



# Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice

荒井, 隆志

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5033

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005033>

※ 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	荒井 隆志
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5033 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 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice(プレプロインスリンの抗原の投与は制御性 T 細胞を誘導し NOD マウスの膵島への自己免疫を抑制する)

審 査 委 員

主 査	教 授	南 康博
	教 授	清野 進
	教 授	中村 俊一

## [目的]

1 型糖尿病は、 $\beta$  細胞に特異的な抗原に対してリンパ球が反応し、 $\beta$  細胞が選択的に破壊される臓器特異的な自己免疫疾患である。抗原ペプチドの投与によって自己反応性の T 細胞を免疫寛容に誘導する免疫療法は、1 型糖尿病の理想的な治療として期待されている。近年、1 型糖尿病の主要な自己抗原として、インスリンが注目されている。しかし、これまで 1 型糖尿病の予防目的でインスリンを投与した臨床研究は、いずれも有意な効果を示すことができなかった。

この理由として、我々はインスリンの A 鎖や B 鎖以外に重要な抗原が存在する可能性を考えた。我々はプレプロインスリンのリーダーペプチドに着目し、そのエピトープを検索した。リーダーペプチドの 7 番から 24 番のペプチド (L7-24) は、NOD マウスの I-A<sup>g7</sup> のポケットに親和性の高いアミノ酸を含んでおり、このペプチドを用いて実験を行った。

## [方法]

ペプチドの投与のプロトコールとして、100  $\mu$ g の L7-24 を PBS100  $\mu$ l に溶解し、さらに不完全フロイントアジュバント 100  $\mu$ l と混和して 1 週間隔で 2 回 NOD マウスに皮下注射した。

10~14 週齢の NOD マウスに L7-24 を投与し、その 1 週間後に脾臓を採取してリンパ球を分離した。リンパ球を L7-24 や  $\beta$  細胞の自己抗原として既に知られているインスリン B9-23、IGRP206-214 と反応させ、ELISPOT アッセイにて IFN- $\gamma$  と IL-4 の分泌を評価した。また、反応させた後の上清に含まれる IL-10 や TGF- $\beta$  の濃度を ELISA にて測定した。脾臓や膵臓所属リンパ節からリンパ球を分離し、制御性 T 細胞のマーカーである CD25 や FoxP3 をフローサイトメトリーにて測定した。

無処置の 20 週齢の NOD マウスと 12 週齢のインスリン 2 ノックアウトマウスの膵島に浸潤しているリンパ球を分離した後、L7-24 やインスリン B9-23、IGRP206-214 と反応させ、ELISPOT アッセイにて IFN- $\gamma$  の分泌を評価した。

12 週齢の NOD マウスや 8 週齢のインスリン 2 ノックアウトマウスに L7-24 を投与し糖尿病の発症を追跡した。また、糖尿病を発症した NOD マウス (BG>300mg/dl) に L7-24 を投与し血糖値の推移を追った。糖尿病が寛解したマウスの膵島の組織を H-E 染色とインスリン、グルカゴンの免疫染色で観察した。

## [結果]

皮下注射した 1 週間後の脾臓のリンパ球を用いた ELISPOT アッセイにて、L7-24

を投与したマウスでは L7-24 に反応して著明な IL-4 の分泌がみられた (P<0.01)。その一方で、1 型糖尿病の原因となる Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は IGRP206-214 に反応して分泌がみられたが、L7-24 に対しては IFN- $\gamma$  の有意な分泌は認めなかった。また、脾臓から採取したリンパ球を抗原と反応させた後の上清の IL-10 と TGF- $\beta$  を ELISA で測定したところ、TGF- $\beta$  の分泌はみられなかったが、IL-10 は L7-24 を投与したマウスで有意に増加していた (P<0.01)。

次に L7-24 を投与した 1 週間後の NOD マウスの脾臓に含まれる制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した結果、L7-24 を投与した NOD マウスでは CD4+CD25+FoxP3+の制御性 T 細胞の CD4 陽性細胞に占める割合が有意に増加していた。また、脾臓の制御性 T 細胞の割合を経時的に測定したところ、L7-24 の投与後 3 日にピークがみられ、その後漸減した。脾臓所属リンパ節では有意な制御性 T 細胞の増加はみられなかった。

L7-24 が  $\beta$  細胞破壊の自然経過の中で自己反応性の T 細胞によって認識されているかどうかを評価するために、無処置の 20 週齢の NOD マウスと 12 週齢のインスリン 2 ノックアウトマウスの脾臓のリンパ球と膵島に浸潤しているリンパ球を用いて ELISPOT アッセイを行った。脾臓のリンパ球では L7-24 に対して有意な IFN- $\gamma$  の分泌はみられなかったが、膵島に浸潤しているリンパ球は NOD マウスとインスリン 2 ノックアウトマウスの両者で有意な分泌の亢進がみられた (P<0.05)。

L7-24 が糖尿病を予防する効果があるかどうかを検討するため、12 週齢の NOD マウスに L7-24 を投与し糖尿病の発症の有無を追跡した。その結果、L7-24 を投与した NOD マウスは 45 週齢の段階で 22 匹中 3 匹が発症したのみで、不完全フロイントアジュバント単独を投与した NOD マウスと比較して有意な糖尿病の発症抑制が得られた (P=0.04)。糖尿病発症が著明に促進されるインスリン 2 ノックアウトマウスでは、8 週齢の段階で投与を行っても糖尿病の発症抑制は得られなかった。

糖尿病を発症した NOD マウス (BG>300mg/dl) に L7-24 を投与したところ、13 匹中 5 匹に糖尿病の寛解がみられた。コントロールを投与した NOD マウスでは、18 匹中 1 匹が寛解したのみであった。L7-24 の投与によって寛解したマウスの膵島の組織を寛解後 16 週に評価したところ、著明なリンパ球浸潤にもかかわらず膵島が保たれている組織像がみられた。インスリンとグルカゴンの免疫染色を行ったところ、 $\beta$  細胞の間に  $\alpha$  細胞が散在しており膵島の再構成を示していた。

## [考察]

L7-24 の NOD マウスに対する投与は、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-10 を誘導し、CD4+CD25+FoxP3+の制御性 T 細胞を増加させた。Th2 サイトカインや制御性 T 細胞が自己反応性 T 細胞を抑制し、糖尿病発症の抑制及び発症したマウスの寛解

をもたらしたと考えられる。また、無処置の NOD マウスやインスリン2ノックアウトマウスの膵島浸潤細胞は L7-24 に反応して IFN- $\gamma$  を分泌しており、膵島炎の自然経過において L7-24 に反応する自己反応性 T 細胞が出現していることがうかがわれる。

最近、MHC に対する親和性の低いペプチドが自己抗原として重要である可能性が考えられている。仮説として、MHC に対する親和性の低いペプチドに反応する自己反応性 T 細胞は、胸腺におけるネガティブセレクションを回避しやすいという理由が挙げられる。逆に、MHC に対する親和性の高いペプチドに反応する T 細胞は、ネガティブセレクションを受け制御性 T 細胞として生き残ることが考えられる。L7-24 は NOD の MHC である I-A<sup>g7</sup> のポケットに対する親和性の高いアミノ酸を3つ有しており、I-A<sup>g7</sup> への結合性が高いと推測される。MHC への結合性が高いことが、制御性 T 細胞を誘導しやすい理由として挙げられる。

この実験で、我々は初めてインスリンのリーダーペプチドに含まれるペプチドが、NOD マウスの糖尿病発症抑制と発症後の治療に有効であることを示した。インスリンの A 鎖や B 鎖、C 鎖についてはこれまで詳細な研究がされてきたが、リーダーペプチドが注目される機会は少なかった。2008 年にリーダーペプチドに含まれる CD8 のエピトープが、1 型糖尿病患者のリンパ球によって認識されることが報告されている。今後、1 型糖尿病の発症や治療におけるリーダーペプチドの役割の研究が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2116号	氏 名	荒井 隆志
論文題目 Title of Dissertation	プレプロインスリンの抗原の投与は抑制性 T 細胞を誘導し NOD マウスの膵島への自己免疫を抑制する Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 清野進 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>1 型糖尿病は、膵β細胞特異的な抗原に対してリンパ球が反応し、β細胞が選択的に破壊される自己免疫疾患である。抗原ペプチド投与により自己反応性 T 細胞を免疫寛容に誘導する免疫療法は、1 型糖尿病の理想的な治療と期待され、自己抗原としてインスリンが注目されているが、従来インスリンを投与した臨床研究は有意な効果を挙げていない。そこで、私はインスリンの A 鎖や B 鎖以外に重要な抗原が存在する可能性を考え、プレプロインスリンのリーダーペプチドに着目しエピトープ検索を行った。</p> <p>リーダーペプチドの 7 番から 24 番のペプチド (L7-24) は、NOD マウスの I-A<sup>b</sup> のポケットに高親和性のアミノ酸を含み、このペプチドを用いて実験を行った。</p> <p>10～14 週齢の NOD マウスに L7-24 を投与し、1 週間後脾臓を採取しリンパ球を分離した。リンパ球を L7-24 やβ細胞の自己抗原として知られているインスリン B9-23、IGRP206-214 と反応させ、ELISPOT アッセイにて INF-γ、IL-4 の分泌を評価し、反応後の上清中の IL-10、TGF-β の濃度を ELISA にて測定した。また、脾臓や膵臓所属リンパ節からリンパ球を分離し、制御性 T 細胞のマーカーである CD25 や FoxP3 をフローサイトメトリーにて測定した。一方、無処置の 20 週齢の NOD マウスと 12 週齢のインスリン 2 ノックアウトマウスの膵島に浸潤しているリンパ球を分離後、L7-24 やインスリン B9-23、IGRP206-214 と反応させ、ELISPOT アッセイにて INF-γ の分泌を評価した。さらに、12 週齢 NOD マウスや 8 週齢インスリン 2 ノックアウトマウスに L7-24 を投与し糖尿病の発症を追跡した。また、糖尿病を発症した NOD マウスに L7-24 を投与し血糖値の推移を追った。糖尿病が寛解したマウスの膵島の組織を H-E 染色とインスリン、グルカゴンの免疫染色で観察した。</p> <p>投与 1 週間後の脾臓のリンパ球を用いて解析したところ、L7-24 を投与したマウスでは L7-24 に反応して著明な IL-4 の分泌がみられたが、1 型糖尿病の原因となる INF-γ は IGRP206-214 に反応して分泌がみられたが、L7-24 に対しては有意な分泌は認めなかった。また、脾臓から採取したリンパ球を抗原と反応させたところ、TGF-β の分泌はみられなかったが、IL-10 は L7-24 を投与したマウスでは有意に増加した。L7-24 を投与した NOD マウスでは制御性 T 細胞の CD4 陽性細胞に占める割合が有意に増加した。</p>
--

脾臓の制御性 T 細胞の割合は、L7-24 の投与後 3 日にピークがみられ、その後漸減した。
脾臓所属リンパ節では有意な制御性 T 細胞の増加はみられなかった。無処置の 20 週齢
NOD マウスと 12 週齢インスリン 2 ノックアウトマウスの脾臓のリンパ球と脾島に
浸潤しているリンパ球では、脾臓のリンパ球では L7-24 に対して有意な IFN- $\gamma$ の
分泌はなかったが、脾島に浸潤しているリンパ球は NOD マウスとインスリン 2
ノックアウトマウス両者で有意な分泌亢進がみられた。また、L7-24 投与 NOD マウス
では、対照 NOD マウスと比べ有意な糖尿病の発症抑制がみられた。糖尿病発症が著明に
促進されるインスリン 2 ノックアウトマウスでは、8 週齢で投与を行っても糖尿病の
発症抑制はなかった。また、糖尿病を発症した NOD マウスに L7-24 を投与したところ、
有意な糖尿病の寛解がみられた。L7-24 の投与によって寛解したマウスの脾島は、寛解後
16 週で著明なリンパ球浸潤にもかかわらず脾島が保たれている組織像がみられた。
これらの成果から、NOD マウスへの L7-24 投与は、IL-4 や IL-10 を誘導し制御性
T 細胞を増加させるが、Th2 サイトカインや制御性 T 細胞が自己反応性 T 細胞を抑制し、
糖尿病発症の抑制及び発症したマウスの寛解をもたらしたと考えられる。
本研究は、インスリンのリーダーペプチド中のエピトープについて研究したもので
あるが、従来解明されていなかったリーダーペプチド中のペプチドが、NOD マウスの
糖尿病発症抑制と発症後の治療に有効であるという重要な知見を得たものとして価値
ある業績と認める。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。