a細胞におけるICAM-1の発現を検討するため、MIN6N8a細胞を種々の濃度のIFN-γおよびTNF-α存在下で3

日間培養後、1次抗体としてラット抗マウスICAM-1抗体(YN1/1.7)を、2次抗体としてFITC標識抗ラットIgG抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

(3) ^{51}Cr release assay

NODマウスより樹立した膵 β 細胞特異的CD8陽性T細胞クローン(YNK1.3)のMIN6N8a細胞(H-2:K^dD^b)、ならびにC57BL/6マウス由来のインスリノーマ細胞株MIN6細胞(H-2:K^bD^b)に対する細胞障害性を ^{51}Cr release assayを用いて検討した。200U/mlのIFN- γ と37°C2日間インキュベーションしたMIN6N8a細胞並びにMIN6細胞とIFN- γ を加えずに同期間培養したMIN6N8a細胞を用意した。これらの細胞を ^{51}Cr にてラベルし、これにエフェクター細胞であるYNK1.3を種々のeffector:target(E:T) ratioで加えた。37°C、8時間インキュベーションした後、上清を回収し放射活性を調べた。

(4) 抗ICAM-1、抗LFA-1モノクローナル抗体のYNK1.3のMIN6N8a細胞に対する細胞障害性に及ぼす影響

^{51}Cr でラベルしたMIN6N8a細胞に、種々の濃度の抗ICAM-1、抗LFA-1抗体を加え37°C2時間反応させた。次いで同数のYNK1.3を加え37°C8時間培養し上記の方法で ^{51}Cr の放出を調べた。

<結果>

(1) NODマウス膵におけるICAM-1の発現

光顕レベルでは、ICAM-1の発現はラ島内及び周囲の血管内皮ならびに浸潤リンパ球で認められたが、ラ島細胞には明らかな陽性所見を認めなかった。免疫電顕では、ラ島に浸潤した単核球及び隣接した膵ラ島 β 細胞にもICAM-1の発現が確認できた。LFA-1の発現はリンパ球以外には認めなかった。

(2) サイトカインによるMIN6N8a細胞のICAM-1分子誘導

サイトカイン未処理とTNF- α のみで刺激したMIN6N8a細胞ではICAM-1の発現はほとんど確認できなかった。IFN- γ で刺激したMIN6N8a細胞では濃度依存性にICAM-1の発現は増加した。また、TNF- α とIFN- γ の両者で刺激した細胞については相乗効果がみられICAM-1の発現はさらに増加した。サイトカインによるMHCクラスI分子(H-2K^d)の発現についてもほぼ同様の傾向がみられた。

(3) ^{51}Cr release assayを用いた細胞障害性試験

YNK1.3はMIN6細胞に対しては障害性を示さなかったが、MIN6N8a細胞に対しては明らかな障害性を示し、IFN- γ 刺激MIN6N8a細胞では、その障害性は全てのE:T ratioにおいてIFN- γ 非添加時と比して増強していた。このことよりIFN- γ により誘導された接着分子によりCTLによる細胞障害性が促進されることが示唆された。また、この障害性は抗K^d抗体によりほぼ完全に抑制されたが、抗D^b抗体はほとんど影響を与えなかった。このことよりYNK1.3はK^d拘束性細胞障害性T細胞であることが確認された。

(4) 抗ICAM-1、抗LFA-1抗体による細胞障害性抑制効果

抗ICAM-1、抗LFA-1モノクローナル抗体は、それぞれ単独ではYNK1.3のMIN6N8a細胞に対する細胞障害性をコントロール抗体に較べて軽度抑制したにすぎなかった。しかし抗ICAM-1+抗LFA-1モノクローナル抗体の存在下では、その障害性は著しく

抑制されることが明らかとなった。

< 考 察 >

ヒト I 型糖尿病剖検膵の組織学的検討では主に CD 8 陽性 T 細胞のラ島への浸潤が報告されており、I 型糖尿病の発症機構に膵 β 細胞特異的な細胞障害性 T リンパ球によるラ島の破壊が推定されている。CD 8 陽性 T 細胞が標的細胞を認識し破壊する際に T リンパ球の T 細胞レセプターと標的細胞の MHC クラス I 分子に組み込まれた抗原ペプチドとの結合が重要であるが、この結合の親和性は弱く T 細胞が細胞障害性を示すのに十分でないといわれており、抗原非特異的な接着分子などを介した強固な細胞間接着と副情報伝達経路がキラー活性発現に必要とされている。したがって、CD 8 陽性 T リンパ球が β 細胞を破壊する機序としては、サイトカインにより β 細胞上に接着分子の発現が増加し、やがて互いの細胞が接着し、T リンパ球からのパーフォリンなどの分泌顆粒により最終的に破壊されるのではないかと考えられる。人や糖尿病モデル動物の膵ラ島炎においては、浸潤細胞、特にマクロファージからの IL-1、TNF- α 、T リンパ球からの TNF- α 、IFN- γ など様々なサイトカインが分泌されていることが推定される。これらのサイトカインは ICAM-1 の発現を増強させることから、 β 細胞の破壊機序に ICAM-1 の関与が推測される。今回の検討では MIN 6 N 8 a 細胞における ICAM-1 の発現は IFN- γ 刺激時に出現し、TNF- α と IFN- γ を加えた場合には相乗的に ICAM-1 の発現は増強した。また電顕的に膵ラ島 β 細胞の ICAM-1 の発現を確認したが、抗 IFN- γ 抗体の投与でラ島炎の抑制が認められ、TNF- α 産生細胞はラ島炎浸潤細胞の数%以下という報告などから、in vivo では IFN- γ が中心となり ICAM-1 発現を増強させて T リンパ球による β 細胞破壊が進行する可能性があると考えられる。

YNK1.3 は MIN 6 N 8 a 細胞に対して強い細胞障害性があり、IFN- γ 刺激にてその障害性は増強した。IFN- γ 刺激により MIN 6 N 8 a 細胞上に ICAM-1 分子以外に MHC クラス I 分子の発現増強が認められ、これらの分子発現が CTL の cytolysis の感受性を引き上げているものと考えられる。この細胞障害性は抗 ICAM-1 + 抗 LFA-1 モノクローナル抗体の存在下で抑制されることが確認された。従って誘導されたこれらの接着分子により YNK1.3 と MIN 6 N 8 a 細胞の接着が強固になり、細胞間の情報伝達、破壊機序の促進が生じたものと考えられる。抗 ICAM-1 及び抗 LFA-1 モノクローナル抗体単独では YNK1.3 の MIN 6 N 8 a 細胞に対する細胞障害性をほとんど抑制できなかったが、この抗 LFA-1 抗体と抗 ICAM-1 抗体の相乗作用メカニズムは LFA-1 が ICAM-1 以外にすくなくとも ICAM-2、ICAM-3 というリガンドを持ち、また ICAM-1 も同様に LFA-1 以外に Mac-1、CD43 などのカウンターレセプターを有するという事に起因するのかもしれない。

< 結 語 >

- (1) NOD マウスの膵ラ島浸潤リンパ球、血管内皮及び浸潤リンパ球に近接したラ島細胞に ICAM-1 の発現が確認された。
- (2) MIN 6 N 8 a 細胞では、IFN- γ との培養後には、濃度依存性に ICAM-1 の発現が増強し、TNF- α による相乗作用も認められた。
- (3) YNK1.3 による MIN 6 N 8 a 細胞に対する細胞障害性は IFN- γ 刺激後には著明に上昇していた。
- (4) YNK1.3 による細胞障害性は、抗 ICAM-1 + 抗 LFA-1 モノクローナル抗体の存在下

でほぼ完全に抑制された。

以上より、NODマウス膵ラ島浸潤免疫細胞から分泌されたサイトカインにより、ラ島細胞には反応性に接着分子ICAM-1の発現が増強され、T細胞によるβ細胞破壊が促進されていることが明らかになった。更に、このICAM-1/LFA-1 pathwayの抗体等による抑制がI型糖尿病の発症予防に有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

個体の発生、分化には細胞間の接着が必要であり、この現象は接着分子により仲介される。近年、炎症性疾患、自己免疫疾患の発症機構に関して、これら接着分子の役割が重要視されてきている。ICAM-1はIgGスーパーファミリーに属する接着分子の一つで、接着分子LFA-1をカウンターレセプターとし、その発現が活性化リンパ球、抗原提示細胞、血管内皮細胞などに認められる糖蛋白であり、細胞間、特にTリンパ球の接着ならびに情報伝達を補助するなど数多くの生体内の免疫応答に関与している。

そこで今回、著者はI型（インスリン依存型）糖尿病のモデル動物であるNODマウス膵ラ島におけるICAM-1の発現を組織学的に検索し、次いでNODマウスの膵ラ島浸潤単核細胞よりCD8陽性の膵β細胞特異的細胞障害性Tリンパ球（CTL）をクローン化し、このCTLの膵β細胞破壊におけるICAM-1/LFA-1 pathwayの関与について検討した。

その結果、免疫電顕において、ラ島に浸潤した単核球及び隣接した膵ラ島β細胞にICAM-1の発現が確認できた。IFN-γで刺激したNODマウス由来のinsulinoma細胞株MIN6N8a細胞では濃度依存性にICAM-1の発現は増加した。また、TNF-αとIFN-γの両者で刺激したMIN6N8a細胞については相乗効果がみられICAM-1の発現はさらに増加した。サイトカインによるMHCクラスI分子（H-2K^d）の発現についてもほぼ同様の傾向がみられた。CD8陽性のNOD膵β細胞特異的細胞障害性Tリンパ球（CTL）であるYNK1.3は、MIN6N8a細胞に対しては明かな障害性を示し、IFN-γ刺激MIN6N8a細胞では、その障害性はIFN-γ非添加時と比して増強していた。このことよりIFN-γにより誘導された接着分子によりCTLによる細胞障害性が促進されることが示唆された。また、この障害性は抗K^d抗体によりほぼ完全に抑制されたが、抗D^d抗体はほとんど影響を与えなかった。このことよりYNK1.3はK^d拘束性細胞障害性T細胞であることが確認された。抗ICAM-1、抗LFA-1モノクローナル抗体は、それぞれ単独ではYNK1.3のMIN6N8a細胞に対する細胞障害性をコントロール抗体に較べて軽度抑制したに過ぎなかった。抗ICAM-1+抗LFA-1モノクローナル抗体の存在下では、その障害性は著しく抑制されることが明かとなった。

これらの結果より、NODマウス膵ラ島浸潤免疫細胞から分泌されたサイトカインにより、ラ島細胞には反応性に接着分子ICAM-1の発現が増強され、T細胞によるβ細胞破壊が促進されていることが明らかになった。更に、このICAM-1/LFA-1 pathwayの抗体等による抑制がI型糖尿病の発症予防に有用である可能性が示唆された。

以上本研究は、I型（インスリン依存型）糖尿病について、その発症機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった接着分子ICAM-1/LFA-1 pathwayの関与について、重要な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、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。