

Title	1型糖尿病の発症機序の解明に関する研究：動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割
Sub Title	
Author	及川, 洋一(Oikawa, Yoichi) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.T11- T26
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050301-0011">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050301-0011</a>

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型糖尿病の発症機序の解明に関する研究  
—動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割—

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

おいかわ よういち  
及川 洋一

(平成16年6月25日受付)

Key Words : type 1 diabetes mellitus, interleukin-18, insulinitis, nonobese diabetic mouse

1型糖尿病は膵β細胞の破壊によるインスリン欠乏を成因とする糖尿病であり<sup>1)</sup>、インスリン依存状態にある典型例では絶対的インスリン欠乏状態に対して適切なインスリン治療を行わないと著明な高血糖状態やケトアシドーシスなどの代謝失調にいたりしばしば致命的となる。比較的若齢における発症が多いために発症早期の若齢期からインスリン治療に依存した生活を強いられるケースが多く、また糖尿病性腎症、網膜症や神経障害などの合併により患者の quality of life (QOL) が著しく損なわれ精神的な苦痛を伴うこともしばしば見受けられる。現在、強化インスリン療法を基本とした適切な血糖管理や糖尿病合併症への迅速な対応が医療体制の改善とともに普及し、腎症や急性合併症による1型糖尿病患者の死亡は大幅に減少しているが、それでも今なお生命予後は悪い<sup>2)</sup>。したがって1型糖尿病の病態解明ならびにそれに基づく発症予防や疾患の根治が可能な治療法の開発が急務である。

1型糖尿病の病態に関する研究は、この20年余りの間に飛躍的な進歩を遂げたが、その大きな要因として1980年に日本で確立された nonobese diabetic (NOD) マウス<sup>3)</sup>の存在が挙げられる。本マウスでは、最も強力な1型糖尿病疾患感受性遺伝子 *Idd1* の候補遺伝子である主要組織適合遺伝子複合体 major histocompatibility complex (MHC) class II 領域の I-A 分子、I-E 分子に特徴がみられるが<sup>4) 5)</sup>、ヒト1型糖尿病患者においても I-A 分子、I-E 分子にそれぞれ対応する Human Leukocyte Antigen (HLA)-DQ, HLA-DR 領域に疾患特異的な特徴が認められており<sup>6) 7)</sup>、NOD マウスとヒト1型糖尿病患者との間に遺伝的背景・免疫学的背景にお

ける類似性が認められる。さらに NOD マウスは自然発症モデル動物であることなどから、1型糖尿病における自然経過、特に膵島炎の出現・進展や糖尿病の発症機序などについて研究する上で極めて優れた動物モデルであることが知られている。

この NOD マウスを用いた研究から、1型糖尿病の多くは T helper 1 (Th1) タイプの自己免疫疾患と考えられている<sup>8) 9)</sup>。NOD マウスでは4週齢頃から樹状細胞やマクロファージが膵島に浸潤しはじめ、続いて膵島周囲を中心に T 細胞の浸潤 (膵島周囲炎) がみられる<sup>10-13)</sup> (本稿では膵島関連の免疫反応とともに膵島炎が出現しはじめる4週齢前後の時期を“膵島炎進展初期段階”と表記する)。その後16週齢頃から主に T 細胞を介した膵β細胞の破壊が始まり (破壊性膵島炎)、顕性糖尿病を発症する<sup>14)</sup>。膵島炎の出現や進展に直接寄与する自己抗原は現在も明らかではないが、インスリン<sup>15) 16)</sup>、熱ショック蛋白 (heat shock protein)<sup>17-19)</sup>、グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase : GAD)<sup>20) 21)</sup>などの自己抗原に対する免疫応答が NOD マウスにおいて観察されており、これらの抗原を NOD マウスに免疫することによって糖尿病発症の抑制をみた報告が多くみられる<sup>22-29)</sup>。これまでの報告から、NOD マウスにおける糖尿病の発症には Th1/Th2 バランスの不均衡が関与しているが<sup>30-32)</sup>、実際に Th1/Th2 バランスに直接影響を及ぼすと考えられている CD28/B7 副刺激経路の機能異常、すなわち T 細胞表面上の副刺激分子 CD28 と抗原提示細胞表面上の副刺激分子 B7 との間における相互作用の異常が NOD マウスにおいて報告されており<sup>33)</sup>、糖尿病発症に寄与する因子の1つと推測されている。

Interleukin-18 (IL-18) は interferon (IFN)- $\gamma$  産生を誘導する interferon-gamma-inducing factor (IGIF) として Okamura らによって発見された分子量 18kDa のサイトカインであり、IL-12 と同様、Th1 タイプの免疫応答に関与している<sup>34)</sup>。IL-18 は IL-12 の共存下で活性化マクロファージを介して Th1 反応を惹起し、T 細胞や natural killer (NK) 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を促進する<sup>34-36)</sup>。ところが近年、IL-18 は IL-12 の非共存下で T 細胞や NK 細胞から Th2 タイプのサイトカインである IL-13 の産生を誘導することが明らかになった<sup>39)</sup>。更に IL-4、IL-10、IL-5 といった他の Th2 サイトカインや、immunoglobulin (Ig) E および IgG1 の産生にも関与していることが報告され<sup>40-43)</sup>、現在 IL-18 は IL-12 存在の有無に依存して、Th1 作用と Th2 作用の両面性を持つサイトカインと考えられている<sup>44)</sup>。

IL-18 遺伝子は NOD マウスにおける糖尿病の疾患感受性遺伝子の 1 つである *Idd2* の近傍に局在しており<sup>45)</sup>、IL-18 は NOD マウスにおいて糖尿病の発症に関係していると考えられている。実際、シクロホスファミド (cyclophosphamide : CY) によって糖尿病発症を誘発させた系では、糖尿病の発症直前に膵局所の IL-12 mRNA の発現が増強するが、それに追隨して IL-18 mRNA の発現も経時的に増強する<sup>46)</sup>。しかしながら、CY による糖尿病発症誘発モデルさらには自然発症の系において、10 週齢以降に IL-18 を NOD マウスに連日投与すると糖尿病発症が強力に抑制される<sup>47-48)</sup>。このように IL-18 と糖尿病発症との関係は報告によって大きく異なり、IL-18 の投与時期や投与方法、投与量などがこれらの違いに大きく寄与している可能性がある。

一方、自然経過における膵島炎の出現・進展と外因性 IL-18 との関係はこれまで報告されていない。実際に若齢から数週にわたって IL-18 を生体に投与することは動物への侵襲も強く、コストもかかり現実的ではないためと考えられる。近年、Aihara らによって、遺伝子発現プラスミド DNA の筋肉内注射 (筋注) 法に *in vivo* electroporation (電気穿孔法) を併用した画期的な遺伝子導入法が開発された<sup>49)</sup>。本法は 1 回のプラスミド DNA 筋注に電気刺激を組み合わせることで、極めて効率よく目的の遺伝子が長期間にわたって筋注部位で発現され、発現蛋白が全身性に高濃度に供給される有用な遺伝子導入システムである。本研究ではマウス IL-18 発現プラスミド DNA を用いて若週齢の NOD マウスに IL-18 を全身性に投与し、IL-18 が膵島炎の進展や糖尿病発症にどのような影響を与えるか検討した。

## 対象と方法

### 1. 動物

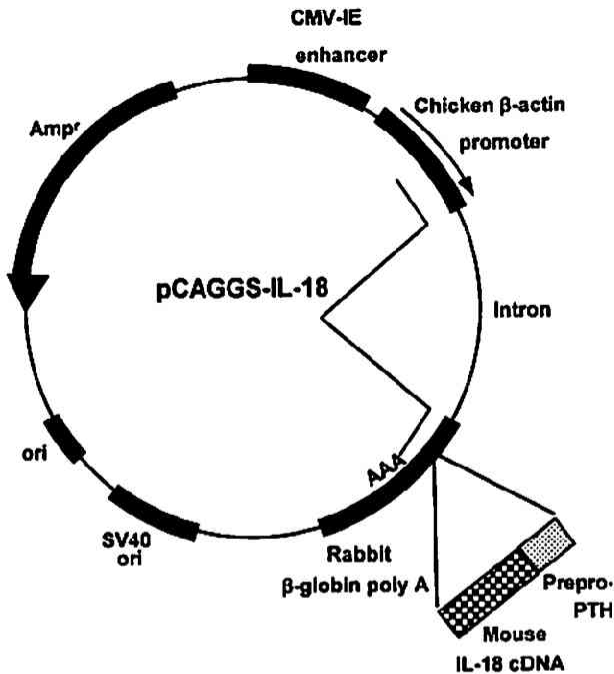
4 週齢の雌性 NOD マウスを日本クレア (東京) より購入し、動物室にて特定病原体非感染 (specific pathogen-free : SPF) 環境下にて飼育した。本実験は、慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 : 012039)。飼育及び実験処置にあたっては、慶應義塾大学実験動物取扱マニュアルに準拠した。8 週齢より週 1 回の割合でテストテープ (Eli Lilly 社、米国) を用いて尿糖を定性的に確認した。尿糖陽性時にグルテストエース (三和化学、東京) を用いて血糖値を測定し、血糖値 250 mg/dl 以上時に糖尿病と判定した。用いた NOD マウスの最終糖尿病発症率は 40 週齢の時点で約 70%であった。

### 2. IL-18 発現ベクターの作成・精製

本研究では、哺乳類細胞で強い発現力を呈する CAG プロモーターを組み合わせた発現プラスミド pCAGGS (サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ  $\beta$ -アクトチンプロモーターを結合し、さらにウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子のポリ A シグナルを結合したもの : 第 1 図) を発現ベクターとして利用した。マウス成熟型 IL-18 cDNA を pCAGGS の CAG プロモーターとウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子のポリ A シグナルとの間に存在する EcoRI 部位に組み込んで IL-18 発現ベクター (pCAGGS-IL-18) を作成した (第 1 図)。IL-18 cDNA には IL-18 の細胞外分泌に必要なシグナルペプチドが存在しないため、その代用としてヒト prepro PTH 遺伝子のリーダーシーケンスを成熟型マウス IL-18 cDNA の上流にあらかじめ組み込んでおき、IL-18 の細胞外分泌の効率上昇を図った<sup>50)</sup>。作成した発現ベクターは *Escherichia coli* (BH10B) を用いて増やしたあと、プラスミド精製カラム (Qiagen 社、ドイツ) を用いて精製し、さらに塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて精製を繰り返した。

### 3. 発現ベクター筋肉内注射法および *in vivo* electroporation (電気穿孔法)

4 週齢の NOD マウスをペントバルビタールで麻酔し、50  $\mu$ g の pCAGGS-IL-18 を両側の前脛骨筋に 27 ゲージ針を用いて計 100  $\mu$ g 筋注した後、同部位に電気刺激パルス (*in vivo* electroporation : 電気穿孔法) を加えた。すなわち、DNA 筋注部位を挟むように 2 本の電極針を筋肉内に刺入し、電気刺激パルスを加えた。至適条



第1図 pCAGGS-IL-18の構造。マウス成熟型IL-18 cDNAをpCAGGSのCAGプロモーターとウサギβグロビン遺伝子のポリAシグナルとの間に存在するEcoRI部位に組み込んでIL-18発現ベクターを作成した。IL-18 cDNAにはIL-18の細胞外分泌に必要なシグナルペプチドが存在しないため、その代用としてヒトprepro PTH遺伝子のリーダーシーケンスを成熟型マウスIL-18 cDNAの上流にあらかじめ組み込んでおき、IL-18の細胞外分泌の効率上昇を図った。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig1を許可を得て転載)

件として1パルスあたり100Vで持続時間を50ミリ秒とし、1秒ごとに計6回の電気刺激パルスを加えた<sup>49)</sup>。同様な方法でコントロール群には空ベクターであるpCAGGSを筋注し *in vivo* electroporation を施行した。pCAGGS-IL-18 および pCAGGS 投与の両群とも、同一の操作を6週齢時に繰り返し行った。

#### 4. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射部位におけるIL-18 mRNA 発現の確認

pCAGGS-IL-18 または pCAGGS 筋注後2日目に局所の筋肉を採取し、液体窒素で凍結後RNAの抽出まで-80℃で保存した。RNAの抽出は酸性グアニジンチオシアネート-フェノール/クロロホルム法 (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform: AGPC) 法で行った。すなわち、グアニジンチオシアネート (guanidinium thiocyanate: GTC) 溶液中で組織をホモジナイズし、

RNaseを失活させ、細胞のタンパク質を可溶化した。続いて液性を酸性に保ちながらフェノール/クロロホルム処理を行い、水層 (GTC層) に分離したRNAをアルコールで塩析し抽出した。次に、アデニン (A) の連続配列であるポリAシグナルを有するmRNAの性質を利用して、オリゴdTプライマーを用いた逆転写反応にてcDNAを作成した。最後に、得られたcDNAを鋳型としてTaq polymerase (Takara社、大津)にてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行った。IL-18およびhypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT: 内部標準として使用) に対するPCR用プライマーはIL-18 5'プライマー: 5'-TCT GAC TGA CCG CGT TAC TC-3', IL-18 3'プライマー: 5'-CTG CGG TTG TAC AGT GAA GT-3', HPRT 5'プライマー: 5'-CTC GAA GTG TTG GAT ACA GG-3', HPRT 3'プライマー: 5'-TGG CCT ATA GGC TCA TAG TG-3'であった。設計したプライマーはゲノム上のイントロン配列を挟む形で、連続する2つのエクソン上に設計されており、目的のPCR産物と混在したゲノムDNA由来の産物との区別が電気泳動上可能となっている。PCR反応は94℃×2分の熱変性処理後、94℃×15秒 (熱変性)→55℃×15秒 (アニーリング)→72℃×30秒 (伸長反応)を1サイクルとして30サイクル施行し、最後に72℃×10分間の伸長反応を行った。PCR産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動法により分離し、エチジウムブロマイド液に浸した後、トランスイルミネーター上で紫外線を照射して各種遺伝子発現の有無を検討した。

#### 5. 組織学的検討

採取した膵臓は10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。100 μm以上の間隔をあけた非連続切片にてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作成し、膵島炎の程度 (膵島への炎症細胞浸潤) を以下のようにスコア化し、各膵臓における膵島炎スコアの平均値を算出した。なお、1膵臓あたり25個以上の膵島を観察した。

- grade 0: 炎症細胞浸潤を膵島に認めない。
- grade 1: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の25%未満。
- grade 2: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の25%以上50%未満。
- grade 3: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の50%以上75%未満。
- grade 4: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の75%以上または退縮した膵島炎。

6. ポリクローナルなリンパ球刺激によるサイトカイン反応の検討

各マウスより採取した脾臓および脾局所リンパ節をナイロン・メッシュ (Becton Dickinson 社, 米国) にて無菌的に細胞分散し, エチレンジアミンテトラ四酢酸ナトリウム (2Na-EDTA) 0.045 g, 塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) 8.34 g, 重炭酸ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) 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に, ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% 仔牛胎児血清 (fetal calf serum: FCS) (JRH Bioscience 社, 米国) を含む RPMI1640 (GibcoBRL 社, 米国) (以下 10%FCS-RPMI1640) に浮遊させた。この細胞浮遊液を  $5 \times 10^6$  個/ml に調整し 96 穴 U 底マイクロプレート (Corning 社, 米国) の各ウェルに 200  $\mu$ l ずつ加えた後, 最終濃度が 5  $\mu$ g/ml になるように抗 CD3 抗体 (145-2C11, Pharmingen 社, 米国) を添加し, リンパ球にポリクローナルな刺激を加えた。コントロールのウェルには何も加えなかった。5%CO<sub>2</sub>・37°C の条件下で 72 時間培養した後上清を回収し, サイトカイン濃度測定まで -80°C にて凍結保存した。

7. ELISA 法によるサイトカインの測定

サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4) の定量は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によって測定した<sup>51)</sup>。すなわち, 96 穴平底マイクロプレート (Corning 社, 米国) の各ウェルを抗 IFN- $\gamma$  抗体 (XMG1.2, Pharmingen 社) または抗 IL-4 抗体 (BVD4-1D11, Pharmingen 社) でコーティングし, 4°C で 48 時間静置した。続いて, 上清あるいは標準溶液 (組換えマウス IFN- $\gamma$ , 同 IL-4, 以上 Pharmingen 社) を各ウェルに加え 2 時間室温に静置した。0.1% Tween20 (BioRad 社, 米国) を加えたリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) (以下 0.1% Tween20-PBS) で洗浄後, ビオチン化抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (XMG1.3, Pharmingen 社) あるいはビオチン化抗マウス IL-4 抗体 (BVD6-24G2, Pharmingen 社) を加え, さらに 1 時間室温で静置した。続いて 0.1% Tween20-PBS で洗浄したのち, AB 溶液 (Vector Laboratories 社, 米国) を加え 30 分間静置した。最後に発色試薬 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid (ABTS, Sigma 社, 米国) を加え, ELISA リーダー (BioRad 社, 米国) にて吸光度 (A<sub>405</sub>) を測定して各サイトカインを検出した。サイトカイン濃度は, 標準溶液を利用して作成した標準曲線から算出した (検出感度: 20 pg/

ml)。本法の日差再現性試験および同時再現性試験における変動係数 (coefficient of variation 値: C.V. 値) は, それぞれ 3% および 4% であった。マウス血清 IL-18 濃度も同様な方法で測定した。すなわち, 抗マウス IL-18 モノクローナル抗体 (clone74, MBL 社, 名古屋) をコーティングした 96 穴マイクロプレートのウェルに血清を添加し, 抗原-抗体反応させた。洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IL-18 モノクローナル抗体 (clone93-10c, MBL 社) を添加して反応させ, 抗体-抗原-標識抗体の複合物を形成させた。洗浄後, テトラメチルベンチジンと過酸化水素の溶解液を基質溶液として添加し, ペルオキシダーゼにより発色させ, 吸光度 (A<sub>450</sub>) を測定してマウス IL-18 を検出した。日差再現性試験および同時再現性試験における C.V. 値は, それぞれ 6% および 4% であり, 検出感度は 12.5 pg/ml であった。

8. 各種サイトカイン, IP-10/CXCL10 および CD86 mRNA の定量的リアルタイム PCR 分析

各マウスごとに脾臓, 脾局所リンパ節および脾臓から AGPC 法にて RNA を抽出し, Dnase I (タカラバイオ社, 大津) を用いてゲノム DNA の分解処理を行った。続いて, ポリ A シグナルを有する mRNA の性質を利用して, オリゴ dT プライマーである Not1-d(T)18 を用いた逆転写反応により cDNA を作成した。得られた cDNA は, 定量的リアルタイム PCR 分析まで -80°C で保存した。IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12(p40), Interferon-inducible protein-10/CXC chemokine ligand10 (IP-10/CXCL10), CD86 および  $\beta$ -アクチン (内部標準として使用) の各 mRNA 発現レベルは, ABI Prism 7700 sequence detector (PE Applied Biosystems 社, 米国) を利用してリアルタイム PCR 法にて定量的に測定した<sup>52)</sup>。利用したプローブの 5'側は蛍光リポーターの 6-carboxyl-fluorescein (FAM) で, 3'側はクエンチャー (消光分子) の carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) で修飾されている (TaqMan プローブ)。TaqMan プローブ上に結合している FAM は 3'側のクエンチャー TAMRA の影響により蛍光を発しない。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 プローブから遊離した蛍光リポーター FAM は TAMRA の影響を受けなくなり蛍光を発するようになる。リアルタイム PCR 法は, 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

第1表 定量的PCR解析に利用したプライマー対およびTaqManプローブ

遺伝子	5'プライマー	3'プライマー	TaqManプローブ
IFN- $\gamma$	5'-CAGCAACAGC AAGGCGAAA-3'	5'-GCTTCCTGAG GCTGGATTCC-3'	5'-AGGTCAACAACC CACAGGTCCAGCG-3'
IL-4	5'-TCTCATGGAGC TGCAGAGACTCT-3'	5'-GCTCTTTAGGC TTTCCAGGAAGT-3'	5'-CTGCACCATGAATG AGTCCAAGTCCACA-3'
IL-12 (p40)	5'-TCCTGAAGTGT GAAGCACCAAAT-3'	5'-CTTCAAGTCCA TGTTTCTTTGCA-3'	5'-ACTCCGGACGG TTCACGTGCTCA-3'
IP-10/CXCL10	5'-CGTCATTTTC TGCCTCATCCT-3'	5'-TGGTCTTAGAT TCCGGATTCAG-3'	5'-AAGCTTGAAATCA TCCCTGCGAGCC-3'
CD86	5'-TGGTTCTGTACG AGCACTATTTGG-3'	5'-CATGTCCTTGAT CTGAACATTGTG-3'	5'-CCGCACGAGCTTT GACAGGAACAAC-3'
$\beta$ -アクチン	5'-CAACGTCACAC TTCACGATGGA-3'	5'-TCCAGCCTTC CTTCTTGGGTA-3'	5'-TGTAGTTTCATGGA TGCCACAGGATTCC-3'

ムに定量できるシステムである。本研究で使用したプライマーとTaqManプローブは第1表に示した。リアルタイムPCR反応は、反応溶液としてTaqMan Universal MasterMix (PE Applied Biosystems社)を用いて行われた。サンプルにおける各mRNA発現レベルは、同一サンプルから増幅された $\beta$ -アクチンPCR産物に対する相対的な量として算出した。

9. 抗原特異的な細胞内サイトカイン産生細胞数の測定

GADあるいはインスリンに対して反応性を示すリンパ球のサイトカイン産生プロファイルをフローサイトメーターにて同定し、その細胞数を定量した<sup>33</sup>。すなわち、各マウスから採取した脾臓あるいは脾局所リンパ節を無菌的に細胞分散して溶血した後に、ペニシリン/ストレプトマイシン添加10%FCS-RPMI1640に浮遊させた。この細胞浮遊液を $5 \times 10^6$ 個/mlに調整し、96穴U底マイクロプレートの各ウェルに200  $\mu$ lずつ加えた。各ウェルには速効型インスリン (Novo Nordisk Pharma社, デンマーク) あるいは酵母菌で発現させ精製した組換えGAD65 (RSR社, 英国) を最終濃度が5  $\mu$ g/mlになるように調整して加えた。なお、組換えGAD65の内毒素レベルは、10  $\mu$ g/mlのGAD65に対して0.1 EU/ml以下であった(比色法)<sup>34</sup>。コントロールのウェルには何も添加しなかった。5%CO<sub>2</sub>・37°C条件下で72時間培養し、終了4時間前にBrefeldin A (Sigma社, 最終濃度10  $\mu$ g/ml) を各ウェルに加え、産生サイトカインの細胞外分泌を防止した。培養終了後、サンプル150  $\mu$ lを5 mlポリスチレンチューブ (Becton Dickinson社)に移し、phycoerythrin/cyanine5 (Cy-chrome) 標識抗マウスCD4抗体 (H129.19,

Pharmingen社) 5  $\mu$ lを加えた。15分間室温静置後、FACS lysing solution (Becton Dickinson社)を4 ml加え、室温で10分間静置した。続いてサンプルを0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA, Sigma社) -PBS (以下0.1%BSA-PBS) で洗浄して遠沈(1600rpm  $\times$  5分間)し、上清を除去してからFACS permeabilizing solution (Becton Dickinson社) 4 mlを加え、室温で10分間静置した。0.1%BSA-PBSで洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスIFN- $\gamma$ 抗体 (IgG1, Pharmingen社) 3  $\mu$ lおよびphycoerythrin (PE) 標識抗マウスIL-4抗体 (IgG2b, Pharmingen社) 3  $\mu$ lを加え室温で30分間静置した。なお、FITC標識IgG1およびPE標識IgG2b (以上Pharmingen社) をアイソタイプコントロールとして加えたサンプルを別に準備し、FACS分析の際のカットオフラインの決定に利用した。最後に0.1%BSA-PBSで洗浄しサンプル調整の終了した細胞浮遊液をフローサイトメーター (Epics Altra, Coulter社, 米国) で分析した。なお、この細胞内サイトカイン蛍光標識システムが機能していることを確認するためにovalbumin (OVA) 反応性サイトカイン産生細胞の検出をあらかじめ試みた。すなわち、10週齢C57BL/6マウスをincomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma社) と共にOVAで免疫した後14日目に脾臓を無菌的に採取し、ペニシリン/ストレプトマイシン添加10%FCS-RPMI1640に浮遊させた。この細胞浮遊液をマイクロプレートのウェルに分注し、OVAを添加後(最終濃度: 10  $\mu$ g/ml) 72時間培養した。得られたサンプルを先述の細胞内サイトカイン蛍光標識システムに適用し、本システムが機能していることを確認した。本研究において、

抗原未投与時の IFN- $\gamma$  および IL-4 産生 CD4 細胞は検出感度(細胞数 50,000 個あたり 5 個)以下であった。

10. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表示した。糖尿病累積発症率の比較には  $\chi^2$  検定を行った。血清 IL-18 濃度、IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの経時的な変化に関しては、一元配置分散分析による F 検定で解析した。その他の mRNA 発現レベル、膵島炎スコア、サイトカイン産生量および GAD 反応性サイトカイン産生 CD4 細胞数の比較は、Mann-Whitney *U* 検定で解析した。膵局所 IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルと膵局所 IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベル、膵局所 IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルと膵島炎スコア、さらに膵局所 IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルと膵島炎スコアの相互関係については、Pearson の相関係数 ( $\rho$ ) を算出し評価した。また、GAD 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 細胞数と膵島炎スコアの相互関係、および同細胞数と膵局所 IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルの相互関係は、Spearman の相関係数 ( $\rho_s$ ) を算出し評価した。p<0.05 を統計学的に有意差があると判定した。

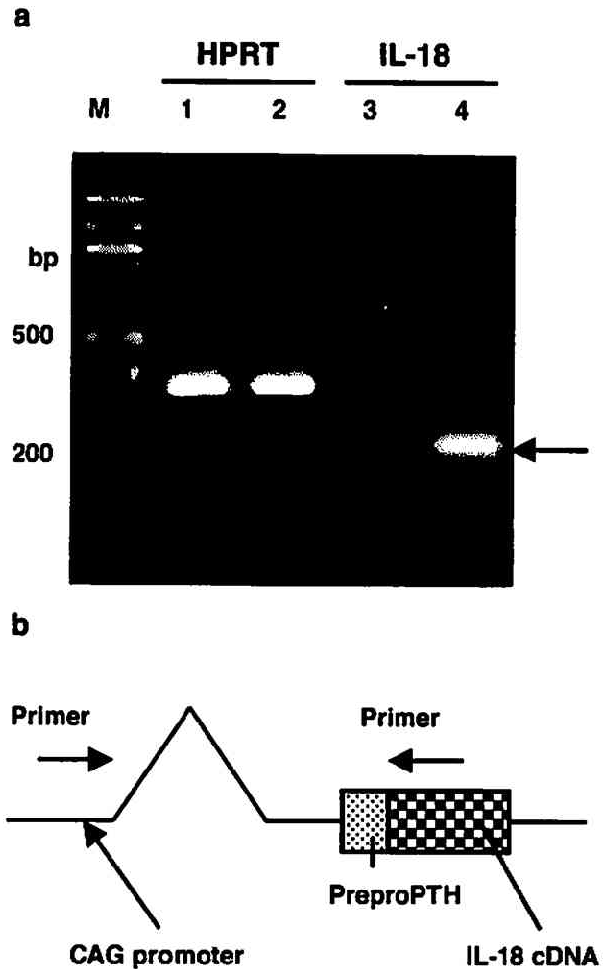
成績

1. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射部位における IL-18 mRNA 発現の確認

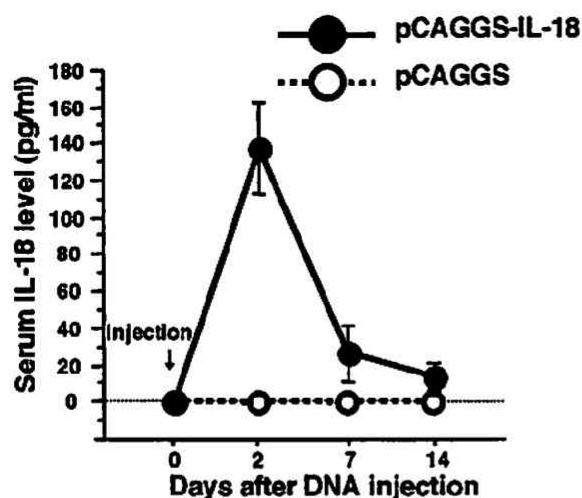
pCAGGS-IL-18 筋注部位における IL-18 mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。IL-18 mRNA は、pCAGGS-IL-18 筋注部位のみに確認され(第2a図, 第4レーン), pCAGGS 筋注部位では確認されなかった(第2a図, 第3レーン)。

2. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射後の血清 IL-18 濃度

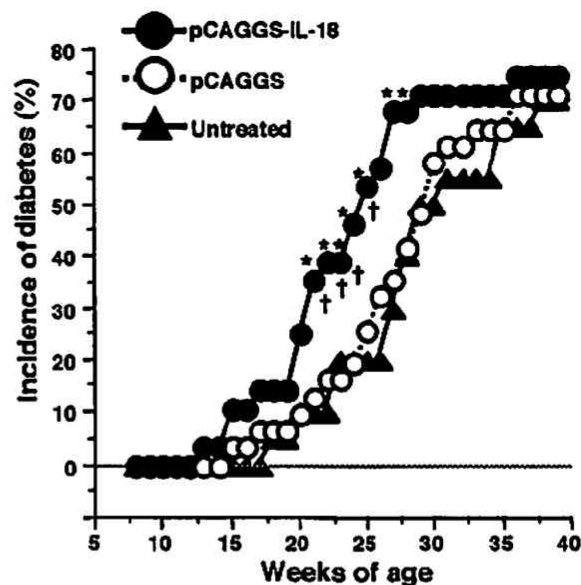
pCAGGS-IL-18 筋注後、全身性に IL-18 が供給されているか否かを評価するために、50  $\mu$ g の pCAGGS-IL-18 または pCAGGS を 6 週齢雌性 NOD マウスの両側前脛骨筋に計 100  $\mu$ g ずつ注射し、同部位に *in vivo* electroporation を施行して遺伝子発現レベルの増強を図った。血清 IL-18 濃度は、ベクター筋注後 2 日目、7 日目および 14 日目に血清を採取し、ELISA 法で測定した。その結果、pCAGGS-IL-18 筋注群における血清 IL-18 濃度は、筋注後 2 日目でピークに達しその後徐々に低下したが、2 週間以上にわたって IL-18 が全身性に供給されることが確認された(第3図)。一方、pCAGGS 筋注群および未処置群では検出感度(12.5



第2図 pCAGGS-IL-18 筋注部位における IL-18 mRNA の発現。pCAGGS-IL-18 または pCAGGS 筋注後 2 日目に局所の筋肉を採取し、RNA を抽出した。その後、逆転写反応にて cDNA を作成し PCR を行った。IL-18 mRNA は、pCAGGS-IL-18 筋注部位のみに確認され(a; 第4レーン), pCAGGS 筋注部位では確認されなかった(a; 第3レーン)。IL-18 の5'プライマーはCAGプロモーターの転写開始部位下流の配列を認識するように設計されているため(b), pCAGGS-IL-18 由来の IL-18 cDNA のみが増幅され、内因性 IL-18 遺伝子は増幅されない。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動法により分離した。M レーン: 分子量マーカー (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 3 を許可を得て転載)



第3図 プラスミドDNA筋注後の血清IL-18濃度の経時的变化。6週齢のNODマウスに、pCAGGS-IL-18またはpCAGGSを計100μgずつ筋注し、*in vivo* electroporationを行った。筋注後2日目、7日目および14日目に血清を採取し、ELISA法で測定した。pCAGGS-IL-18筋注後2日目に血清IL-18濃度がピークに達しその後徐々に低下したが、2週間以上にわたってIL-18が全身性に供給された。一次元配置分散分析によるF検定を行い、血清IL-18濃度の上昇には有意性 ( $p < 0.0001$ ) があることを確認した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 4を許可を得て転載)



第4図 プラスミドDNA筋注後の糖尿病累積発症率。計100μgのpCAGGS-IL-18(以下IL-18群; n=28)またはpCAGGS(以下コントロール群; n=31)を4週齢時に筋注し、*in vivo* electroporationを行った。さらに2週間後(6週齢)に同様な処置を繰り返した後、8週齢より週1回の割合で糖尿病発症の有無を確認した。22~27週齢における糖尿病の累積発症率は、コントロール群および未処置群(n=20)と比較してIL-18群において有意に高値となった。\*,  $p < 0.05$  vs control group, †;  $p < 0.05$  vs untreated group ( $\chi^2$ 検定により解析)(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 2を許可を得て転載)

pg/ml) 以下であった。

### 3. pCAGGS-IL-18筋肉内注射後の糖尿病累積発症率

最初に、50μgのpCAGGS-IL-18(以下IL-18群; n=28)またはpCAGGS(以下コントロール群; n=31)を、4週齢雌性NODマウスの両側前脛骨筋に計100μg注射し、同部位に*in vivo* electroporationを行った。さらに2週間後(6週齢)に、同様な処置を繰り返した。その結果、22週齢以降における糖尿病の累積発症率は、コントロール群および未処置群(n=20)と比較してIL-18群において有意に高値となった(第4図)。しかし、28週齢以降はコントロール群や未処置群における糖尿病発症も進み、IL-18群との差はみられなくなった。一方、コントロール群における糖尿病の累積発症率は、未処置群と有意差が認められず、pCAGGS投与そのものが糖尿病発症に影響しないことが示唆された。

この糖尿病発症促進効果が発現ベクターの投与週齢の差によって異なるか評価するために、同様な処置を8週齢時および10週齢時に繰り返し雌性NODマウスに行ったが、IL-18投与群とコントロール群との間に糖尿病累

積発症率に差は認められなかった。

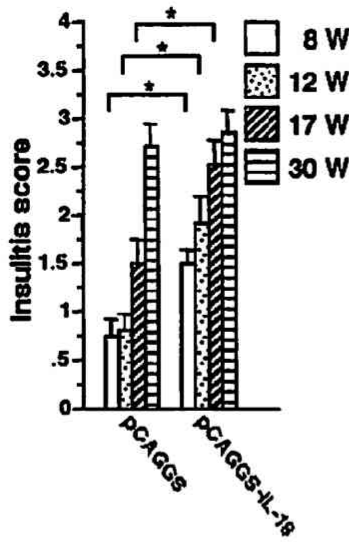
### 4. 全身性IL-18投与が膵島炎の進展に与える影響

pCAGGS-IL-18筋注による全身性IL-18投与が膵島炎の進展に与える影響を評価するために、IL-18およびコントロールの各群における膵島炎の程度をスコア化して経時的に検討した。第5図に示すように、IL-18群では、糖尿病発症前期の8-17週齢における膵島炎の進展が確認された。一方、30週齢における膵島炎スコアは両群で差を認めず、第4図で示した糖尿病累積発症率を反映する結果となった。以上よりpCAGGS-IL-18筋注による膵島局所への著しい炎症細胞浸潤が示され、全身性IL-18投与は糖尿病原性リンパ球による膵β細胞の破壊を促進する可能性が示唆された。

### 5. pCAGGS-IL-18筋肉内注射による全身性および膵島局所サイトカインバランスの評価

全身性Th1/Th2サイトカインバランスに対する外因

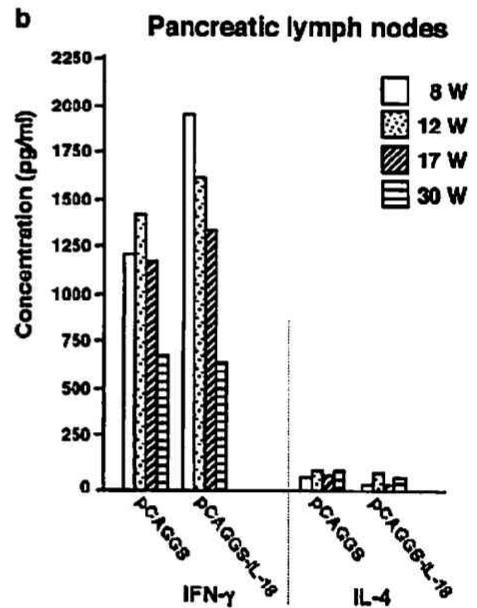
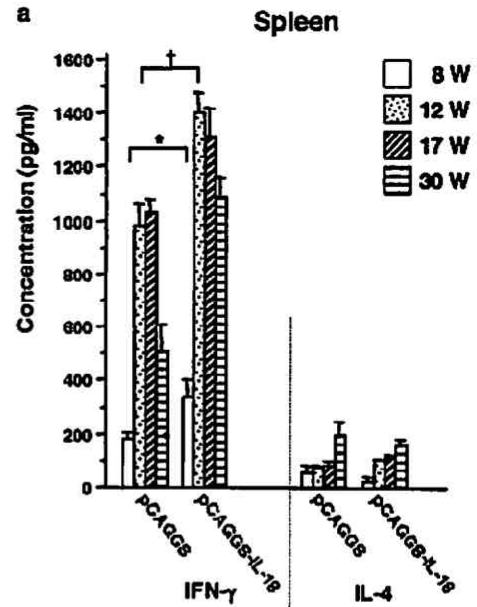




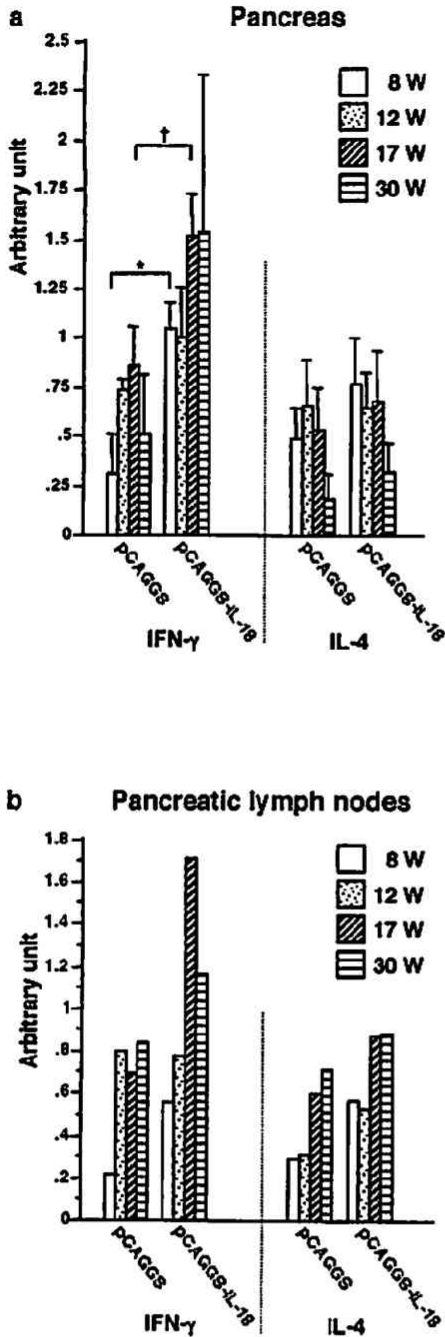
第5図 プラスミドDNA筋注後の膵島炎の進展。IL-18群(pCAGGS-IL-18)およびコントロール群(pCAGGS)における膵島炎の程度を週齢別にスコア化して検討した。IL-18群では、糖尿病発症前期(8-17週齢)における膵島炎の進展が確認された。\*,  $p < 0.05$  (Mann-Whitney  $U$  検定により解析)。8週齢(IL-18群,  $n=7$ ; コントロール群,  $n=5$ ), 12, 17および30週齢(IL-18群,  $n=5$ ; コントロール群,  $n=5$ ) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 5を許可を得て転載)

性IL-18の影響を評価するために、抗CD3抗体刺激によって観察される脾細胞のサイトカイン反応を検討した。なお、IL-18およびコントロールの両群間において、脾臓のリンパ球分画中におけるCD4およびCD8細胞の組成に有意差は認めない(IL-18群: CD4細胞,  $32.4 \pm 1.1\%$ , CD8細胞,  $17.2 \pm 0.8\%$ ; コントロール群: CD4細胞,  $29.5 \pm 2.2\%$ , CD8細胞,  $14.6 \pm 1.4\%$ )。その結果、IFN- $\gamma$ 産生量がコントロール群と比較してIL-18群で増加しており(8週齢時:  $p < 0.05$ , 12週齢時:  $p < 0.01$ )。全身性サイトカインバランスはTh1優位な状態であった(第6a図)。また、膵局所リンパ節における検討でも同様の傾向が認められた(第6b図)。ただし、コントロール群および未処置群の両群間では、全身性サイトカインバランスに差を認めず、今回使用したベクター(pCAGGS)そのものがサイトカイン反応に直接影響を及ぼさないことが確認された。さらに、抗CD3抗体未刺激による脾細胞からの各サイトカインの産生量は、ELISA法の検出感度(20 pg/ml)以下であった。

続いて、膵局所のサイトカインバランスに対する外因



第6図 脾臓および膵局所リンパ節におけるリンパ球のサイトカイン産生量。IL-18群(pCAGGS-IL-18)およびコントロール群(pCAGGS)から脾臓(a)あるいは膵局所リンパ節(b)を採取し、週齢別に抗CD3抗体刺激によるリンパ球のサイトカイン産生量をELISA法にて検討した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし、1回の測定で評価した。脾臓および膵局所リンパ節のいずれも、IL-18群では糖尿病発症前期(8-17週齢)においてIFN- $\gamma$ 産生の亢進が認められた。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  検定により解析)。8週齢(IL-18群,  $n=7$ ; コントロール群,  $n=5$ ), 12, 17および30週齢(IL-18群,  $n=5$ ; コントロール群,  $n=5$ ) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 6を許可を得て転載)



第7図 膵臓および膵局所リンパ節におけるサイトカイン mRNA 発現レベル。IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から膵臓 (a) あるいは膵局所リンパ節 (b) を採取し、週齢別にサイトカイン mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし、1回の測定で評価した。膵臓および膵局所リンパ節のいずれも、IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) において IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルが増強していた。\*、 $p < 0.05$ ；†、 $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群、 $n=7$ ；コントロール群、 $n=5$ )、12、17 および 30 週齢 (IL-18 群、 $n=5$ ；コントロール群、 $n=5$ ) (Oikawa Y et al : J Immunol 171 : 5865-5875, 2003 の Fig 7 を許可を得て転載)

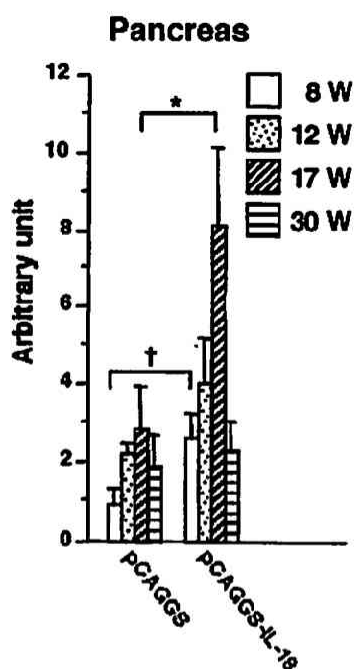
性 IL-18 の影響を評価するために、膵臓における IFN- $\gamma$  および IL-4 の mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 分析にて検討した。第 7 a 図に示すように、IL-18 群における膵臓の IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルは糖尿病発症前期においてコントロール群より有意に高値であったが (8 週齢時： $p < 0.05$ ，17 週齢時： $p < 0.01$ )，IL-4 mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差が認められなかった。したがって、膵局所におけるサイトカインバランスは、IL-18 群において Th1 優位な状態であることが示唆された。同様な傾向が膵局所リンパ節においても観察された (第 7 b 図)。さらに、糖尿病発症前期において膵臓の IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルと膵島炎スコアの間には正の順位相関があった ( $\rho = 0.563$ ； $p < 0.001$ )。これらの所見から、若齢 NOD マウスへの全身性 IL-18 投与が免疫抑制性の Th2 細胞ではなく、糖尿病原性 Th1 細胞の膵島浸潤を促進し、膵  $\beta$  細胞の破壊に関わる可能性が示唆された。

#### 6. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルの検討

IP-10/CXCL10 は活性化 Th1 細胞の遊走を促進するケモカイン<sup>55-57)</sup>であり、自己免疫性疾患の病因との関連が複数報告されている<sup>53, 56)</sup>。外因性 IL-18 による膵局所の IP-10/CXCL10 発現レベルの変化や膵島炎との関係の評価するために、定量的リアルタイム PCR 法にて膵臓における IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルを評価した。第 8 図に示すように IL-18 群では、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルが、糖尿病発症前期において顕著に増加していた (8 週齢時： $p < 0.01$ ，17 週齢時： $p < 0.05$ )。さらに、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルは、膵島炎スコア ( $\rho = 0.517$ ； $p < 0.01$ ) や膵局所の IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベル ( $\rho = 0.510$ ； $p < 0.01$ ) と正の相関があった。これらの所見から、外因性 IL-18 が膵局所における IP-10/CXCL10 発現を増加させることによって、膵島への糖尿病原性 Th1 細胞の浸潤による膵島炎の進展を促進する可能性が示唆された。

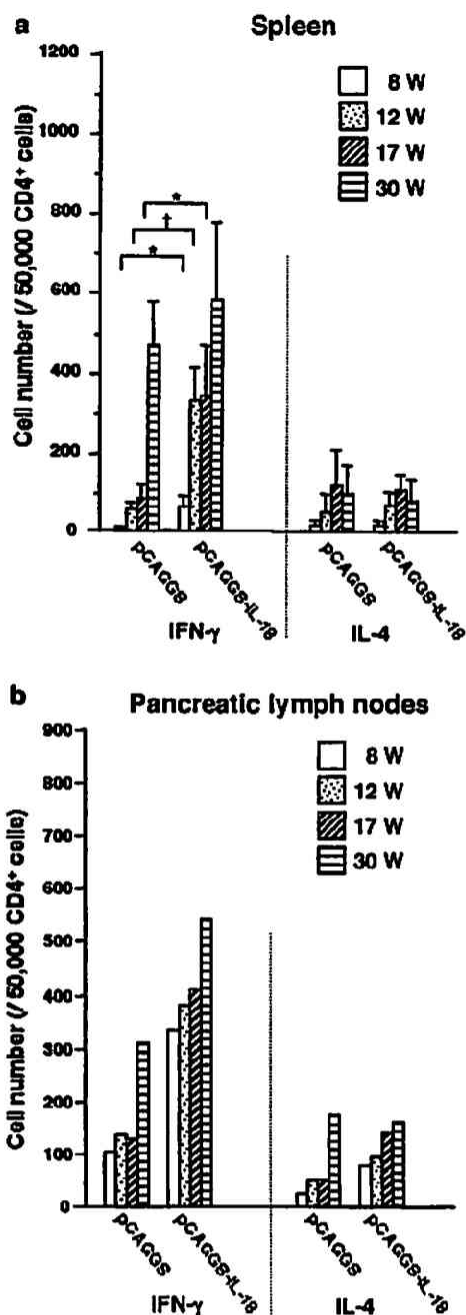
#### 7. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における GAD 反応性 IFN- $\gamma$ 産生 CD4 細胞数の検討

全身性 IL-18 投与による膵島関連自己抗原反応性リンパ球への影響を評価するために、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出システムを利用して GAD およびインスリン反応性 IFN- $\gamma$  ならびに IL-4 産生 CD4 細胞数を検討した。第 9 a 図に示すように、糖

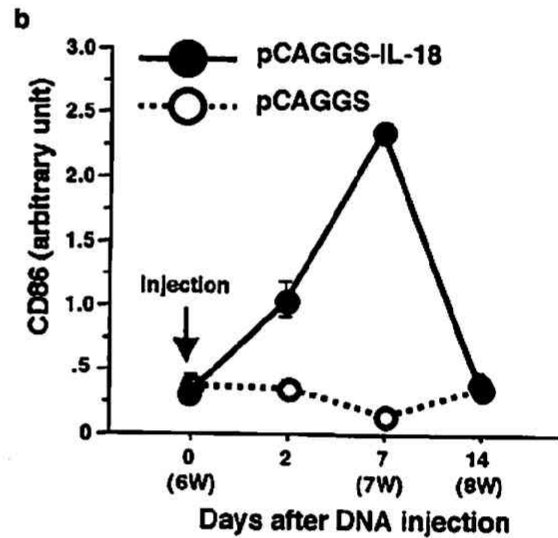
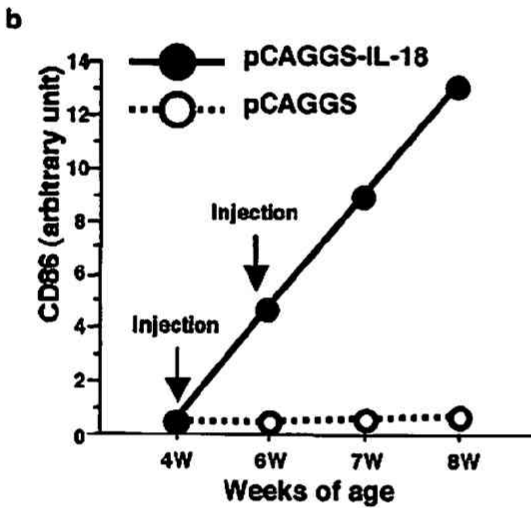
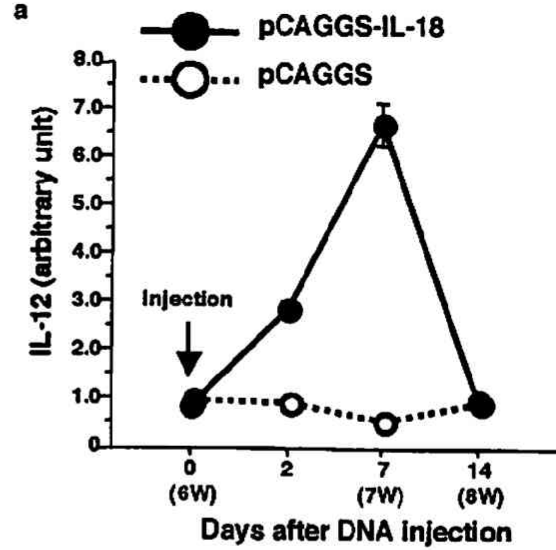
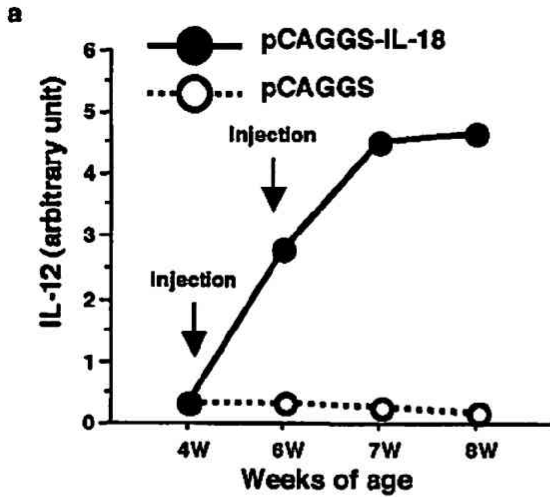


第8図 膵臓におけるIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベル。IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から膵臓を採取し、週齢別にIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) においてIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルが増強していた。\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群,  $n=7$ ; コントロール群,  $n=5$ ), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群,  $n=5$ ; コントロール群,  $n=5$ ) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 8 を許可を得て転載)

糖尿病発症前期において、IL-18 群では脾細胞中のGAD反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4細胞が有意に増加していた (8 および 17 週齢時:  $p < 0.05$ , 12 週齢時:  $p < 0.01$ )。膵局所リンパ節においても同様な傾向が認められた (第9b 図)。さらに、糖尿病発症前期におけるGAD反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4細胞数は、膵島炎スコア ( $\rho_s=0.510$ ;  $p < 0.01$ )、膵局所のIFN- $\gamma$  mRNA 発現レベル ( $\rho_s=0.429$ ;  $p < 0.03$ ) および膵局所IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベル ( $\rho_s=0.479$ ;  $p < 0.01$ ) と有意な正の相関を示した。しかし、GAD反応性IL-4産生CD4細胞数 (第9a 図) あるいはインスリン反応性IFN- $\gamma$  またはIL-4産生CD4細胞数は、2群間に差が認められなかった。以上の結果から全身性IL-18投与は、GAD反応性Th1細胞の増加を促し、破壊性膵島炎の促進に寄与する可能性が示唆された。



第9図 脾臓および膵局所リンパ節におけるGAD反応性サイトカイン産生CD4細胞数の検討。IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から脾臓 (a) あるいは膵局所リンパ節 (b) を採取し、GAD65 刺激後のGAD反応性サイトカイン産生CD4細胞数をフローサイトメーターにて検討した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし、1 回の測定で評価した。脾臓および膵局所リンパ節のいずれも、IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) においてGAD反応性IFN- $\gamma$ 産生CD4細胞が増加していた。\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群,  $n=7$ ; コントロール群,  $n=5$ ), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群,  $n=5$ ; コントロール群,  $n=5$ ) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 9 を許可を得て転載)



第10図 脾局所リンパ節におけるIL-12(p40)およびCD86 mRNA発現レベル。計100 µgのpCAGGS-IL-18 (以下IL-18群; n=13) またはpCAGGS (以下コントロール群; n=10) を4週齢時に筋注し, *in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に, 同様な処置を繰り返した。4, 6, 7および8週齢時に脾局所リンパ節を回収し, IL-12(p40) (a) およびCD86 (b) mRNA発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18群では筋注後から経時的にIL-12(p40) およびCD86 mRNA発現レベルが増強した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし, 1回の測定で評価した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 11を許可を得て転載)

第11図 脾臓におけるIL-12(p40)およびCD86 mRNA発現レベル。計100 µgのpCAGGS-IL-18 (以下IL-18群; n=13) またはpCAGGS (以下コントロール群; n=10) を4週齢時に筋注し, *in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に, 同様な処置を繰り返した。2回目の筋注前, 筋注後2日目, 7日目および14日目に脾臓を回収し, IL-12(p40) (a) およびCD86 (b) mRNA発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18群ではpCAGGS-IL-18筋注後7日目をピークとして一過性にIL-12(p40) およびCD86 mRNA発現レベルが増強した。一次元配置分散分析によるF検定を行い, 両者の増強には有意性(p<0.0001)があることを確認した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 10を許可を得て転載)

8. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における末梢 IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの検討

近年、未分化 CD4 細胞の Th1 または Th2 細胞への分化に、抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) と T 細胞との間の適切な CD28/B7 副刺激経路が重要な役割を担っていることが報告されている。同様なことが NOD マウスでも報告されており、同マウスにおける CD28 と B7 分子の1つである CD86 を介した副刺激経路の機能障害が自己免疫性糖尿病の発症と関連していると考えられている<sup>33)</sup>。さらに膵局所リンパ節における未分化糖尿病原性 T 細胞の活性化が、膵島周囲炎の出現に密接に関連があることも報告されている<sup>39)</sup>。そこで APC の機能に対する IL-18 の効果を評価するために、膵局所リンパ節および脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

第 10 図および第 11 図で示すように、膵局所リンパ節および脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルは、コントロール群と比較して IL-18 群において増加していた。さらに IL-18 群では、膵局所リンパ節における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルが 4 週齢から 8 週齢まで直線的に増加した (第 10a 図および第 10b 図) のに対し、脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルは pCAGGS-IL-18 筋注後 7 日目にピークに達したのち、14 日目までに徐々に基礎レベルに低下していった (第 11a 図および第 11b 図)。この IL-18 群における脾臓の IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの経時的な変化は、同群における血清 IL-18 濃度 (第 3 図) の経時的変化とほぼ平行していた。これらの所見は、全身性 IL-18 投与が若齢 NOD マウスの末梢および膵局所リンパ節における APC 機能、すなわち IL-12 産生や CD28/CD86 副刺激系に何らかの影響を与えている可能性を示唆するものであり、結果的に GAD 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 細胞の増加 (第 9 図) や他の糖尿病原性 Th1 細胞の分化促進に寄与した可能性がある。

考 察

本研究では、若齢 (4 週齢) NOD マウスへの全身性 IL-18 投与により糖尿病発症の促進が観察された。IL-18 は Th1 および Th2 作用の両面性を持ったサイトカインであり<sup>44)</sup>、これまでに筆者らのグループは 10 週齢の NOD マウスへの IL-18 の腹腔内投与により全身性サイトカインバランスが Th2 優位になり、CY 投与に

よる糖尿病発症が抑制されることを報告した<sup>47)</sup>。同様に、Rothe らは 10 週齢の NOD マウスに IL-18 を連日腹腔内投与し続けたところ、糖尿病の累積自然発症が低下したことを報告している<sup>48)</sup>。彼らの報告でも、IL-18 投与 NOD マウスの膵局所における IL-4 mRNA 発現レベルがコントロール群に比し上昇しており、IL-18 投与が膵島に浸潤している Th1 細胞を Th2 細胞へ変化させた可能性を提唱している。

しかし、これまでの報告とは異なり、本研究では若齢 NOD マウスへの全身性 IL-18 投与による糖尿病発症促進効果が観察された (第 4 図および第 5 図)。全身性および膵局所のサイトカインバランスは IL-18 群において Th1 優位な状態にシフトしており (第 6 図および第 7 図)、この所見は IL-18 の Th1 サイトカインとしての元来の性質<sup>44)</sup>と一致するものであった。本研究とこれまでの外来性 IL-18 の糖尿病抑制作用を示した報告<sup>47, 48)</sup>との相違は、次の 3 点、すなわち IL-18 投与方法、血清 IL-18 濃度および IL-18 投与週齢の違いに起因していると考えた。

IL-18 投与方法に関して、本研究では IL-18 発現プラスミド DNA 筋注法を利用した。ウィルスなどを利用した他のベクター<sup>60-63)</sup>を用いた遺伝導入システムと比較して、この DNA 筋注法は簡単で安価であり、かつ安全な方法であることが知られている。しかし、この方法では、遺伝子の発現レベルが比較的低いという短所があった<sup>63, 64)</sup>。近年、Aihara らは、DNA 筋注法に *in vivo* electroporation を組み合わせることによって、非常に高レベルのサイトカイン遺伝子発現が観察され、サイトカインの安定した長期的全身供給を可能にした<sup>49)</sup>。第 3 図で示すように、1 回の pCAGGS-IL-18 筋注により、血清 IL-18 レベルは筋注後 2 日目にピーク (約 130 pg/ml) に達し、2 週以上にわたり IL-18 が全身性に供給された。一方、これまでの報告<sup>47, 48)</sup>で行われていた IL-18 (0.3  $\mu$ g/マウス) の腹腔内連日投与では平均 150,000 pg/ml という極めて高い血清 IL-18 濃度に達しており<sup>47)</sup>、このことが糖尿病発症に対する Th2 作用の誘因になっていた可能性がある。実際、これまでに IL-18 の Th2 作用は *in vitro* の系<sup>39, 42)</sup>のほか、*in vivo* の系では大量 IL-18<sup>40, 41, 43)</sup>の生体内投与や IL-18 トランスジェニックマウス<sup>65)</sup>を用いた検討で観察されてきた。すなわちこれらすべての報告が非生理的な IL-18 レベルにおける検討であり、そのような高 IL-18 レベルでは本来の生理的な IL-18 の作用ではなく非生理的な作用を観察してしまう可能性がある。筆者は実際に pCAGGS-IL-18 を 8 週齢、10 週齢と続けて NOD マウスに筋注したが、従来の報

告<sup>47, 48)</sup>にみられていた糖尿病発症の抑制は観察されなかった。それゆえに、外因性 IL-18 による NOD マウスの糖尿病発症抑制効果は、おそらく血清 IL-18 濃度の極端な高値に起因していたと考えている。

本研究では、IL-18 投与により全身性および膵局所のサイトカインバランスが Th1 優位な状態にシフトし (第 6 図および第 7 図)、さらに GAD 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 細胞の増加も観察された (第 9 図)。“膵島炎進展初期段階”では、膵島関連自己抗原に反応性を示す未分化 T 細胞が抗原提示細胞によって刺激を受け、IL-12 の存在下では糖尿病原性の Th1 細胞へ、一方 IL-4 の存在下では免疫制御性の Th2 細胞へ分化することが想像される。したがって、第 10a 図および第 11a 図で示した APC からの IL-12 の産生亢進を考慮すると、“膵島炎進展初期段階”における IL-18 の全身性投与は Th1 細胞への分化の補助因子あるいは促進因子として働いているものと推測される。これまでのところ外因性 IL-18 が内因性 IL-12 の産生を誘導するという報告はなく、今後、両者の関係を解明する必要がある。

pCAGGS-IL-18 筋注による Th1 作用が筋注時の週齢によって異なるか否か評価するために、8 週齢および 10 週齢と続けて NOD マウスに pCAGGS-IL-18 の筋注および *in vivo* electroporation を施行した。しかし、全身性および膵局所の Th1/Th2 サイトカインバランス、および GAD またはインスリン反応性 IFN- $\gamma$  ならびに IL-4 産生 CD4 細胞数は、pCAGGS のみを筋注したコントロール群と IL-18 群との間に明らかな差がみられなかった。すなわち、全身性 IL-18 投与による糖尿病発症促進は週齢に依存してみられる現象であり、“膵島炎進展初期段階”では IL-18 が膵島炎の進展過程上、免疫学的に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

これまでに筆者らの研究室では、IP-10/CXCL10 が NOD マウスの膵島炎において発現していることを確認し、CY 誘発性糖尿病モデルの系で抗 IP-10/CXCL10 抗体を NOD マウスに腹腔内投与すると糖尿病発症が抑制されることを報告した<sup>64)</sup>。さらにヒトでも 1 型糖尿病患者では血清 IP-10/CXCL10 値が高く、疾患活動性と相関していることを報告した<sup>53)</sup>。以上より、膵局所における IP-10/CXCL10 発現は自己免疫性膵島炎の病因および膵島炎の活動性と関連があると考えられる。本研究では、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルがコントロール群と比較して、IL-18 群で増加していることを示した (第 8 図)。さらに、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルは、膵島炎スコアおよび膵局所の IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルとの間に正の相関

を認めた。これらの所見は外因性 IL-18 が膵島における IP-10/CXCL10 発現を増加させる可能性を示唆するものであり、膵島炎への糖尿病原性 Th1 細胞の遊走や、その後の膵  $\beta$  細胞破壊を促進する可能性を示唆している。しかし、IL-18 と IP-10/CXCL10 との直接的な関係についてはこれまで報告されていないため、両者の関係について今後詳細に検討を行う必要があると考える。

NOD マウスでは APC の分化異常や機能異常が報告されており、このことが糖尿病原性の Th1 タイプ CD4 細胞および CD8 細胞の分化・成熟に寄与していると考えられている<sup>65-70)</sup>。実際、NOD マウスにおけるマクロファージでは IL-12 の高い産生・分泌能が観察されており、他の非自己免疫種のマウスと比較して、Th1 細胞あるいは細胞障害性 T 細胞への優先的な分化促進が観察される<sup>69)</sup>。さらに、CD28/B7 経路を介したナイーブ T 細胞の活性化についても、自己免疫性糖尿病を含む自己免疫疾患で検討されてきた<sup>39)</sup>。本研究では、末梢における IL-12(p40)および CD86 の mRNA 発現レベルが、IL-18 群において一過性に増強することを示した (第 11a 図および第 11b 図)。そこで GAD 反応性 IFN- $\gamma$  産生 CD4 細胞が IL-18 群において増加した (第 9 図) ことを考慮すると、外因性 IL-18 による APC 上の CD86 発現増強と IL-12 産生亢進が、結果的に膵  $\beta$  細胞反応性 CD4 細胞の Th1 細胞への分化促進に寄与したものと考えられた。

CD86 に関するこれらの所見は、NOD マウスを用いた諸報告と一致する<sup>39)</sup>。たとえば Salomon らは、CD86 ノックアウト NOD マウスを作成し、同マウスでは破壊性膵島炎にいたらず膵島周囲炎でとどまるため、糖尿病発症が観察されなかったと報告している<sup>71)</sup>。また、Lenschow らは、2 週齢から 7 週齢までの NOD マウスでは、抗 CD86 抗体を投与して CD86 経路を遮断すると糖尿病発症が抑制されるが、10 週齢以降の NOD マウスに投与すると抗 CD86 抗体による糖尿病発症抑制効果はみられなくなると報告している<sup>72)</sup>。これらの 2 つの報告は、CD28/CD86 副刺激系の活性化が“膵島炎進展初期段階”における糖尿病原性リンパ球の分化・成熟において重要な役割を担っていることを示唆している<sup>39)</sup>。

Hoglund らは、“膵島炎進展初期段階”におけるナイーブ膵  $\beta$  細胞反応性 T 細胞が膵島ではなく膵局所リンパ節の APC によって活性化されることを見出し、その後、膵島局所へ同細胞が遊走し膵島周囲炎を形成していくことを報告した<sup>59)</sup>。実際に、膵局所リンパ節で IL-12(p40) および CD86 mRNA の発現レベルが IL-18 群において著しく増加した (第 10a 図および第 10b 図) を考

えれば、“膵島炎進展初期段階”における外因性 IL-18 投与が膵局所リンパ節における APC 機能に影響を与え、糖尿病原性リンパ球の分化・成熟に寄与した可能性が推測された。

以上より、膵島炎の進展初期の段階において IL-18 が Th1 タイプの免疫促進因子として膵島炎の進展に関与し、結果的に糖尿病の発症促進に寄与し得る可能性が示された。今後、IL-18 ノックアウトモデルの作成によって、1型糖尿病における IL-18 の役割に関するより詳細な検討が可能になると考えられる。そして、IL-18 の重要性をさらに明確化することによって、IL-18 をターゲットとした1型糖尿病の発症予防や治療法の開発が進むものと期待される。一方、これまでに NOD マウスへの IL-18 投与による糖尿病発症抑制効果が示され、将来的に IL-18 が1型糖尿病の発症予防に有用である可能性が報告されてきた<sup>49)</sup>。しかし、IL-18 の投与法や血清 IL-18 濃度、IL-18 の投与時期によって、逆に糖尿病の発症を促進させてしまう可能性があることを本研究は示しており、ヒトへの IL-18 投与の適用に関しては更なる慎重な検討が必要であることをここで強調しておきたい。

## 総括

1型糖尿病の多くは T helper 1 (Th1) タイプの自己免疫性疾患と考えられているが、膵島炎の出現やその進展における IL-18 の役割を検討する目的で、若齢 NOD マウス (1型糖尿病モデル動物) に IL-18 を全身性に投与し、膵島炎ならびに糖尿病の発症におよぼす影響を検討した<sup>73)</sup>。

1. IL-18 発現ベクター (pCAGGS-IL-18) を作成し、4週齢、6週齢と続けて NOD マウスの前脛骨筋に筋肉内注射した。さらに同部位に *in vivo* electroporation を施行して遺伝子発現の増強を図った。1回の pCAGGS-IL-18 筋肉内注射で2週間以上にわたって全身性に IL-18 が供給された。

2. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射群 (以下 IL-18 群と略す) では、22週齢以降における糖尿病累積発症率が有意に高値となった。しかし、28週齢以降は pCAGGS 筋肉内注射群 (以下コントロール群と略す) や未処置群における糖尿病発症も進み、IL-18 群との差はなくなった。

3. IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17週齢) において膵島炎が有意に進展していた。

4. 全身性サイトカインバランス、膵臓や膵局所リンパ節におけるサイトカインバランスはいずれも IL-18 群に

おいて Th1 優位であった。

5. IL-18 群では、膵局所における IP-10/CXCL10 (Th1 タイプのケモカイン) mRNA 発現レベルが増強しており、外因性 IL-18 が膵島における IP-10/CXCL10 発現を増加させる可能性が示唆された。

6. 膵島関連自己抗原の1つであるグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase: GAD) に対して反応性を示す IFN- $\gamma$  産生 CD4 細胞が IL-18 群の膵細胞において有意に増加していた。

7. IL-18 群では、膵局所リンパ節あるいは脾臓における IL-12(p40)および CD86 mRNA 発現レベルがいずれも増強しており、外因性 IL-18 が抗原提示細胞に影響を与える可能性が示唆された。

以上より、膵島炎の進展初期の段階において、IL-18 は Th1 タイプの免疫応答を介した膵島炎の進展促進に寄与し、結果的に糖尿病の発症を促進することが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導いただきました、慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗博士に深謝いたします。さらに、発現ベクターの開発、作成および遺伝子導入法に関して多大なる御指導、御協力を賜りました大阪大学大学院医学系研究科幹細胞制御分野宮崎純一教授、倭英司助教授、東京大学医科学研究所外科田原秀晃教授、大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座大崎匡博士、また動物管理に御協力を賜りました東京電力病院内科春日明博士に深謝いたします。最後に本研究に御助言、御協力いただきました埼玉社会保険病院内科丸山太郎博士、ならびに慶應義塾大学医学部内科腎臓内分泌代謝科内分泌代謝研究室の諸先生方に感謝いたします。本研究の一部は第45回日本糖尿病学会年次学術集会 (2002年、東京) および第32回日本免疫学会総会・学術集会 (2002年、東京) にて発表した。

本論文は Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, Miyazaki T, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Saruta T: Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol* 171: 5865-5875, 2003 の一部を含む。

## 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) 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. The Diabetes Epidemiology Research International Study Group. Diabetes Care 19 : 758-760, 1996
- 3) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y : Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Jikken Dobutsu 29 : 1-13, 1980
- 4) Hattori M, Buse JB, Jackson RA, Glimcher L, Dorf ME, Minami M, Makino S, Moriwaki K, Kuzuya H, Imura H, Strauss WM, Seidman JG, Eisenbarth GS : The NOD mouse : recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. Science 231 : 733-735, 1986
- 5) Acha-Orbea H, McDevitt HO : The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. Proc Natl Acad Sci U S A 84 : 2435-2439, 1987
- 6) Maruyama T, Shimada A, Kasuga A, Kasatani T, Ozawa Y, Ishii M, Takei I, Suzuki Y, Kobayashi A, Takeda S, Matsubara K, Saruta T : Analysis of MHC class II antigens in Japanese IDDM by a novel HLA-typing method, hybridization protection assay. Diabetes Res Clin Pract 23 : 77-84, 1994
- 7) Melanitou E, Fain P, Eisenbarth GS : Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. J Autoimmun 21 : 93-98, 2003
- 8) Eisenbarth GS : Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med 314 : 1360-1368, 1986
- 9) Bach JF : Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev 15 : 516-542, 1994
- 10) Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA : Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. Diabetes 43 : 667-675, 1994
- 11) Kay TW, Campbell IL, Harrison LC : Characterization of pancreatic T lymphocytes associated with beta cell destruction in the non-obese diabetic (NOD) mouse. J Autoimmun 4 : 263-276, 1991
- 12) Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE : CD4+ and CD8+ T lymphocytes : clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. Res Immunol 148 : 320-327, 1997
- 13) Wong FS, Janeway CA, Jr. : The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM. J Autoimmun 13 : 290-295, 1999
- 14) Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE : NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. Immunol Today 14 : 193-196, 1993
- 15) Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R : Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. Diabetes 39 : 933-937, 1990
- 16) Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL : Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. Proc Natl Acad Sci U S A 88 : 10252-10256, 1991
- 17) Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR : Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A 87 : 1576-1580, 1990
- 18) Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker MD, Cohen IR : Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A 88 : 3088-3091, 1991
- 19) Elias D, Cohen IR : Peptide therapy for diabetes in NOD mice. Lancet 343 : 704-706, 1994
- 20) Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV : Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. Nature 366 : 69-72, 1993
- 21) Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO : Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. Nature 366 : 72-75, 1993
- 22) Bergerot I, Arreaza GA, Cameron MJ, Burdick MD, Strieter RM, Chensue SW, Chakrabarti S, Delovitch TL : Insulin B-chain reactive CD4+ regulatory T-cells induced by oral insulin treatment protect from type 1 diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector T-cells. Diabetes 48 : 1720-1729, 1999
- 23) Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N : Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. J Clin Invest 95 : 628-634, 1995
- 24) Urbanek-Ruiz I, Ruiz PJ, Paragas V, Garren H, Steinman L, Fathman CG : Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. Clin Immunol 100 : 164-171, 2001
- 25) Daniel D, Wegmann DR : Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 956-960, 1996
- 26) Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL : Modulating autoimmune responses to



- GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 2 : 1348-1353, 1996
- 27) Sai P, Rivereau AS, Granier C, Haertle T, Martignat L : Immunization of non-obese diabetic (NOD) mice with glutamic acid decarboxylase-derived peptide 524-543 reduces cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Clin Exp Immunol* 105 : 330-337, 1996
- 28) Elliott JF, Qin HY, Bhatti S, Smith DK, Singh RK, Dillon T, Lauzon J, Singh B : Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 43 : 1494-1499, 1994
- 29) Pleau JM, Fernandez-Saravia F, Esling A, Homodelarche F, Dardenne M : Prevention of autoimmune diabetes in nonobese diabetic female mice by treatment with recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD 65). *Clin Immunol Immunopathol* 76 : 90-95, 1995
- 30) Shimada A, Rohane P, Fathman CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45RB(low) CD4+ cells correlate with cytokine profiles in the spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 31) Shimada A, Charlton B, Rohane P, Taylor-Edwards C, Fathman CG : Immune regulation in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9 : 263-269, 1996
- 32) Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman CG : Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
- 33) Salomon B, Bluestone JA : Complexities of CD28/B7 : CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19 : 225-252, 2001
- 34) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M : Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378 : 88-91, 1995
- 35) Hunter CA, Timans J, Pisacane P, Menon S, Cai G, Walker W, Aste-Amezaga M, Chizzonite R, Bazan JF, Kastelein RA : Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur J Immunol* 27 : 2787-2792, 1997
- 36) Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K : Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 10 : 259-264, 1998
- 37) Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M : Overview of interleukin-18 : more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 63 : 658-664, 1998
- 38) Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M : Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18 : A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187 : 2103-2108, 1998
- 39) Hoshino T, Wiltrott RH, Young HA : IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells : a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 162 : 5070-5077, 1999
- 40) Hoshino T, Yagita H, Ortaldo JR, Wiltrott RH, Young HA : In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 30 : 1998-2006, 2000
- 41) Wild JS, Sigounas A, Sur N, Siddiqui MS, Alam R, Kurimoto M, Sur S : IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol* 164 : 2701-2710, 2000
- 42) Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K : IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 13962-13966, 1999
- 43) Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K : IL-18 induction of IgE : dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 1 : 132-137, 2000
- 44) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H : Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12 : 53-72, 2001
- 45) Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H : Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 99 : 469-474, 1997
- 46) Rothe H, Hibino T, Itoh Y, Kolb H, Martin S : Systemic production of interferon-gamma inducing factor (IGIF) versus local IFN-gamma expression involved in the development of Th1 insulinitis in NOD mice. *J Autoimmun* 10 : 251-256, 1997
- 47) Tokui M, Shimada A, Funae O, Nomaguchi H, Okamura H, Takei I, Saruta T : Recombinant IL-18 administration suppresses cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mice. *Diabetes* 47(Suppl.1) : A222, 1998
- 48) Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, Mathieu C, Kolb H : IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol* 163 : 1230-1236, 1999
- 49) Aihara H, Miyazaki J : Gene transfer into muscle by

- electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16 : 867-870, 1998
- 50) Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H : Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 6 : 808-815, 1999
- 51) Funae O, Shimada A, Tokui M, Takei I, Saruta T : Balance of GAD65-specific IL-10 production and polyclonal Th1-type response in type 1 diabetes. *Autoimmunity* 34 : 45-52, 2001
- 52) Casteels K, Waer M, Laureys J, Valckx D, Depovere J, Bouillon R, Mathieu C : Prevention of autoimmune destruction of syngeneic islet grafts in spontaneously diabetic nonobese diabetic mice by a combination of a vitamin D3 analog and cyclosporine. *Transplantation* 65 : 1225-1232, 1998
- 53) 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
- 54) Yano S, Hotta Y, Takahashi S : Determination of endotoxin in injectable antibiotic preparations by the chromogenic assay method using a Limulus reagent (*Tachypleus* hemocyte lysate) and a chromogenic substrate. *J Clin Microbiol* 23 : 11-16, 1986
- 55) Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B : Chemokine receptor specific for IP10 and mig : structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 184 : 963-969, 1996
- 56) Tamaru M, Tominaga Y, Yatsunami K, Narumi S : Cloning of the murine interferon-inducible protein 10 (IP-10) receptor and its specific expression in lymphoid organs. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 41-48, 1998
- 57) Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA : Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162 : 4928-4937, 1999
- 58) Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, Narumi S, Sakamoto M, Nakamura H, Morita A, Kashima K : Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 123 : 271-279, 2001
- 59) Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D : Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med* 189 : 331-339, 1999
- 60) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL : Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247 : 1465-1468, 1990
- 61) Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG : Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 4 : 733-740, 1993
- 62) Schofield JP, Caskey CT : Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull* 51 : 56-71, 1995
- 63) Davis HL, Michel ML, Whalen RG : Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann N Y Acad Sci* 772 : 21-29, 1995
- 64) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA : Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 : 1745-1749, 1993
- 65) Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K : Cutting edge : IL-18-transgenic mice : *in vivo* evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J Immunol* 166 : 7014-7018, 2001
- 66) 森本二郎, 米山博之, 島田朗, 山田悟, 及川洋一, 松島綱治, 猿田享男, 成見正作 : NOD マウスにおける抗 CXCL10 抗体の糖尿病発症抑制効果の検討. 日本免疫学会総会・学術集会記録, 33 : 283, 2003
- 67) Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB, Beller DI : Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains : elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49 : 1106-1115, 2000
- 68) Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon JW : The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 189 : 347-358, 1999
- 69) Piganelli JD, Martin T, Haskins K : Splenic macrophages from the NOD mouse are defective in the ability to present antigen. *Diabetes* 47 : 1212-1218, 1998
- 70) Serreze DV, Gaskins HR, Leiter EH : Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J Immunol* 150 : 2534-2543, 1993
- 71) Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, Arcella J, Girvin AM, Padilla J, Miller SD, Bluestone JA : Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med* 194 : 677-684, 2001
- 72) Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone JA : Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody

treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. J Exp Med 181 : 1145-1155, 1995

73) Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, Miyazaki T, Tashiro F, Yamato E,

Miyazaki J, Saruta T : Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. J Immunol 171 : 5865-5875, 2003

---