



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。



【 103 】

氏 名・(本 籍) 山田 克己 (鳥取県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1563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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Vaccination with Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) or
Proinsulin against Type 1 Diabetes Mellitus
(グルタミン酸脱炭素酵素 (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)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博
教 授 春日 雅人
教 授 熊谷 俊一

【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、高血糖やケトーシス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、また末梢血において膵β細胞特異的T細胞の存在も認められている。一方、non-obese diabetic (NOD) mouse は急激な高血糖とケトーシスを示す1型糖尿病モデル動物であり、その病態はヒトの1型糖尿病とよく類似している。

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。これらの自己抗原に特異的なT細胞の移入、自己抗原を発現する plasmid DNA による免疫療法等により、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や、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。なぜなら、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。糖尿病の進展過程で他の抗原も同定されているが、ヒトと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はGADとinsulinが最も重要と思われる。実際、NODマウスに可溶性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。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。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。マウスのβ細胞では proinsulin I と proinsulin II という2つのプロインスリンが存在しているが、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ている。

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。

【方法と結果】

1. 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をそれぞれ作成し、これらのアデノウイルス・ベクターを新生児期のNODマウスより採取したNOD線維芽細胞に感染させ、GAD67あるいはproinsulin IIが発現していることをwestern blot法、ELISA法にて確認した。

2. Ad.mGAD67、Ad.mPreproinsulin IIをそれぞれMOI:10で感染させた 1×10^6 個のNOD線維芽細胞を3週齢と5週齢の2回に雌性NODマウスへ皮下移植を行い、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(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(1×10^6 個)を雌性NODマウスへ皮下移植した(n=10)。この結果、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.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。

3. Ad.mGAD67またはAd.mPreproinsulin IIを感染させた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、膵島炎の程度をH-E染色にて組織学的に検討した。GAD67発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスでは、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。

4. 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、膵島を分離した。この膵島よりRNAを抽出し、reverse transcriptionにてcDNAを得た。このcDNAを用いてIFN- γ 、IL-4を半定量PCR法で評価した。この結果、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、IL-4の増加傾向およびIFN- γ 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・バランスを示しており、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た。

【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おり、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。本研究では、3週齢よりGAD67及びproinsulin II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。従って、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る。

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。NOD線維芽細胞のMHCはclass I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。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、anergyによる糖尿病発症抑制の可能性は低いものと思われる。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、末梢での自己抗原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。また、本実験のGAD67及びproinsulin II発現NODマウスにおいて、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理由として、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細胞が存在することも示唆された。

NODマウスに対して自己抗原を投与した研究も多く報告されているが、異なった結果を示

している。この要因として、自己抗原の発現様式の違いや発現量の違いが重要であると考えられ、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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1559 号	氏名	山田 克己
論文題目	Vaccination with Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) or Proinsulin against Type 1 Diabetes Mellitus 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		
審査委員	主 査 南 康博 副 査 春日 雅人 副 査 熊谷 俊一		
審査終了日	平成 16 年 / 月 30 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

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、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。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。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。これらの自己抗原に特異的なT細胞の移入、自己抗原を発現するplasmid DNAによる免疫療法等により、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や、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。最近の研究から、ヒトと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はGADとinsulinが最も重要と考えられている。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。

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・ベクターをそれぞれ作成し、これらのアデノウイルス・ベクターを新生児期のNODマウスより採取したNOD線維芽細胞に感染させ、GAD67あるいはproinsulin IIの発現を確認後、3週齢と5週齢の2回に雌性NODマウスへ皮下移植を行い、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。コントロールとして、Ad.LacZを感染させたNOD線維芽細胞を雌性NODマウスへ皮下移植した。この結果、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.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。

また、Ad.mGAD67またはAd.mPreproinsulin IIを感染させた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、膵島炎の程度をH-E染色にて組織学的に検討した。GAD67発現NOD線維芽細胞の皮下移植NODマウスでは、無治療及びコントロール・ベクター感染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。

さらに、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、膵島を分離後IFN- γ 、IL-4を半定量PCR法で評価した。この結果、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、IL-4の増加傾向およびIFN- γ 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・バランスを示しており、末梢におけるGAD67およびproinsulin IIの発現により糖尿病病原性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。

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。NOD線維芽細胞のMHCはclass I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。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、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、末梢での自己抗原発現により糖尿病病原性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。また、本実験のGAD67及びproinsulin II発現NODマウスにおいて、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理由として、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細胞が存在することも示唆された。今後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る。また、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る。

本研究は、1型糖尿病に対するワクチン療法について、アデノウイルスベクター感染細胞を用いたワクチン療法の効果・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新しい自己抗原提示法によるワクチン療法の有用性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。