

古林正和論文内容の要旨

主 論 文

Altered B:9-23 Insulin, when Administered Intranasally with Cholera Toxin Adjuvant, Suppresses The Expression of Insulin Autoantibodies and Prevents Diabetes

コレラトキシンを粘膜アジュバントに用いた、インスリン改変 B:9-23 ペプチドの経鼻投与によるインスリン自己抗体発現抑制及び1型糖尿病の発症予防

古林正和、阿比留教生、新川武、福島慶子、周紅波、川崎英二、山崎浩則、Edwin Liu、Dongmei Miao、F. Susan Wong、George S Eisenbarth、江口勝美

(The Journal of Immunology, 179 巻 4 号, 2082-2088, 2007 年)

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

自己抗原が同定された自己免疫疾患では、自己反応性 T 細胞の標的エピトープである自己抗原ペプチド投与による免疫寛容の誘導療法は有効な治療となりうる。一方、自己抗原エピトープに細胞傷害性 T 細胞 (CTL) のエピトープが重複する場合、同ペプチド投与の粘膜免疫は、自己免疫疾患の発症抑制効果のみならず増悪させる可能性が報告された。1 型糖尿病において、インスリン B 鎖の 9-23 番目のアミノ酸 (B:9-23) は NOD マウスの CD4+T 細胞の主要な抗原エピトープである。また若年 NOD マウスに B:9-23 ペプチドを皮下投与すると、インスリン自己抗体発現を増強し糖尿病発症を抑制する。この B:9-23 ペプチドは 2 つの CD4+T 細胞のエピトープ (B:9-16, B:13-23) と、CTL のエピトープ (B:15-23) を有する。今回我々は、通常の B:9-23 ペプチドより強い糖尿病発症抑制効果の獲得の為に B:9-23 ペプチドの CTL への反応を消失させた二つのペプチド (B:9-23 ペプチドの B16, 19 番目アミノ酸をアラニンに置換した改変ペプチド (A16, 19-APL) あるいは欠損ペプチド (B:9-21, B:11-23)) を NOD マウスに投与し、効果的な糖尿病発症抑制療法を確立する目的にコレラトキシンを粘膜アジュバントとして用い経鼻投与の検討を行った。

対象と方法

1. 雌性 NOD マウスにコレラトキシン添加、非添加の B:9-23 ペプチドを投与し、B:9-23 ペプチド抗体及びインスリン自己抗体の出現を確認した。
2. インスリン B 鎖ペプチド(B:9-23)、改変ペプチド(A16, 19-APL)、欠損ペプチド(B:9-21、B:11-23)の CTL への反応をインスリン B:15-23 反応性 CD8T 細胞に対する増殖能及び ^{51}Cr リリース法による細胞障害活性を用い確認した。
3. 雌性 NOD マウスにコレラトキシンを添加したインスリン B 鎖ペプチド(B:9-23)、改変ペプチド(A16, 19-APL)、C 端欠損ペプチド(B:9-21)、N 端欠損ペプチド(B:11-23)を 4-10 週齢にかけ経鼻投与し、その後のインスリン自己抗体の測定、膵島炎スコア、累積糖尿病発症率を検討した。
4. 高血糖雌性 NOD マウスにコレラトキシンを添加した B:9-23 ペプチド、A16, 19-APL ペプチドを投与し、糖尿病寛解率を検討した。

結 果

1. コレラトキシン非添加の B:9-23 ペプチド投与では B:9-23 ペプチド抗体の出現及びインスリン自己抗体の増強を認めなかった。コレラトキシンを添加した B:9-23 ペプチド投与では B:9-23 ペプチド抗体の出現及びインスリン自己抗体の増強を認めた。
2. CTL エピトープ(B:15-23)を含む B:9-23 ペプチド、B:11-23 ペプチドではインスリン反応性 CD8T 細胞の増殖及び細胞障害活性を認めたが、A16, 19-APL ペプチド、B:9-21 ペプチドでは CD8T 細胞の増殖及び、細胞障害活性も認めない事より CTL への反応消失を確認した。
3. CTL エピトープを含む B:9-23 ペプチド、B:11-23 ペプチドでは、インスリン自己抗体発現、膵島炎スコアは増強し、糖尿病発症抑制効果を認めなかった。一方 CTL の反応を消去した B:9-21 ペプチドではインスリン自己抗体発現の増強を認めず、膵島炎進展、糖尿病発症を抑制した。また A16, 19-APL ペプチドではインスリン自己抗体の発現を強力に抑制、膵島炎進展、糖尿病発症も抑制し、更に明らかな糖尿病寛解誘導効果を認めた。

考 察

本研究は NOD マウスの膵島浸潤リンパ球の CD4+T 細胞 CD8+T 細胞の主要抗原エピトープである B:9-23 ペプチドを用いた粘膜免疫による糖尿病抑制効果を検討した。今回粘膜アジュバントにコレラトキシンをを用いた経鼻免疫は抗体産生増強を認め、明らかなアジュバント効果が確認された。CTL エピトープを含む B:9-23 ペプチド、B:11-23 ペプチドの経鼻免疫は糖尿病発症抑制効果が不完全であるのに対し、CTL の反応を消失させた B:9-21 ペプチド、A16, 19-APL ペプチドは膵島炎、糖尿病発症を抑制した事から経鼻免疫による自己免疫疾患発症阻止法の開発には制御性 T 細胞の側面だけでなく、発症を促進させる CTL の反応をいかに減少させるかが重要と考えられた。特に A16, 19-APL ペプチドはインスリン自己抗体発現も抑制しており、インスリンに対する液性免疫、細胞性免疫の両者を抑制し、糖尿病発症及び発症後の寛解を誘導する可能性が示唆され、ヒトへの臨床応用の可能性が高い治療と考えられた。コレラトキシンは顔面神経麻痺などの副作用の報告もあり今後ヒトへ応用するには無毒化コレラトキシンなど安全かつ生理的なアジュバントの開発が必要と考えられた。