



# グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）及びプロインスリンを用いた1型糖尿病に対するワクチン療法の試み

山田, 克己

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2953

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002953>

※ 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。



# グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 及びプロインスリンを用いた 1 型糖尿病に対するワクチン療法の試み

山田 克己

神戸大学大学院医学系研究科老年内科学  
(指導：横野 浩一教授)

連絡先：山田 克己 神戸大学大学院医学系研究科老年内科学  
T e l : (078)-382-5901  
F a x : (078)-382-5919

(平成 15年12月17日受付)

## 【要 約】

ヒト 1 型糖尿病のモデル動物である NOD マウスに対して、組換えアデノウイルス・ベクターを用いたワクチン療法を行い、糖尿病の発症阻止を試みた。1 型糖尿病の自己抗原のうち最も重要であると考えられる GAD67 あるいは proinsulin II を発現するアデノウイルス・ベクターである Ad. mGAD67, Ad. mPreproinsulin II をそれぞれ NOD 線維芽細胞に感染させた後、幼若な雌性 NOD マウスへの皮下移植を行い、末梢における自己抗原発現による免疫学的修飾を試みた。GAD67 発現 NOD 線維芽細胞の皮下移植 NOD マウス、および proinsulin II 発現 NOD 線維芽細胞の皮下移植 NOD マウスにおいてそれぞれ糖尿病発症率の著明な抑制効果を認めたが、これらの皮下移植マウスはコントロールマウスと同程度の膵島炎を示した。膵島におけるサイトカイン発現を RT-PCR 法にて検討したところ、GAD67 および proinsulin II 発現 NOD 線維芽細胞の皮下移植 NOD マウスの両者において Th2 優位であった。以上より、末梢における GAD67 および proinsulin II の発現により糖尿病原性 Th1 細胞を抑制する Th2 細胞が誘導されたことが考えられ、末梢での自己抗原発現による 1 型糖尿病ワクチン療法の有用性が示唆された。

## 【緒言】

1 型糖尿病は膵β細胞に対する免疫学的破壊により

絶対的インスリン欠乏の結果、高血糖やケトosis で発症する臓器特異的自己免疫性疾患である。ヒト 1 型糖尿病において膵島関連自己抗体が検出されており、代表的なものとして膵島細胞自己抗体 (islet cell antibody; ICA), インスリン自己抗体 (insulin auto-antibodies; IAA), 抗 GAD (glutamic acid decarboxylase) 抗体, IA-2 (insulinoma-associated antigen-2) 抗体がある。また、ヒトの 1 型糖尿病の末梢血において膵β細胞特異的 T 細胞の存在も認められている<sup>(1)</sup>。一方、non-obese diabetic (NOD) mouse は急激な高血糖とケトosis を示す 1 型糖尿病モデル動物であり、その病態はヒト 1 型糖尿病とよく類似している<sup>(2)</sup>。

ヒトや NOD マウスにおいて、1 型糖尿病の進展にともなって T 細胞の認識する自己抗原が同定されている<sup>(1)</sup>。これらの自己抗原に特異的な T 細胞の移入<sup>(3)</sup>、自己抗原を発現する plasmid DNA による免疫療法<sup>(4, 5, 6, 7)</sup> 等により、NOD マウスにおける 1 型糖尿病の抑制、または促進が可能である。さらに病原性自己抗原に対する免疫寛容の誘導<sup>(8, 9, 10)</sup>、β細胞特異的 Th2 細胞の抑制的効果を誘導することは、Th1 優位である 1 型糖尿病に対する選択的治療を可能にするものと考えられる<sup>(10, 11, 12, 13)</sup>。なぜなら、免疫調節性 T 細胞は抗原特異的な様式で誘導され、Th1 細胞の抑制を引き起こすためである。

最近の研究では、糖尿病の初期段階において GAD や insulin などの自己抗原が Th1 細胞による膵β細胞破壊の標的となっていることが示されている<sup>(10, 11, 12)</sup>。糖尿病の進展過程で他の抗原も同定されているが、ヒ

キーワード：1 型糖尿病, GAD67, proinsulin II, ワクチン療法, NOD マウス, アデノウイルス・ベクター

トとNODマウスの糖尿病進展において、T細胞の認識する自己抗原で最も重要と考えられているのはGADとinsulinである<sup>(3, 14, 15, 16, 17)</sup>。実際、NODマウスにおいて、糖尿病進展過程の後期で可溶性GADや、適当な adjuvant と共にGADペプチドを静脈内または腹腔内投与することで、顕性糖尿病を抑制することが可能である<sup>(9, 18, 19)</sup>。また、NODマウスにinsulinまたはinsulin B chainを投与することによる糖尿病抑制効果も報告されている<sup>(10)</sup>。インスリンのエピトープ認識に関する検討では、膵島の自己抗原として proinsulin が重要であると考えられる<sup>(20)</sup>。マウスでは proinsulin I と proinsulin II という2つのプロインスリンが存在し、 $\beta$ 細胞では両方のプロインスリンが存在している。proinsulin II は脳と胸腺でも存在しているが、proinsulin I は $\beta$ 細胞に特異的に存在している。マウスの proinsulin II のinsulin B chain peptide 9-23をマウスに投与すると糖尿病に対する著明な抑制効果が認められる<sup>(21, 22)</sup>。

本研究では、組換えアデノウイルス・ベクターであるAd.mGAD67またはAd.mPreproinsulin IIを感染させたNOD線維芽細胞を幼若期の雌性NODマウスに皮下移植することで、1型糖尿病に対する免疫修飾による発症抑制を試みた。

## 【方法】

### 1. Ad.mGAD67, Ad.mPreproinsulin IIの作成

NOD膵島ライブラリーより分離したGAD67遺伝子には変異等のないことを確認し、これを用いてアデノウイルス・ベクターを作成した。アデノウイルスを組み込んだコスミドと、GAD67遺伝子をTPC法により293細胞に組み込み、GAD67のベクターを得た。Ad.mPreproinsulin IIの作成も同様の方法で行った<sup>(23)</sup>(Fig. 1.)。

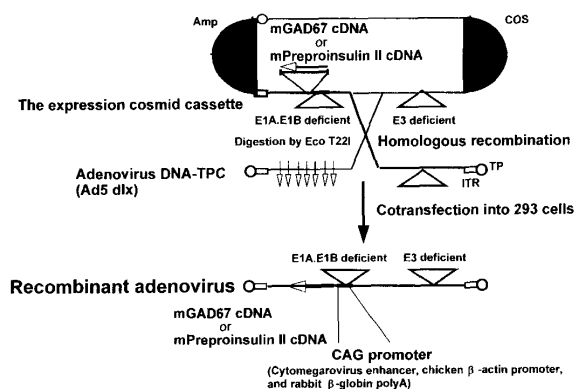


Fig. 1. Construction of Ad.mGAD67 and Ad.mPreproinsulin II.

### 2. NOD線維芽細胞の採取、培養

新生児期のNODマウスの皮膚切片を10%FCSを含むRPMI1624培養液で培養し、増殖してきた線維芽細胞を系代培養した。

### 3. Ad.mGAD67, Ad.mPreproinsulin II 感染NOD線維芽細胞におけるGAD67, proinsulin II 発現確認

#### i) mGAD67の発現確認

Ad.mGAD67をMOI:10で2時間NOD線維芽細胞に感染させ、48時間培養した後に細胞を回収した。回収した細胞は $\text{NaCl}$ 糖密度勾配遠心分離法にて細胞膜成分を分離し、western blot法にてmGAD67の発現を解析した。1次抗体にRabbit IgG抗GAD65/67抗体(SIGMA)を用い、2次抗体にアルカリフォスファターゼ標識抗Rabbit IgG抗体(SIGMA)を用いた。

#### ii) Proinsulin IIの発現確認

$1 \times 10^6$ 個のNOD線維芽細胞にAd.mPreproinsulin IIをMOI:10で2時間感染させ、48時間培養した後の上清中のproinsulin IIの発現をELISA法にて検討した。

### 4. アデノウイルス・ベクター感染NOD線維芽細胞のNODマウスへの移植

$1 \times 10^6$ 個のNOD線維芽細胞にAd.mGAD67をMOI:10で2時間感染させ、雌性NODマウスの3週齢と5週齢に2回皮下移植を行った(n=10)。同様にAd.mPreproinsulin IIをNOD線維芽細胞に感染させ、雌性NODマウスへの皮下移植を行った(n=10)。コントロールとして、Ad.LacZをMOI:10で感染させたNOD線維芽細胞( $1 \times 10^6$ 個)を雌性NODマウスへ皮下移植した(n=10)。

### 5. 移植マウスにおける膵島の組織学的検討

アデノウイルス・ベクター感染NOD線維芽細胞を皮下移植したNODマウスにおける膵臓を10週齢で摘出し、10%中性ホルマリン固定後パラフィン処理し5 $\mu$ mの切片を作成した。この切片をH-E染色しラ島炎の程度を組織学的に検討した。ラ島炎は、3匹のマウスにおいて、1匹あたり25個以上のラ島を観察し評価した。ラ島炎の程度は以下のように分類した。0:ラ島炎なし 1:ラ島周囲に局限したラ島炎 2:25%以下のラ島炎 3:25%以上、50%未満のラ島炎 4:50%以上のラ島炎

### 6. 膵島におけるサイトカイン・バランスの検討

アデノウイルス・ベクター感染NOD線維芽細胞を皮下移植したNODマウスにおける膵臓を10週齢で摘出し、コラゲナーゼ処理後、ヒストパークを用いて膵臓を分離した。この膵臓よりRNAを抽出し、reverse transcriptionにてcDNAを得た。このcDNAを用いてIFN- $\gamma$ 、IL-4を半定量PCR法で評価した。

internal control として TCR-C  $\beta$ を用いた。Table 1に各プライマーと増幅条件を示す。

Table 1. PCR primers for analysis of cytokine expression on pancreatic islets.

Table 1. PCR primers for analysis of cytokine expression on pancreatic islets.

	Sequence (5' to 3')	Den.	Ann.	Ext.	
IFN- $\gamma$	5' primer	TGAACGCTACACACTGCATCTTGG	94°C	52°C	72°C
	3' primer	CGACTCCTTTTCGGCTTCTCTGAG			
IL-4	5' primer	ATGGGICTCAACCCCGAGTA	94°C	52°C	72°C
	3' primer	GCTCTTTAGGCTTTCAGGAAGTC			
TCR-C $\beta$	5' primer	GCAAAACAAAAGGCTACCC	94°C	52°C	72°C
	3' primer	CCACTGTCTCTCCICTGAAA			

## 【結果】

### 1. NOD線維芽細胞における自己抗原の発現

Ad.mGAD67感染NOD線維芽細胞は、western blot法にてGAD67の発現が認められた (Fig.2)。一方、Ad.mPreproinsulin IIを感染させたNOD線維芽細胞 ( $1 \times 10^6$ )の培養上清中の proinsulin IIの発現量をELISA法にて測定した。感染後48時間の培養上清中の proinsulin IIの発現量は2.5ng/mlであったが、対照である Ad.LacZ を感染させた線維芽細胞の培養上清中では測定感度以下 (<0.1ng/ml)であった。

### 2. 移植マウスにおける糖尿病発症の抑制

GAD67 発現 NOD 線維芽細胞の皮下移植NODマウスでは、無処置及びコントロール・ベクター(Ad.

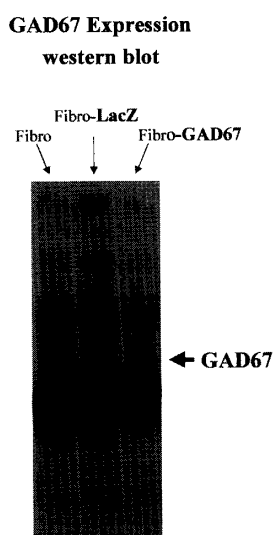


Fig.2. Expression of transduced gene products. NOD fibroblasts were transfected with Ad. GAD67 at a MOI of 10 for 2 hours. At 48 hours after transfection, the expression of GAD67 on NOD fibroblasts was examined by western blotting.

LacZ)感染NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスに比して糖尿病発症率の抑制を認めた。proinsulin II発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスにおいても、GAD67発現の場合と同様に有意な糖尿病発症抑制を認めた (Fig.3)。いずれの場合もKaplan Meier法によるLogrank Testでコントロール群 (Ad.LacZ)に比べて有意差を認めた (Ad.mGAD67:P<0.05, Ad.mPreproinsulin II:P<0.05)。

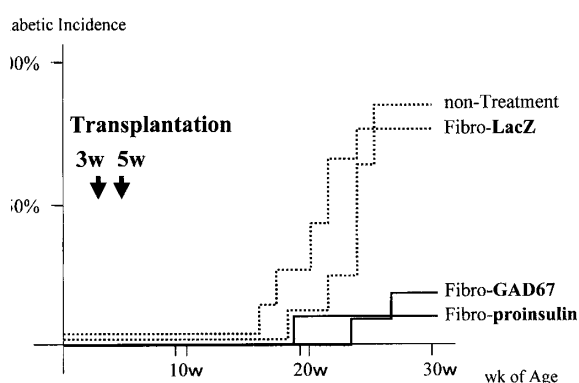


Fig.3. Diabetic incidence of NOD mice with GAD67 and proinsulin II expressing fibroblast Tx.

At 3 and 5 wk of age, female NOD mice were transplanted subcutaneously with  $1 \times 10^6$  NOD fibroblasts that were transfected with Ad.mGAD67(n=10) or Ad.mPreproinsulin II (n=10) at a MOI of 10 for 2 hours. Diabetic incidence of transplanted NOD mice were monitored until 30 wk of age. These incidences were analyzed using the Kaplan Meier method. Diabetic incidence was apparently reduced in NOD mice transplanted with Ad.mGAD67 compared to control with Ad.LacZ(Logrank Test, P<0.005). In the case of Ad.mPreproinsulin II, diabetic incidence was also reduced (Logrank Test, P<0.005).

### 3. 移植マウスにおける膵島の組織学的検討

GAD67発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスにおける、10週齢での膵島の組織学的検討では、無治療及びコントロール・ベクター(Ad.LacZ)感染NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスの場合と同程度の膵島炎が認められ、膵島炎の抑制効果を認めなかった。proinsulin II発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスにおいても、コントロール群と同程度の膵島炎が認められた (Fig.4.)。

### 4. 膵島におけるサイトカイン・バランスの検討

10週齢の時点での各マウス膵島におけるサイトカイン・バランスの解析をRT-PCR法にて行った。GAD67発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスでは、膵島でのIL-4の増加傾向を認めた。proinsulin II発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスにおいては、

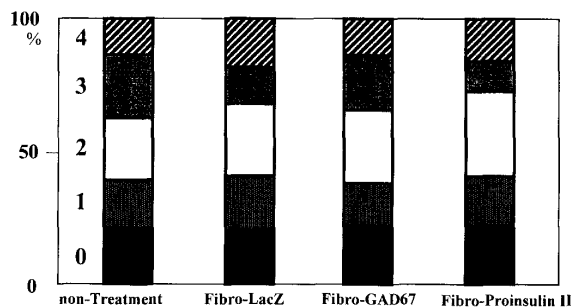


Fig.4. Degree of insulinitis in NOD mice with GAD67 or proinsulin II-expressing fibroblast Tx.

At 10 wk of age, degrees of insulinitis were histologically evaluated in NOD mice that were transplanted with GAD67 or proinsulin II-expressing NOD fibroblasts. A minimum of 25 individual islets was scored for 3 mice. The degrees of insulinitis were classified as follows. 0: no infiltration, 1: peri-insulinitis, 2: intra-insulinitis (<25%), 3: intra-insulinitis (<50%), 4: severe insulinitis (>50%)

IL-4の増加傾向およびIFN- $\gamma$ 産生低下傾向を認めた。以上よりGAD67及びproinsulin II発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスでは、膵島においてTh2優位のサイトカイン・バランスを示していると考えられた(Fig.5.)。

### 【考察】

NODマウスにおける1型糖尿病の初期に、どのような抗原が膵島炎と関連しているのかを同定する研究が数多く行われている。糖尿病発症前のNODマウスにおいて、ヒトのGAD蛋白もしくはそのペプチドに対する最も初期の反応に関する実験では、GADに対する自己免疫反応は糖尿病の初期において重要なステップであることが示唆されている。これらの報告によるとGAD特異的Th1細胞の反応性は、4週齢のNODマウスで検出可能となり、12週齢頃には最も強い反応性が示されている<sup>(11, 12)</sup>。また最近、糖尿病を引き起こすT細胞の抗原特異的な活性化や増殖は、末梢である脾リンパ節が重要であることが報告されている<sup>(24, 25)</sup>。本研究では、3週齢よりGAD67発現NOD線維芽細胞をNODマウスに移植することにより、自己免疫反応の初期に末梢での免疫学的修飾を試み、30週齢での糖尿病発症率に有意な抑制効果が認められた。本実験では、Ad.mGAD67によるNOD線維芽細胞への遺伝子導入により、NOD線維芽細胞の細胞膜でGAD67の発現を確認した(Fig.2.)。NOD線維芽細胞のMHCはclass I

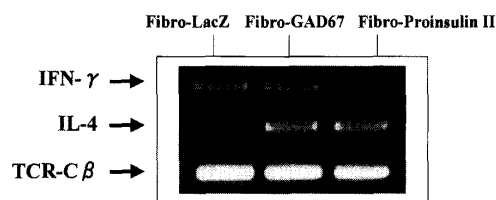


Fig.5. Cytokine expression on pancreatic islets of NOD mice with GAD67 or proinsulin II-expressing fibroblast Tx.

Pancreatic islets were isolated from NOD mice at 10 wk of age which had been transplanted with GAD67 or proinsulin II-expressing NOD fibroblasts at 3wk and 5wk of age. mRNA was extracted from the isolated islets, and was reverse-transcribed to generate cDNA. Evaluation for cytokine expression was carried out by PCR analysis. IL-4 expression was increased in the islets from NOD mice transplanted with GAD67-expressing NOD fibroblasts. In the islets from NOD mice transplanted with proinsulin II-expressing NOD fibroblasts, IL-4 expression was increased and IFN- $\gamma$  expression was decreased.

しか存在しないため末梢のCD8陽性T細胞に抗原提示されるが、NOD線維芽細胞は professional な抗原提示細胞ではないためco-stimulatory signalが存在しない。このため本実験において糖尿病原性T細胞のanergyを引き起こしている可能性が考えられた。実験的自己免疫性脳脊髄炎での検討においても、疾患を増悪させる抗原ペプチドを発現するプラスミドによる免疫を行うと、病原性T細胞はanergyまたはdeletionの機序を介して免疫寛容が誘導され、自己免疫が抑制されると報告されている<sup>(26, 27)</sup>。しかしながら10週齢での膵島はコントロールマウスと同程度の細胞浸潤が認められており(Fig.4.)、anergyによる糖尿病発症抑制の可能性は低いものと思われた。これらの移植マウスの10週齢での膵島におけるサイトカイン・バランスはTh2優位であったことより(Fig.5.)、末梢でのGAD67発現により糖尿病原性Th1細胞を抑制するTh2細胞が誘導されたことが考えられた。

1型糖尿病を引き起こす自己反応性細胞がGADのどの部分を抗原決定基として認識するのかわからないが、あるGADペプチドに反応性を示すT細胞クローンは膵島細胞に対しての反応性を示さず、このクローンをNODマウスに移入しても糖尿病の促進は認められなかったという報告もある<sup>(28)</sup>。このため本実験ではペプチドではなくGAD蛋白を発現するアデノウイルス・ベクターを用いてNODマウスに対するワクチン療法の可能性を検討した。

現在まで1型糖尿病を阻止する目的でGAD蛋白も

しくはGADペプチドを用いた実験が多く報告されているが、異なった結果が示されている。本実験ではGAD67発現NOD線維芽細胞をNODマウスに移植することで糖尿病抑制効果を認めた。この実験と同様に糖尿病初期での免疫学的修飾を行った実験では、幼若期NODマウスへGAD蛋白を胸腺内投与することにより糖尿病進展が遅延するが、GADペプチドを同様に胸腺内投与すると糖尿病を促進することが報告されている<sup>(29)</sup>。このため、糖尿病初期におけるGAD蛋白の発現は自己免疫反応抑制に対して有用であることが示唆される。一方で分泌型GAD蛋白を発現するプラスミドを4~12週齢のNODマウスに筋肉内投与した実験では、GAD特異的Th1細胞の反応性増強が観察され糖尿病の促進を引き起こしている。同研究では、更に分泌型GADを発現するプラスミドと、IL-4を発現するプラスミドで4週齢のNODマウスに免疫すると、GAD特異的CD4陽性T細胞の反応や糖尿病進展を著明に抑制することができたが、非分泌型GADとIL-4を発現するプラスミドではこのような効果は認められず、GAD蛋白の発現様式の違いも重要であることを示している<sup>(30)</sup>。1型糖尿病の確立された自己免疫反応に対する検討では、GAD蛋白もしくはGADペプチドの免疫による糖尿病抑制効果が報告されている<sup>(9, 18, 19)</sup>。このように異なった結果を示す要因として、GADの発現様式の違いと共にGADの発現量の違いも重要であると考えられる。GADに特異的なTh2細胞を誘導し、糖尿病の進行を抑制するためには多量の蛋白もしくはペプチドを適当なアジュバントと共に頻回に投与しなければならないという報告がある<sup>(9, 19)</sup>。対照的に、NODマウスに対して短期間で比較的少量のプラスミドDNAを筋肉内注射することで、糖尿病の長期的な抑制が可能であったとの報告や<sup>(30)</sup>、3-4週齢のNODマウスに比較的少量のGADペプチドを腹腔内投与すると糖尿病の発症率が増加し、大量のGADペプチドで糖尿病の発症が遅延したという報告もある<sup>(31)</sup>。膵島抗原に対する容量依存性の免疫寛容についての報告もあり<sup>(32)</sup>、本実験では、GAD67発現NOD線維芽細胞をNODマウスに移植することで糖尿病発症率の低下を認めたが、発現量の検討により更なる糖尿病抑制効果が期待できるものと思われた。

本実験では proinsulin II 発現NODマウスにおいてもGAD67と同様に糖尿病発症率の低下を認めた。若年のNODマウスの膵ではinsulin B chain 15-23-特異的CD8陽性T細胞が高い割合で認められるという報告があり<sup>(33)</sup>、本実験におけるNOD線維芽細胞でのproinsulin II 発現もGAD67の場合と同様に病原性CD8陽性T細胞に対する免疫修飾を誘導したことが考

えられた。insulin B chainもしくはB<sub>9-23</sub>ペプチドをIncomplete Freund Adjuvant (IFA) と共にNODマウスへ投与した場合、皮下投与であれば糖尿病の抑制を認めたという実験があり<sup>(22)</sup>、本実験の結果と類似した結果を示している。しかし同報告によると腹腔内投与、及び静脈内投与では糖尿病を抑制できないとしており、他の報告においても4週齢のNODマウスにinsulin B chain-IgGFcをコードするプラスミドを筋肉内投与することで、膵島炎と糖尿病の促進が認められている<sup>(7)</sup>。従ってproinsulin II による糖尿病抑制効果は、末梢局所での発現が重要な意味を持つものと考えられた。

本実験のGAD67及びproinsulin II 発現NODマウスにおいて、10週齢での膵島炎はコントロールマウスと同程度であり、糖尿病の抑制も完全ではなかった。これは本実験で発現させた抗原以外のものに反応する病原性T細胞も存在することが示唆される。NODマウスにおいてはGADやproinsulinの他に、carboxypeptidase H, peripherin<sup>(34)</sup>やheat shock protein 65<sup>(35)</sup>, the tyrosine phosphatase-like IA-2<sup>(36, 37)</sup>, ICA69<sup>(38)</sup>,そして未だ同定されていない抗原<sup>(38)</sup>など、様々な自己抗原に対するT細胞の反応が認められると報告されている。しかし、GAD67及びproinsulin II 発現NODマウスそれぞれで顕著な糖尿病発症率の抑制がみられたことより、NODマウスにおける様々な自己抗原の中でGAD及び proinsulin II は糖尿病発症、進展に大きく関与しているものと思われた。NODマウスにおいて末梢での自己抗原の発現量を検討することで、更なる糖尿病抑制効果が期待できるものと思われた。更に、このような抗原によるワクチン療法はヒト1型糖尿病の発症予防の可能性を示唆するものと考えられた。

## 【謝辞】

稿を終えるに際し、本研究に際し多大なるご指導をいただいた横野浩一教授、永田正男助教授、及びご協力をいただいた神戸大学大学院医学系研究科老年内科の方々に対し、心より深謝申し上げます。

## 【文献】

1. Foulis, A. K., Farquharson, M.A.: Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin containing  $\beta$ -cells in recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetes* 35: 1215-1224, 1986.
2. Leiter, E.H.: The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and

- environment in development of autoimmune disease. *ILAR News* 35:4, 1993.
3. Daniel, D., Gill, R. G., Schloot, N., Wegmann, D.: Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur. J.Immunol.* 25: 1056-1062, 1995.
  4. Balasa, B., Boehm, B.O., Fortnagel, A., Karges, W., Van Gunst, K., Jung, N., Camacho, S.A., Webb, S. R., Sarvetnick, N.: Vaccination with glutamic acid decarboxylase plasmid DNA protects mice from spontaneous autoimmune diabetes and B7/DC28 costimulation circumvents that protection. *Clin. Immunol.* 99:241-252, 2001.
  5. Bot, A., Smith, D., Bot, S., Hughes, A., Wolfe, T., Wang, ., Woods, C., von Herrath, M.: Plasmid vaccination with insulin B chain prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 167:2950-2955, 2001.
  6. Urbanek-Ruiz, I., Ruiz, P. J., Paragas, V., Garren, H., Steinman, L., Fathman, C.G.: Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. *Clin. Immunol.* 100:164-171, 2001.
  7. Jr Weaver, D.J., Liu, B., Tisch, R.: Plasmid DNAs encoding insulin and glutamic acid decarboxylase 65 have distinct effects on the progression of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 167: 586-592, 2001.
  8. Tian, J., Atkinson, M.A., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Forsthuber, T., Lehmann, P.V., Kaufman, D.L.: Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.* 183: 1561-1567, 1996.
  9. Tisch, R., Liblau, R.S., Yang, X.D., Liblau, P., McDevitt, H.O.: Induction of GAD65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 47:894-899. 1998.
  10. Muir, A., Peck, A., Clare-Salzler, M., Song, Y.H., Cornelius, J., Luchetta, R., Krischer, J., Maclaren, N.: Insulin immunization of non-obese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished islet interferon- $\gamma$  transcription. *J.Clin. Invest.* 95:628-634. 1995.
  11. Tisch, R., Yang, X.D., Singer, S.M., Liblau, R.S., Fugger, L., McDevitt, H.O.: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366:72-75. 1993.
  12. Kaufman, D.L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E., Liblau, A.J., Lehmann, P.V.: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:585-593, 1993.
  13. Tisch, R., McDevitt, H.O.: Antigen-specific immunotherapy: is it a real possibility to combat T-cell-mediated autoimmunity?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:437-438, 1994.
  14. Yoon, J.W., Yoon, C.S., Lim, H.W., Huang, Q.Q., Kang, Y., Pyun, K.H., Hirasawa, K., Sherwin, R.S., Jun, S.: Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 284:1183-1187, 1999.
  15. Geng, L., Solimena, M., Flavell, R.A., Sherwin, R.S., Hayday, A.C.: Widespread expression of an autoantigen-GAD65 transgene does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10055-10060, 1998.
  16. Atkinson, M.A., Bowman, M.A., Campbell, L., Harrow, B.L., Kaufman, D.L., Maclaren, N.K.: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and Coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J.Clin. Invest.* 94:2125-2129, 1994.
  17. Baekkeskov, S., Anstoot, H.J., Chrisgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Foli, F., Richter-Olsen, W., de Camilli, P.: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:151-156, 1990.
  18. Tian, J., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Middleton, B., Newman, D., Mueller, R., Arita, S., Evans, C., Atkinson, M.A., Mullen, Y.: Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet

- graft survival in diabetes-prone mice. *Nat. Med.* 2:1348-1353, 1996.
19. Tisch, R., Wang, B., Serreze, D.V.: Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J. Immunol.* 163:1178-1187, 1999.
  20. Philippe, H., Jean-Paul, B., Chantal, B., Sylviane, M., Christian, B.: T Cell Response to Preproinsulin I and II in the Nonobese Diabetic Mouse. *J. Immunol.* 169:2436-2443, 2002.
  21. Daniel, D., Wegmann, D.R.: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:956-960, 1996.
  22. Hutchings, P., Cooke, A.: Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. *J. Autoimmun.* 1:127-130, 1998.
  23. Yasuda, H., Nagata, M., Arisawa, K., Yoshida, Fujihira, K., Okamoto, N., Moriyama, H., Miki, M., Saito, I., Hamada, H., Yokono, K., Kasuga, M.: Local expression of immunoregulatory IL-12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.* 102:1807-1814, 1998.
  24. Hoglund, P., Mintern, J., Waltzinger, C., Heath, W., Benoist, C., Mathis, D.: Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 189:331-339, 1999.
  25. Morgan, D.J., Kurts, C., reuwel, H.T.C., Holst, K.L., Heath, W.R., Sherman, L.A.: Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3854-3858, 1999.
  26. Ruiz, P.J., Garren,., Ruiz, I.U., Hirschberg, D.L., Nguyen, V.T., Karpuj, M.V., ooper, M.T., Mitchell, D., Fathman, C.G., Steinman, L.: Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *J. Immunol.* 162:3336-3341, 1999.
  27. Lobell, A., Weissert, R., Storch, M.K., Svanholm, C., De Graaf, L., Lassmann, H.R., andersson, T., Olsson, T., Wigzell, H.: Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 187:1543-1548, 1998.
  28. Schloot, N.C., Daniel, D., Norbury-Glaser, M., Wegmann, D.R.: Peripheral T cell clones from NOD mice specific for GAD65 peptides: lack of islet responsiveness or diabetogenicity. *J. Autoimmun.* 9:357-363, 1996.
  29. Cetkovic-Cvrlje, M., Gerling, I.C., Muir, A., tkinson, M.A., Elliot, J.F., Leiter, E.H.: Retardation or acceleration of diabetes in NOD/Lt mice mediated by intrathymic administration of candidate  $\beta$ -cell antigens. *Diabetes* 46:1975-1982, 1997.
  30. Tisch, R., Wang, B., Weaver, D.J., Liu, B., ui, T., Arthos, J., Serreze, D.V.: Antigen-specific mediated suppression of cell autoimmunity by plasmid DNA vaccination. *J. Immunol.* 166: 2122-2132, 2001.
  31. Wilson, S.S., Todd C.W., DeLuca, D.: Therapeutic alteration of insulin-dependent diabetes mellitus progression by T cell tolerance to glutamic acid decarboxylase 65 peptides in vitro and in vivo. *J. Immunology.* 167:569-577, 2001.
  32. Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J.F.A.P., Heath, W.R.: CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12703-12707, 1999.
  33. Wong, F. S., Karttuen, J., Dumont, C., Wen, L., Visintin, I., Pilip, I.M., Shastri, N., Pamer, E.G., Janeway, C.A.: Identification of a MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat. Med.* 5:1026-1031, 1999.
  34. Boitard, C., Villa, M.C., Becourt, C., Gia, H.P., uc, C., Sempe, P., Portier, M.M., Bach, J.F.: Peripherin : an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:172-176, 1992.



35. Elias, D., Reshef, T., Birk, O.S., Van der zee, R., Walker, M.D., Cohen, I.R.: Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa hest shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3088-3091, 1991.
36. Kudva, Y.C., Deng, Y.J., Govindarajan, R., Abraham, R.S., Marietta, E.V., Notkins, A.L., David, C.S.: HLA-DQ8 transgenic and NOD mice recognize different epitopes within the cytoplasmic region of the tyrosine phosphatase-like molecule, IA-2. *Hum. Immunol.* 62:1099-1105, 2001.
37. Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Magistrelli, G., Isacchi, A., Adorini, L.: Early Th1 response in unprimed nonobese diabetic mice to the tyrosine phosphatase-like insulinoma-associated protein 2, an autoantigen in type 1 diabetes. *J. Immunol.* 165:6748-6755, 2000.
38. Tree, T.I., O'Byrne, D., Tremble, J.M., MacFarlane, W.M., Haskins, K., James, R.F., Docherty, K., Hutton, J.C., Banga, J.P.: Evidence for recognition of novel islet T cell antigens by granule-specific T cell lines from new onset type 1 diabetic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 21:100-105. 2000.

# Vaccination with Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) or Proinsulin against Type 1 Diabetes Mellitus

Katsumi Yamada

Division of Internal and Geriatric Medicine, Department of Development and Aging  
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

## Abstract

To evaluate the effect of vaccination by islet-antigen-expressing cells on type 1 diabetes, we utilized recombinant adenovirus vectors transducing several islet-antigen genes into NOD fibroblasts and tried to modify the development of autoimmune diabetes in NOD mice, an excellent animal model of human type 1 diabetes. The expression of GAD67 or proinsulin II was detected in NOD fibroblasts transfected with Ad. mGAD67 or Ad.mPreproinsulin II by western blotting or ELISA, respectively. The transfected NOD fibroblasts were subcutaneously transplanted to young female NOD mice. Diabetic incidence was apparently reduced in NOD mice transplanted with either Ad. mGAD67 or Ad. mPreproinsulin II-transfected NOD fibroblasts, however, these transplanted mice still showed insulinitis as same degree as control mice. Th2 dominant pattern of cytokine expression was observed by RT-PCR method on the islets from NOD mice transplanted with GAD67 or proinsulin II-expressing fibroblasts. These results suggest that peripheral expression of GAD67 or proinsulin II in NOD mice could induce immunoregulatory Th2 cells that down-regulate diabetogenic Th1 cells. This experiment has implications for the application of the treatment for human type 1 diabetes.