



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。



氏名・(本籍)	もり やま ひろ あき 森 山 啓 明	(鹿児島県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1041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8年3月31日	
学位論文題目	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—	
審査委員	主査 教授 春日 雅 人	
	教授 千原 和 夫	教授 前田 盛

論文内容の要旨

緒言

免疫系においてLFA-1/ICAM-1 pathwayを始めとする接着分子群は細胞間の接着のみならず、種々の反応に重要な働きを有するが、生体内の多様で複雑な免疫反応におけるその詳細な機能や生理的意義には不明な点が多い。NODマウスはインスリン依存型糖尿病 (IDDM) の優れたモデル動物であるが、最近我々は、LFA-1/ICAM-1 pathwayがNODマウスの自己免疫性糖尿病発症における膵ラ島への単核細胞浸潤 (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持つことを報告した。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抗体をはじめとする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。

方法及び結果

(1) NODマウス幼若期における抗接着分子抗体投与実験

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500μg投与した。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与は30週において糖尿病及び膵ラ島炎を全く認めなかった。抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体投与は糖尿病発症率は若干低下させたが、膵ラ島炎はPBS投与群と有意差を認めなかった。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糖尿病、膵ラ島炎共に促進させる傾向を認めた。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与の影響を更に詳細に検討する為、2週齢、5週齢に各100μgずつ6日間のみ投与した。2週齢投与群は糖尿病発症も膵ラ島炎も認めなかったが、5週齢、10週齢に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、膵ラ島炎に有意差を認めず、糖尿病及び膵ラ島炎の完全で永続的な抑制効果は膵ラ島炎が顕性化する以前の2週齢の投与が有効であった。また抗CD80及び抗CD86抗体投与を2週齢、10週齢に同様に投与したところ、両群共に糖尿病発症率の増加と膵ラ島炎の増強を認めた。次いで各々の抗体を単独投与したところ、抗CD80抗体投与は糖

尿病発症及び膵ラ島炎を促進させたが、抗CD86抗体投与は促進も抑制も示さなかった。以上の結果より、抗CD80抗体投与が2週齢でも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

2週齢時に抗CD11a及び抗ICAM-1抗体を6日間投与したマウスから胸腺細胞と脾細胞を抗体投与終了1週後と4週後に分離した。それらの細胞を1 μ gの抗CD11a抗体あるいは抗ICAM-1抗体と反応させ、FITC標識抗ラットIgG抗体でさらに反応させた後、解析を行った。脾細胞のLFA-1分子及びICAM-1分子の発現は抗体投与1週後で著明に減少していた。このdown modulationは一過性であり、抗体投与4週後には両分子の発現は完全に回復していた。胸腺細胞でも同様の所見が認められた。これらの結果より両分子のdown modulationによる様々な免疫反応の抑制は一過性には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、膵 β 細胞に対する自己反応性T細胞のトレランスの誘導が推察された。

(3) NOD-scidマウスへの糖尿病の移入

抗CD11a及び抗ICAM-1抗体投与マウスの脾細胞を抗体投与後20週にて分離し、NOD-scidマウスに 3×10^7 個を経静脈的に移入し、レシピエントの糖尿病発症を観察した。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マウスが6週以内に全例糖尿病を発症するのに対し、抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与マウスの脾細胞を移入したマウスは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。これによりエフェクターT細胞は抗体投与後20週を経ても不活性化あるいはクローン除去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

抗CD11a及び抗ICAM-1抗体投与マウスの脾細胞 3×10^7 個を抗体投与後20週にて分離し、糖尿病発症マウスから分離した同数の脾細胞と共に γ 線を照射したNODマウスに移入し、糖尿病発症率を観察したところ、コントロールに比べ、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発症した。さらに脾細胞を抗体投与後8週にて分離し、3週齢雌性NODマウスに経静脈的に移入したが、レシピエントの糖尿病発症を抑えられなかった。これらの結果は抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与によりいくらかはSuppressor activityを誘導し得るが、膵ラ島炎及び顕性糖尿病を完全に阻止するに十分な活性はないと考えられた。

(5) NOD膵ラ島及びGAD65に対するT細胞の増殖能

抗CD11a及び抗ICAM-1抗体投与NODマウスの脾細胞を10週齢にて分離し、遠心分離法にて単核細胞分画を分離した後、抗マウスIgカラムにて脾T細胞を精製した。これらの脾T細胞をmitomycin-Cにて処理した膵ラ島あるいは膵ラ島抗原の一つであるGAD65と反応させ、 ^3H -thymidineのuptakeにてその増殖反応を調べた。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GAD65に対し増殖反応を示した。以上の結果より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抗体投与により不活性やクローナル除去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NODマウスに抗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及び膵ラ島炎をほぼ完璧に抑制し得た。両抗体投与による両分子のdown modulationは一過

性であり、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。その機序はsuppressive regulatory T cellsの誘導や膵ラ島に反応するT細胞の不活性やクローン除去によるものではないと考えられた。Immunological ignorance（免疫学的無視）とはトランスジェニックマウスで証明された現象で、同一個体内に抗原とそれに対応するT細胞受容体を持つT細胞が同時に存在しながら、免疫応答が起こらない状態のことである。この際、トランスジェニックマウスのT細胞はin vitroでは対応抗原発現細胞に対し細胞増殖性や細胞障害性を示す。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与によるトレランスは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。今回の抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与によるトレランスの成立は、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initial eventsの存在の可能性は他の研究でも示唆されている。我々も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細胞アナジ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、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。抗CD80及び抗CD86抗体投与、抗CD80抗体投与は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。また血管外浸潤に関与するVLA-4/VCAM-1もinitial eventsに影響を与えず、LFA-1/ICAM-1のみが特異的に関与しているようである。この様に自己免疫性糖尿病発症過程の初期に何がどの様に関与するかは未だ不明な点が多く、initial eventsにおいて接着分子やサイトカイン等の生体内の物質がどの様に重要であるか追求していく事は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。

結論

NODマウスにおける抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体2週齢投与にて糖尿病及び膵ラ島炎をほぼ完全に阻止し得た。一方、抗CD80及び抗CD86抗体投与は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が成立することが示唆された。その機序としてSuppressor activityやエフェクターT細胞のクローン除去あるいは不活性は否定的であり、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推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究では自己免疫性糖尿病発症過程の初期反応接着分子の役割を解析する為に、本疾患のモデル動物であるにおけるNODマウスの幼若期に各種抗接着分子抗体の投与実験を行った。抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体の2週齢における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が、10週齢での短期投与では膵ラ島炎及び糖尿病発症を阻止できなかった。一方、抗CD80及び抗CD86抗体の短期投与は2週齢投与あるいは10週齢投与にても膵ラ島炎及び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。抗VLA-4及び抗VCAM-1抗体あるいはコントロール抗体の短期投与は膵ラ島炎及び糖尿病発症に影響を与えてなかった。これらの結果より、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（自己寛容）が成立することを推察した。そのメカニズムとして、両抗体で処置したNODマウス脾細胞を用い、以下の解析を行った。1) 糖尿病発症NODマウス脾細胞を放射線照射NODマウスへ移入し糖尿病を発症させる系に、両抗体投与NODマウス脾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。これらの結果より両抗体投与によりSuppressor activityは十分には誘導されないと考えられた。2) 両抗体投与NODマウス脾細胞を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性も考えられた。3) しかし、*in vitro*では両抗体投与NODマウス脾T細胞は膵ラ島及び膵ラ島自己抗原の一つと考えられるGAD 65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。本研究はNODマウスにおける自己免疫性糖尿病についてその初期反応における接着分子の役割を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった抗LFA-1及び抗ICAM-1抗体投与による自己反応性T細胞の膵β細胞抗原に対する免疫寛容の誘導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。