



Low-dose warfarin functions as an immunomodulator to prevent cyclophosphamide-induced NOD diabetes

Kurohara, Midori

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Date of Publication)

2011-12-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4148

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004148>

※ 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 黒原 みどり
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 1892 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Low-dose warfarin functions as an immunomodulator to prevent cyclophosphamide-induced NOD diabetes(低用量ワーファリンの免疫修飾作用による NOD マウスにおけるシクロフォスファミド誘導糖尿病の抑制)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一
教 授 春日 雅人
教 授 南 康博

背景と研究目的

1型糖尿病は自己反応性T細胞がインスリン産生膵β細胞を特異的に破壊する臓器特異的自己免疫疾患である。NODマウスはヒト1型糖尿病の自然発症動物モデルで、3-5週齢から膵島におけるリンパ球浸潤が始まり膵島炎が徐々に進行した結果、16週齢を過ぎると雌で高率に高血糖をきたし糖尿病発症に至る。β細胞の破壊機構についてはCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞がともに関与するといわれている。ひとつはCD4陽性T細胞により膵島に誘導された浸潤細胞由来のIL-1、IFN-γ、TNF-α、IL-6や一酸化窒素などの液性因子がβ細胞を破壊する機構である。もうひとつは細胞障害性CD8陽性T細胞が直接β細胞を破壊する機構で、perforin/granzyme-Bを介する経路と、Fas/Fasリガンドを介する経路がある。Fasを発現するβ細胞はFasリガンドを発現する活性化T細胞によってアポトーシスをおこす。

ワーファリンは抗凝固薬として広く普及しているが、KaterらはワーファリンがTNF-αから誘導されるマクロファージのIL-6分泌を抑制することを介して抗炎症作用を持つことを示した。またワーファリンはTyro3/Gas6シグナル経路を阻害することでも知られている。柳田らはGas6とTyro3ファミリーの一つであるAxlの糸球体腎炎におけるメサングウム細胞増殖に対する重要な役割と、低用量ワーファリンの経口投与によるGas6/Axlシグナル阻害を介した糖尿病性腎症における糸球体肥大の抑制効果を報告している。

Axl、Rse(別名Tyro3)、Merを含むTyro3ファミリーはチロシンキナーゼ受容体蛋白のサブファミリーであり、抗凝固作用を持つビタミンK依存性血清蛋白Gas6およびProtein Sをリガンドとする。Gas6はビタミンK存在下でN末端がγ-carboxyl化されることでのみ機能する。ワーファリンはビタミンKを枯渇させることによりGas6のγ-carboxyl化を阻害してTyro3/Gas6シグナルを抑制する。またTyro3受容体は免疫系、神経系、血管系、生殖器系など幅広い分布を示し、免疫系ではAPC(抗原提示細胞)上に多く発現しており、マクロファージの活性化状態を制御するなど重要な作用をもつ。

本研究では低用量ワーファリン投与によるNODマウスにおける自己免疫糖尿病に対する抑制効果について検討した。

方法と結果

(1)ワーファリンの抗炎症作用を調べるため、0.05-200μMの様々な濃度のワーファリン存在下でNODマウスの脾細胞によるIL-6の分泌をELISAにて測定したところ、プロトロンビン時間に全く影響を及ぼさない低濃度のワーファリン(0.1μM)存在下でIL-6分泌が抑制された。

(2)NODマウスの脾細胞、膵島および骨髄由来樹状細胞からcDNAを精

製し、RT-PCRを用いてTyro3メンバーの一つであるRseとGas6のmRNAの発現を確認した。

(3)8週齢前後のNODマウスにシクロフォスファミドを投与すると急激に糖尿病発症を誘導できることが知られている。プロトロンビン時間に全く影響を及ぼさない低用量のワーファリン(0.25mg/lと0.50mg/l)をNODマウスに経口投与し、このシクロフォスファミド誘導糖尿病の実験系を用いてワーファリンによる糖尿病発症抑制効果を検討した。糖尿病発症率は0.25mg/l群:27%(n=15)、0.50mg/l群:73%(n=15)、未投与群:100%(n=15)であった。H-E染色による組織学的検討では0.25mg/l投与群において膵島炎が著明に抑制された。

(4)0.25mg/lと1.00mg/lのワーファリンを雌性NODマウスに3週齢より経口投与し30週齢時における糖尿病発症率を観察した。未投与群は11週齢から30週齢(中央値26.8週齢)において糖尿病を発症し、発症率は80%(n=40)であった。これに対し0.25mg/l群は14週齢から30週齢(中央値28週齢)と糖尿病発症の遅延傾向を示したものの発症率は60%(n=20)と有意差を認めなかった。1.00mg/l群は17週齢から30週齢(中央値22.5週齢)で糖尿病発症を認め、発症率は70%(n=20)であった。

(5)以前我々は雌性NODマウスに抗FasL抗体を投与すると膵島炎と糖尿病発症を完全に抑制することを報告した。Fas/FasLシグナルはシクロフォスファミド誘導糖尿病モデルに不可欠であるとの報告もあることから、抗FasL抗体投与NODマウスと未処理のNODマウスを18、20週齢時にインスリンB9-23+IFAでfootpadより2回感作後、単径リンパ節由来リンパ球から抽出したDNAをcDNA arrayを用いて解析したところ、Fas/FasLシグナル阻害に相関してRse遺伝子の低下を検出した。さらにreal-time PCRにて抗FasL抗体投与NODマウスにおけるRse遺伝子発現が未処理マウスの半分程度に低下していることを確認した。

考察

本研究により低用量ワーファリンが免疫修飾作用によりNODマウスの自己免疫糖尿病を抑制することを新たに発見した。Katerらは100μM以下の低濃度ワーファリンがマクロファージのIL-6分泌を抑制するのに対し、100-250μMの高濃度ではIL-6分泌を促進することを報告している。またIL-6は自己免疫性糖尿病において自己反応性T細胞の活性化、細胞傷害性T細胞の分化、活性化B細胞の成熟などに関与することが知られているが、NODマウスのシクロフォスファミド誘導糖尿病の実験系への抗IL-6モノクローナル抗体の投与により糖尿病が抑制されたとの報告は本研究の実験結果に矛盾しないと考えられる。

ワーファリンは Tyro3/Gas6 シグナルの阻害薬としても知られている。Tyro3 ファミリー(Rse, Axl, Mer)は単球系の細胞表面に分布しており APC のホメオスターシスを制御している。自己免疫性糖尿病は APC の遺伝的欠陥や樹状細胞の機能不全に起因するとの研究もある。RT-PCR では Rse とそのリガンド Gas6 が 13 週齢以上のマウスの膵島、脾臓から検出された。このことは Rse や Gas6 が前糖尿病段階のマウスの体内で増殖したエフェクター細胞由来であることを示唆する。また骨髄由来樹状細胞から Rse と Gas6 が検出されたことはこれらの分子が NOD マウスの APC にも分布していることを示す。

シクロフォスファミド処理 NOD マウスへの低用量ワーファリンの経口投与実験では糖尿病発症率の抑制と膵島炎の軽減が認められた。本研究のワーファリン濃度は通常の抗凝固薬としての濃度(4-5 μ M)より著明に低くプロトロンビン時間を延長しない。実際、ワーファリン投与マウスに明らかな出血傾向や貧血は認めなかった。

本研究の *in vitro* の実験結果は *in vivo* の実験においてワーファリンの有効濃度域が極めて狭い範囲であったことと合致する。また本研究の *in vivo* の結果は、NOD マウスのシクロフォスファミド誘導糖尿病の実験系において IL-6 の阻害が糖尿病発症率を抑制したという報告とも合致する。以上より、適切な濃度が得られればワーファリンは糖尿病を抑制する可能性があり、その濃度は臨床で使用されている濃度より極めて低濃度であることが示唆された。

8 週齢前後の NOD マウスにシクロフォスファミドを投与すると自然発症の系ではみられない急激な糖尿病発症を誘導できることが知られている。Balasa らは NOD-Fas/lpr (+/-) マウスではシクロフォスファミド投与で糖尿病を誘導できるのに対し、正常 Fas 分子を完全に欠損する NOD-lpr/lpr (-/-) マウスでは糖尿病が誘導されないことを報告している。以前我々は 2-4 週齢の NOD マウスに抗 FasL 抗体を投与すると、膵島炎と糖尿病を完全に抑制することを報告した。この機序を解明するため、Fas/FasL シグナル阻害を呈する抗 FasL 抗体投与マウスを cDNA array で解析したところ、Tyro3 の一つである Rse の遺伝子レベルが低下していた。Real-time PCR では抗 FasL 抗体投与 NOD マウスにおける Rse 遺伝子発現が未処理マウスの半分程度に低下していることを確認した。ワーファリンは Tyro3/Gas6 シグナルを阻害することが知られており、本研究ではワーファリン投与が Fas/FasL 依存性の実験系であるシクロフォスファミド誘導糖尿病を抑制することを示した。さらに Fas/FasL シグナルが阻害された抗 FasL 抗体投与マウスでは Rse 遺伝子が低下していることも示した。以上を考え合わせると、低用量ワーファリン投与によるシクロフォスファミド誘導糖尿病の抑制機序は、IL-6 分泌抑制に加えて、Rse(Tyro3)/Gas6 シグナルおよび Fas/FasL シグナルの阻害に

何らかの関連があると考えられる。

シクロフォスファミド誘導糖尿病の実験系においてワーファリンが有効であったのに対し、自然発症自己免疫糖尿病の系では有意な効果は得られなかったが発症の遅延傾向は認められた。ヒトの自己免疫性糖尿病には種々の亜型があるが詳細な機序は解明されていないものの病因は多様性を示すと考えられている。本研究においても実験系による糖尿病発症機序の差異が異なる結果をもたらしたと考えられる。

結論

プロトロンビン時間に影響しない低用量のワーファリンには免疫修飾作用があり、経口投与により NOD マウスにおけるシクロフォスファミド誘導糖尿病が抑制されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1896号	氏名	黒原 みどり
論文題目 Title of Dissertation	Low-dose warfarin functions as an immunomodulator to prevent cyclophosphamide-induced NOD diabetes 低用量ワーファリンの免疫修飾作用による NOD マウスにおけるシクロフォスファミド誘導糖尿病の抑制		
審査委員 Examiner	主 査 熊谷 俊一 Chief Examiner 副 査 春日 推人 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20 年 1 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

1型糖尿病は自己反応性 T 細胞がインスリン産生膵β細胞を特異的に破壊する臓器特異的自己免疫疾患である。NOD マウスはヒト 1 型糖尿病の自然発症動物モデルで、3-5 週齢から膵島におけるリンパ球浸潤が始まり膵島炎が徐々に進行した結果、16 週齢を過ぎると雌で高率に高血糖をきたし糖尿病発症に至る。β細胞の破壊機構については CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞がともに関与するといわれている。ひとつは CD4 陽性 T 細胞により膵島に誘導された浸潤細胞由来の IL-1、IFN-γ、TNF-α、IL-6 や一酸化窒素などの液性因子がβ細胞を破壊する機構である。もうひとつは細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞が直接β細胞を破壊する機構で、perforin/granzyme-B を介する経路と、Fas/Fas リガンドを介する経路がある。ワーファリンは抗凝固薬として広く普及しているが、Kater らはワーファリンが TNF-α から誘導されるマクロファージの IL-6 分泌を抑制することを介して抗炎症作用を持つことを示した。またワーファリンは Tyro3/Gas6 シグナル経路を阻害することでも知られている。柳田らは Gas6 と Tyro3 ファミリーのひとつである Axl の糸球体腎炎におけるメサンギウム細胞増殖に対する重要な役割と、低用量ワーファリンの経口投与による Gas6/Axl シグナル阻害を介した糖尿病性腎症における糸球体肥大の抑制効果を報告している。本研究では低用量ワーファリン投与による NOD マウスにおける自己免疫糖尿病に対する抑制効果について検討した。

まず、ワーファリンの抗炎症作用を調べるため、0.05-200 μM の様々な濃度のワーファリン存在下で NOD マウスの脾細胞による IL-6 の分泌を ELISA にて測定したところ、プロトロンビン時間に全く影響を及ぼさない低濃度のワーファリン (0.1 μM) 存在下で IL-6 分泌が抑制された。また、NOD マウスの脾細胞、膵島および骨髄由来樹状細胞から cDNA を精製し、RT-PCR を用いて Tyro3 メンバーのひとつである Rse と Gas6 の mRNA の発現を確認した。

8 週齢前後の NOD マウスにシクロフォスファミドを投与すると急激に糖尿病発症を誘導できることが知られている。そこでこの系を用いて、ワーファリンの糖尿病発症に対する抑制効果を検討した。ワーファリン (0.25mg/l と 0.50mg/l) を NOD マウスに経口投与すると、糖尿病発症率は 0.25mg/l 群: 27% (n=15)、0.50mg/l 群: 73% (n=15)、未投与群: 100% (n=15) であった。H-E 染色による組織学的検討では 0.25mg/l 投与群において膵島炎が著明に抑制された。次に、0.25mg/l と 1.00mg/l のワーファリンを雌性 NOD マウスに 3 週齢より経口投与し 30 週齢時における糖尿病発症率を観察した。未投与群は 11 週齢から 30 週齢 (中央値 26.8 週齢) において糖尿病を発症し、発症率は 80% (n=40) であった。これに対し 0.25mg/l 群は発症の遅延傾向を示したものの発症率は 60% (n=20) と有意差を認めず、1.00mg/l 群での発症率も、70% (n=20) であった。

Fas/FasL シグナルはシクロフォスファミド誘導糖尿病モデルに不可欠であ

るとの報告もあることから、抗 FasL 抗体投与 NOD マウスと未処理の NOD マウスを 18、20 週齢時にインスリン B9-23+IFA で footpad より 2 回感作後、単径リンパ節由来リンパ球から抽出した DNA を cDNA array を用いて解析したところ、Fas/FasL シグナル阻害に相関して Rse 遺伝子の低下を検出した。さらに real-time PCR にて抗 FasL 抗体投与 NOD マウスにおける Rse 遺伝子発現が未処理マウスの半分程度に低下していることを確認した。

本研究は、シクロフォスファミド誘導糖尿病について、プロトロンビン時間に影響しない低用量のワーファリン投与について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった糖尿病発症抑制作用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。