



# インスリン依存型糖尿病の発症機構に関する研究 : 自己免疫性糖尿病の初期反応における接着分子の役割

森山, 啓明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Date of Publication)

2014-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1556

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3116904>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001556>

※ 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。



# インスリン依存型糖尿病の発症機構に関する研究

－ 自己免疫性糖尿病の初期反応における接着分子の役割 －

神戸大学医学部内科学第二講座（指導：春日 雅人教授）

森 山 啓 明

神戸大学医学部紀要 第56巻 第2号 抜刷

平成 8 年 3 月

# インスリン依存型糖尿病の発症機構に関する研究

— 自己免疫性糖尿病の初期反応における接着分子の役割 —

神戸大学医学部内科学第二講座（指導：春日 雅人教授）

森 山 啓 明

（平成8年1月29日受付）

## 要 約

自己免疫性糖尿病発症過程の初期反応における接着分子の役割を解析する為、本疾患のモデル動物であるNODマウスの幼若期に抗接着分子抗体を投与した。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与にて糖尿病だけでなく、膵ラ島炎もほぼ完全に阻止し得た。しかし10週齢での短期投与では糖尿病発症を阻止できなかった。一方、抗CD80及び抗CD86抗体短期投与は2週齢投与あるいは10週齢投与にても糖尿病発症を促進し、この傾向は抗CD80抗体単独投与でも認められた。これらの結果は自己免疫性糖尿病の初期にLFA-1とICAM-1の両分子が重要な役割を果たしており、両分子抗体により膵β細胞抗原に対しトレランス（免疫寛容）が成立することを示唆し、以下両抗体で処置したマウス膵細胞を用い、そのメカニズムの解析を進めた。1）糖尿病発症NODマウス膵細胞を放射線照射NODマウスへ移入し糖尿病を発症させる系に、抗体投与NODマウス膵細胞を同時移入しても発症抑制効果を認めなかった。さらに若齢NODマウスへの移入でも自然発症糖尿病を阻止できなかった。これらの結果より抗体投与によりSuppressor activityは十分には誘導されないと考えられた。2）抗体投与NODマウス膵細胞をNOD-scidマウスへ移入しても糖尿病を誘導できず、両抗体投与によるエフェクター細胞のクローン除去あるいは不活化も考えられた。3）しかし、in vitroでは抗体投与NODマウス膵T細胞は膵ラ島及び膵ラ島抗原の一つと考えられるGAD65に増殖反応を示した。以上の結果より、NODマウス幼若期におけるLFA-1/ICAM-1 pathwayの一過性の遮断が特殊な末梢トレランスの誘導を惹起し得たと考えられ、LFA-1/ICAM-1 pathwayは自己免疫性糖尿病の初期反応に不可欠なものと考えられた。

## 緒 言

様々な細胞群により構成される免疫系においてleukocytes function-associated antigen-1(LFA-1)/intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) pathwayを始め、CD80、CD86/CD28、very late antigen-4(VLA-4)/vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)等の細胞間接着分子群は単に細胞間の接着に働くだけでなく、細胞分化、細胞増殖、細胞の血管外への浸潤、サイトカイン産生、細胞障害性等の種々の反応に重要な働きを有することが明らかとなってきている<sup>1, 2, 3, 4)</sup>。マクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞とT細胞との反応の際には、抗原ペプチドの結合したMHC分子とT細胞受容体を介する主シグナル(first signal)に対し、細胞間接着分子群が副シグナル(second signal, costimulatory signal)と呼ばれる細胞内シグナル伝達能を持ち、主シグナルに修飾を加え、抗原非特異的でMHC非拘束性でありながらその反応に大きな影響を与えていることも明らかになりつつある<sup>1, 2, 3, 4, 5)</sup>。このように多くの研究が免疫反応における接着分子群の重要性を明らかにしているが、実際の生体内の多様に複雑な免疫反応における個々の接着分子の詳細な機能やその生理的意義についてはまだ不明な点が多い。

インスリン依存型糖尿病(IDDM)は臓器特異的なT細胞依存性の自己免疫性疾患である<sup>6)</sup>。しかしその詳細な発症機序は不明な点が多く、現在のところその発症を予知し、予防することは困難な状況である。NODマウスは膵ラ島への単核細胞浸潤(膵ラ島炎, insulinitis)とそれに引き続いて起こる膵β細胞破壊による顕性糖尿病発症を特徴とするヒトIDDMの優れたモデル動物である<sup>7)</sup>。我々は最近、細胞間接着分子群の重要な一組であるLFA-1/ICAM-1 pathwayがNODマウスの自己免疫性糖尿病発症に深く関与していることを報告した<sup>8, 9)</sup>。この報告の中で我々は

キーワード：インスリン依存型糖尿病，接着分子，トレランス

LFA-1/ICAM-1 pathway が組織学的に顕性化したあとの膵ラ島炎の進展や膵β細胞破壊などのIDDM発症のエフェクター期に重要な役割を有することを示した。そこで今回は、膵ラ島炎が発生する以前、つまり糖尿病を引き起こすT細胞の活性化が最初に起こると考えられる時期、5週齢以前のNODマウスに抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体をはじめ、抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体、抗CD80及び抗CD86抗体等の各種抗接着分子抗体を投与しこれらの接着分子の自己免疫性糖尿病の発症早期における免疫学的意義を解析した。

## 方 法

### (1) マウス

雌雄のNODマウスは神戸大学医学部附属動物実験施設において維持されているNOD/Shi/Kbコロニーを使用した。我々のコロニーでは5-7週齢に膵ラ島炎が顕性化し、加齢とともに増強する。30週における累積糖尿病発症率は雄で5%、雌で65%である。NOD-scidマウスは中央動物実験施設の日置先生から御供与いただいた。C3H/Heマウスはクレアから購入した。動物はすべて神戸大学動物実験施設のガイドラインに基づいて取り扱われた。

### (2) 単一クローン性抗体

LFA-1のαサブユニットCD11aに対する単一クローン性抗体であるKBA(rat IgG2a)、ICAM-1に対するYN/1.7(rat IgG2b)及びKAT-1(rat IgG2a)、B7(CD80)に対するRM80(rat IgG2a)、B70(CD86)に対するPO3(rat IgG2a)、VLA-4に対するPS2(rat IgG2b)、VCAM-1に対するMK2(rat IgG2a)、LFA-1のβサブユニットCD18に対する抗体であるM18/2(rat IgG2a)を各々分泌するハイブリドーマを継代培養した。これらのハイブリドーマ細胞は順天堂大学免疫学教室の奥村教授及び八木田助教授より御供与いただいた。M18/2はin vitroにおいて細胞障害性をブロックしない為、コントロール抗体として使用した。これらのハイブリドーマ細胞をテトラメチルペンタデカン(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI)で前処置したBALB/c nu/nuマウスに腹腔内投与し、回収した腹水を硫酸透析後、プロテインGにて精製した。

### (3) NODマウス若齢期における抗体投与実験

雌性NODマウスに抗LFA-1(CD11a)及び抗ICAM-1抗体、抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体、抗CD80及び抗CD86抗体を2週齢から4週齢の間各々500μg、週2回の計6回腹腔内投与した。コントロール群として1mgの抗CD18抗体と200μlのPBS(phosphate

buffer saline)を同様に投与した。

さらに各抗体6日間のみ少量短期投与の実験を行った。抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を2週齢、5週齢、10週齢に、抗CD80及び抗CD86抗体を2週齢、10週齢に投与した。また抗CD80と抗CD86抗体に関してはそれぞれ2週齢、10週齢に単独投与も試みた。投与量は2週齢及び5週齢のマウスが各100μg、10週齢のマウスは各500μgとした。3日間連日尿糖陽性で血糖が300mg/dlを越える場合を糖尿病と判定した。糖尿病を発症したマウスは発症時点で、糖尿病未発症マウスは30週齢で屠殺し、膵臓を摘出し10%ホルマリンで固定した。摘出した膵臓をパラフィンに包埋した後、パラフィン切片をhematoxylin-eosin(H-E)にて染色し、膵ラ島炎の強度(insulinitis score)を以下に示す基準で評価した。0- 正常膵ラ島、1- 25%以下の単核細胞の膵ラ島への浸潤、2- 25%-50%の浸潤、3- 50%-75%の浸潤、4- 75%以上の浸潤。

### (4) フローサイトメトリーによる解析

2週齢時に抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を各100μg 6日間投与したNODマウスから胸腺細胞と脾細胞を抗体投与終了1週間後と4週間後に分離した。それらの細胞( $1 \times 10^6$ 個)を1μgの抗CD11a抗体あるいは抗ICAM-1抗体と4°C、30分間反応させた。細胞を洗浄後、FITC標識ラットIgG抗体(Cappel, Westchester, PA)でさらに反応させた。蛍光強度はFACS440 flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, CA)にて測定した。

### (5) NOD-scidマウスへの糖尿病移入

2週齢にて抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を各100μg 6日間投与したNODマウスの脾細胞を抗体投与後20週にて分離し、6-8週齢の雄性NOD-scidマウスに $3 \times 10^7$ 個を経静脈的に移入した。移入後6週間レシピエントマウスの糖尿病発症を観察した。

### (6) 抗CD11a及び抗ICAM-1抗体投与による

#### Suppressor activityの誘導

2週齢にて抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を各100μg 6日間投与したNODマウスの脾細胞 $3 \times 10^7$ 個を抗体投与後20週にて分離し、急性糖尿病発症NODマウスから分離した同数の脾細胞と共に雄性NODマウスに移入した。レシピエントである6-8週齢の雄性マウスは移入2時間前に7.5Gyのγ線を照射した。コントロールとしてPBSまたは抗CD18抗体を投与したNODマウスから分離した脾細胞を移入した。さらに2週齢にて抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を各100μg 6日間投与したマウスの脾細胞 $3 \times 10^7$ 個を抗体投与後22週にて分離し、3週齢雌性NODマウスに経静脈的に移入し、糖尿病発症を抑制しうるか否か30週齢まで

観察した。

(7) 脾T細胞の増殖反応

2週齢にて抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を各100  $\mu$ g 6日間投与したNODマウスの脾細胞を10週齢にて分離した。まず0.015M Tris-0.83%NH<sub>4</sub>Clにて脾細胞から赤血球を溶血させ、さらにFicoll-Hypaqueによる遠心分離法にて単核細胞分画を分離した後、抗マウスIgカラムにてT細胞を精製した。これらの脾T細胞( $2 \times 10^5$ /well)を6-8週齢の雄性NODマウスから単離しmitomycin-C(MMC)にて処理した脾ラ島(25個/well)あるいは5  $\mu$ g/mlのrecombinant human glutamic acid decarboxylase 65(GAD65)と反応させ、その増殖反応を調べた。GAD65はHoechst Japanより御供与いただいた。ポジティブコントロールとしてMMC処理した同種異系のC3H脾細胞と、またネガティブコントロールとして同種同系のNOD脾細胞と上記精製脾T細胞とを反応させた。反応は96穴マイクロプレートにおいてRPMI1640培養液に1%NOD血清、 $5 \times 10^{-6}$ Mの2-メルカプトエタノール、50U/mlのペニシリン、そして50  $\mu$ g/mlのストレプトマイシン(Flow, Mclean, VA)を添加した培養液の中で37°C、7%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養し、74時間後に<sup>3</sup>H-thymidine(20-30Ci/mmol; Amersham, Tokyo, Japan)を各ウェルに1  $\mu$ Ciに加え、90時間後にセルハーベスタ(Packard, Meriden, CT)にてハーベストし、マイクロプレートシンチレーションカウンタにて<sup>3</sup>H-thymidineの細胞内への取り込みを測定した。結果はstimulation index(抗原存在下でのcpm/抗原非存在下でのcpm)で示した。

(8) 統計

糖尿病発症率の統計処理は $\chi^2$ テストで行った。Insulinitis score及びその他の結果はnonparametric Mann-Whitney Uテストで統計処理した。すべてのデータは平均±標準偏差(SD)で示した。

結果

(1) NODマウス幼若期における抗接着分子抗体投与実験

自己免疫性糖尿病発症過程の初期でのLFA-1/ICAM-1, CD80, CD86/CD28, VLA-4/VCAM-1 pathwayの関与を調べる為、各々の抗体をNODマウスに2週齢から4週齢まで週2回各500  $\mu$ g投与した(Table 1)。抗LFA-1及び抗IC

AM-1抗体投与は30週において糖尿病発症を認めず、脾ラ島炎も全く認めなかった。抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体投与、コントロール抗体である抗CD18抗体投与は30週における累積糖尿病発症率は若干低下したものの、脾ラ島炎の程度はPBS投与群と有意な差を認めなかった。抗CD80及び抗CD86抗体投与はコントロール抗体投与群よりもむしろ糖尿病、脾ラ島炎共に促進している傾向を認めた。

抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与の糖尿病発症及び脾ラ島炎形成阻止を更に詳細に検討する為、2週齢、5週齢に各100  $\mu$ gずつ、10週齢に各500  $\mu$ gずつ6日間のみ投与した(Table 2)。2週齢投与群は、2週齢から4週齢まで週2回各500  $\mu$ g投与した群と同等の効果を認め、糖尿病発症も脾ラ島炎も全く認めなかった。しかし5週齢、10週齢に抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体を短期投与した群はコントロール抗体投与群と比して糖尿病発症、脾ラ島炎に有意差を認めなかった。この結果より抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与による糖尿病発症及び脾ラ島炎の完全で永続的な抑制効果は脾ラ島炎が顕性化する以前の2週齢の投与が有効であることが明らかとなった。

また抗CD80及び抗CD86抗体投与の糖尿病発症に対する影響をさらに詳しく検討するために、2週齢に各100  $\mu$ gずつ、10週齢に各500  $\mu$ gずつ6日間のみ投与した。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体の短期投与群とは対照的に2週齢投与群、10週齢投与群共に糖尿病発症率の増加を認め、非発症マウスも脾ラ島炎の増強を認めた。次いで抗CD80抗体と抗CD86抗体のどちらが優位に働いているか、単独投与でも同等の効果があるか否かを検索する為、抗CD80抗体、抗CD86抗体を各々2週齢、10週齢に6日間のみ単独投与した。そ

Table 1. The effect on autoimmune diabetes by administration of anti-adhesion molecules mAbs in young NOD mice<sup>a</sup>

mAb	Age(wk)	Incidence of diabetes	Insulinitis score at 30 wk					Mean±SD
			0	1	2	3	4	
PBS	2-4	12/20(60%)	0%	5%	23%	32%	40%	3.1±0.4
anti-CD18	2-4	5/13(38%)	5%	16%	21%	26%	32%	2.7±0.3
anti-CD11a+anti-ICAM-1	2-4	0/7(0%) <sup>b</sup>	100%	0%	0%	0%	0%	0 <sup>c</sup>
anti-VLA-4+anti-VCAM-1	2-4	12/32(38%)	4%	15%	24%	27%	30%	2.7±0.6
anti-CD80+anti-CD86	2-4	4/6(67%)	0%	0%	8%	29%	63%	3.2±0.5

<sup>a</sup>Female NOD mice were i.p. injected with 500  $\mu$ g each of anti-CD11a and anti-ICAM-1 mAbs, anti-VLA-4 and anti-VCAM-1 mAbs, anti-CD80 and anti-CD86 mAbs or 1mg of anti-CD18 mAb twice a week during 2-4wk of age.

<sup>b</sup>P<0.05( $\chi^2$  test) compared to anti-CD18 group.

<sup>c</sup>P<0.005(Mann-Whitney U test) compared to anti-CD18 group.

Table 2. The effect on autoimmune diabetes by short-term administration of anti-adhesion molecules mAbs in young NOD mice\*

mAb	Age(wk)	Incidence of diabetes	Insulinitis score Mean±SD
anti-CD11a+anti-ICAM-1	2	0/12( 0%) <sup>b</sup>	0.02±0.04 <sup>c</sup>
anti-CD11a+anti-ICAM-1	5	2/10( 20%)	1.5±1.5
anti-CD11a+anti-ICAM-1	10	8/22( 36%)	2.6±0.6
anti-CD80+anti-CD86	2	7/9( 78%)	3.3±0.8
anti-CD80+anti-CD86	10	6/7( 86%)	3.2
anti-CD80	2	5/6( 78%)	3.2
anti-CD80	10	7/7(100%)	—
anti-CD86	2	3/5( 60%)	2.1±0.6
anti-CD86	10	3/5( 60%)	2.2±0.2
anti-CD18	2	8/14( 57%)	2.6±0.3

\*Female NOD mice at 2 wk or 5 wk of age were injected with 100 μg each of indicated mAbs for 6 consecutive days. Mice at 10 wk of age were injected 500 μg each of indicated mAbs for 6 consecutive days. Mice of control group were treated with 200 μg of anti-CD18 mAb for 6 consecutive days at 2 wk of age.

<sup>b</sup>P<0.01( $\chi^2$  test) compared to anti-CD18 group.

<sup>c</sup>P<0.001(Mann-Whitney U test) compared to control group.

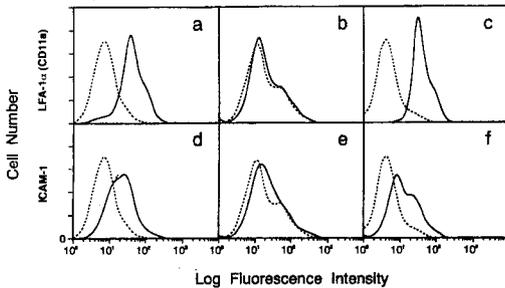


FIGURE 1. Down modulation of LFA-1 and ICAM-1 on splenocytes after mAb treatment.

Splenocytes from the mice that had been treated with the anti-CD11a and anti-ICAM-1 mAbs (b, c, e, f) or anti-CD18mAb (a, d) at 2 wk of age were isolated at 3 wk (a, b, d, e) or 6 wk (c, f) of age. Cells were first incubated with anti-CD11a (a, b, c) or anti-ICAM-1 (d, e, f) mAb and then with fluorescein-conjugated anti-rat IgG (second antibody). Fluorescence intensity was analyzed on FACS 440. Profiles of stained cells are shown by solid lines, while background staining with second antibody alone is shown by dotted lines. Representative data are shown from three independent experiments.

の結果は抗CD80抗体短期投与は糖尿病発症及び膵ラ島炎形成を促進させたが、抗CD86抗体短期投与は促進も抑制も示さなかった。以上の結果より、抗CD80抗体短期投与が膵ラ島炎顕性前の2週齢でも顕性後の10週齢でも何らかの機序で自己免疫過程を増強したと推察された。

(2) フローサイトメトリーによる胸腺細胞と脾細胞の解析  
接着分子短期投与で最も劇的な効果をもたらした抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与の糖尿病発症及び膵ラ島浸潤の完全で永続的な抑制効果のメカニズムを調べる為、フローサイトメトリーによる解析を行なった。まず、

両抗体投与により脾細胞の絶対数の有意な変化は認めなかった。しかし、脾細胞のLFA-1分子の発現は抗体投与終了後1週間で著明に減少していた(Fig. 1)。この down modulation は一過性であり、抗体投与4週後には脾細胞のLFA-1分子の発現は完全に無処置のマウスと同レベルに回復していた。また、胸腺細胞においても同様の所見が認められた。胸腺細胞及び脾細胞のICAM-1分子の発現はLFA-1分子より弱いものだったが、同様の一過性の down modulation が観察された。この down modulation は週齢にかかわらず、両抗体の投与により観察された。これらの結果よりLFA-1分子及びICAM-1分子の down modulation による様々な免疫反応の抑制は一過性に生じると考えられたが、自己免疫性糖尿病の永続的な阻止効果は単に両抗体投与による免疫抑制効果だけでは説明ができず、両抗体投与により膵β細胞に対する自己反応性T細胞のトランスが誘導されている可能性が推察された。

### (3) NOD-scid マウスへの糖尿病の移入

自己免疫性糖尿病が完全に阻止されたNODマウスにおいて糖尿病を惹起する細胞(diabetogenic effector cells)の活性を調べる為、2週齢で抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を受けたマウスの脾細胞を22週齢で分離し、NOD-scidマウスへ移入した(Table 3)。コントロール抗体投与マウスから分離した脾細胞を移入したNOD-scidマウスが6週以内に

Table 3. Adoptive transfer of diabetes to NOD-scid mice<sup>a</sup>

Donor cells from <sup>b</sup>	n	Incidence of diabetes	Insulinitis score at 6 wk after transfer				
			0	1	2	3	4
anti-CD18-treated mice	6	6/6(100%)			n.d.		
anti-CD11a and anti-ICAM-1-treated mice	6	0/6( 0%)	91%	9%	0%	0%	0%

n.d.; noto done

<sup>a</sup>Six to eight wk-old NOD-scid female recipients received i.v. injection of  $3 \times 10^7$  donor splenocytes.

Development of diabetes and insulinitis was examined at 6 wk after transfer.

<sup>b</sup>Donor cells were isolated from 22 wk-old female NOD that had received the treatment at 2 wk of age.

全例糖尿病を発症するのに対し、抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を受けたマウスの脾細胞を移入したレシピエントは一例も糖尿病発症を認めず、組織学的に膵ラ島炎も極く軽度であった。これにより diabetogenic effector cells は抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を受けたマウスにおいて抗体投与後20週を経ても不活性化(anergy)あるいはクローン除去(deletion)されている可能性が推察された。

#### (4) 抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与による糖尿病抑制活性(Suppressor activity)誘導の評価

糖尿病発症直後のNODマウスから分離した脾細胞を6-8週齢のγ線照射雄性NODマウスに移入すると100%糖尿病を移入することができる。この際、Suppressor activityを持つ脾細胞を同時移入すると糖尿病発症率が低下する。この方法を用いて、抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を受けたマウスから分離した脾細胞のSuppressor activityを評価した(Fig. 2)。糖尿病発症直後のNODマウスから分離した脾細胞と抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を2週齢に受けた8週齢のマウスから分離した脾細胞の同時移入では、コントロール抗体投与マウスからの脾細胞との同時移入に比べ、糖尿病の発症をわずかに遅らせたが、移入後8週以内に全てのマウスが糖尿病を発症した。また抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を2週齢に受けた8週齢のマウスから分離した脾細胞を2週齢雌性NODマウスに移入したが、レシピエントの糖尿病発症を抑えることはできなかった(Table 4)。これらの結果は抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与によりいくらかはSuppressor activityが誘導され得るが、膵ラ島炎と顕性糖尿病を完全に阻止するに十分な活性を持たないと考えられた。

(5) NOD膵ラ島及びGAD65に対するT細胞の増殖  
膵ラ島抗原に対するT細胞の増殖能を調べるため、2週齢に抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与を受けた10週齢のNODマウスから脾T細胞を分離した。

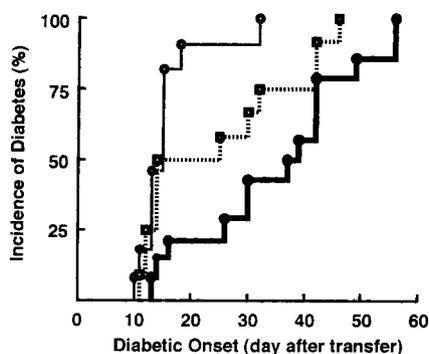


FIGURE 2. Suppressor activity of splenocytes from anti-CD11a and anti-ICAM-1 mAbs-treated mice.

Splenocytes from female NOD mice that had been treated with anti-CD11a and anti-ICAM-1 mAbs(●), anti-CD18 mAb(■), or PBS(○) at 2 wk of age were isolated at 22 wk of age. These splenocytes ( $3 \times 10^7$  cells/recipient) were intravenously injected into irradiated recipient NOD mice together with splenocytes ( $3 \times 10^7$  cells/recipient) from acutely diabetic NOD mice. Six to eight wk-old male NOD recipients were irradiated with 7.5 Gy from a Co source 2 hr before cell transfer. Occurrence of diabetes was monitored 3 times a week by measuring urine and plasma glucose. In PBS-, anti-CD18 mAb-, or anti-CD11a and anti-ICAM-1 mAbs-treated groups, mean  $\pm$  SD of diabetic onset was  $15.5 \pm 5.6$  (n=11),  $24.5 \pm 12.9$  (n=12), and  $35.1 \pm 13.8$  (n=14) day after cell transfer, respectively.

生体内で膵ラ島の浸潤を認めないにもかかわらず、これらの脾T細胞はコントロールマウスの脾T細胞と同様にNOD膵ラ島とIDDMの発症に関与すると考えられる膵ラ島抗原の一つであるGAD65に対し増殖反応を示した(Fig. 3)。以上の結果は膵ラ島抗原に対する自己反応性T細胞は抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短

Table 4. Adoptive transfer of splenocytes from mAbs-treated NOD mice to young NOD<sup>a</sup>

Donor cells from <sup>b</sup>	n	Incidence of diabetes	Insulinitis score at 30 wk				
			0	1	2	3	4
anti-CD18-treated mice	4	2/4(50%)	0%	7%	24%	36%	33%
anti-CD11a and anti-ICAM-1-treated mice	4	2/4(50%)	0%	4%	19%	38%	39%

n.d.; noto done

<sup>a</sup>3 wk-old NOD female recipients received i.p. injection of  $3 \times 10^7$  donor splenocytes.

Development of diabetes and insulinitis was examined until 30 wk of age.

<sup>b</sup>Donor cells were isolated from 22 wk-old female NOD that had received the treatment at 2 wk of age.

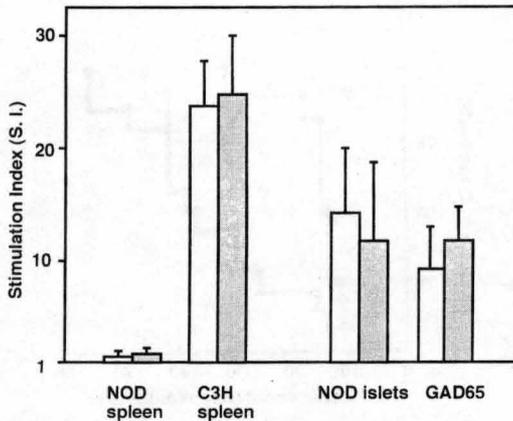


FIGURE 3. Proliferative responses of T cells from anti-LFA-1/ICAM-1 mAb-treated NOD mice to syngenic islet cell antigens or GAD65.

Splenic T cells were isolated from 10 wk-old NOD mice, which had been treated with anti-LFA-1/ICAM-1 mAbs at 2 wk of age (stippled) or control mAb (white). These T cells were purified over an anti-mouse Ig column. Purified T cells were plated in triplicate cultured either alone, with mitomycin-C-treated NOD islets, human GAD65, NOD splenocytes, or C3H splenocytes. After 3 days, <sup>3</sup>H-thymidine was added at 16h before harvesting. Data are represented as a mean stimulation index (S. I.) of 5 individual mice.

期投与によりクローナル除去や不活化を受けているのではないと推察された。

## 考 察

本研究において膵ラ島への自己反応性T細胞浸潤が組織学的に顕性化する以前に様々な抗接着分子抗体を投与し、自己免疫性糖尿病に対する影響を調べた。その中で抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体を2週齢に6日

間のみ投与することで糖尿病発症のみならず3週における膵ラ島炎をほぼ完璧に抑制することが明らかとなった。一方、抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体や抗CD80及び抗CD86抗体を5週齢以前に投与しても膵ラ島炎及び顕性糖尿病を抑制し得ず、後者ではむしろそれらが促進する傾向が認められた。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与にて5週齢や10週齢の短期投与ではLFA-1分子やICAM-1分子のdown modulationが誘導されるにもかかわらず、膵ラ島炎や顕性糖尿病を完全に抑えることはできなかった。両抗体投与による両分子のdown modulationは一過性であり、2週齢から4週齢がNODマウスにおいて自己免疫性糖尿病発症過程において重要な時期であり、それゆえに2週齢の両抗体短期投与は膵β細胞自己抗原に対する自己反応性T細胞のセルフトレランス(自己寛容)を誘導していると考えられた。

NODマウスにおいて自己抗原を攻撃するT細胞(autoaggressive T cells)とそれらを抑制し制御するT細胞(suppressive regulatory T cells)の微妙なバランスで糖尿病発症が促進あるいは、抑制されたりすることがわかっている<sup>10)</sup>。Complete Freund's Adjuvant(CFA)や抗CD4抗体やスーパー抗原などが免疫抑制性T細胞を活性化することで糖尿病発症を抑制することが報告されている<sup>11, 12, 13)</sup>。これらで処置したマウスから分離した脾細胞と糖尿病発症直後のNODマウスから分離した脾細胞の同時移入はレシピエントである照射NODマウスの糖尿病発症を阻止したり、その発症を著明に遅らせたりする<sup>13, 14)</sup>。これらの結果に対し、我々の抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与マウスから分離した脾細胞との同時移入では糖尿病発症をわずかに遅らせただけである。さらに抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与マウスから分離した脾細胞は再び別の3週齢雌性NODマウスに経静脈性に移入してもレシピエントの糖尿病発症を阻止することはなく、抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体の2週齢短期投与による永続的で完全な糖尿病

発症抑制，つまりセルフトレランスの成立は suppressive regulatory T cells の誘導では説明できないと考えられた。

LFA-1/ICAM-1 pathwayの抗体による抑制はT細胞分化，抗原提示，活性化T細胞の血管外への浸潤，標的細胞障害など自己免疫現象の多くの場面で影響すると考えらえる<sup>1,2,3,4)</sup>。LFA-1/ICAM-1 pathwayは活性化T細胞の血管外浸潤にも働いており<sup>5,15)</sup>，その抗体の投与は活性化T細胞の血管外浸潤を抑制する。しかし，T細胞の血管外浸潤をより強力に抑制する抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体の顕性糖尿病発症前の投与が糖尿病及び膵ラ島炎を抑制できないことより<sup>16)</sup>，本実験におけるトレランスの成立は両抗体によるT細胞の血管外浸潤に対する抑制効果でも説明はつかないと考えられる。

別の機序として抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与がNODマウスの胸腺での自己反応性T細胞の分化に影響を与えている可能性が考えられる。NODマウスは幼若期に胸腺を摘出すると糖尿病を発症せず，胸腺依存性の疾患であることが知られている<sup>17)</sup>。またマウス胎児胸腺培養系に抗ICAM-1及び抗LFA-1抗体を加えるとCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の分化が阻害される事より<sup>2)</sup>，胸腺でのT細胞分化にLFA-1/ICAM-1 pathwayが重要であることが示唆されている。従って抗ICAM-1及び抗LFA-1抗体の2週齢での投与が一過性に胸腺でのT細胞分化を遅らせ，自己反応性T細胞が自己免疫性糖尿病発症に重要な時期に末梢に出現できず，以後の糖尿病及び膵ラ島炎を抑制している可能性も考えられる。しかしながら，抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体の2週齢短期投与マウスにおいてGAD65を含む膵ラ島抗原に対する脾T細胞の増殖反応は保たれており，抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢短期投与が幼若期での胸腺摘出と同じ効果であるとは考えにくい。

T細胞と抗原提示細胞の反応の際，接着分子をブロックすることでT細胞が麻痺状態(T細胞アナジー)に陥り，トレランスが誘導されることが知られている<sup>18,19)</sup>。これは多くはin vitroの実験系で示されてきた事実であり，アナジーになったT細胞の抗原提示と同一の抗原再刺激での不反応性が示されている。NODマウスでは幾つかの自己抗原の中でGADに反応するT細胞が膵ラ島炎顕性化以前の3，4週齢に最も早く認められるようになると報告されている<sup>20,21)</sup>。3週齢のNODマウスにGAD65を経静脈性あるいは胸腺内に投与するとGAD自体に対する反応だけでなくその他の自己抗原に対してもT細胞の反応性が著しく減少し，膵ラ島炎と顕性糖尿病を阻止することが示されている。

これに対し，我々の実験では抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体を2週齢に短期投与したマウスでは抗体投与後8週後に分離した脾細胞は膵ラ島細胞やGAD65に対して増殖反応を認め，このことよりトレランスは膵ラ島に反応するT細胞のクローン除去やアナジーによるものではないと考えられた。

Immunological ignorance(免疫学的無視)と呼ばれるトレランスの一種が今回の実験で認められたトレランスを説明できるかもしれない。膵β細胞内にlymphocytic choriomeningitis viral(LCMV) glycoprotein(GP)を発現し，T細胞にLCMV GP抗原のT細胞受容体を発現させたダブルトランスジェニックマウスを用いてOhashi等はGPに特異的なT細胞が同一個体内に存在するLCMV-GPを発現する膵β細胞を攻撃しない状態を見出した<sup>22)</sup>。トランスジェニックマウスのT細胞はin vitroでアナジーやクローン除去を受けておらず，GP発現細胞に対し細胞増殖性や細胞障害性があることが確認されている。さらにin vivoでLCMVの感染によりこの末梢トレランスは直ちに破綻し，CD8<sup>+</sup>細胞主体の膵ラ島浸潤を引き起こした。つまり，このトレランスは適切なT細胞活性化を欠くために起こると考えられている。このようなトレランスをOhashi等はImmunological ignoranceと呼ぶことを提唱している。磯部等はマウス同種異系の心臓移植において我々が用いた抗体と同一の抗体を用いて一過性にLFA-1/ICAM-1 pathwayを遮断し，移植片の永続的な生着に成功し，同種異系の移植片にトレランスが成立していることを報告している<sup>23)</sup>。次いで彼等はトレランス成立マウスから分離した脾細胞がドナーと同じアロ抗原と混合リンパ球反応させた後にアロ抗原に対する細胞障害性を示す事を明らかにした<sup>24)</sup>。これらの結果を考え合わせると抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与によるトレランスは同種異系移植系でも自己免疫系でもin vitroで反応を示す脾T細胞がin vivoで無反応性を維持しており，Immunological ignoranceと同様の機序が働いている可能性が推察される。

今回NODマウス自己免疫性糖尿病発症過程において膵ラ島炎が顕性化する5週齢以前にいくつかの抗接着分子抗体を投与してみたが，その結果，この時期に特異的に抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与により自己免疫性T細胞のトレランスが成立することが判明した。このことは，自己免疫性糖尿病発症過程にLFA-1/ICAM-1 pathwayを必要とする何らかの初期病態が存在している可能性を示唆する。自己免疫性糖尿病発症過程における何らかのinitial eventsの存在の可能性は他の単一抗体投与実験やトランスジェニック

クマウスの研究でも示唆されている<sup>25, 26)</sup>。一般的に initial events は自己抗原表出, 抗原提示細胞による自己抗原提示, 自己反応性T細胞の自己抗原に対する感作, 自己反応性T細胞の機能分化等のプロセスを含むと推定される。我々も今回 initial events を想定して抗体投与を試みたが抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体短期投与が強力なトレランスを誘導しうるのに対し, 抗CD80及び抗CD86抗体の投与はむしろ自己免疫過程を促進させた。他の in vitro の研究ではT細胞アナザーが関与するトレランスにCD80, CD86/CD28 pathway は最も重要な pathway であるとされており<sup>27, 28)</sup>, in vivo の研究でもマウス同系異種心臓移植系で我々が使用した同じ抗体で移植片に対するトレランスが誘導されることが報告されている<sup>29)</sup>。抗CD80及び抗CD86抗体投与, 抗CD80抗体投与は膝ラ島炎が顕性化した10週齢の投与でも糖尿病発症を促進することにより, その促進機序は initial events に特異的に働くものではないと考えられる。また血管外浸潤に関与するVLA-4/VCAM-1も initial events に対して影響を与えず, LFA-1/ICAM-1のみが特異的に関与しているようである。この様に実際生体内で自己免疫性糖尿病発症過程の初期に何がどの様に起こるかは未だ不明な点が多い。臨床的にも IDDM は遺伝的要因だけでも環境的要因だけでも発症, 未発症の分別点は捕えられない。従って疾患の initial events において自己免疫を引き起こすことになる免疫担当細胞間のプロセスに, 接着分子やサイトカイン等の生体内の物質の何がどの様に重要であるか追及していく事は IDDM 発症機構解明に重要であり, その過程の中から疾患の発病を予知, 予防できる可能性が見い出されるものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり, 終始御指導, 御校閲を賜りました第二内科講座春日雅人教授に深謝します。また, 直接御指導頂きました横野浩一博士, 天野和彦博士, 永田正男博士ならびに御協力頂きました第二内科講座の糖尿病免疫グループの先生方に深く感謝致します。

## 文 献

- Springer, T. A. : Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346 : 425-434, 1990.
- Fine, J. S., and A. M. Kruisbeek. : The role of LFA/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J. Immunol.* 147 : 2852-2859, 1991.
- Van Seventer, G. A., W. Newman, Y. Shimizu, T. B. Nutman, Y. Tanaka, K. J. Horgan, T. V. Gopal, E. Ennis, D. O. Sullivan, H. Grey, and S. Shaw. : Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: Costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1, *J. Exp. Med.* 174 : 901-913, 1991.
- Damle, N. K., K. Klussman, P. S. Linsley, and A. Aruffo. : Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 148 : 1985-1992, 1992.
- Van Seventer, G. A., Bonvini, H. Yamada, A. Conti, S. Stringfellow, C. H. June, and S. Shaw : Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4<sup>+</sup> T cell by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intercellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J. Immunol.* 149 : 3872-3880, 1992.
- Eisenbarth, G. S. : Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 314 : 1360-1368, 1986.
- Makino, S., K. Kunimoto, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri, and Y. Tochino. : Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.* 29 : 1-13, 1980.
- Hasegawa, Y., K. Yokono, T. Taki, K. Amano, Y. Tominaga, R. Yoneda, N. Yagi, S. Maeda, H. Yagita, K. Okumura, and M. Kasuga. : Prevention of autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD mice by anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 mAb. *Int. Immunol.* 6 : 831-838, 1994.
- Yagi, N., K. Yokono, K. Amano, M. Nagata, K. Tsukamoto, Y. Hasegawa, R. Yoneda, N. Okamoto, H. Moriyama, M. Miki, Y. Tominaga, J. Miyazaki, H. Yagita, K. Okumura, A. Mizoguchi, A. Miki, C. Ide, S. Maeda, and M. Kasuga. :

- Expression of intercellular adhesion molecule-1 on pancreatic  $\beta$ -cells accelerates  $\beta$ -Cell destruction by cytotoxic T-cells in murine autoimmune diabetes. *Diabetes*. 44 : 744-752. 1995.
10. Reich, E. -P., R. S. Sherwin, O. Kanagawa, and C. A. Janeway Jr. : An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. *Nature*. 341 : 326-328. 1989.
  11. Mcinerney, F. M., S. B. Pek, and D. W. Thomas. : Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice. *Diabetes*. 40 : 715-725. 1991.
  12. Hutchings, P., L. O' Reilly, N. M. Parish, H. Waldmann, and A. Cooke. : The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to  $\beta$  cells in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 22 : 1913-1918. 1992.
  13. Kawamura, T., M. Nagata, T. Utsugi and J. -W. Yoon. : Prevention of autoimmune type I diabetes by CD 4<sup>+</sup> suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. *J. Immunol.* 151 : 4362-4370. 1993.
  14. Qin, H. -Y., M. W. J. Sadelain, C. Hitchon, J. Lauzon, and B. Singh. : Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 150 : 2072-2080. 1993.
  15. Christelle, F., M. -C. Gagnerault, and F. Lepault. : Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of langerhans and salivary gland of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 152 : 5969-5978. 1995.
  16. Tsukamoto, K., K. Yokono, K. Amano, M. Nagata, N Yagi, Y. Tominaga, H. Moriyama, M. Miki, N. Okamoto, R. Yoneda, Y. Inoue, H. Yagita, and M. Kasuga. : Administration of monoclonal antibodies against vascular cell adhesion molecule-1/very late antigen-4 abrogates predisposing autoimmune diabetes in NOD mice. *Cell. Immunol.* 165 : 193-201.1995.
  17. Ogawa, M., T. Maruyama, T. Hasegawa, T. Kanaya, F. Kobayashi, Y. Tochino, and H. Uda. : The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed. Res.* 6 : 103. 1985.
  18. Mueller, D. L., M. K. Jenkins, and R. H. Schwartz. : Clonal expansion versus functional clonal inactivation : a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7 : 445-480. 1989.
  19. Schwartz, R. H. : A cell culture model for T lymphocytes clonal anergy. *Science*. 248 : 1349-1356. 1990.
  20. Kaufman, D. L., M. C. -Salzler, J. Tian, T. Forshuber, G. S. P. Ting, P. Robinson, M. A. Atkinson, E. E. Sercarz, A. J. Tobin, and P. V. Lehmann. : Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*. 366 : 69-72. 1993.
  21. Tisch, R., X. -D. Yang, S. M. Singer, R. S. Liblau, L. Fugger and H. O. McDevitt. : Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*. 366 : 72-75. 1993.
  22. Ohashi, P. S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C. T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. : Ablation of tolerance and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*. 65 : 305-317. 1991.
  23. Isobe, M., H. Yagita, K. Okumura, and A. Ihara. : Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science*. 255 : 1125-1127. 1992.
  24. Isobe, M., and A. Ihara. : Tolerance induction against cardiac allograft by anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 treatment : T cells respond to vitro allostimulation. *Transplant Proc.* 25 : 1079-1080. 1991.
  25. Guerder, S., D. E. Picarella, P. S.

- Linsley, and R. A. Flavell. : Costimulator B 7 - 1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis  $\alpha$  factor leads to autoimmunity in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 : 5138-5142. 1994.
26. Yang, X. -D., R. Tisch, S. M. Singer, Z. A. Cao, R. S. Liblau, R. D. Schreiber, and H. O. McDevitt. : Effect of tumor necrosis  $\alpha$  factor on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. J. Exp. Med. 180 : 995-1004. 1994.
27. Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, and J. P. Allison. : CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature. 356 : 607-609. 1992.
28. Gimini, C. D., G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. Gray, and L. M. Nadler. : Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B 7 costimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 : 6586-6590. 1993.
29. 八木田秀雄 : 細胞相互作用による免疫系の調節, 実験医学 (増刊), 12 : 2153-2158, 1994.

Studies on Pathogenesis of Insulin-dependent Diabetes Mellitus.  
— The role of the Adhesion Molecules on Initial Events in Autoimmune Diabetes —

Hiroaki Moriyama

The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine  
(Director. Prof. Masato Kasuga)

Abstract

In the present study, to analyze the role of several adhesion molecules in the early age of NOD mice, short-term treatment with monoclonal antibodies (mAbs) against these molecules were performed. When mAbs against leukocytes function-associated antigen-1 (LFA-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were administered for only 6 days at 2 wk of age, neither diabetes nor insulinitis was observed at 30 wk of age. However, anti-LFA-1/ICAM-1 treatment at 10 wk of age could not prevent overt diabetes. In contrast, administration of anti-CD80/CD86 mAbs at 2 wk or 10 wk of age accelerated the development of diabetes. The treatment with anti-CD80 mAb alone also resulted in an accelerated onset of diabetes. These results suggested that the tolerance against  $\beta$  cell antigen(s) was induced only when LFA-1/ICAM-1 pathway was transiently blocked at 2 wk of age. Protective suppressor activity was not explicable for the tolerance since splenocytes from anti-LFA-1/ICAM-1 mAbs-treated NOD mice had a little suppressive effect in the adoptive transfer experiments. Although these splenocytes could not transfer the insulinitis and subsequent diabetes to NOD-scid mice, the absence or the inactivation of diabetogenic effector T cells could not also explain the tolerance, since splenic T cells from treated mice preserved proliferative responses to islet cell antigens and glutamic acid decarboxylase 65 *in vitro*. These results suggest that a unique peripheral tolerance was induced by the transient blockade of LFA-1/ICAM-1 pathway in early age of NOD mice and also suggest the possibility that LFA-1/ICAM-1 pathway would be an essential component of the initial events in autoimmune diabetes.