

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790638
 研究課題名 (和文) GAD 反応性免疫制御性 T 細胞の生体内誘導による自己免疫性糖尿病の発症抑制
 研究課題名 (英文) Induction of in vivo anti-GAD65 reactivity leads to the suppression of autoimmune diabetes.
 研究代表者
 及川 洋一 (OIKAWA YOICHI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：30296561

研究成果の概要：

1 型糖尿病の病態形成において、GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) に対する自己免疫応答がどのような役割を果たしているのかを明らかにするために、1 型糖尿病の優れたモデルである NOD (Nonobese diabetic) マウスを用いて研究を進めた。その結果、GAD に対する自己免疫応答は、1 型糖尿病の疾患形成に抑制的に働く可能性を見出すことに成功した。将来、GAD を標的とした免疫寛容療法が、1 型糖尿病の発症予防や治療に有用である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学、免疫学、免疫制御、GAD、NOD マウス

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病の多くは、膵島関連抗原を標的とした自己免疫機序が関与していると考えられている。しかし、1 型糖尿病の病態形成において、膵島関連抗原の 1 つである GAD に対する自己免疫応答の役割については不明な点が多い。GAD 欠損 NOD マウスでは野生型の NOD マウスと比較して、糖尿病発症率に差を認めないとの報告があり、少なくとも糖尿病の発症の primary antigen ではない可能性が報告されている (Yamamoto T et al. Diabetologia. 2004;47:221-4.)。しかし同報告では、経過中に痙攣等で死亡するマウスが

多発するなど実験系に問題があることから、詳細な検討が必要とされていた。一方我々は、糖尿病発症直前の NOD マウスの脾細胞では、GAD 刺激に対して高インターロイキン (IL) -10 産生性、すなわち 1 型糖尿病の病態形成に対して抑制的に働いている可能性を提唱してきた。以上より、GAD に対する自己免疫応答能は 1 型糖尿病の病態形成に対して促進的ではなくむしろ抑制的に働いている可能性があり、詳細な検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

GAD に対する免疫応答が 1 型糖尿病糖尿病の病態形成にどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GAD 欠損 NOD マウスあるいは野生型 NOD マウスから脾細胞 (3×10^6 個) を採取し、NOD-scid マウスに養子移入して、糖尿病発症率 (移入率) を検討した。

(2) レシピエントマウスの膵臓における膵島炎スコアを HE 染色後に評価した。

(3) レシピエントマウスの脾細胞を単離し、脾細胞浮遊液中に GAD あるいはインスリンを添加し、各蛋白に対するサイトカイン (インターフェロン (IFN) γ およびインターロイキン (IL) -10) の産生能をフローサイトメーターで同定し、サイトカイン産生リンパ球 (CD4) 数をカウントした。

(4) 膵ならびに膵所属リンパ節における各種サイトカイン (IFN γ 、IL-4、TGF β など) の mRNA 発現レベルを real-time PCR 法にて半定量し、各組織におけるサイトカインプロフィールを検討した。

(5) 膵切片を作成し、制御性 T 細胞のマーカーである CD25 分子の免疫染色を行った。

(6) 自己免疫性糖尿病の発症に寄与するケモカイン CXCL10 ならびにその受容体である CXCR3 の膵臓ならびに膵所属リンパ節における mRNA 発現レベルを real-time PCR 法にて半定量した。

4. 研究成果

(1) GAD 欠損 NOD マウスの脾細胞 (3×10^6 個) を NOD-scid マウス (レシピエント) に移入 (KOT 群) したところ、糖尿病の移入率は 21.4% であり、野生型 NOD マウス (コントロール) の脾細胞による糖尿病移入率 (WTT 群; 100%) と比較して有意に低かった。

(2) 両群間のレシピエントにおける膵島炎スコアを比較したところ、KOT 群の膵島炎は WTT 群と比べて軽度であった。

(3) レシピエントにおける膵島抗原特異的な免疫応答能を評価するため、レシピエント脾細胞における GAD 反応性 CD4 細胞数をフローサイトメーターで評価した。その結果、GAD 反応性 IFN γ 産生 CD4 細胞数は、KOT 群において少ない傾向を示した。一方、免疫制御に関わるサイトカインである IL-10 を産生する GAD 反応性 CD4 細胞数は、KOT 群において増加の傾向が認められた。同様の系を GAD の代わりにインスリンを用いて行ったが、インスリン反応性 CD4 細胞については、IFN γ ならびに IL-10 共に両群間で差が見られなかった。

以上より、GAD 欠損 NOD マウス由来のリンパ球の一部は、レシピエント内で GAD に対する反応性を獲得したこと、そのリンパ球は膵島に対して細胞傷害性よりもむしろ免疫制御性を呈し、疾患の進展阻止に寄与する可能性が高いことが示された。

(4) 免疫制御性サイトカインである TGF β の発現レベルが WTT 群と比較して KOT 群の膵組織において有意に上昇していた。

(5) 膵切片の免疫染色では、TGF β の産生に関わる免疫制御性 T 細胞 (regulatory T cell、以下 Treg) が KOT 群においてのみ膵島局所に浸潤していたことから、膵島への Treg の浸潤が KOT 群における糖尿病発症の抑制に寄与している可能性が示唆された。

(6) ケモカイン CXCL10 ならびにその受容体である CXCR3 の膵臓における発現レベルは、WTT 群において有意に高値であったが、膵リンパ節においては逆に KOT 群で高値であった。これは、糖尿病原性リンパ球の浸潤が KOT 群では膵リンパ節に留まり、膵島局所への遊走が困難となっている状態を示唆しており、糖尿病の発症抑制に寄与するものと考えられた。

以上から、GAD に対する免疫抑制性の反応は、糖尿病原性リンパ球を脾リンパ節に留め、かつ膵島炎局所において直接的に Treg を介した免疫制御に寄与し、結果的に糖尿病の発症抑制に繋がるものと考えられた。本研究の成果は、1 型糖尿病の発症予防や治療に GAD を標的とした免疫寛容療法が有用である可能性を示唆するものとして、注目に値すると考えられた。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)
Yasuhiko Kanazawa, Akira Shimada, Yoichi Oikawa, Yoshiaki Okubo, Ai Tada, Takatoshi Imai, Junichi Miyazaki, Hiroshi Itoh. Induction of anti-whole GAD65 reactivity in vivo results in disease suppression in type 1 diabetes. **Journal of Autoimmunity**, 2009 (In press). 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)
金澤寧彦、及川洋一、大久保佳昭、今井孝俊、宮崎純一、鳥田 朗、伊藤 裕. GAD 反応性 T 細胞の誘導による 1 型糖尿病発症への影響. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 24 - 26 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

及川 洋一 (OIKAWA YOICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30296561

(2)研究分担者

特記事項なし

(3)連携研究者

特記事項なし