

Title	1型糖尿病の発症予知に関する研究：動物モデルを用いた基礎的検討
Sub Title	
Author	山田, 悟(Yamada, Satoru) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.T11- T26
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040301-0011

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

1 型糖尿病の発症予知に関する研究：動物モデルを用いた基礎的検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

山 田 悟

(平成 15 年 9 月 25 日受付)

Key words : macrophage, prediction, type 1 diabetes

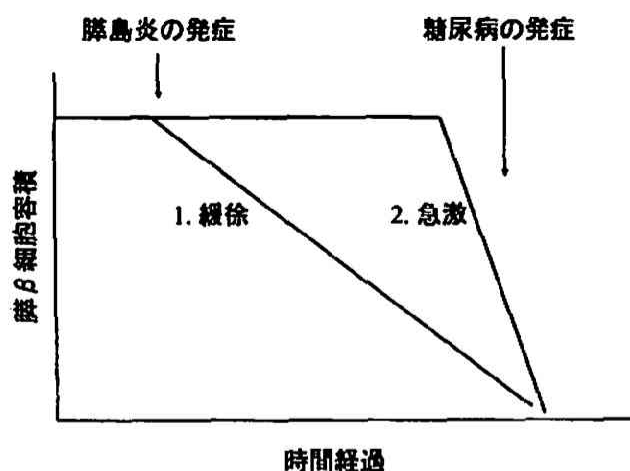
1 型糖尿病は、「膵 β 細胞の破壊的病変でインスリンの欠乏が生じることによって起こる糖尿病」と定義されている¹⁾。多くの 1 型糖尿病では、自己免疫学的な機序により膵 β 細胞周囲にリンパ球を中心とする炎症性細胞浸潤がまず生じ、その後膵 β 細胞が破壊されて糖尿病を発症する。最終的にインスリン依存状態に陥ることが多く、かつてはインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus : IDDM) と呼ばれ、実際、1920 年代のインスリンの発見まで 1 型糖尿病を発症した小児の多くは数週間で死に至っていた。1922 年のインスリンの臨床応用開始後、生命予後は一般健常児なみになることが期待されたが、1965 年から 1979 年に診断された各国の 1 型糖尿病患児の 20 年間の累積死亡率を調べた長期予後の報告によれば、欧米でも 1 型糖尿病患児の死亡率は一般人口と比較して 2~7 倍も高く、日本においては 14 倍も死亡率が高かった²⁾。このような日本における予後の悪さは、医療体制の改善とともに急性合併症や腎症による死亡が減少したことでほぼ欧米なみ (5 倍程度) にまで改善されてはいるが³⁾、それでも今なお生命予後は悪い。また、30 歳以上の 1 型糖尿病患者においては、心血管疾患による死亡が増加し、死亡リスクは一般人口の 10 倍以上になるとされている⁴⁾。加えて、最近では生命予後の改善に伴って慢性的な高血糖による多くの合併症が問題になりつつある。よって、今後、1 型糖尿病の予防は、きわめて重要な課題であると考えられる。

適切かつ効率的に発症を予防するためには、発症を正

確に予知する必要がある。これまで、発症予知マーカーとしては、遺伝子 (ヒト白血球抗原、インスリン)⁵⁾ や膵 β 細胞を標的とした自己抗体 (膵島関連自己抗体)⁶⁾ が提唱されている。しかし、1 型糖尿病は患者の一卵性双生児でも 10~60% 程度しか発症せず^{7,8)}、遺伝因子のみによる発症予知は不可能である。また、1 型糖尿病患者の近親者 (遺伝子がある程度限定された集団) の中で、膵島関連自己抗体が陽性の集団を対象にすれば 1 型糖尿病発症予知は可能であることが示されつつある^{9,10)} が、1 型糖尿病患者のほとんどが家族歴をもたないことを考えると、一般集団を対象に 1 型糖尿病発症予知・予防を考えるには、別途の予知マーカーが必要であることが示唆される。

新たな予知マーカーを検索し、有効な予防法を確立するためには、1 型糖尿病における膵 β 細胞破壊の進行過程の理解が不可欠と考えられる。1 型糖尿病は、膵 β 細胞容積が本来の 65~90% 程度を失ってから発症するとされてきたが^{11,12)}、現在まで糖尿病発症前の 1 型糖尿病における膵 β 細胞の変化については 2 つの仮説が提唱されており、未だ結論が出ていない。1 つは、かなり早期に成立する膵ランゲルハンス氏島 (ラ氏島) へのリンパ球浸潤 (膵島炎) の出現直後から徐々に β 細胞の数は減少し、90% 程度が消失したところで糖尿病が発症するという説¹³⁾ であり、もう 1 つは膵島炎の成立後も β 細胞は保持され、ある時点で (おそらくは) T helper 1 (Th1)/T helper 2 (Th2) バランスの変化を伴う免疫状態の変化に伴って急激に β 細胞が減少し、その直

本論文は、Yamada S, Irie J, Shimada A, Kodama K, Morimoto J, Suzuki R, Oikawa Y, Saruta T : Assessment of beta cell mass and oxidative peritoneal exudate cells in murine type 1 diabetes using adoptive transfer system. Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の一部を含む。



第1図 1型糖尿病発症過程における膵β細胞容積に関する2つの仮説。1. 膵島炎の発症直後より徐々に減少し、65~90%の容積が失われると糖尿病が発症する。2. 膵島炎の発症後も容積はしばらく保持されるが、Th1/Th2バランスの変化を契機に急激に容積が減少し、糖尿病に至る。NODマウスにおいては、4週齢頃に膵島炎が成立し、12週齢以降に糖尿病が発症しはじめ、雌性では30週齢頃までに70%程度の発症率を示す。

後に糖尿病が発症するという説¹⁴⁾である(第1図)。もし、前者が正しいのならば、発症予防は可能な限り早期から開始する必要がある。場合によってはβ細胞の再生を伴わせなければならない。逆に後者が正しいのであれば、糖尿病発症の直前に1型糖尿病の発症過程にブレーキをかければ、糖尿病を予防することができるはずである。

そこで、今回著者は、将来の1型糖尿病の予知マーカーや有効な予防法の確立につなげることを目的として、1型糖尿病における膵β細胞破壊の進展過程の検討とその過程の中で変動する因子の検索を行った。

1. 1型糖尿病モデルマウスにおける膵β細胞容積の減少過程の検討

1型糖尿病の病因解明のためのモデル動物の一つとして、non-obese diabetic (NOD) マウスが繁用されている。NODマウスは、ヒト1型糖尿病に類似した性質を数多くもつ優れたモデル動物であり、生後4週齢頃より膵島炎(膵ランゲルハンス島(膵島)へのリンパ球浸潤)を認め、生後12週齢以降に顕性糖尿病を発症する。累積発症率は雌性では30週齢ころまでで約70%である。本研究では、遺伝的には均一でありながら、どの個体が糖尿病を発症するのか予知することができない、このNODマウスをモデル動物として用いることとした。

また、免疫担当細胞の*in vivo*における役割を検討する方法として「細胞移入」の系があり、NODマウスにおいても数多くの移入実験の報告がある¹⁵⁻¹⁷⁾。今回、著者は細胞移入の系を用いることとし、1型糖尿病モデルであるNODマウスをドナーとし、遺伝的な背景はNODマウスと同様でありながら有効なリンパ球を欠如するNOD-scid (severe combined immunodeficiency) マウスをレシピエントとして、NODマウスの膵β細胞容積を検討しつつ、その脾細胞(リンパ球)をNOD-scidマウスに移入することで糖尿病の発症しやすさを調べ、両者の関係を検討した。

2. 1型糖尿病モデルマウスを用いた膵β細胞破壊とともに変動する因子についての検討

上記の細胞移入の系を利用し、ドナーのNODマウスの免疫担当細胞の機能や細胞表面マーカーなどを検討し、レシピエントのNOD-scidマウスの発症までの週数に示される発症のしやすさとの関係を探ることによって、膵β細胞の破壊過程とともに変動する因子を明らかにすることとした。こうした因子の変動が膵β細胞の破壊に対して原因として働いていないとしても、ともに変動する因子が明らかとなれば、予知マーカーや予防法の確立の糸口になるものと期待される。

対象と方法

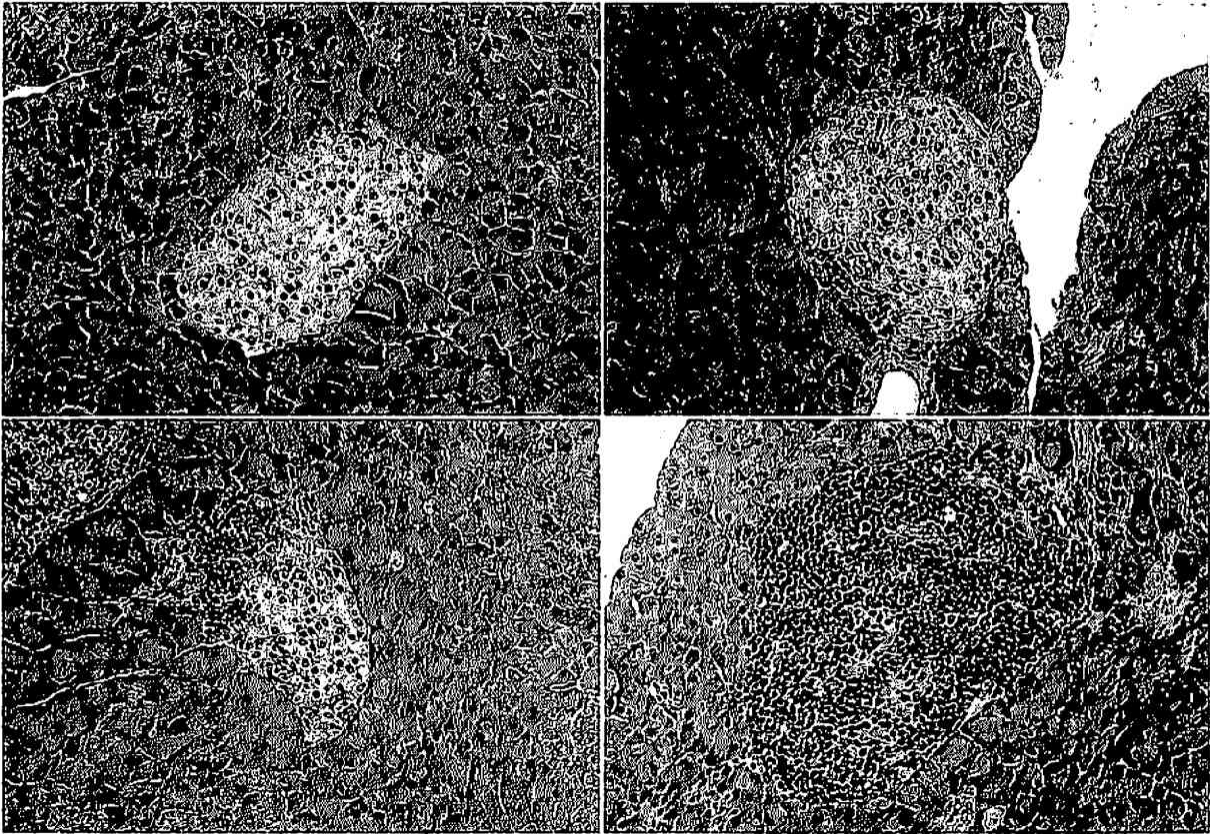
1. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた1型糖尿病発症前の膵β細胞容積の変化の推測

1) 動物

雌性NODマウスと雌性NOD-scidマウスを日本クレーア(東京)より購入し、慶應義塾大学医学部動物実験センター内で特定病原体非感染(specific pathogen-free; SPF)環境下にて飼育した。飼育及び実験処置にあたっては、慶應義塾大学実験動物取扱マニュアルに準拠した。また、本実験は倫理委員会の承認を得た(承認番号021017(2002年))。

2) 脾細胞の準備

糖尿病未発症の16~18週齢のNODマウスもしくは発症直後の18週齢のNODマウスを頸椎脱臼により無痛に屠殺した後、脾臓を取り出し、2%の仔牛胎児血清(fetal calf serum; FCS)(JRH Bioscience, アメリカ)を含んだRPMI-1640液(Gibco BRL, アメリカ)(以下2%FCS-RPMI)に入れ、75µmフィルター(Corning, アメリカ)を使用して単細胞浮遊液を作成した。エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム



a	b
c	d

第2図 膵島炎の評価。a) grade 0；膵島周囲に炎症性細胞の浸潤がない。b) grade 1；膵島周囲に炎症性細胞の浸潤はあるが膵島内には認めない。c) grade2；膵島内に炎症性細胞の浸潤はあるが、膵島内の面積の1/2は越えない範囲に留まっている。d) grade3；膵島内の面積の1/2を越える面積に炎症性細胞の浸潤を認める。すべての膵島に対して膵島炎の評価を行い、その平均値をその個体の膵島炎の評価とした。

(2Na-EDTA) 0.045 g, 塩化アンモニウム (NH₄Cl) 8.34 g, 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃) 1.0 g を 1000 ml の水に溶解して作成した液を用いて赤血球を溶血させた後、3回2%FCS-RPMIで洗浄し、細胞移入実験などの次の段階まで数分から数時間氷上にて静置した。

3) 細胞移入

単離した脾細胞を2%FCS-RPMIからリン酸緩衝液(PBS)に移し、1×10⁷個/mlの濃度に調整し、1匹のNODマウスあたり3匹ずつの5週齢雌性NOD-scidマウスに0.2 ml (2×10⁶個/匹) ずつ腹腔内投与した。

4) 糖尿病発症のモニタリング

脾細胞の移入を受けたNOD-scidマウスに対して、週2回テストテープ(Eli Lilly, アメリカ)を用いて尿糖をチェックした。尿糖が陽性であったマウスに対しては尾静脈より採血し、グルテストエース(Arkay, 日本)

を用いて血糖を調べた。2回続けて血糖が250 mg/dl以上であったマウスは糖尿病と診断した。レシピエントであるNOD-scidマウスの個体差による影響を排除するために3匹のレシピエントのうち1匹でも発症した場合、ドナーのNODマウスは糖尿病発症性をもって判断し、3匹のレシピエントのうち最も早く発症した個体の週数をもって、ドナーのNODマウスの糖尿病発症性の強さとした。一方、3匹のレシピエントが移入後14週までに1匹も発症しなかった場合、ドナーのNODマウスには糖尿病発症性がないと判断した。14週までに発症しなかったNOD-scidマウスは解剖に賦し、胸腺腫がないかどうかを検討した。NOD-scidマウスは胸腺腫を発症しやすいことが知られており、40週齢までの累積発症率は雌性で約80%、雄性で約30%に及ぶことが知られている¹⁸⁾。NOD-scidマウスにおける胸腺腫は

ほとんどが20週齢以降に発症するが、まれに20週齢以前にも胸腺腫が発症し、胸腺腫がある場合、リンパ球移入の系が成立しなくなる。このため、移入後14週(19週齢)で糖尿病を発症しなかったNOD-scidマウスのうち、胸腺腫を認めたものは、本研究のその後の検討に利用しないこととした。

5) 膵臓の組織学的検討

NODマウスから膵臓を摘出する際に、同時に膵臓も摘出した。摘出された膵臓を半分に分割し、うち半分を10%ホルムアルデヒドにて固定した。この固定された膵臓を後にパラフィンに包埋し、50μmの距離を開けて、少なくとも3切片以上のプレパラートを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。膵島炎の評価においては、下記のような分類を行った。grade 0;膵島周囲に炎症性細胞の浸潤がない。grade 1;膵島周囲に炎症性細胞の浸潤はあるが膵島内には認めない。grade 2;膵島内に炎症性細胞の浸潤はあるが、膵島内の面積の1/2を越えない範囲に留まっている。grade 3;膵島内の面積の1/2を越える面積に炎症性細胞の浸潤を認める(第2図)。3枚以上のプレパラートの全ての膵島に対して膵島炎の評価を行い、その平均値をその個体の膵島炎の評価とした。

膵臓の残る半分はインスリン含有量の計測に供した。

6) 膵臓インスリンの抽出

ホルムアルデヒドで固定しなかった膵臓の半分を、重量の測定後に酸エタノール液(6規定塩酸:水:純エタノールを容積比1.8:23.2:75.0で混和した液)中ですり潰した。その後4℃下で48時間攪拌を続け、インスリンを抽出した。

7) マウスインスリンの測定

上記の膵臓よりの抽出に用いた酸エタノール液のpHを調節した後、RIA法にてインスリンを測定した。すなわち、コントロール検体とサンプル検体に¹²⁵Iで標識したインスリン(Linco Research, アメリカ)を加え、そこにモルモット由来の抗インスリン抗体(Linco Research)を加え、4℃下で24時間静置する。翌日、ヤギ由来の抗モルモット免疫グロブリン抗体(Linco Research)を加え、4℃下で20分静置し、2,000~3,000gにて遠心して免疫複合体を回収し、その放射活性を測定した。コントロール検体から得られる検量線からサンプル濃度を得た。

2. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討

1) 動物及び脾細胞の移入

本研究でも1)の実験と同様、未発症の16~18週齢の雌性NODマウスもしくは発症直後の18週齢の雌性NODマウスから脾細胞を取り出し、5週齢の雌性NOD-scidマウスに 2×10^6 個/匹ずつ腹腔内投与した。

2) 脾細胞に対する抗原非特異的な刺激と抗原特異的な刺激によるサイトカインの分泌及びその回収

レシピエントに移入しなかった脾細胞浮遊液の一部に磁性マイクロビーズの付着した抗CD4抗体を加え、MiniMACS system (Miltenyi Biotech, ドイツ)を用いてCD4陽性細胞を分離した。CD4陽性細胞を除いた脾細胞浮遊液に3000radの放射線を照射して、リンパ球の増殖を抑制して抗原提示活性のみを残した。さきに分離したCD4陽性細胞 3×10^6 個と放射線照射細胞 6×10^6 個とを10%FCS-RPMIの中で混じ、さらに抗CD3抗体10μg/ml(clone 145-2C11, PharMingen, アメリカ)を加えて最終液量250μlとし、96穴丸底細胞培養プレート(Corning, アメリカ)にて48時間(37℃, 5%CO₂)培養した。培養後、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20℃で冷凍保存した。

また、これと同様の実験を、抗CD3抗体に替えて、ヒトGAD(RSR, イギリス)、ヒトインスリン(Novo, デンマーク)、または卵白アルブミン(Sigma, アメリカ)を刺激として施行した。抗CD3抗体と同様、各々の刺激物を10μg/ml加えて最終液量を250μlとし、96穴丸底細胞培養プレート上で48時間(37℃, 5%CO₂)培養した。培養後、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20℃で冷凍保存した。

3) サイトカインの計測

上清中のサイトカインの計測にはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いた。すなわち平底の96穴プレートに各種抗体(抗インターフェロン(interferon; IFN)-γ(clone R4-6A2), 抗インターロイキン(interleukin; IL)-2(JES6-1A12), 抗IL-4(BVD4-1D11), もしくは抗IL-10(JES5-2A5)抗体(全てPharMingen)をPBSに溶かして4℃で一晩静置し、翌日、採取された上清もしくは各サイトカインのスタンダード検体を加えて2時間室温で静置した。0.1% Tween 20(BioRad, アメリカ)を加えたPBSで洗浄した後、ビオチン化した各種抗体(抗IFN-γ(XMG 1.2), 抗IL-2(JES6-5H4), 抗IL-4(BVD 6-24G), もしくは抗IL-10(SXC1.2)抗体(全てPharMingen)を加えさらに1時間室温で静置した。その後AB溶液(Vectastain, アメリカ)を加えて30分静置した後、2,2'-azobis-3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid (ABTS)

(Sigma) を加えて 405nm での発色を ELISA reader (Titertek Multiskan, アメリカ) にて調べた。本研究では検体をすべて二重に計測し、スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより各種サイトカインの濃度を求めた。

4) RNA の抽出と cDNA の合成

NOD マウスから得られた脾臓の一部を RNA later RNA stabilization reagent (Qiagen, アメリカ) 中でホモジナイズし、得られた検体にエタノールを添加した後に、シリカゲル膜のついたスピニングカラムに移し、遠心にて RNA を膜に結合させた後、膜に水を通して、濃縮された RNA を得た。

RNA を抽出後、70°C 10 分間の処置をし、RNA の高次構造を破壊した。その後、アデニン (A) の配列が続くポリ A の構造をもつ mRNA の性質を利用し、オリゴ dT プライマーを用いて 42°C の環境下で逆転写反応を生じさせ、ファーストストランド cDNA を作成した。

5) PCR によるサイトカインの発現解析

脾細胞から得られたファーストストランド cDNA を鋳型にして、 β -アクチン、IFN- γ 、IL-4、IL-10 について PCR を施行した。各々の 5'プライマー及び 3'プライマーの配列は β -アクチン AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 及び CAATAGTGATGACCTGGCCvGT、IFN- γ TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 及び AGGCTCTGCAGGATTTTCATG、IL-4 ACAGGAGAAGGGACGCCAT 及び GAAGCCCTACAGACGAGCTCA、IL-10 GGTTGCCAAGCCTTATCGGA 及び ACCTGCTCCACTGCCTTGCT であった。各々の反応は脱重合 (ディネイチャー) に 94°C 40 秒、プライマーの重合 (アニー

リング) に 61°C 40 秒、伸長反応 (エクステンション) に 72°C 40 秒の条件を用い、35 サイクルの反応を行った。各々の PCR 産物を 3% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド液 (コンチネンタルラボラトリープロダクツ, 米国) に浸した後、トランスイルミネーター (UVP, 米国) 上で紫外線を照射して各種遺伝子の発現の有無を検討した。

6) 定量的 PCR によるサイトカイン・ケモカイン受容体の発現解析

Perkin Elmer 7700 PCR quantification system (Perkin Elmer Corp./Applied Biosystems, アメリカ) を用いて、脾細胞から得られたファーストストランド cDNA を β -アクチン、IFN- γ 、IL-10、CXC ケモカイン受容体 3 (CXC chemokine receptor 3; CXCR3) について定量的 PCR に供した。5) において実施した予備実験で発現を確認できなかった IL-4 については検討しなかった。まず、5'プライマー、3'プライマー、及びその間に 2 つの蛍光色素を持ったオリゴヌクレオチドプローブ (TaqMan プローブ) を重合させる。この 2 つの色素は TaqMan プローブに結合している間は発光しない。しかし、その後 DNA ポリメラーゼ活性と 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性をあわせもつ Taq ポリメラーゼによってプライマーからの伸長反応が生じ TaqMan プローブが分解されると、TaqMan プローブに結合していた蛍光色素は強い発光を生じるようになる。Perkin Elmer 7700 PCR quantification system では、この蛍光を検出することによって目的遺伝子の増幅の程度をリアルタイムに定量できるのである。各々の 5'プライマー、3'プライマー、TaqMan プローブは第 1 表に示した。各々の反応は脱重合 (ディネイチャー) に

第 1 表 各種遺伝子の polymerase chain reaction のための primer の配列、制限酵素の種類、TaqMan probe の配列

遺伝子名	5' プライマー	3' プライマー	TaqMan プローブ
β -アクチン	5'- CAACGTCACACT TCATGATGGA-3'	5'- TCCAGCCTTCCT TCTTGGGTA-3'	5'- TGTAGTTTCATGGAT GCCACAGGATTCC-3'
IFN- γ	5'- CAATGAACGCTA CACACTGCAT-3'	5'- TGGCAGTAACAG CCAGAAACA-3'	5'- TTGGCTTTGCAGCTC TTCCTCATGG-3'
IL-10	5'- CACAAAGCAGCC TTGCAGA-3'	5'- GTAAGAGCAGGC AGCATAGCA-3'	5'- AAGAGAGCTCCATCA TGCTGGCTCA-3'
CXCR3	5'- ATCAGCGCTTCA ATGCCAC-3'	5'- TGGCTTTCTCGA CCACAGTT-3'	5'- ATGCCCATATCCTAG CTGTCTGCTGGTC-3'

95°C 30 秒、プライマーの重合(アニーリング)と伸長反応(エクステンション)に59°C 60 秒の条件を用い二重に施行された。

7) フローサイトメーターを用いた T 細胞受容体(T cell receptor; TCR) α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の発現の解析

レシピエントに移入しなかった脾細胞浮遊液の残りの一部はフローサイトメーターによる解析に供した。脾細胞を2%FCS-RPMI から2%のFCSを混じたPBS(以下2%FCS-PBS)に移し、Cy-Chrome-conjugated 抗 CD4 抗体(clone H129.19)、Cy-Chrome-conjugated 抗 CD8 抗体(53-6.7)(PharMingen)、FITC-conjugated 抗 TCR α/β 抗体(H57-597)(Immunotech, フランス)により染色した。各々の染色は4°C20 分間の静置によって行い、2%FCS-PBSにより洗浄後、10⁴-10⁵個の細胞をフローサイトメーター(EPICS XL(Beckman Coulter, アメリカ))により解析した。

8) フローサイトメーターを用いた腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cells (PEC))のグルタチオンレベルの検討

屠殺直後の20匹のNODマウスに対して、脾臓や膵臓の摘出に先んじて、5 mlのPBSで腹腔内を無菌的に洗浄し、それを回収した。この洗浄液中に含まれる細胞

のすべてを腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cells (PEC))とした。

40 mmol/lの濃度で monochlorobimane (MBCI)(Clontech, アメリカ)を純エタノール(和光純薬, 大阪)に溶かし、PBSで500倍に希釈した。希釈されたMBCI溶液5 mlをPECを含む5 mlのPBSと混じて(最終濃度40 μmol/l)室温下、5分間静置した。その後直ちにEPICS ALTRA system(Beckman Coulter)を用いて、20 mWの紫外線を照射下でのグルタチオン-MBCIによる蛍光を抽出した。この系においては、グルタチオンレベルの高い細胞集団を還元型PEC、グルタチオンレベルの低い細胞集団を酸化型PECと定義した(第3図)。

9) 統計学的解析

マウスの群間の比較については、Student t testを用いてパラメトリックに、あるいはMann-Whitney's U testを用いてノンパラメトリックに解析した。また、指標間の相関については、Spearman rank correlation coefficientを用いてノンパラメトリックに検討した。

結 果

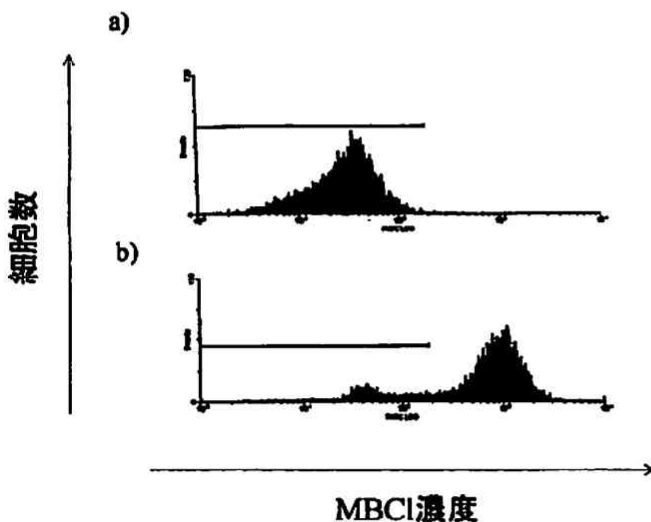
1. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた1型糖尿病発症前の膵β細胞容積の変化の推測

1) 細胞移入の結果

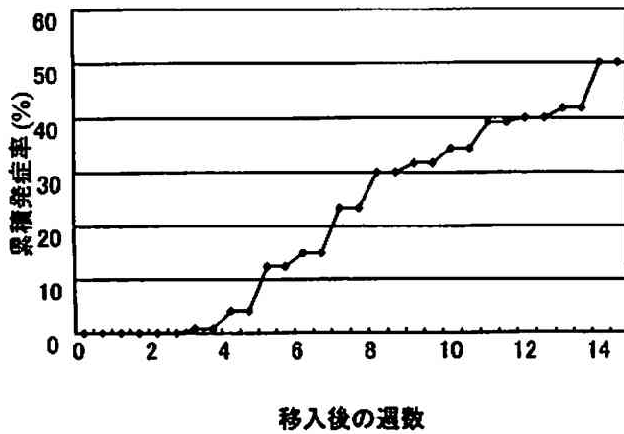
本研究では合計で16~18週齢の雌性NODマウス(n=41)の脾細胞2×10⁶個を5週齢の雌性NOD-scidマウス(n=123)に腹腔内投与した。41匹のドナーのうち、4匹は細胞移入の直前に糖尿病を発症していた。この糖尿病発症済みドナーの脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントはすべて移入後3~6週に発症した。胸腺腫のレシピエント3匹を除くと、120匹のレシピエントのうち60匹(50%)が糖尿病を発症し、これらのレシピエントに対するドナーは29匹であった。すなわち、発症済みNODマウス4匹と未発症NODマウス25匹が糖尿病発症性をもっており、残る12匹の未発症NODマウスは糖尿病発症性をもっていなかった(第4図)。

2) ドナーの膵臓とレシピエントが糖尿病を発症するまでの期間の関係

細胞移入の系において、若週齢のNODマウスから脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントは移入後、糖尿病発症までに時間がかかり、発症直前の時期のNODマウスから脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエント



第3図 腹腔浸潤細胞の monochlorobimane 濃度についての代表的フローサイトメーターのデータ。a) 染色前、b) 染色後:b)における下線部をグルタチオンレベルが低いと判断し、酸化型と定義した。(Yamada S et al: Autoimmunity 36: 63-70, 2003のFig 1を許可を得て転載)



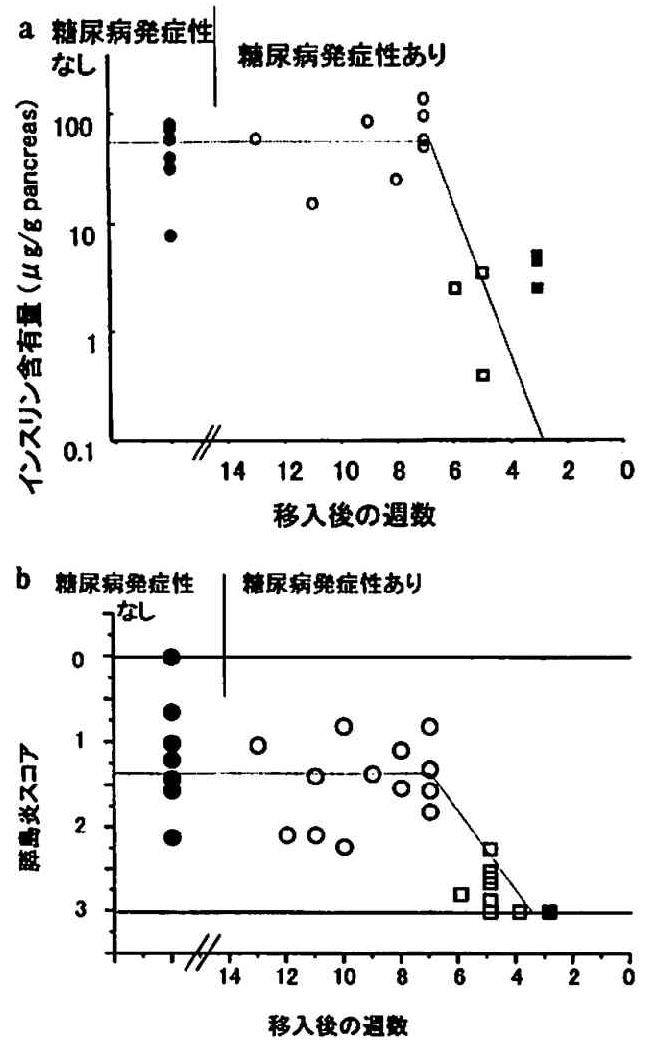
第4図 NODマウスの脾細胞を移入されたNOD-scidマウスの糖尿病累積発症率。(Yamada Set al: Autoimmunity 36: 63-70, 2003のFig 2を許可を得て転載)

は移入後、すみやかに糖尿病を発症する¹⁹⁾ことより、NODマウスの糖尿病発症性は、その脾細胞を移入されたレシピエントが移入後に糖尿病を発症するまでの期間で評価できると考えられている。

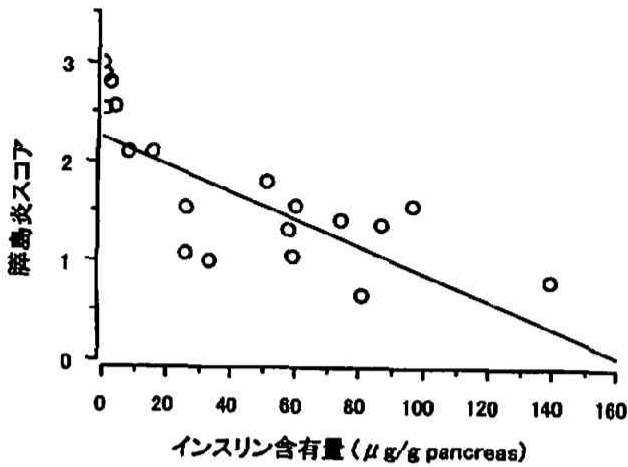
もし、膵β細胞が膵島炎を発症後、徐々にβ細胞数を減らすのであれば、ドナーの膵臓のインスリン含有量あるいは膵島炎スコアとレシピエントの移入後発症までの週数は直線相関するはずである。そのような観点にたち、相関関係を調べたが、ドナーの膵インスリン含有量、膵島炎スコアともレシピエントの発症までの週数とは相関がなかった。

逆に膵β細胞容積は発症直前まではある程度保たれ、発症直前に激減するという観点にたつて観察したところ、レシピエントが発症するのに7週かかったドナーの膵インスリン含有量は、一匹のレシピエントも発症させなかったドナーの膵インスリン含有量と同等であり、また、レシピエントが6週以下しかかずに糖尿病を発症したドナーの膵インスリン含有量は、糖尿病を発症済みのドナーの膵インスリン含有量と同等であった(第5a図)。

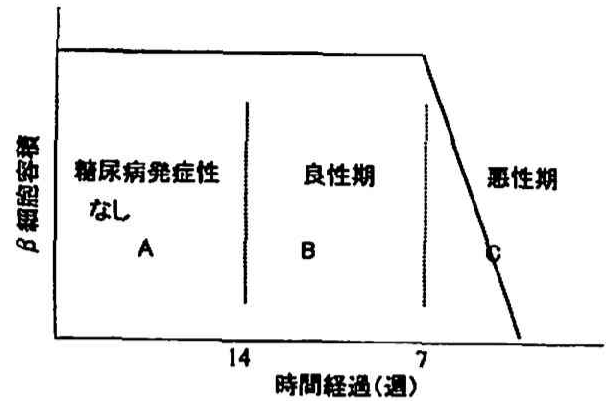
膵インスリン含有量と膵島炎スコアの関係を検討すると、有意な負の相関関係が存在した($r = -0.66$, $p < 0.0001$) (第6図)。そこで、膵島炎スコアとレシピエントが発症するまでの週数との関係を求めた。すると、レシピエントの発症に7週以上かかったドナーの膵島炎は、レシピエントを発症させなかったドナーの膵島炎と同等であり、レシピエントの発症に6週以下しかかからなかったドナーの膵島炎は発症済みのドナーの膵島炎と同等であった(第5b図)。



第5図 NODマウスにおける膵β細胞容積の時間経過に伴う変化。a)膵β細胞容積を膵臓インスリン含有量で検討した図(n=20)、b)膵β細胞容積を膵島炎スコアで評価した図(n=32):a)においては、糖尿病発症済みのNODマウスのインスリン含量はすべて10μg/g pancreas未満であり、その脾細胞のレシピエントは移入後3~6週には糖尿病を発症した(closed square)。レシピエントが6週以内に発症した糖尿病未発症NODマウスのインスリン含有量も10μg/g pancreas未満であり(open square)、糖尿病発症済みのNODマウスと同等であった。これに対してレシピエントが発症に7週以上要した糖尿病未発症マウスのインスリン含量は10μg/g pancreas以上であり(open circle)、これは1匹のレシピエントも発症させることができなかったドナー(closed circle)と同等であった。b)は膵島炎スコアを示す。膵β細胞容積の大きいものをY軸の上方にとるべく、この図のみ膵島炎スコアの低いもの(膵島炎の軽いもの)を上方に示した。膵島炎スコアにても膵臓インスリン含有量と同様の結果を示した。(a)についてはYamada Set al: Autoimmunity 36: 63-70, 2003のFig 3を許可を得て転載)



第6図 胰岛炎スコアと膵臓インスリン含有量の相関。胰岛炎と膵臓インスリン含有量は強く相関していた ($r = -0.66, p < 0.0001$)。



第7図 レシピエントの発症性に基づくドナーの分類。A群；レシピエントに糖尿病を発症させないNODマウス、B群；レシピエントに糖尿病を発症させるが7週以上要するNODマウス、C群；6週以内にレシピエントに糖尿病を発症させるNODマウスに分類することとした。

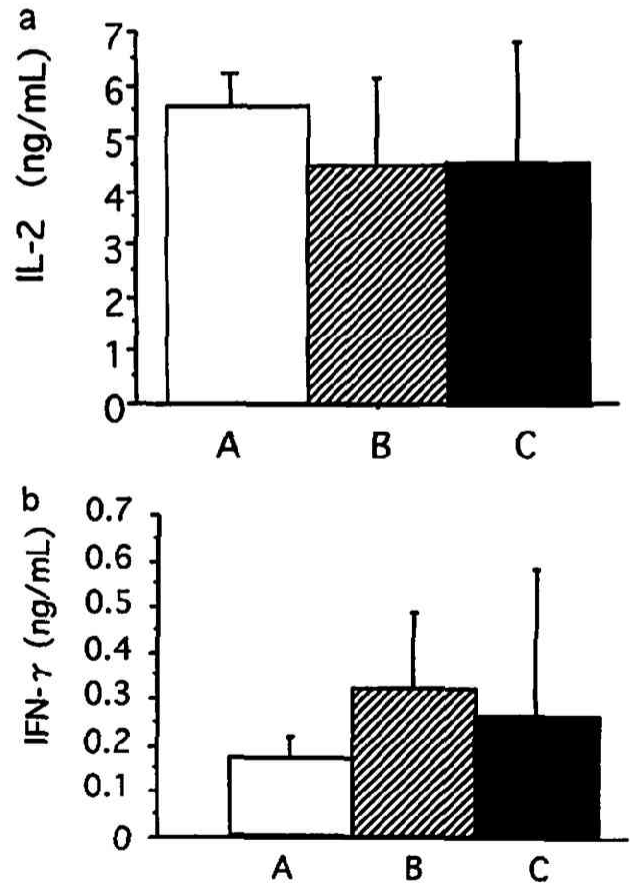
このことは、レシピエントの発症にわずか1~2週の違いしかないドナーの間で膵インスリン含有量(膵β細胞容積)、膵島への細胞浸潤の程度については大きな差が存在することを示唆している。

2. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討

上記の実験結果に鑑み、膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討においては、ドナーのNODマウスを以下の3群に分類した。A群；レシピエントが発症しない、B群；レシピエントが発症するが、発症までに移入後7週以上かかる、C群；レシピエントが移入後6週以内に発症する(第7図)。そして、以下の検討項目について群間での比較を行った。検討項目が発症直前であるC群において他群より有意に高値(もしくは低値)であれば、その項目は破壊過程の進展とともに変動していると判断することとした。

1) CD4陽性脾細胞の抗原非特異的な刺激に対するサイトカイン反応

NODマウスのCD4陽性脾細胞に対して抗CD3抗体による刺激を加えて48時間培養し、上清を回収して上清中のサイトカイン濃度を計測した。その結果、IL-2、IFN- γ についてはA、B、C群の群間で差異を認めなかった(第8図)。IL-10、IL-4についてはいずれのマウスにおいても検出できなかった。



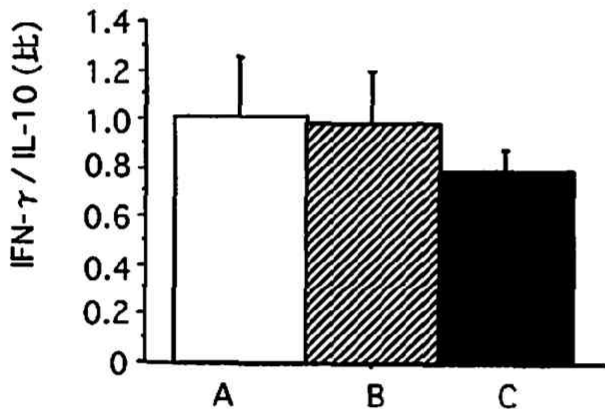
第8図 CD4T細胞と抗原提示細胞を抗CD3抗体刺激下で48時間共培養した後の上清中のサイトカイン。a) IL-2、b) IFN- γ を示す。3群間での有意差は認められなかった。(A群n=5、B群n=9、C群n=6)

2) 脾細胞の膵島抗原特異的な刺激に対するサイトカイン反応

NOD マウスの脾細胞に対してヒト GAD あるいはヒトインスリンによる刺激を加えて48時間培養し、上清を回収して上清中のサイトカイン濃度の計測を試みた。また、それらと比較するため卵白アルブミンにても同様の培養上清を回収し、サイトカイン濃度の計測を試みた。しかし、IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 のいずれも、ほとんど検出できず、この点では A, B, C 群の群間で差異を認めなかった。

3) 脾細胞の mRNA 定量によるサイトカインの検出

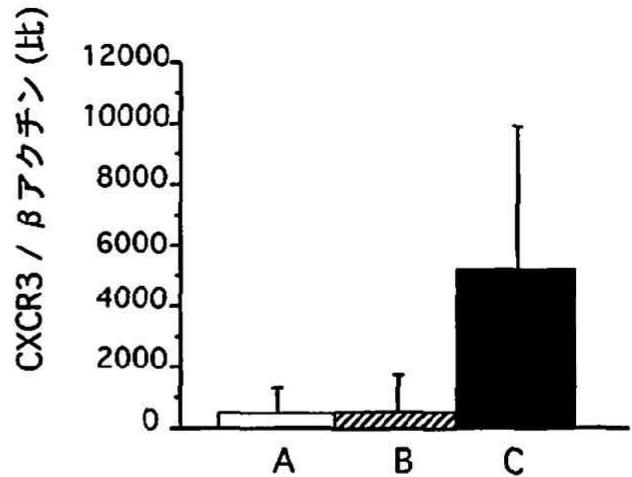
蛋白レベルではサイトカインの発現に差異をみる事ができなかったため、NOD マウスの脾臓から RNA を抽出し、cDNA を作成して定量的 PCR によりその発現量を検討した。エチジウムブロマイドを用いた予備実験において IL-4 の検出が困難であったため、検討するサイトカインとして IFN- γ と IL-10 を選び、両者の比を検討した。IFN- γ と IL-10 を用いた mRNA の検討の有用性は Kolb より確認されている (The 4th Immunology of Diabetes Society Congress, イタリア, 1999 年) が、今回の著者の検討では A, B, C 群の群間で差異を認めなかった (第9図)。



第9図 脾臓の mRNA の定量的 RT-PCR における IFN- γ /IL-10 比。b) 3 群間での有意差は認められなかった。(A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=6)

4) 脾細胞の mRNA 定量による CXCR3 の検討

次に Th1 細胞の比率をサイトカインの検出以外の方法で検討することを考え、Th1 細胞表面に発現するとされている^{20,21)}CXCR3 の発現の程度を mRNA の定量的 PCR にて検討し、 β -アクトリンとの比を調べた。その

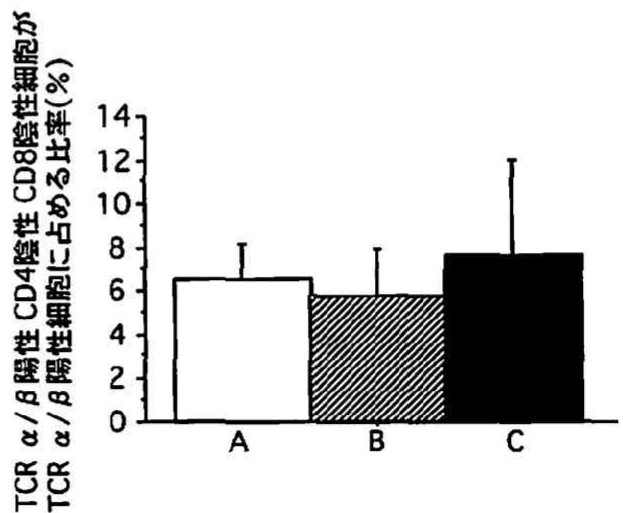


第10図 脾臓の mRNA の定量的 RT-PCR における CXCR3 発現。有意差はなかったが、C 群が高値である傾向を認めた (B-C 群間 $p=0.06$)。 (A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=3)

結果、C 群において A, B 群よりも CXCR3 の mRNA の発現が高い傾向があったが、統計学的に有意ではなかった (B~C 群間差 $p=0.06$, Mann-Whitney's U test) (第10図)。

5) 脾細胞における TCR α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の比率

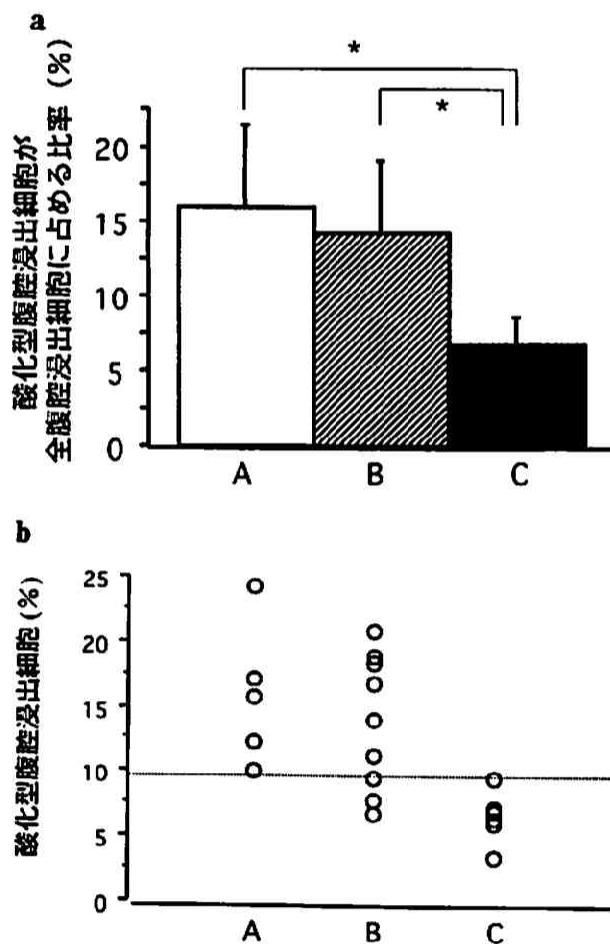
Th1/Th2 バランスをサイトカイン以外のものでもさらに検討するための方法として、著者はさらに NKT 細胞



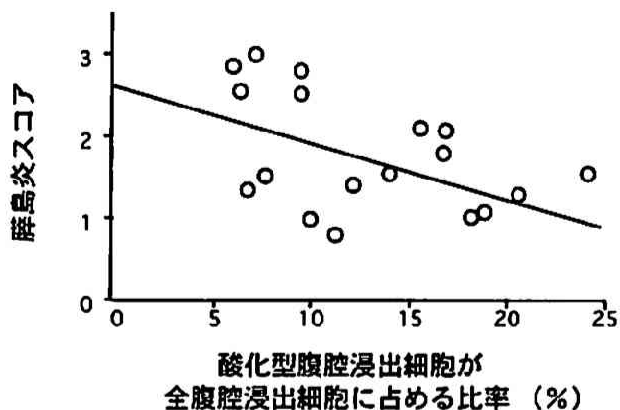
第11図 脾臓の TCR α/β 陽性細胞に占める TCR α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の比率。3 群間に有意差はなかった。(A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=6)

の検討を試みた。T細胞, B細胞, NK細胞につぐ第4のリンパ球集団として知られるNKT細胞は、免疫系の調節を司っていることが知られ、1型糖尿病においてもその関与が報告されている²²⁻²⁴。実際、NKT細胞の性質がTh1/Th2バランスを決定し、その後の1型糖尿病の発症を左右するという説が提唱されており²³、NKT細胞の検討によりTh1/Th2バランスの把握や発症予知につながる可能性がある。

NK1.1分子が欠如しているNODマウス²⁵においてはNKT細胞を定義することが困難であるが、著者は本研究においてはTCR α / β 陽性CD4陰性CD8陰性細胞をもってNKT細胞様細胞と考え²⁶、TCR α / β 陽性細胞に対する比率を検討した。しかし、A, B, C群の群間で差



第12図 全腹腔浸出細胞中に占める酸化型腹腔浸出細胞の比率。a) 棒グラフで示したもの、b) 分布図にて示したもの：A群では全ての、B群ではほとんどのドナーの酸化型腹腔浸出細胞は10%以上であり、C群では全てのドナーの酸化型腹腔浸出細胞が10%未満であった。
* $p < 0.05$ (a) については Yamada S et al : Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の Fig 5 を許可を得て転載)



第13図 膵島炎スコアと酸化型腹腔浸出細胞の比率との関係。膵島炎スコアと酸化型腹腔浸出細胞の比率は相関していた ($\rho = -0.50, p < 0.05$)。 (Yamada S et al : Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の Fig 4 を許可を得て転載)

異を認めなかった (第11図)。

6) 酸化型腹腔浸出細胞 (PEC) の比率

最近、抗原提示細胞、特にマクロファージにおけるグルタチオンのレベルがTh1/Th2バランスと関係があると報告がなされている²⁷。そこで個体におけるマクロファージのグルタチオンレベルを検討するべく、腹腔浸出細胞 (PEC) をMBCIにて染色した。MBCIの染色レベルの低い細胞を酸化型PECと定義してその比率を検討したところ、A, B群に比してC群では明らかにその比率が低かった (第12a図)。実際、すべてのA群 (糖尿病発症性をもたないNODマウス) の酸化型PECは10%を超え、すべてのC群 (レシビエントを6週以内に発症させるNODマウス) の酸化型PECは10%を下回っていた (第12b図)。

さらに、酸化型PECが本当に病勢を反映する指標かどうかを検討するために、酸化型PECと膵インスリン含有量あるいは膵島炎スコアとの相関を検討した。その結果、膵島炎スコアと有意な負の相関を認めた ($\rho = -0.50, p < 0.05$) (第13図)。

これらのデータに基づき、酸化型PEC 10%未満を糖尿病発症の予知マーカーとしたところ、相対危険度は1.714 (95%信頼区間 1.062-2.765, 感度 50%, 特異度 100%) であった²⁸。

考 察

現在、生活習慣の変化に伴い2型糖尿病患者の数が爆発的に増加している。これに比し、軽度ではあるが1

型糖尿病患者も世界的に増加しつつある²⁹⁾。1型糖尿病も2型糖尿病も、遺伝因子と環境因子が発症に関与するが、環境因子のほとんどを食習慣と運動習慣がしめている2型糖尿病と異なり、1型糖尿病ではどんな環境因子が発症に関与しているかが不明である。このため、食習慣や運動習慣の改善などにより予防が可能であることが証明された2型糖尿病³⁰⁻³²⁾と異なり、1型糖尿病では予防法が確立できていない^{33,34)}。Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes (DPT-1)³⁵⁾ではインスリン投与により、European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)³⁶⁾ではニコチナミドにより、1型糖尿病発症の予防を図ったが、いずれも有効ではなかった。そこで、本研究では、新たな予防対象の選定法や予防法を見いだすべく、1型糖尿病の進展過程を検討し、それとともに変動する因子の探索を行った。

1型糖尿病患者の遺伝因子として、すでにヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen ; HLA)³⁵⁾とインスリン遺伝子上流の繰り返し配列の繰り返し数 (variable number of tandem repeat ; VNTR)³⁶⁾が確立されているが、日本人に限るとインスリン VNTR については関与を否定する報告が多く³⁷⁻³⁹⁾、関与するにしても微弱な関係にすぎない⁴⁰⁾ものと思われる。よって、確実に関与することが判明しているのは HLA のみである。HLA の中で一番強く日本人1型糖尿病と関与するのは DR 遺伝子であり、DR4 及び DR9 が糖尿病発症に関与するとされている^{41,42)}。その中でもより強く発症に関与するのが DR4 であるが、DR4 は、健常者の3割程度に認められる⁴²⁾ため、単独では発症率 1.5~2.5 人/10 万人/年とされる1型糖尿病の予防対象の選定にはほど遠い。DPT-1 では、1型糖尿病患者の近親者の中で、膵島関連自己抗体が陽性の集団を対象にし、経静脈的ぶどう糖負荷試験におけるインスリン分泌反応をみれば、発症高リスク集団 (5年間で60%が発症) や中等度リスク集団 (5年間で35%が発症) を見出せる、すなわち発症予知が可能であることを明らかにした³⁵⁾。しかし、1型糖尿病患者のほとんどが家族歴をもたないことを考えると、一般的には1型糖尿病発症予知・予防は依然不可能である。一般人口を対象にした発症予防を考えると、1型糖尿病の進展を十分に理解し、膵β細胞破壊の過程を反映するような予知マーカーを用いなければ、不必要な症例にも予防介入をしてしまったり、逆に必要な症例に予防介入をしなかったりする可能性があるだろう。そこで、著者は、NOD マウスから NOD-scid マウスへの細胞移入の実験を施行し、1型糖尿病の進展過程を明らかにし、発症予知マーカーの発見につながるような因子の検討を

試みることにした。

本来、こうした検討においては、NOD マウスに侵襲を与えずに膵臓やそれ以外の因子を評価することが望ましいが、現実的にはそれは不可能である。そこで、本研究で採用したのが細胞移入の系である。細胞移入の系によりドナーの糖尿病発症性がレシピエントに再現されることは、Rohane らにより報告されている¹⁹⁾。本研究では、NOD マウスの膵臓や脾細胞その他の状態を評価しつつ、その糖尿病発症性を NOD-scid マウスへの脾細胞の移入によって再現することを試みたのである。NOD マウスは4週齢頃より膵島炎と呼ばれる膵島への炎症細胞浸潤を認めるが、すべての個体が発症するわけではなく、12週齢頃から30週齢までの間に雌性で70-80%、雄性で20~30%程度の個体しか糖尿病を発症しない。そして、どの個体が発症するかを予知することは現在まで不可能である。ヒト1型糖尿病の予知のためには、まず、本モデルマウスにおいて発症予知が可能となる必要があると思われる。また、本研究ではドナーの NOD マウスを16~18週齢とした。これは、Watanabe らにより、18週齢前後の NOD マウスの胸腺は他の週齢に比して、germinal center が大きく、また、個体差も大きいことが報告されている⁴³⁾、18週齢前後の NOD マウスでは、今後糖尿病を発症する個体と糖尿病を発症しないマウスとが混在すると考えられたからである。

また、レシピエントは有効な T, B リンパ球は存在しないものの他の免疫担当細胞は存在する NOD-scid マウスであり、その個体差を最小化するために本研究ではドナー1匹あたりのレシピエントを3匹とし、3匹のレシピエントのうち1匹でも糖尿病を発症すればドナーを“糖尿病発症性あり”と判断した。また、NOD-scid マウスには胸腺腫を発症する個体があり¹⁸⁾、胸腺腫例ではその存在のために細胞移入にても糖尿病を発症しないため、こうした個体は検討から除外した。

まず、本研究ではβ細胞容積減少の過程を明らかにすることを試みた。これまで、1型糖尿病発症前のβ細胞容積減少の過程については2つの仮説が提唱されていて結論を見ていない。1つは、β細胞容積は膵島炎の成立後、徐々に(直線的に)減少していくという考え方であり⁴⁴⁾、もう1つは、β細胞容積は膵島炎成立後もしばらくはそのままだに保持され、発症の直前に激減するという考え方である^{44,45)}。ヒト1型糖尿病患者の三つ子の非罹患同胞が糖尿病を発症するまでの経静脈的ブドウ糖負荷試験のデータから Eisenbarth がまず前者を提唱し¹⁹⁾、Sreenan らは各週齢の NOD マウスのβ細胞容積を直接測定することでこの説を支持した⁴⁴⁾。しかし、

Eisenbarth のデータは例数が乏しいという欠点があり、Sreenan らのデータでは 12 週齢で発症率が 30%、18 週齢で 80% という特殊な NOD 家系で、かつ 8 ないし 9 週齢以後のデータしか提示されていないため、発症直前 (3 週前程度) から膵 β 細胞容積が減少しているとすれば後者の説でも、Sreenan らのデータは説明が可能であり、結論を導くことができないのである。

これに対し、Shimada らは NOD マウスの CD4 陽性 CD45RB^{hi} 細胞のサイトカイン反応が発症の時期を境に IL-4 優位から IFN- γ 優位になることを示し⁴⁶⁾、1 型糖尿病が Mosmann らの提唱した Th1/Th2 バランス理論⁴⁷⁾に合致することを証明するとともに、 β 細胞の破壊が自己免疫過程の後期の現象であることを提唱した⁴⁸⁾。さらに、Gazda らは NOD マウスに NOD-scid マウス由来の膵島を移植する系を通じて、1 型糖尿病の発症に至るまでの病勢には、自己免疫反応は存在しても膵 β 細胞の破壊はほとんど生じていない「良性期」と、膵 β 細胞の破壊が生じている「悪性期」があり、悪性期になってはじめて膵 β 細胞が減少しはじめ、その約 3 週後に糖尿病が発症するということを報告した⁴⁹⁾。しかし、Shimada らの報告では直接膵 β 細胞容積の観察はしておらず、Gazda らの報告では膵島移植や全身麻酔による侵襲が糖尿病発症に影響を与えた可能性を否定できなかった。

こうした論議に結論をだすべく、本研究ではドナーの NOD マウスの膵 β 細胞容積を直接観察した上で、その糖尿病発症性をレシピエントの NOD-scid マウスに再現して、レシピエントにおける脾細胞移入後の発症までの期間とドナーにおける膵 β 細胞容積との関係を検討することとした。

著者による検討の結果として、ドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアとレシピエントの発症までの時間の関係には直線相関は認められなかった。このことは NOD マウスの膵 β 細胞容積が徐々に (直線的に) 減少するという Eisenbarth¹³⁾ や Sreenan⁴⁴⁾ の説とは一致しないものであった。逆に、本研究の結果では、レシピエントの発症に 7 週かかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアは、レシピエントをまったく発症させなかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアと同等であり、レシピエントの発症に 6 週以下しかかからなかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアは、すでに糖尿病を発症している NOD マウスの膵インスリン含有量や膵島炎スコアと同等であった。このことは、わずか 1-2 週の違いでも膵 β 細胞容積に大きな差異が存在する可能性を示しており、糖尿病発症の直前に

膵 β 細胞容積が激減するとする Shimada⁴⁸⁾ らや Gazda⁴⁹⁾ らの説と一致するものであった (第 5 図)。最近、Ryu らは、すでに糖尿病を発症してしまった NOD マウスでも自己免疫機序を抑制させることで内因性の β 細胞機能が復活することを示した⁴⁹⁾。こうしたことから、Palmer は 1 型糖尿病の過程において糖尿病発症直後ですらある程度の膵 β 細胞容積が保持されている可能性があることを提唱している⁴⁹⁾。本研究を含む、こうした報告を合わせて考えると、1 型糖尿病における膵 β 細胞容積保持のための介入は糖尿病発症の直前 (あるいは直後) でも可能であることが示唆される。

次に、著者は、新たな発症予知マーカーの発見につなげるべく、 β 細胞破壊の進展とともに変動する因子の検索を試みた。これまで、発症予知の方法として、遺伝子や膵島関連自己抗体を用いる方法が提唱されている⁶⁾。しかし、最近では NOD マウスにおける発症予知マーカーの候補であるインスリン自己抗体 (IAA) が⁵⁰⁾、糖尿病を発症しない NOR マウス⁵¹⁾ やインスリン B 鎖 B9-23 ペプチドで免疫づけされた Balb/c マウス⁵²⁾ にも認められ、その発症予知マーカーとしての有用性が否定されつつある。自己抗体の存在が発症予知マーカーになりにくいことは、GAD 抗体の存在が必ずしもその時点での膵 β 細胞の欠乏を意味しない緩徐進行型 1 型糖尿病の存在⁵³⁾ から明らかである。こうしたことをふまえ、本研究では、脾細胞の Th1/Th2 バランス、NKT 細胞様細胞の比率、酸化型 PEC の比率などの状態がどのように糖尿病発症に関与するかを検討した。実際には、先の実験において膵 β 細胞容積が発症直前に激減することが明らかになったことを踏まえ、これらの因子がレシピエントが糖尿病を発症するのに 7 週以上かかった NOD ドナー (B 群) と 6 週以下であった NOD ドナー (C 群) との間で有意差をもつかを検討した。

まず、著者は脾細胞のサイトカイン反応を検討した。Shimada らによれば、抗 CD3 抗体による抗原非特異的な刺激に対して、若週齢の NOD マウスの CD4 陽性 CD45RB^{hi} 脾細胞は IL-4 優位に、糖尿病発症後の NOD マウスの CD4 陽性 CD45RB^{hi} 脾細胞は IFN- γ 優位に反応する⁴⁶⁾。これは Mosmann らの概念⁴⁵⁾ の Th2 から Th1 へのシフトを意味する。発症に先んじてこの Th2 から Th1 への変化が生じているのであれば、これを発症の予知に用いられるはずである。しかし、今回の検討では、抗 CD3 抗体刺激に対して CD4 陽性脾細胞から IL-4 を検出できた個体はなく、IL-4 とならぶ Th2 サイトカインである IL-10 や Th1 サイトカインである IFN- γ での検討においても、発症予知への応用は困難で

あった(第8図)。

そこで、抗原非特異的な反応ではなく、膵島抗原特異的な反応を検討するべく、GADあるいはインスリンの刺激下でのサイトカイン反応を検討した。しかし、この検討でもIL-4ほどの個体からも検出できず、IL-10とIFN- γ についても、特異的反応の検出は困難であった。

そこで、*in vitro*で刺激を加えることが、生体内での現象に修飾を与えてしまう可能性を考慮し、無処置のまま脾臓からmRNAを抽出して*in vivo*におけるサイトカイン発現を類推することを試みた。しかし、この検討でもIFN- γ 、IL-10の両者とも特徴的な所見を示さなかった(第9図)。

MosmannらがTh1/Th2の概念を提唱したのは、同じヘルパーT細胞の中にも機能的に異なる2つの亜群がある、ということからであった⁴⁷⁾。よって、本来、Th1/Th2の分類は産生されるサイトカイン反応のみで正当である。しかし、本研究では、産生されるサイトカインでは特徴的な結果が得られなかったため、Th1/Th2に関与すると考えられている細胞表面マーカーに着目することにした。ここでは、特にケモカイン受容体であるCXCR3に注目した。最近の報告では、Th1細胞はその表面にCXCR3やCCケモカイン受容体5(CCR5)を発現し、Th2はCCR4などを発現すると考えられている^{20,21)}。また、Shimadaらによれば、日本人1型糖尿病患者の血清中においてCXCケモカインリガンド(CXCL)10が高値である⁵⁰⁾。CXCR3はCXCL10の受容体であり、Th1細胞の表面マーカーとされている⁵¹⁾ため、発症予知に使用できる可能性が考えられた。著者らの検討では、発症後時間の経過した日本人1型糖尿病患者の末梢血におけるCXCR3陽性細胞は増加していたのだが(unpublished observation)、Lohmannらによるとドイツ人1型糖尿病患者の末梢血におけるCXCR3陽性細胞の比率は、発症直後においてのみ有意に低下し、発症後時間の経過した症例ではコントロール群と有意差を認めなかった⁵²⁾。このため、本研究においても発症後時間の経過したマウスを除き、C群として未発症のNODマウスに限定して検討することとした。その結果、統計学的な有意差はないものの、C群において高値の傾向が認められた(第10図)。

サイトカイン反応では差が認められないものの、Th1細胞の表面マーカーでは差異の傾向が見られたことから、Th1/Th2バランスのより上流の反応を調べることの有用性が考えられた。Th1/Th2バランスの上流には、NKT細胞やマクロファージの存在が提唱されている。

1型糖尿病患者のV α 24J α Q T細胞は、数が少なく、

またサイトカイン反応ではIFN- γ 産生に偏っていることが報告されている²⁰⁾。しかし、日本人1型糖尿病においては逆にV α 24V β 11T細胞の数が多く²⁰⁾、1型糖尿病発症におけるNKT細胞の役割は未だ不明である。NODマウスにおいては、NK1.1の発現がなく、NKT細胞を定義することが難しい²⁵⁾。そこで、今回、著者はT細胞受容体(T cell receptor; TCR) α/β 陽性CD4陰性CD8陰性細胞をNKT細胞様細胞と定義し²⁶⁾、そのTCR α/β 陽性細胞に対する比率を検討した。その結果、NKT細胞様細胞は群間では差異を認めなかった(第11図)。

そこで、著者はマクロファージに着目した。MillsらはTh1優位のC57BL6マウスとTh2優位のBalb/cマウスとでそのマクロファージの機能が異なることを示し、Th1を誘導するマクロファージをM-1、Th2を誘導するマクロファージをM-2と呼ぶことを提唱したが³⁷⁾、それ以前よりPetersonらは抗原提示細胞中のグルタチオンレベルがTh1/Th2バランスに影響を与えることを報告していた²⁷⁾。このため、マクロファージのTh1/Th2バランスに対する影響の指標として、別の言い方をすれば、M-1/M-2状態の指標として、そのグルタチオンレベルの検討が有用ということが提唱されつつある^{58,59)}。グルタチオンはレドックス制御による細胞周期や遺伝子発現のコントロールにおいて重要な役割を果たす小分子であり、酸化ストレスに反応してグルタチオンジスルフィドを形成する。こうしたことから本研究では、グルタチオンに乏しくグルタチオンジスルフィドの多い酸化型PECが総PECに占める比率が全身におけるM-2あるいはTh2への指向性を表現するという仮説を立て、これを検証した。その結果、酸化型PECによってC群をA群(糖尿病発症性のないNODドナー)やB群から区別することができた²⁸⁾。すなわち、すべてのC群のマウスは酸化型PECが10%未満(平均6.6%)であり、すべてのA群のマウスとB群のマウスのほとんどが10%以上であった(平均15.9%、14.7%)(第12図)。これらのデータは膵 β 細胞容積の減少に同期して酸化型PECが減少することを示唆しており、その評価によって糖尿病発症を予知できる可能性を示している。

さらに酸化型PECと膵島炎スコアとの関係を検討したところ、両者は逆相関し、酸化型PECが膵島局所の病態を反映している可能性が考えられた(第13図)。

今後、この知見を臨床に生かす場合、現実的には、ヒトの腹腔浸出細胞を検査することは困難であり、腹腔浸出細胞に替わって評価可能な末梢血中マーカーをさらに検索していく必要があると思われた。

総 括

1型糖尿病のモデル動物である non-obesediabetic (NOD) マウスの脾細胞を、遺伝的な背景は NOD マウスと同様ながら有効なリンパ球を欠如する NOD-scid (severe combined immuno-deficiency) マウスに移入して、レシピエントが糖尿病を発症するまでの週数を検討することによって、ドナーの NOD マウスの糖尿病発症までの期間を類推した。また、その際にドナーの膵β細胞容積やその他の因子を調べ、糖尿病発症までの期間との関係を検討することにより、以下の結果および結論を得た。

1. 1型糖尿病発症の直前まで膵β細胞容積は保持されていることを見出した。

2. その膵β細胞容積の減少に同期して酸化型腹腔浸出細胞(酸化型 PEC)が減少することを明らかにした。

3. 膵β細胞容積の減少に同期して、脾細胞のサイトカイン反応、NKT細胞数、CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) 陽性細胞数が変化することは確認できなかった。

以上のことから1型糖尿病モデルマウスにおいて酸化型 PEC の評価によって糖尿病発症を予測できる可能性が見出された。今後、ヒト1型糖尿病予防法の確立のために、酸化型 PEC にかわってヒトにおいて検討可能な予知マーカーをさらに検索するべきであると考えられた。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室嶺田享男教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し、直接ご指導、ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗先生に感謝いたします。また、本研究に終始ご指導、ご協力いただいた埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に感謝いたします。また、マウス CXCR3 用のプライマーをご提供くださった東京大学大学院医学研究科分子予防医学教室成見正作先生に感謝いたします。

なお、本研究のうち、NKT細胞の検討については慶應義塾大学医学部内科学教室及川洋一先生が、酸化型 PEC の検討については慶應義塾大学医学部内科学教室入江潤一郎先生が著者と同等の貢献者である。

文 献

1) 葛谷 健, 中川 昌一, 佐藤 謙, 金澤 康徳, 岩本

安彦, 小林 正, 南條 輝志男, 佐々木 陽, 清野 裕, 伊藤 千賀子, 島 健二, 野中 共平, 門脇 孝: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病, 42: 385-404, 1999

2) The Diabetes Epidemiology Research International (DERI) Study Group: International analysis of insulin-dependent diabetes mellitus mortality: a preventable mortality perspective. *Am J Epidemiol* 142: 612-618, 1995

3) Nishimura R, Matsushima M, Tajima N, Agata T, Shimizu H, LaPorte RE: A major improvement in the prognosis of individuals with IDDM in the past 30 years in Japan. *Diabetes Care* 19: 758-760, 1996

4) Dorman JS, LaPorte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, Becker DJ, Cavender DE, Drash AL: The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. *Diabetes* 33: 271-276, 1984

5) Lin-Su K, Kukreja A, Maclaren NK: Diabetes vaccines: a future to be realized. *Diabetes Technol Ther* 3: 451-461, 2001

6) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, Eisenbarth GS: Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9: 379-383, 1996

7) Ikegami H, Ogihara T: Genetics of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J.* 43: 605-613, 1996

8) Matsuda A, Kuzuya T: Diabetic twins in Japan. *Diabetes Res Clin Pract* 24: S63, 1994

9) Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EA: Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-1310, 1994

10) Verge CF, Gianni R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-933, 1996

11) 米村 豊: ラット膵部分切除後のラ島再生. *医学のあゆみ*, 114: 354-356, 1980

12) 米村 豊, 宮崎 逸夫, 三輪 晃一, 荻野 茂, 松木 伸夫, 高島 茂樹: 膵大量切除後の残存膵内分泌機能. *日外会誌*, 82: 671-680, 1981

13) Eisenbarth GS: Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368, 1986

14) Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathmann CG: Beta cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45: 1063-1067, 1996

15) Hanafusa T, Sugihara S, Fujino-Kurihara H, Miyagawa J, Miyazaki A, Yoshida T, Yamada K,

- Nakajima H, Asakawa H, Kono N, Fujiwara H, Hamaoka T, Tarui S : Induction of insulinitis by adoptive transfer with L3T4+Lyt2- T-lymphocytes in T-lymphocyte-depleted NOD mice. *Diabetes* 37 : 204-208, 1988
- 16) 島田 朗：インスリン依存型糖尿病発症に関する免疫学的研究—NOD マウスにおける腹腔内マクロファージの移入—。慶應医学, 70 : 81-91, 1993
- 17) Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y : Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35 : 855-860, 1986
- 18) Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH : The nonobese diabetic scid mouse : Model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3290-3294, 1992
- 19) Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, Fathman CG : Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 44 : 550-554, 1995
- 20) Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW : CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 6873-6878, 1999
- 21) Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, Butcher EC : Rules of chemokine receptor association with T cell polarization *in vivo*. *J Clin Invest* 108 : 1331-1339, 2001
- 22) Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Esley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N : Multiple immuno-regulatory defects in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109 : 131-140, 2002
- 23) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA : Extreme Th1 bias of invariant V alpha24 J alphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391 : 177-181, 1998
- 24) Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J, Maruyama T, Saruta T : High frequency of V alpha24(+) V beta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25 : 1818-1823, 2002
- 25) Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF : Early quantitative and functional deficiency of NK1+ -like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26 : 2989-2998, 1996
- 26) Hammond KJL, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG : α/β -T cell receptor (TCR)⁺ CD4⁺CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187 : 1047-1056, 1998
- 27) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C : Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 3071-3076, 1998
- 28) Yamada S, Irie J, Shimada A, Kodama K, Morimoto J, Suzuki R, Oikawa Y, Saruta T : Assessment of beta cell mass and oxidative peritoneal exudate cells in murine type 1 diabetes using adoptive transfer system. *Autoimmunity* 36 : 63-70, 2003
- 29) Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J : Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes—the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 42 : 1395-1403, 1999
- 30) Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M : Finnish Diabetes Prevention Study Group : Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344 : 1343-1350, 2001
- 31) Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM : Diabetes Prevention Program Research Group : Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346 : 393-403, 2002
- 32) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M : STOP-NIDDM Trial Research Group : Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus : the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet* 359 : 2072-2077, 2002
- 33) Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group : Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346 : 1685-1691, 2002
- 34) Schatz DA, Bingley PJ : Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus : the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 : suppl 1619-622, 2001
- 35) She JX : Susceptibility to type 1 diabetes : HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 17 : 323-329, 1996
- 36) Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F, Nerup J, Bouzekri N, Cambon-Thomsen A, Roenningen KS, Barnett AH, Bain SC, Todd JA : Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9 : 284-292, 1995
- 37) Awata T, Shibasaki Y, Hirai H, Okabe T, Kanazawa Y, Takaku F : Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene region in Japanese diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 28 : 911-913,

- 1985
- 38) Takeda J, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Otsuka A, Ikeda M, Kuno S, Yawata M, Moridera K, Morita T, Tsuda K, Imura H : The polymorphism linked to the human insulin gene : its lack of association with either IDDM or NIDDM in Japanese. *Acta Endocrinol* 113 : 268-271, 1986
- 39) Matsumoto C, Awata T, Iwamoto Y, Kuzuya T, Saito T, Kanazawa Y : Lack of association of the insulin gene region with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* 37 : 210-213, 1994
- 40) Kawaguchi Y, Ikegami H, Shen GQ, Nakagawa Y, Fujisawa T, Hamada Y, Ueda H, Fu J, Uchigata Y, Kitagawa Y, Omori Y, Shima K, Ogiwara T : Insulin gene region contributes to genetic susceptibility to, but may not to low incidence of, insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 233 : 283-287, 1997
- 41) Matsuda A, Kuzuya T, Iwamoto Y, Yoshioka N, Awata T, Kumakura S, Ohwada N : HLA DR antigens in adult-onset and juvenile-onset Japanese insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 13 : 107-112, 1988
- 42) Sakurami T, Ueno Y, Nagaoka K, Kuno S, Iwaki Y, Park MS, Terasaki PI : HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31 : 105-106, 1982
- 43) Watanabe K, Tanaka R, Nishimura T, Kumagai Y, Miyazaki J, Yamamura K, Habu S : I-E-restricted monoclonal expansion of B lymphocytes in the thymus of NOD mouse. *Int Immunol* 3 : 839-842, 1991
- 44) Sreenen S, Pick AJ, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Polonsky KS : Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 48 : 989-996, 1999
- 45) Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ : Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun* 10 : 261-270, 1997
- 46) Shimada A, Rohane P, Fathman CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45R^{low} CD4⁺ cells correlate with cytokine profiles in the spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 47) Mosmann TR, Coffman RL : Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 : 145-173, 1989
- 48) Ryu S, Kodama S, Ryu K, Schoenfeld DA, Faustman DL : Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous beta cell function. *J Clin Invest* 108 : 63-72, 2001
- 49) Palmer JP : Immunomodulatory therapy of human type 1 diabetes : lessons from the mouse. *J Clin Invest* 108 : 31-33, 2001
- 50) Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS : Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse : evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 1701-1706, 2000
- 51) Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth GS : Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes : comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun* 17 : 1-6, 2001
- 52) Abiru N, Maniatis AK, Yu L, Miao D, Moriyama H, Wegmann D, Eisenbarth GS : Peptide and major histocompatibility complex-specific breaking of humoral tolerance to native insulin with the B9-23 peptide in diabetes-prone and normal mice. *Diabetes* 50 : 1274-1281, 2001
- 53) Kobayashi T : Subtype of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in Japan : slowly progressive IDDM-the clinical characteristics and pathogenesis of the syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 24 : S95-99, 1994
- 54) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S : Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 : 510-515, 2001
- 55) 松島 綱治, 米山 博之 : ケモカイン. *Minophagen medical review* 47 : 57-67, 2002
- 56) Lohman T, Laue S, Nietzschmann U, Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, Paschke R, Kiess W : Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes* 51 : 2474-2480, 2002
- 57) Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM : M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164 : 6166-6173, 2000
- 58) Dobashi K, Aihara M, Araki T, Shimizu Y, Utsugi M, Iizuka K, Murata Y, Hamuro J, Nakazawa T, Mori M : Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 124 : 290-296, 2001
- 59) Murata Y, Shimamura T, Hamuro J : The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14 : 201-212, 2002