

福島慶子 論文内容の要旨

主 論 文

Combined insulin B:9-23 self-peptide and polyinosinic-polycytidylic acid accelerate insulinitis but inhibit development of diabetes by increasing the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the islets in nonobese diabetic mice

(インスリン B:9-23 ペプチド+poly I:C 併用投与による、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の膵島内誘導と自己免疫性糖尿病の発症抑制)

(福島慶子、阿比留教生、永山雄二、古林正和、佐藤剛、中原麻美、川崎英二、山崎浩則、上羽悟、松島鋼治、エドウィン・ルウ、江口勝美)

(Biochemical and Biophysical Research Communication 367 (2008) 719-724)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口勝美教授)

緒 言

インスリンは、ヒト 1 型糖尿病の主要自己抗原である。1 型糖尿病自然発症モデルマウスである NOD マウスにおいても、インスリンは主要自己抗原であり、B 鎖の 9 番目から 23 番目のペプチド(B:9-23p)は、T リンパ球の標的抗原であることが明らかにされた。B:9-23p を NOD マウスに免疫するとインスリン自己抗体発現が増強し、糖尿病発症は抑制される。正常 BALB/c マウスに同ペプチドを免疫するとインスリン自己抗体発現は誘導されるが、膵島炎、糖尿病には進展しない。B:9-23p 免疫に TLR3ligand である poly I:C を併用投与することで、膵島への自己免疫反応が増強され、BALB/c マウスでは膵島炎を、疾患感受性マウスでは早期に糖尿病が誘導される。今回、我々は、NOD マウスに poly I:C と B:9-23p を併用投与し、膵島炎進展と糖尿病発症抑制という、一見矛盾した結果を観察した。CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は、胸腺および末梢で分化し、末梢での免疫学的自己寛容の主要な役割を果たしている。我々は、B:9-23p と polyI:C による膵島炎進展と糖尿病発症抑制の機序として、末梢において制御性 T 細胞が誘導されているのではないかと仮説をたてた。仮説の証明のため、膵島内に浸潤している CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞と effector T 細胞を観察し、さらに制御性 T 細胞の部分的除去後の B:9-23p と polyI:C 併用投与の影響について検討した。

対象と方法

雌性 NOD マウスを実験に用いた。4 週齢雌性 NOD マウスに B:9-23p (100 μ g)/IFA を単回皮下投与し、同時に poly I:C (7.5mg/g-体重) 腹腔内投与 (計 10 回) の併用投与を行い、その後の膵島炎進展および糖尿病発症率を検討した。また、別の群に対して、抗 CD25 抗体 PC61 (500 μ g) を単回腹腔内投与したのち、3 日後に B:9-23p と poly I:C の併用投与を行った。PC61 非投与群では、12 週齢から隔週で血糖測定を開始、PC61 投与群では、4.5 週齢から週 2 回の血糖測定を開始し、その後の糖尿病発症率を比較検討した。血糖値 250mg/dl 以上で糖尿病と判断した。治療 2 週間後 (6 週齢時) の膵島、甲状腺、唾液腺を hematoxylin&eosin 染色し、膵島炎のレベルを比較検討した。膵島においては、リンパ球浸潤の程度により膵島炎レベルを score1~score4 まで分類した。また、治療 4 週間後 (8 週齢時) の膵島および膵リンパ節において、CD4 陽性 T 細胞に占める Foxp3 陽性細胞の頻度 (%Foxp3⁺/CD4⁺) を免疫組織学的に検討した。

結 果

4 週齢 NOD マウスへの B:9-23p 単独投与および B:9-23p+poly I:C の併用投与は、膵島炎は進展させたが、その後の糖尿病発症を抑制していた。抗 Foxp3 抗体、抗 CD4 抗体を用いた免疫組織学的検討の結果、B:9-23p+poly I:C 群では、%Foxp3⁺/CD4⁺の頻度は 16.4%と未治療群の 8.4%と比較して有意に増加していたが、膵リンパ節においては、%Foxp3⁺/CD4⁺の頻度は両群間に有意差は認めなかった。抗 CD25 抗体である PC61 を前投与し、制御性 T 細胞を部分的に除去した群では、PC61 単独投与でも糖尿病発症が促進されることを確認した。PC61 の投与 3 日後に、B:9-23p と poly I:C の併用投与を行った群においては、その発症抑制効果は消失し、興味あることに、治療後わずか 2 週間 (6 週齢) という超早期からの糖尿病発症を認めた。この 6 週齢-糖尿病発症マウスの組織学的検討において、膵島全体に著明なリンパ球浸潤を認めたが、甲状腺および唾液腺においては明らかな細胞浸潤を認めなかった。PC61 を前投与した群では、B:9-23p+poly I:C の投与、非投与に関わらず、%Foxp3⁺/CD4⁺の頻度は PC61 非投与群に比し有意に減少していた。

考 察

若年 NOD マウスへのインスリン B 鎖ペプチドと poly I:C の併用投与は、膵島局所に、自己免疫性糖尿病を急速に誘導可能な病的 T リンパ球とともに、CD4⁺CD25⁺制御性を誘導する。膵島内に誘導された細胞は、制御性 T 細胞がより優位バランスをとるために、膵島炎が増強されるにも関わらず、糖尿病への進展を予防していると考えられる。抗 CD25 抗体を前投与することにより、制御性 T 細胞を部分的に除去することで、インスリン B 鎖ペプチドと poly I:C 投与後に、自己反応性の病的 T リンパ球が優位に膵島内に浸潤し、超早期の糖尿病が誘導されることが示唆された。ヒト 1 型糖尿病において、インスリンを用いた大規模な発症抑制の臨床治験が行われたが、そのほとんどの治療が効果なしと結論された。今後、有効な 1 型糖尿病の発症阻止には、抗原特異的な制御性 T 細胞を、病的細胞に対して優位かつ長期に誘導しうる効果的な治療法の開発が不可欠であると考えられた。