



Detection of GAD65-reactive T-cells in type 1 diabetes by immunoglobulin-free ELISPOT assays

小谷, 玲子

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-10-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2647

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002647>

※ 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。



【 142 】

氏名・(本籍) 小谷玲子 (京都府)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博ろ1849号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成14年10月9日

【 学位論文題目 】

Detection of GAD65-Reactive T-Cells in Type 1
Diabetes by Immunoglobulin-Free ELISPOT Assays
(Immunoglobulin-free ELISPOT 法を用いた1型
糖尿病患者における GAD65 反応性T細胞の同定)

審査委員

主査教授 横野 浩一

教授 熊谷 俊一

教授 春日 雅人

Immunoglobulin-free ELISPOT 法を用いた 1 型糖尿病患者における GAD65 反応性

T 細胞の同定

【緒言】

1 型糖尿病の病態は、NOD マウスなどのモデル動物の研究にて T 細胞、特に Th1 細胞主体の自己免疫現象(細胞性免疫)による臍 β 細胞の破壊であることが明らかとなっている。しかし、実際の臨床においては、ヒトの 1 型糖尿病の診断や予知に GAD、インスリン、IA-2/ICA512 などの臍 β 細胞に対する自己抗体(液性免疫)の検出が応用されているにすぎない。また、その陽性率も日本人は欧米に比べると低く、発症後年月が経つと陰性化することが知られており、抗体測定のみでは診断や予知に不十分である。本来 1 型糖尿病の診断や予知においては、臍 β 細胞破壊の主因である細胞性免疫反応の測定が、自己抗体測定に優る方法と考えられる。しかしながら、ヒト末梢血中の自己抗原反応性細胞の同定については、細胞増殖反応の測定が行われているものの、操作手技が煩雑で測定結果が不安定であるなどの問題点が指摘されており、十分確立されていない。

本研究では、ヒト T 細胞の非特異的反応を軽減させるために、培養液中のヒト AB 型血清から免疫グロブリン除去する工夫を加え、測定手技の比較的簡単な ELISPOT 法を用いて 1 型糖尿病患者の末梢血に存在する臍 β 細胞自己抗原反応性 T 細胞の同定とその機能的な解析を行なった。そして、我々が確立した Immunoglobulin-free ELISPOT 法による自己抗原特異的 T 細胞の検出率について細胞増殖反応によるものと比較検討を行なった。

【方法】

(1) 対象

1 型糖尿病患者 33 名 (男性 14 名、女性 19 名; 年齢 32.7 ± 17.8 歳)

2 型糖尿病患者 15 名 (男性 6 名、女性 9 名; 年齢 53.9 ± 15.6 歳)

健常コントロール 23 名 (男性 10 名、女性 13 名; 年齢 32.2 ± 6.1 歳)

(2) 1 型糖尿病患者の末梢血中の臍 β 細胞反応性 T 細胞の同定

対象者よりヘパリン採血を行ない、Ficoll-Hypaque 法で単核球を分離し、臍 β 細胞自己抗原と考えられている human GAD65、 β -Casein、外来抗原である PPD、マイトジエンである PHA と培養し、細胞増殖反応と ELISPOT 法を行った。培養の際には、透析膜でヒト AB 型血清中の免疫グロブリンを除去した培養液を用いることにより nonspecific な反応を軽減させる工夫を行った。

(a) 細胞増殖反応の測定

ヒト末梢血より単核球を分離し、臍 β 細胞自己抗原やコントロール抗原と反応させ、培養 6 日目に ^{3}H -Thymidine uptake にて細胞増殖反応を測定し、Stimulation index が健常コントロール群の mean+2SD 以上を有意と判定した。

(b) ELISPOT 法

抗サイトカイン抗体 (Anti-IFN- γ 、Anti-IL-4) を固相化した培養プレートに、ヒト末梢血から分離したリンパ球と抗原を反応させ 40 時間の培養後、活性化 T 細胞から分泌されたサイトカイン (IFN- γ 、IL-4) をビオチン、アビシンで標識した抗サイトカイン抗体と反応させ、それを発色させてスポットとして同定した。抗原特異的サイトカイン分泌細胞の同定はすべて triplicate で行い、抗原と反応させた時のスポット数から抗原と反応させない細胞に認められた非特異的スポット数を差し引いた平均値が健常コントロールの mean+3SD 以上を有意と判定した。

【結果】

(1) 細胞増殖反応による抗原反応性 T 細胞の測定

1 型糖尿病、2 型糖尿病、健常コントロール群すべてにおいて、陽性コントロールである PHA (マイトジエン) に対する反応は非常に強く、その反応は 3 群間に差はなかった。PPD は日本人における Th1 細胞優位な免疫反応を示す陽性コントロールとして使用したが、3 群間に反応の差は認めなかった。

GAD に対する細胞増殖反応は、32.3% (10/31) の 1 型糖尿病患者において認め、2 型糖尿病群、健常コントロール群では GAD に対する増殖反応は認めなかつた。 β -Casein に対する細胞増殖反応は、20.7% (6/29) の 1 型糖尿病患者に認め、2 型糖尿病患者 1 例に同様の反応を認めたが、健常コントロール群では全く認めなかつた。

(2) Immunoglobulin-free ELISPOT 法による抗原反応性 T 細胞の同定

免疫グロブリンを除去した培養液を使用することによって、抗原と反応させていない細胞で認めた非特異的 IFN- γ スポットの平均は $1.0 \pm 2.2 / 2 \times 10^6$ PBMC と、従来の報告に比べ非常に軽減されていた。また、PHA に対する反応はすべての対象において 100 以上と強く認められ、3 群間に差はなかつた。PPD に対しては IFN- γ 産生細胞のみ検出され、その反応における 3 群間の差は認めなかつた。

GAD 特異的 IFN- γ 分泌細胞は、66.7% (22/33) の 1 型糖尿病患者に検出され、平均スポット数は $2.9 \pm 4.6 / 2 \times 10^6$ PBMC であった。また、GAD 特異的 IL-4 分泌細胞も 21.4% (6/28) の 1 型糖尿病患者に検出されたが平均スポット数は $0.3 \pm 0.8 / 2 \times 10^6$ PBMC と反応は少なかつた。一方、健常コントロール群では GAD 反応性細胞は検出されず、2 型糖尿病群では 1 例に GAD 反応性 IFN- γ 分泌細胞が検出されたのみであった。 β -

Casein に対しては、36%の1型糖尿病患者に IFN- γ 分泌細胞認めたが、健常コントロールの 26.3%にも同程度の IFN- γ 分泌細胞が検出された。 β -Casein 反応性 IL-4 分泌細胞の同定は3群すべてにおいて認められなかった。

以上の結果から、ELISPOT 法 (66.7%) は細胞増殖反応 (32.3%) よりも有意に1型糖尿病患者の末梢血中の GAD 反応性 T 細胞を検出することができ、Th1 細胞優位であった。

(3) 自己抗体価と GAD 反応性細胞の検出率との関係

本研究を行った1型糖尿病患者のうち、GAD 抗体、IA-2 抗体の両者を測定した30例について、細胞増殖反応、ELISPOT 法それぞれにおける GAD 反応性細胞の検出率と自己抗体価の関係について検討した。

ELISPOT 法では、GAD 抗体、IA-2 抗体ともに陰性の6名中5名、つまり 83.3% の自己抗体陰性の1型糖尿病患者においても GAD 反応性 Th1 細胞を認めた。一方、細胞増殖反応では、40% の自己抗体陰性患者において GAD に対する反応を認めたのみであった。これらの結果から、自己抗体測定に加え、我々が開発した Immunoglobulin-free ELISPOT 法による臍 β 細胞自己抗原反応性細胞の検査を行うことが1型糖尿病の診断や予知に有用であると考えられた。

【考察】

近年の研究では、1型糖尿病は T 細胞を介した自己免疫機序による臍 β 細胞の破壊されることが主たる病態であることが明らかにされている。しかしながら、ヒトの1型糖尿病においては自己抗原特異的 T 細胞の検出法がいまだ十分確立されておらず、一般臨床では自己抗体の測定が行われているにすぎない。現在までの ELISPOT 法を用いた研究では、抗原と反応させると >100 のスポットが見られるものの、抗原を加えていない陰性コントロールにも 10-100 の非特異的なスポットが報告されている。この非特異的反応のためにアッセイが不安定化し、十分な信頼性が得られていない。我々は、この非特異的反応の一因に培養液中に含まれるヒト AB 型血清中の免疫グロブリンが関与する可能性を考え、免疫グロブリンを除去した培養液を用いた基礎実験を行った。細胞増殖反応の測定においては、免疫グロブリンを除去した培養液を用いると、抗原と反応させた際の Stimulation index がより増加し、感度が良好となった。また ELISPOT 法においても、抗原を加えない細胞の非特異的スポットが有意に減少し、その結果 GAD 特異的 IFN- γ スポットが非特異的スポットに比べ有意に検出されることが確認された。

この基礎実験の結果に基づき本研究を行ったところ、Immunoglobulin-free ELISPOT 法では 66.7% の1型糖尿病患者において末梢血中の自己抗原反応性 T 細胞を

検出することができ、細胞増殖反応 (32.3%) よりも有意に高率であった。また自己抗原反応性 T 細胞は Th1 細胞優位であることが確認され、今までの1型糖尿病の報告と一致する結果であった。一方、細胞増殖反応では GAD に対する反応を認めたにもかかわらず、ELISPOT 法ではサイトカイン分泌細胞を認めない症例もあり、細胞増殖反応が T 細胞のみならず NKT 細胞などの他の免疫細胞の反応も捕らえている可能性が考えられた。

Immunoglobulin-free ELISPOT 法では、非特異的スポットが減少したため抗原特異的スポット数も減少した結果、GAD 反応性 T 細胞の検出におけるカットオフ値は、IFN- γ スポット、IL-4 スポットそれぞれ $0.8/2 \times 10^6$ PBMC 以上、 $0.3/2 \times 10^5$ PBMC 以上の IL-4 スポットと非常に低い値となった。しかし、GAD に対する反応が陽性となったものはすべて、その時のスポット数が抗原非存下のスポット数の 2 倍以上であったので、低いカットオフ値であることに問題はないと考えられた。また、多発性硬化症患者における抗原特異的 T 細胞は、TCR レベルでは 1/300 の頻度で存在するが、末梢血で測定すると細胞のアボトーシスのため $1/10^5 \sim 10^6$ しか測定できないとの報告もあり、本研究の結果のように1型糖尿病患者における GAD 反応性 T 細胞の頻度が 1-23/200,000 であることは、決して少ないものではないと考えられた。

GAD 反応性 IFN- γ 分泌細胞が検出された4人の1型糖尿病患者において Immunoglobulin-free ELISPOT 法を再度行ったが、4例とも同程度の GAD 反応性 IFN- γ 分泌細胞が同定され、このアッセイの再現性が確認された。また、3例については凍結保存した単核細胞を用いて Immunoglobulin-free ELISPOT 法も行ったが、いずれも数は若干減少したものの、GAD 反応性 IFN- γ 分泌細胞が検出され、今後この方法が大規模研究の際の T 細胞反応を確認する方法として活用できる可能性が示唆された。

今回 GAD の他に検討を行った β -Casein に対しては、1型糖尿病患者のみならず健常コントロールにも反応性の Th1 細胞が認められた。この理由は明らかではないが、 β -Casein が1型糖尿病の自己抗原といわれているのは白人における報告であり、日本人にとっては特異的な自己抗原ではないのかもしれない。

以上まとめると、Immunoglobulin-free ELISPOT 法によって、非常に高率にそして特異的に、1型糖尿病患者の末梢血中の自己抗原反応性 T 細胞を検出することができた。また、自己抗体測定に加え、この Immunoglobulin-free ELISPOT 法による臍 β 細胞自己抗原反応性細胞の検査を行うことによって 97% (32/33) の1型糖尿病患者の自己免疫反応を検出することができた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1853 号	氏名	小谷 玲子
論文題目	<p>Detection of GAD65-Reactive T-Cells in Type 1 Diabetes by Immunoglobulin-Free ELISPOT Assays</p> <p>Immunoglobulin-free ELISPOT 法を用いた 1 型糖尿病患者における GAD65 反応性 T 細胞の同定</p>		
審査委員	主査 植野 浩一 副査 熊谷 俊一 副査 春日 雄人		
審査終了日	平成 14 年 9 月 30 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

1 型糖尿病の発症機構は、NOD マウスなどのモデル動物の研究において T 細胞主体の自己免疫現象(細胞性免疫)による臍 β 細胞の破壊であることが明らかとなっているが、実際の臨床においては、ヒトの 1 型糖尿病の診断や予知に自己抗体(液性免疫)の検出が応用されているにすぎない。本来 1 型糖尿病の診断や予知においては、臍 β 島破壊の主因である細胞性免疫反応の測定が、自己抗体測定に優る方法と考えられる。しかしながら、ヒト末梢血中の自己抗原反応性 T 細胞の同定については、GAD などの抗原刺激による細胞増殖反応の測定が行われているものの、操作手技が煩雑で測定結果が不安定であるなどの問題点が指摘されており、臨床的検査としてまだ十分に確立されていない。また、ELISPOT 法を用いた研究も、抗原を加えていない陰性コントロールに 10-100 の非特異的なスポットが検出されることが多いため、十分な信頼性が得られていないのが現状である。本研究では、この非特異的反応の一因に培養液中に含まれるヒト AB 型血清中の免疫グロブリンが関与する事を確認し、培養液中のヒト AB 型血清から免疫グロブリンを除去する工夫を加え、1 型糖尿病患者の末梢血中の臍 β 細胞自己抗原反応性 T 細胞を検出する方法として Immunoglobulin-free ELISPOT 法を開発した。

測定手技の比較的簡便な ELISPOT 法と、従来から行われている細胞増殖反応による測定法を用いて 1 型糖尿病患者の末梢血に存在する GAD 反応性 T 細胞の同定とその機能的な解析を行なったところ、Immunoglobulin-free ELISPOT 法では 66.7% の 1 型糖尿病患者において末梢血中の自己抗原反応性 T 細胞が検出され、細胞増殖反応 (32.3%) よりも有意に高率であった。また、自己抗原反応性 T 細胞は IFN- γ を産生分泌する Th1 細胞優位であることも明らかとなり、従来の 1 型糖尿病の報告と一致する結果であった。また、ELISPOT 法では、GAD 抗体、IA-2 抗体ともに

陰性の 6 名中 5 名、つまり 83.3% の自己抗体陰性の 1 型糖尿病患者においても GAD 反応性 Th1 細胞を認めたが、細胞増殖反応では、40% の自己抗体陰性患者において GAD に対する反応を認めたのみであった。これらの結果から、自己抗体測定に加え、私共が開発した Immunoglobulin-free ELISPOT 法による臍 β 細胞自己抗原反応性細胞の検査を行うことが 1 型糖尿病の診断や予知に有用であると考えられた。さらに、Immunoglobulin-free ELISPOT 法の再現性及び、凍結保存した単核細胞を用いた場合の検査の信頼性も確認され、今後この方法が 1 型糖尿病のスクリーニングや大規模研究における T 細胞反応性を確認する方法として活用できる可能性が示唆された。以上より、本研究者が開発した Immunoglobulin-free ELISPOT 法によって、非常に高率になおかつ特異的に、1 型糖尿病患者の末梢血中の自己抗原反応性 T 細胞を検出することが可能となった。また、従来の自己抗体測定にこの Immunoglobulin-free ELISPOT 法による臍 β 細胞自己抗原反応性 T 細胞の検査を加えることによって、97% (32/33) の 1 型糖尿病患者の自己免疫反応を検出することが可能であった。

以上より、本研究はヒト 1 型糖尿病の診断と予知において、従来ほとんど行われていなかった細胞性免疫異常の観点から新しい測定法を開発したものであり、本疾患の病態解析においても重要な知見を得たものとして価値ある業績とみとめる。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。