



One amino acid difference is critical for suppression of the development of experimental autoimmune diabetes(EAD)with intravenous injection of insulinB:9-23 peptide.

奥町, 恭代

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4466

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004466>

※ 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	奥町 恭代
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1958 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 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

One amino acid difference is critical for suppression of the development of experimental autoimmune diabetes(EAD)with intravenous injection of insulinB:9-23 peptide. (実験的 1 型糖尿病モデルマウスにおけるインスリン B : 9 - 2 3 ペプチドの経静脈投与による糖尿病抑制の検討)

審 査 委 員

主 査	教 授	清野	進
	教 授	熊谷	俊一
	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。発症原因は未だ解明されていないが、最近ヒトおよびモデルマウスにおいてインスリンが 1 型糖尿病の重要な自己抗原である可能性が注目されている。

ヒト 1 型糖尿病の診断・予知に関連する自己抗体として、インスリンの他にグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase;GAD)、IA-2(insulinoma associated antigen-2)等があげられるが、インスリンは膵β細胞に最も特異性が高い分子である。またインスリン遺伝子 5' 上流の繰り返し配列(variable number of tandem repeats;VNTR)の多型は、ヒト 1 型糖尿病の疾患感受性と相関がある。

自然発症 1 型糖尿病動物モデルである NOD マウスで、膵島浸潤リンパ球の 50%以上がインスリン反応性 T 細胞であり、インスリン反応性 T 細胞は NOD マウスに糖尿病を誘導することができる。また NOD マウスにインスリンの皮下投与や粘膜投与を行うと抑制性 T 細胞が惹起されて糖尿病の発症が抑制され、さらには主要エпитープと考えられるインスリン B 鎖 9-23 ペプチド(InsB9-23)の皮下免疫でも発症抑制が認められる。マウスは 2 種類のインスリン遺伝子を持つ(insulin1,insulin2)が、insulin2 が knockout され insulin1 のみを持つ insulin2KO-NOD マウスは、糖尿病発症が高率に促進される。そして NOD マウスのインスリン遺伝子を 2 つとも knockout した上で、インスリン B 鎖 16 番のアミノ酸を Tyr から Ala に置換したプレプロインスリンを導入すると完全に糖尿病発症が抑制される。

自然発症でない系統においても、H-2^d を持ち膵β細胞に副刺激分子の B7.1 分子を発現するトランスジェニックマウス[F1(RIP-B7.1C57B/6×BALB/c)]に、insB:9-23 ペプチドを免疫したマウス(Experimental autoimmune diabetes, EAD モデル) は高率に糖尿病が誘導される。

臓器特異的自己免疫疾患に対する抗原特異的ペプチド療法として、抗原を皮下や粘膜に投与して抑制性 T 細胞を惹起する方法と、静脈投与で抗原反応性 T 細胞を除去する方法が考えられる。一般的に抗原の経静脈内投与はクローナルアナジーによる免疫寛容を誘導すると考えられているが、今回自己抗原エпитープ(InsB9-23)が明確な EAD マウスに insB9-23 ペプチドを経静脈的に投与して糖尿病発症への影響を検討した。

方法と結果

【1】 4 週齢の F1(RIP-B7.1 C57BL/6×BALB/c)マウスに 100μg の insB:9-23 ペプチドと IFA を皮下免疫し EAD マウスを作成した。マウスは 2 種類のイン

スリンを持つため、2 種類の insB:9-23 (ins1B:9-23, ins2B:9-23)があり B9 のアミノ酸に違いがある。ins1B:9-23 誘導 EAD マウスは ins2B:9-23 誘導 EAD マウスよりやや発症が促進される傾向にあったが、有意差はなかった。インスリン自己抗体(IAA)価は、ins1B:9-23 誘導 EAD 群が 16 週齢で有意に高値であったが、膵島炎の組織学的検討(Insulinitis score)では両群間に差を認めなかった。

【2】 3,4 週齢の NOD マウスに 100μg の ins1 or 2B:9-23 ペプチドの静脈内投与を行い発症率の変化を追跡したが、コントロール群との間に有意差はなかった。一方、ins1B:9-23 誘導 EAD マウスに対し、糖尿病誘導前後にあたる 3,5 週齢時に糖尿病誘導ペプチドである ins1B:9-23 ペプチド 100μg の静脈内投与を行うと、非投与群と比較して有意に糖尿病の発症が遅延したが、3,5 週齢時に insulinA:1-15 ペプチド 100μg を静脈内投与した群では、全く発症遅延は認めなかった。ins2 誘導 EAD マウスでも同様に、3,5 週齢に ins2B:9-23 ペプチドを静脈内投与すると、有意に糖尿病発症が遅延した。

【3】 ins1B:9-23 誘導 EAD 群と、ins1B:9-23 誘導 EAD に ins1B:9-23 ペプチドを静脈内投与した群とで、insulinitis score、IAA 値、脾細胞中の制御性 T 細胞の割合、insB:9-23 特異的 IgG1 と IgG2a に関して比較検討を行った。

Insulinitis score は、静脈内ペプチド投与群で有意に低下していた。IAA の産生も 8,12,16 週齢において、有意に静脈内ペプチド投与群で抑制されていた。その一方で、脾細胞中の CD4 陽性 CD25 陽性細胞の割合と CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合は、両群間で差は見られなかった。

マウスにおいて IgG1 は Th2 の、IgG2a は Th1 の指標として用いられるが、両群間で総 IgG1 および IgG2a のカウントは差を認めなかった。insB:9-23 特異的な IgG に関して、IgG1 は両群間で差を認めなかったが、IgG2a は 16 週齢時に静脈内ペプチド投与群で抗体産生の有意な抑制が認められた。20 週でも有意差はないものの同様の傾向を認めた。

【4】 ins1B:9-23 誘導 EAD マウスに、3,5 週齢時に糖尿病誘導ペプチドと異なる ins2B:9-23 ペプチドの静脈内投与を行うと非投与群と比較して有意に発症が遅延したが、ins1B:9-23 静脈内投与群に比べると遅延効果は弱かった。対照的に ins2B:9-23 誘導 EAD に ins1B:9-23 ペプチドを静脈内投与しても、糖尿病発症は遅延しなかった。

考察

NOD マウスにおいてインスリンは primary な自己抗原であると考えられている。その理由として、insulin double knockout NOD では糖尿病発症が完全に抑制されるが、GAD65 や IA-2 knockout NOD では発症が抑制されないこと、

インスリン反応性 T 細胞を除去した NOD では糖尿病発症が強く抑制されるのに対して、GAD 反応性 T 細胞や IGRP 反応性 T 細胞の除去では発症抑制が見られないことが挙げられる。IGRP や GAD に対する(自己反応性)T 細胞の反応はプロインスリンに対する反応の下流に位置していると考えられ、それ故 1 型糖尿病の予防の観点からインスリン反応性 T 細胞を標的とした治療法が大切と考えられる。

今回の実験で、NOD に insB:9-23 ペプチドを 2 回静脈内に投与したが、発症率は変化しなかった。この事は、4 週齢の NOD にインスリン A 鎖または B 鎖ペプチドを静脈内投与しても発症を抑制しないという報告に合致する。それに対して、insB:9-23 ペプチドで糖尿病を誘導した EAD では同様のプロトコールで有意に糖尿病発症を抑制した。これは自己抗原が明らかで自己抗原に対する反応が始まった時期が明確なモデルに、抗原投与前後に自己抗原ペプチドを静脈内投与することで、抗原特異的なトレランスを獲得したと考えられる。insB:9-23 特異的 IgG のサブクラス解析より、insB:9-23 特異的に Th1 細胞が減少していることが推察された。

多発性硬化症の動物モデルである EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis)は、ミエリン反応性 CD4T 細胞によって病気が引き起こされるが、ミエリン関連抗原を静脈内投与することで病原性 T 細胞特異的にアポトーシスが引き起こされて発症が抑制される。我々の EAD マウスでも、同様のメカニズムが働いていると考えられる。幾つかの EAE の研究で、病原性の自己反応はエピトープスプレディングを起こすために、一種類のエピトープだけを用いた抗原療法は効果が不十分である事が示されているが、これは我々が用いたプロトコールでは EAD の発症を完全に抑制しなかった理由の一つかもしれない。

EAE では、MOG で誘導された病態に対して MBP の静脈内投与を行っても発病を抑制しないことが報告されているが、今回 EAD でも誘導したペプチドと同種のペプチドを静脈内投与することで効果的に発病を抑制した。興味深いことに、ins1B:9-23 ペプチドは ins2B:9-23 ペプチド誘導 EAD の発症を全く抑制しなかったが、ins1B:9-23 誘導 EAD に対して ins2B:9-2 ペプチドは発症を抑制した。この理由については不明であるが、ins1:B9-23 ではなく ins2B:9-23 ペプチドの NOD への皮下投与は有意に糖尿病発症を抑制したという報告や、NOD において、insulin1 knockout(糖尿病発症抑制)と insulin2 knockout(発症促進)で正反対の性質を持つという結果より、インスリン B 鎖 9 番目のアミノ酸配列が 1 型糖尿病発症抑制に何らかの影響を及ぼすのかもしれない。また NOD の脾臓浸潤細胞から確立した ins1B:9-23 あるいは ins2B:9-23 反応性 T 細胞ハイブリドーマで、ins1B:9-23 ペプチドは ins2B:9-23 反応性ハイブリドーマに全く刺

激を与えず、ins2B:9-23 ペプチドは弱いながらも ins1B:9-23 反応性ハイブリドーマを刺激するという報告は、今回の結果と一致している。

結論

自己免疫誘導時期・自己抗原エピトープの明確な EAD マウスにおいて、皮下免疫前後の自己抗原ペプチド静脈内投与により糖尿病の発症が抑制されたが、発症抑制の機序として抗原特異的なリンパ球が免疫修飾をうけている可能性が示唆された。また、その発症抑制の効果はエピトープ内のアミノ酸 1 つの違いで変化がみられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1959 号	氏 名	奥町 恭代
論文題目 Title of Dissertation	<p>One amino acid difference is critical for suppression of the development of experimental autoimmune diabetes (EAD) with intravenous injection of insulinB:9-23 peptide.</p> <p>実験的1型糖尿病モデルマウスにおけるインスリンB:9-23ペプチドの経静脈投与による糖尿病抑制の検討</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 清野 進 清野 進 Chief Examiner</p> <p>副 査 熊谷 俊一 熊谷 俊一 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 康博 南 康博 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 20 年 9 月 17 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景と目的】

1型糖尿病は自己反応性 T 細胞が膵β細胞を破壊する臓器特異的自己免疫疾患である。インスリン分子は1型糖尿病の重要な自己抗原である可能性が示され、インスリンを用いた1型糖尿病発症の予知や発症予防法が検討されている。本論文はインスリンペプチドを用いた糖尿病発症予防の基礎検討を目的として、インスリン B 鎖 9-23 ペプチド(InsB9-23)で自己免疫性糖尿病を誘導した1型糖尿病モデルマウス(EAD)に対して、InsB9-23 ペプチドを経静脈的に投与して糖尿病発症への影響を研究したものである。

【方法】

① マウスは2種類のインスリンを持ち、B 鎖 9 番のアミノ酸1つが異なる Ins1B:9-23 と Ins2B:9-23 がある。4 週齢の F1(RIP-B7.1 C57BL/6×BALB/c)に 100μg の Ins1 or 2B9-23 と Incomplete Freund's adjuvant の皮下免疫により EAD マウスを作成し、糖尿病発症率、膵島炎、インスリン自己抗体価(IAA)を評価した。

② EAD に 3,5 週齢時に 100μg の Ins1 or 2B9-23 を経静脈的に投与し、糖尿病発症率、膵島炎の評価、IAA 測定、InsB9-23 特異的 IgG 抗体測定、脾細胞中の制御性 T 細胞の解析を行った。

【結果】

① Ins1B9-23 誘導 EAD マウスは Ins2B9-23 誘導 EAD マウスよりやや発症が促進される傾向にあったが有意差はなかった。IAA は、Ins1B9-23 誘導 EAD 群が 16 週齢で有意に高値であったが、膵島炎の組織学的検討では両群間に差を認めなかった。

②-1 Ins1B9-23 誘導 EAD マウスに対し、Ins1B9-23 ペプチドの静脈内投与を行うと、非投与群と比較して有意に糖尿病の発症が遅延した。3,5 週齢時に InsulinA1-15 ペプチド 100μg を静脈内投与しても全く発症遅延は認めなかった。Ins2 誘導 EAD マウスでも同様に、3,5 週齢時に Ins2B9-23 を静脈内投与すると、有意に糖尿病発症が遅延した。

②-2 Ins1B9-23 誘導 EAD 群と、Ins1B9-23 誘導 EAD に Ins1B9-23 を静脈内投与した群で膵島炎を評価すると、静脈内ペプチド投与群で有意に低下していた。IAA の産生も 8,12,16 週齢において、有意に静脈内ペプチド投与群で抑制されていた。InsB9-23 特異的 IgG は、IgG1 は両群間で差を認めなかったが、IgG2a は 16 週齢時に静脈内ペプチド投与群で抗体産生の有意な抑制が認められた。脾細胞中の CD4 陽性 CD25 陽性細胞の割合と CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合は、両群間で差は見られなかった。

②-3 Ins1B9-23 誘導 EAD マウスに、3,5 週齢時に Ins2B9-23 の静脈内投与を行うと、Ins1B9-23 静脈内投与群より遅延効果は減弱しているものの非投与群と比較して糖尿病発症が有意に遅延した。対照的に Ins2B9-23 誘導 EAD に Ins1B9-23 を静脈内投与しても、糖尿病発症は全く遅延しなかった。

【考察】

NOD に InsB9-23 ペプチドを 2 回静脈内に投与しても発症率は変化しなかったが、InsB9-23 ペプチドで糖尿病を誘導した EAD では同様のプロトコールで有意に糖尿病発症

を抑制した。これは自己抗原が明らかで自己抗原に対する反応が開始した時期が明確なモデルに、抗原投与前後に自己抗原を静脈内投与することで、抗原特異的なトレランスを獲得したと考えられる。また、アミノ酸が1分子異なることでトレランスを誘導する力が変化することが示された。

本論文は自己抗原の静脈内投与が自己免疫反応を抑制する事を実験的1型糖尿病マウスモデルにおいて初めて示したものである。また、同程度の糖尿病原性を示す自己抗原であってもアミノ酸1つの差異でトレランスの誘導能が異なることを示し、1型糖尿病の予知・予防に新たな知見を提示した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ものと認める。

The candidate, having completed studies on “One amino acid difference is critical for suppression of the development of experimental autoimmune diabetes (EAD) with intravenous injection of insulinB:9-23 peptide.”, with a specialty in immunology, and having advanced the field of knowledge in the area of diabetes, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine).