

Title	1型糖尿病発症における抗酸化薬の効果：1型糖尿病モデル動物におけるN-acetyl-cysteineの影響
Sub Title	
Author	入江, 潤一郎(Irie, Junichiro) 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.2 (2005. 6) ,p.T127- T138
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=AN00069296-20050601-0127

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 型糖尿病発症における抗酸化薬の効果

— 1 型糖尿病モデル動物における N-acetyl-cysteine の影響 —

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田亨男教授)

いり え じゅんいちろう
入 江 潤 一 郎

(平成 16 年 11 月 19 日受付)

Key Words : type 1 diabetes mellitus, antioxidant, 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る。最終的にインスリンの絶対的欠乏に陥ることが多く、インスリン依存状態にある典型例では、インスリン欠乏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代謝失調に至り致命的となる¹⁾。1 型糖尿病は、自己免疫による T リンパ球を介した膵 β 細胞の破壊が原因の多くとされ、生後 6 ヶ月頃から発症を認めるようになり、12 歳から 14 歳に発症率のピークをむかえる²⁾。絶対的なインスリン欠乏のため血糖管理が困難で、それに伴い合併症の出現頻度が高くなり、糖尿病発症後 30 年で約 20% の患者が末期腎不全に至ると報告されている³⁾。様々なインスリン製剤の開発により適切な血糖管理が可能となっており、糖尿病性腎症や急性合併症による 1 型糖尿病患者の死亡は減少してきているが、それでも今なお生命予後は悪い⁴⁾。日常生活でのインスリン注射が生活の質 (Quality of life) を低下させ、また精神的苦痛を生じることも多い。若年で発症し罹病期間が長くなり、合併症を併発し社会的不都合を生じることも多く、1 型糖尿病の発症機転の解明およびそれに基づく発症予防や治療の開発は、きわめて重要な課題であると考えられる。

1 型糖尿病の発症に関わる膵 β 細胞の傷害には、酸化ストレスが関与していると考えられている。自己免疫 1 型糖尿病の優れた動物モデルである NOD マウスにおいて、膵 β 細胞傷害に酸化ストレスが重要な役割を担っていることが明らかにされ⁵⁾、各種の抗酸化薬が NOD マウスの膵 β 細胞傷害を抑制することが報告されている⁶⁻⁹⁾。現在ヒトにおいて、抗酸化薬を利用した 1 型糖尿病の予防が臨床試験されている¹⁰⁾。

抗酸化薬の一つ、システイン誘導体の N-acetyl-cysteine (以下 NAC と略す) は広く使用されているチオール含有薬であり¹¹⁾、慢性腎不全の患者に造影剤を用いた検査を行う場合に、同時に NAC を経口投与させることで造影剤による腎障害を軽減することや¹²⁾、血液透析を受けている患者に NAC を経口投与することで、その後の心筋梗塞などの心血管事故が減ることなど、臨床上有益な報告が多い¹³⁾。自己免疫糖尿病に関しては、NAC を若週令の NOD マウスに投与すると糖尿病発症が抑制されるとの報告があるが¹⁴⁾、NAC は免疫担当細胞にも影響し、T 細胞の増殖、IL-2 産生を促進すること¹⁵⁾、リンパ球の活性酸素産生を促進することが報告されており¹⁶⁾、NAC の投与が逆に自己免疫疾患を増悪させる可能性も考えられる。特に NOD マウスにおいては、若週令と糖尿病発症直前ではリンパ球の応答性が異なることが報告されており¹⁷⁾、投与する時期によっては NAC が細胞傷害性のリンパ球を増殖させ、膵 β 細胞破壊を助長させる可能性がある。NOD マウスでは、4 週令頃から 10 週令頃まで膵ランゲルハンス島周囲にリンパ球浸潤を認めるが、膵島の破壊には至らない時期があり (良性膵島炎期)、その後 18 週令頃から急激に膵島が破壊され (破壊性膵島炎期)、最終的に糖尿病にいたる。T ヘルパーリンパ球の応答が良性膵島炎期と破壊性膵島炎期で異なることが知られており¹⁷⁾、破壊性膵島炎期にある NOD マウスへの NAC の投与は糖尿病発症を促進すると予想される。

破壊性膵島炎期にある NOD マウスに対する NAC の投与の影響を明らかにするためには、確実に糖尿病を発症する均一な免疫学的背景を有するマウスを用いるのが

望ましい。NOD マウスは12週令頃から30週令頃までの間に雌性で70-80%、雄性で20-30%程度の個体が糖尿病を発症するが、どの個体が実際に糖尿病を発症するかを予知することは不可能である。そこで本研究では細胞移入の系を利用することとした¹⁸⁻²⁰。すなわち、既に糖尿病を発症しているNOD マウスよりリンパ球を得て、遺伝的背景はNOD マウスと同様でありながらリンパ球を欠くNOD-*scid/scid* (severe combined immuno deficiency, 以下NOD-*scid* と略す) マウスをレシピエントとして細胞移入を行い、糖尿病を移入させる系を用いた。本実験系ではNOD-*scid* レシピエントにドナーのNOD マウスの免疫学的状態を再現できることが知られており²¹、破壊性膵島炎期にあるNOD マウスと同じ免疫学的状態をレシピエントに再構築し、そのレシピエントにNACを投与し、糖尿病発症への影響を検討することで、破壊性膵島炎期にあるNOD マウスに対するNACの影響を明らかにすることとした²²。

対象と方法

1. 動物

5-10週令の雌性NOD マウス、NOD-*scid* マウスを日本クレア(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にて特定病原体非感染(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、本実験は本学医学部動物実験委員会の承認を得た(承認番号034002)。糖尿病の発症の診断には、隔日にテストテープ(Eli Lilly社, 米国)を用いて尿糖を検査し、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た。血糖値が250 mg/dl以上の時に糖尿病の発症と判定した。

2. 脾細胞の調整と細胞移入および腹腔浸出細胞の採取

各マウスより脾臓を無菌的に摘出し、ナイロン・メッシュ(Becton Dickinson社, 米国)にて細胞分散し、エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム(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の蒸留水に溶解して作成した液を用いて赤血球を溶血させ、その後リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline; 以下PBSと略す)で3回洗浄した。細胞移入には、糖尿病発症後の雌性NOD マウス(16-32週令, 血糖値250 mg/dl以上)の脾細胞を調整し、 2×10^6 個ずつ雌性NOD-*scid* マウスの腹腔内へ注射し移入した。

腹腔浸出細胞の採取は屠殺直後に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回収し、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 (以下PECと略す))とした。

3. N-acetyl-cysteineの投与

N-acetyl-cysteine (Sigma社, 米国)を蒸留水に溶解し1 mg/mlの濃度として給水瓶へ入れ、NAC投与群のNOD-*scid* マウスに経口投与した。コントロール群へは蒸留水を単独に与えた。

4. 組織学的検討

脾細胞移入後14日経過したNOD-*scid* マウスより膵臓を採取し、10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。150 μ mの間隔をあけた非連続切片にてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、個々の膵島炎の程度(膵島への炎症細胞浸潤)を以下のようにスコア化した。1膵臓あたり40個以上の膵島を観察して、平均スコアにより膵島炎の程度を評価した。

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。

5. 免疫組織学的検討

脾細胞移入後14日経過したNOD-*scid* マウスより膵臓を採取し、OCTコンパウンド(サクラファインテック, 東京)に包埋し液体窒素で凍結した。10 μ mの厚みで薄切してスライドガラスに添付し、冷アセトンで10分間固定した。PBSで2回洗浄後、1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; 以下BSAと略す)(Sigma社, 米国)-PBS溶液で1時間処理し、fluorescein isothiocyanate (以下FITCと略す)標識抗マウスCD8抗体, phycoerythrin (以下PE)標識抗マウスCD4抗体(Pharmingen社, 米国)を1% BSA-PBS溶液で溶解し標本に添加した。1時間染色しPBSで洗浄した後、封入薬を乗せカバーガラスを乗せ、蛍光顕微鏡で観察した(オリンパス, 東京)。

6. 細胞の純化と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

CD4陽性またはCD8陽性の脾細胞を純化するために、磁気細胞分離システムMiniMACS system (Miltenyi Biotech社, ドイツ)を用いた。脾細胞浮遊液に磁性マ

イクロビーズの付着した抗CD4抗体または抗CD8抗体を加え、15分間静置し0.5%BSA-PBSで洗浄した後、磁気カラム (Miltenyi Biotech社, ドイツ) でCD4陽性またはCD8陽性細胞を分離した。この細胞浮遊液をペニシリン/ストレプトマイシン添加した2%仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum; 以下FCSと略す) (JRHBioscience社, 米国) を含むRPMI1640 (GibcoBRL社, 米国) (以下2%FCS-RPMI1640と略す) に浮遊させた。0.5×10⁶個/250 μlに調整し、96穴マイクロプレート (Corning社, 米国) の各ウェルに加えた。CD4陽性またはCD8陽性脾細胞の刺激には、抗CD3抗体 (clone 145-2C11) (Pharmingen社, 米国) でコートしたマイクロプレートに、抗CD28抗体 (clone 37.51) (Pharmingen社, 米国) の最終濃度が1 μg/mlになるように添加し刺激をした。未純化脾細胞の刺激には抗CD3抗体 (Pharmingen社, 米国) が最終濃度5 μg/mlになるように添加した。コントロールのウェルには培養液のみを加えた。5%CO₂・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. フローサイトメーターによるリンパ球上発現マーカーおよび腹腔浸出細胞内グルタチオンレベルの検討

脾細胞浮遊液を5 mlポリスチレンチューブ (Becton Dickinson社, 米国) に移し、サンプルを0.1%BSA-PBSで2回洗浄し、FITC標識抗マウスT細胞受容体抗体 (clone H57-597) およびPE標識抗マウスCD4抗体 (clone GK1.5) またはCD8抗体 (clone 53-6.7) を加え冷所で20分間静置した。続いてサンプルを0.1%BSA-PBSで洗浄してフローサイトメーター (EPICS XL, Coulter社, 米国) でリンパ球ゲート内の陽性細胞数を分析した。

腹腔内を洗浄し回収した腹腔浸出細胞は、PBSで希釈したmonochlorobimane (以下MBClと略す) (Clontech, アメリカ) と混じて最終濃度40 μmol/lとし、室温下で5分間静置した。その後直ちにフローサイトメーター (EPICS ALTRA, Coulter社, 米国) を用いて、20 mWの紫外線を照射下でのグルタチオン-MBClによる蛍光を測定した。

8. ELISA法によるサイトカインの測定

上清中のサイトカインの計測にはenzyme-linked immunosorbent assay (以下ELISAと略す) 法を用いた。すなわち、平底の96穴プレートに各種抗マウスサイトカイン抗体 (抗インターフェロン (interferon;

以下IFNと略す)-γ (clone R4-6A2), 抗インターロイキン (interleukin; 以下ILと略す)-2 (JES6-1A12), 抗IL-4 (BVD4-1D11) 抗体, Pharmingen社, 米国) をPBSに溶解し、4°Cで一夜静置してコーティングし、翌日、採取された上清もしくは各サイトカインの標準溶液 (組換えマウスIFN-γ, IL-4, IL-2, Pharmingen社, 米国) を加えて2時間室温で静置した。0.1%Tween 20 (BioRad社, 米国) を加えたPBS (以下0.1% Tween20-PBSと略す) で洗浄した後、ビオチン化した各種抗マウスサイトカイン抗体 (抗IFN-γ (XMG1.2), 抗IL-2 (JES6-5H4), 抗IL-4 (BVD6-24G) 抗体, Pharmingen社, 米国) 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、アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ (Vector Laboratories社, 米国) を加え30分間静置した。最後に発色試薬3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (Sigma社, 米国) および0.5Mの硫酸水溶液を加え、ELISAリーダー (BioRad社, 米国) にて吸光度 (A₄₅₀) を測定して各サイトカインを検出した。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。

9. 膵局所における各種サイトカインの半定量的リアルタイムPCR分析

マウスの膵臓からのRNAの抽出はAcid Guanidinium-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ェナイズし、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。DNaseI (キアゲン, 東京) を用いてゲノムDNAの分解処理を行った。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, 大津) にてPolymerase Chain Reaction (PCR) を行った。IFN-γ, IL-4, IL-1β, IL-2, Tumor necrosis factor-α (以下TNF-αと略す), FASおよびglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下GAPDHと略す) (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

第1表 半定量的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- γ	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-1 β	5'-CAACCAACAAGT GATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCT CCAGCTGCA-3'	5'-CTGTGTAATGAAAG ACGGCACACCCACC-3'
IL-2	5'-CCTGAGCAGGAT GGAGAATTACA-3'	5'-TCCAGAACATGC CGCAGAG-3'	5'-CCCAAGCAGGCCA CAGAATTGAAAG-3'
TNF- α	5'-TCCAGGCGGTGC CTATGT-3'	5'-GAGCGTGGTGG CCCCT-3'	5'-TCAGCCTCTTCTCA TTCCTGCTTGTGG-3'
FAS	5'-GGAGGGCAAGAT AGATGAGATCA-3'	5'-ATGCATCACTCT TCCCATGAGA-3'	5'-AGTCCAGCTGCTCC TGTGCTGGTA-3'
GAPDH	5'-ACTGGCATGGCC TTCCG-3'	5'-CAGGCGGCACG TCAGATC-3'	5'-TTCCTACCCCCAA TGTGTCCGTCGT-3'

タイム PCR 法にて半定量的に測定した²³⁾。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、米国)を用いて行った。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GAPDH産物に対する相対的な量として算出した。

10. 統計処理

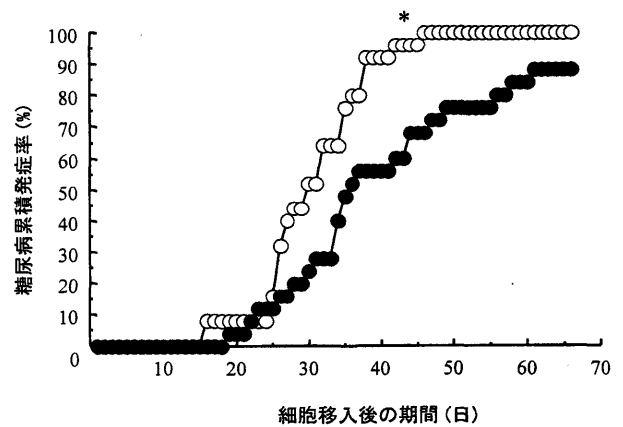
結果はすべて平均値±標準誤差で表示した。糖尿病累積発症率の比較にはlog-rank検定を行った。膵島炎スコア、サイトカイン産生量、mRNA発現レベルの比較は、Mann-Whitney U検定で解析した。CD8陽性膵島の割合の比較ではFisher検定を用いた。p値<0.05を

統計学的に有意差があると判定した。

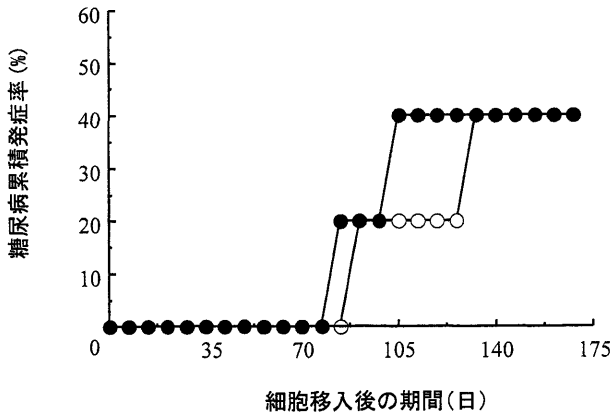
結 果

1. NACの投与が糖尿病発症に与える影響

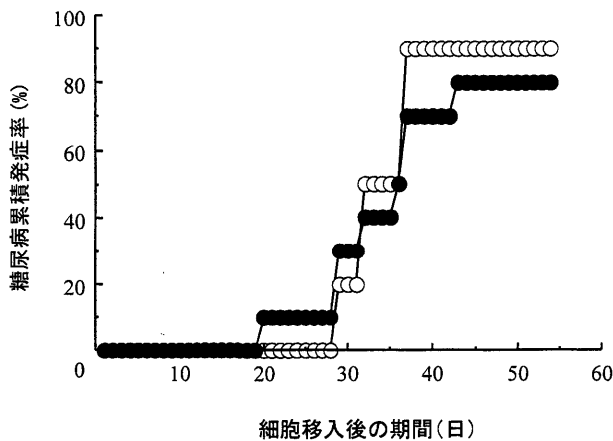
NACの投与がNODマウスの糖尿病発症に与える影響を評価するため、糖尿病発症後のNODマウスの脾細胞をNOD-scidレシピエントに移入し、レシピエントに



第1図：糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントにおける累積糖尿病発症率
糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントのうちNAC投与群(n=25, 白丸)にはNACを経口投与した。一方対照群(n=25, 黒丸)には蒸留水を与えた。(*p<0.002, log-rank検定) (Irie J et al: Diabetologia 47: 1803-1809, 2004のFig. 1を許可を得て転載)



第2図：8週令糖尿病未発症NODマウスの脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントにおける累積糖尿病発症率
糖尿病未発症NODマウス（8週令）の脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントのうちNAC投与群（n=5, 白丸）にはNACを経口投与した。対照群（n=5, 黒丸）には蒸留水を与えた。



第3図：細胞移入前にNACを投与され、その後脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントにおける累積糖尿病発症率

NOD-scidレシピエントに細胞移入4週前から細胞移入直前までNACを投与し（NAC投与群；n=10, 白丸），その後糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入した。対照群（n=10, 黒丸）には同時期に蒸留水を与えた。（Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 2 を許可を得て転載）

NACまたは蒸留水を与えた。NAC投与群にはNACを細胞移入直後より飲水に溶解して投与し、対照群には蒸留水を与えた。NAC投与群のNOD-scidレシピエントの糖尿病発症は対照群に比し有意に促進された（各群n=25；p<0.002：log-rank検定，第1図）。一方，ドナーとして8週令の糖尿病未発症NODマウスを用いた場合は，NACによる糖尿病移入の促進は認められなかった（第2図）。

2. NACの投与がNOD-scidレシピエントの膵β細胞に与える影響

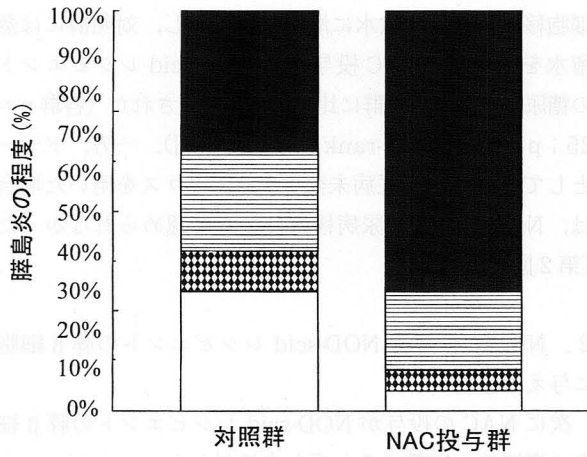
次にNACの投与がNOD-scidレシピエントの膵β細胞に直接的に影響するか否かを検討した。レシピエントに細胞移入を行う4週前から直前まで，NAC投与群にはNACを投与し，その後糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入し，NACの投与を中止した。対照群には本期間蒸留水を与えた。細胞移入前のNACの投与では，NACによる糖尿病移入の促進や抑制は認められなかった（第3図）。

3. NAC投与がリンパ球による膵β細胞破壊に与える影響

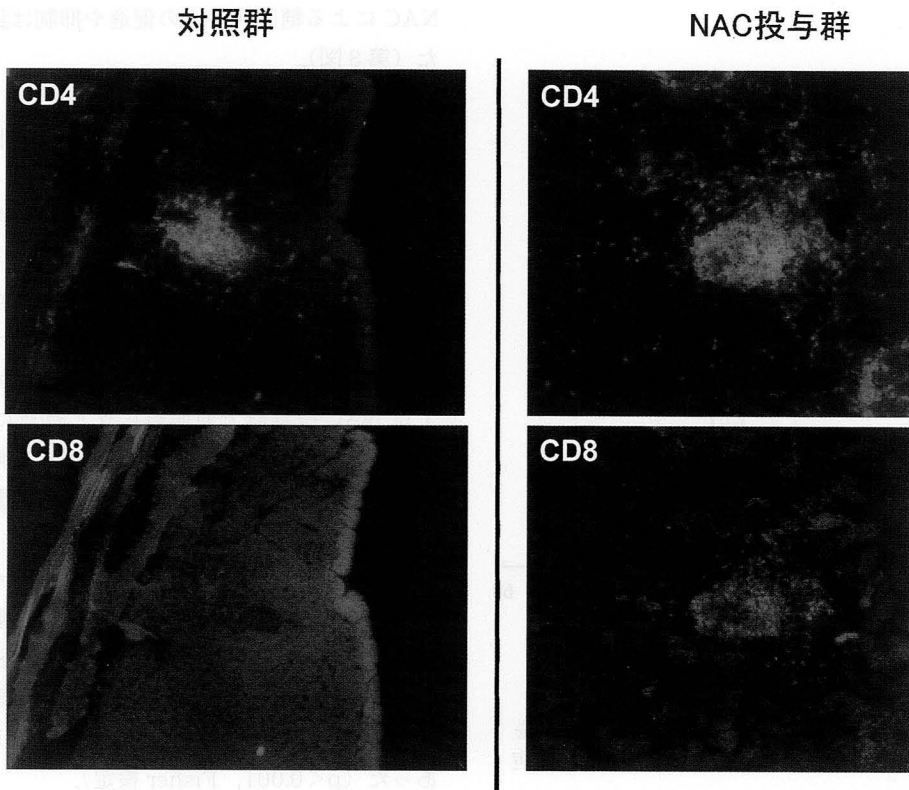
NAC投与による糖尿病移入促進の機序を明らかにするため，脾細胞を移入しその後NACを与えたNAC投与群，および対照群のNOD-scidレシピエントの膵臓を，細胞移入後14日目に検討した。両群のランゲルハンス島にはともにリンパ球浸潤が認められたが，膵島炎スコアはNAC投与群で対照群に比し有意に高値であった（膵島炎平均値：NAC投与群2.56；対照群1.69，p=0.025，Mann-Whitney U検定，第4図）。免疫組織学的な検討では，NAC投与群の浸潤リンパ球はCD8陽性細胞が多く（第5図），CD8陽性細胞が各ランゲルハンス島の50%以上を占めるものをCD8陽性膵島と定義すると，NAC投与群では60.1%がCD8陽性膵島であるが，対照群では4.8%がCD8陽性膵島であり，CD8陽性膵島の割合はNAC群で対照群に比し有意に高値であった（p<0.001，Fisher検定）。

4. NACの投与が膵β細胞におけるサイトカイン産生に与える影響

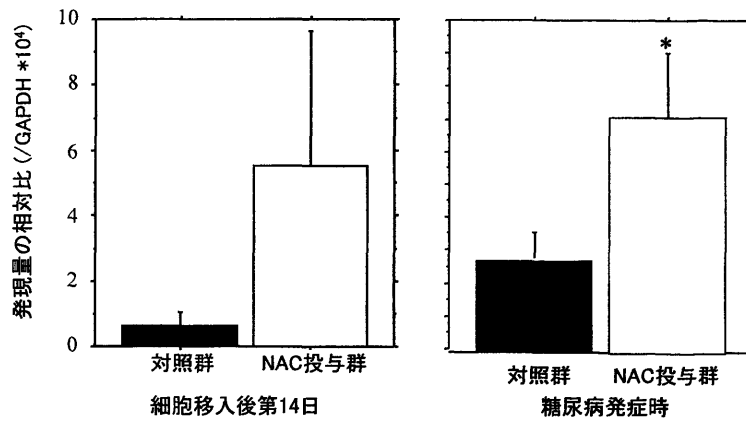
NAC投与による膵β細胞破壊促進の機序を明らかにするため，NAC投与群および対照群のNOD-scidレシピエントの膵臓のサイトカインメッセンジャーRNA量を，細胞移入後14日目およびレシピエントの糖尿病発症時に検討した。IFN-γの産生量は，細胞移入後14日



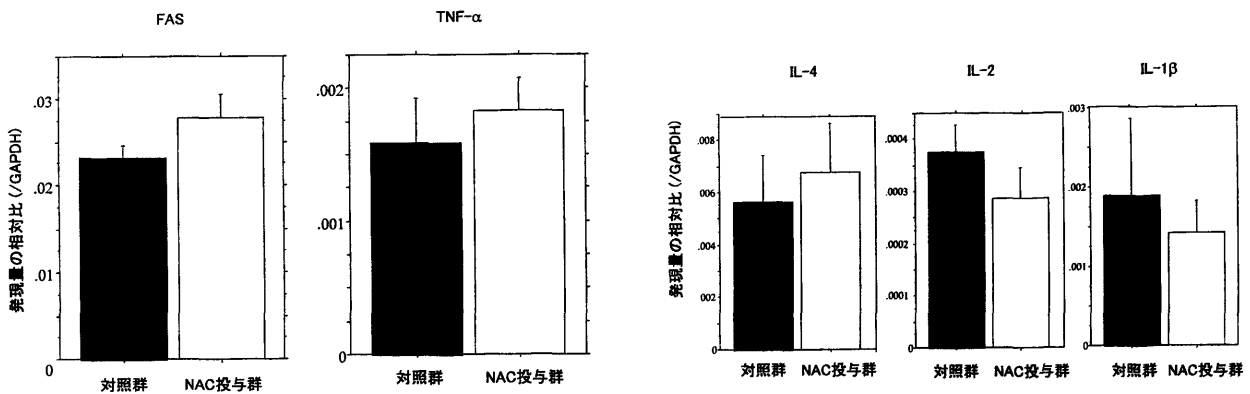
第4図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NOD-scld レシピエントにおける膵島炎スコア
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞を移入後の NOD-scld レシピエントのうち NAC 投与群には NAC を経口投与し、対照群には蒸留水を与えた。移入後 14 日目に膵臓を摘出しヘマトキシリン-エオジン染色し、膵島へのリンパ球浸潤の程度を膵島炎スコアで評価した。グレード 0 (白), グレード 1 (ダイヤモンド), グレード 2 (実線), グレード 3 (黒)。(p=0.025, Mann-Whitney U 検定) (Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 3 を許可を得て転載)



第5図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NOD-scld レシピエントの膵島における免疫組織染色像
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NAC 投与群および対照群の膵臓を CD4 陽性細胞 (赤色), もしくは CD8 陽性細胞 (緑色) にて染色した。各群とも連続切片における染色像を示す。(Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 4 を許可を得て転載)



第6図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目および糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における IFN- γ mRNA 発現量
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目および糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における IFN- γ mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す (* $p=0.004$, Mann-Whitney U 検定). (Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 5 を許可を得て転載)



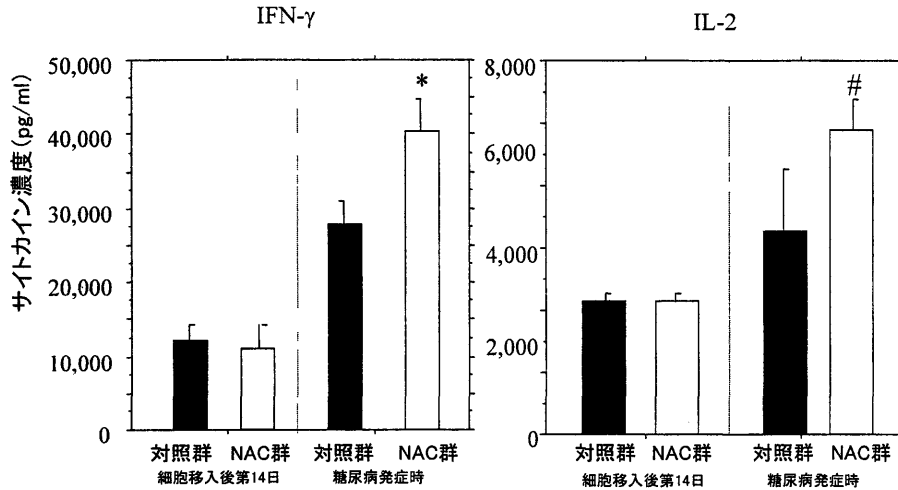
第7図：糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における FAS および TNF- α mRNA 発現量
 糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における FAS および TNF- α mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す。

第8図：糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における IL-4, IL-2 および IL-1 β mRNA 発現量
 糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの膵臓における IL-4, IL-2 および IL-1 β mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す。

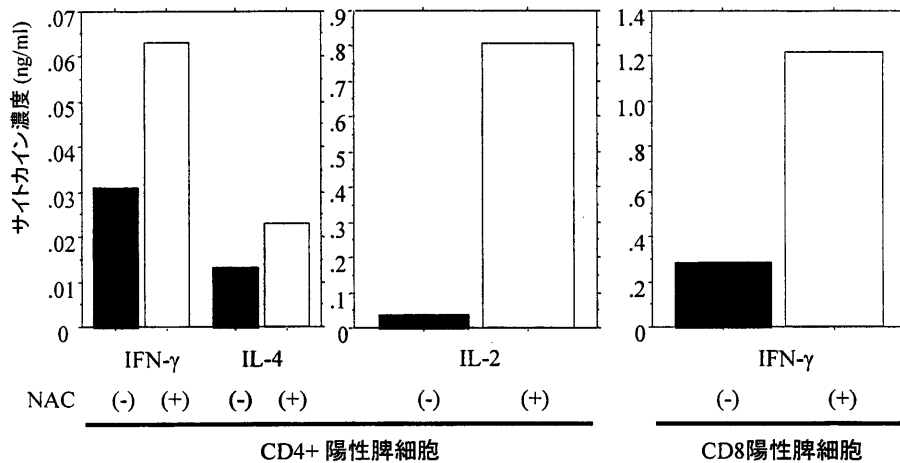
目で NAC 投与群では対照群に比し高い傾向を認め、糖尿病発症時には NAC 投与群で対照群に比し有意に高値であった (NAC 投与群 $7.7 \pm 1.4 \times 10^{-4}$; 対照群 $3.4 \pm 0.7 \times 10^{-4}$ 対 GAPDH 比, $p=0.004$, Mann-Whitney U 検定, 第6図)。FAS および TNF- α は NAC 投与群において高い傾向を認めたが (第7図), IL-4, IL-2, IL-1 β では差を認めなかった (第8図)。

5. NAC の投与が NOD-scid レシピエントでのリンパ球の構築, サイトカイン産生に与える影響

NOD-scid レシピエントでの移入されたリンパ球の構築, サイトカイン産生に対する NAC 投与の影響を評価するため, NAC 投与群および対照群の NOD-scid レシピエントの膵臓を, 細胞移入後 14 日目ならびにレシピエントの糖尿病発症時に検討した。細胞移入後 14 日目では CD4 陽性 T 細胞受容体陽性細胞数, CD8 陽性 T



第9図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目および糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾細胞の IFN- γ 、IL-2 産生量
 レシピエントの脾細胞を抗 CD3 抗体で刺激し上清中のサイトカイン量を ELISA 法にて定量した (*p=0.033, #p=0.015, Mann-Whitney U 検定). (Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 6 を許可を得て転載)



第10図：糖尿病発症 NOD マウスの CD4 陽性および CD8 陽性脾細胞に対する NAC の影響
 糖尿病発症 NOD マウスの脾 CD4 および CD8 陽性細胞 0.5×10^6 個を抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体とともに 72 時間培養した。一部のウェルには NAC を最終濃度 1 mmol/l で添加した (NAC (+))。対照のウェルにはメディウムのみを添加した (NAC (-))。IFN- γ 、IL-4、IL-2 の濃度を ELISA 法にて測定した。3つの独立した実験の代表例を示す。(Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 7 を許可を得て転載)

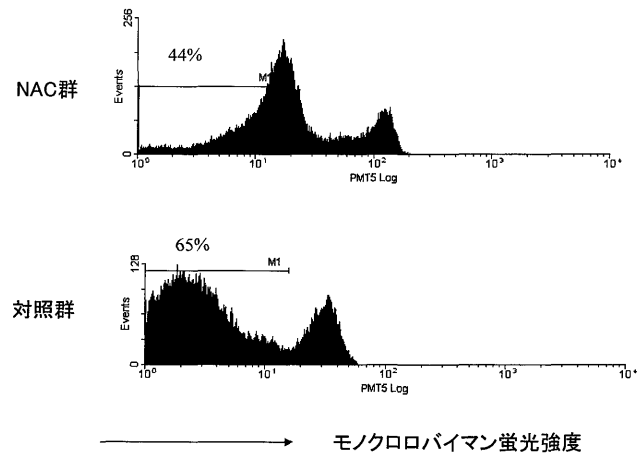
細胞受容体陽性細胞数に両群間で有意な差を認めなかった（NAC投与群；CD4： 1.16×10^6 ，CD8： 0.23×10^6 個，対照群；CD4： 1.18×10^6 ，CD8： 0.31×10^6 個）。また抗CD3抗体を用いたリンパ球刺激によるサイトカイン産生量の比較でも，両群間に有意な差を認めなかった（第9図）。しかし糖尿病発症時には抗CD3抗体刺激によるIFN- γ 産生量はNAC投与群で対照群に比し有意に増加していた（NAC投与群； 40817 ± 5822 pg/ml，対照群； 27213 ± 3447 pg/ml， $p=0.033$ ，Mann-Whitney U検定，第9図）。また抗CD3抗体刺激によるIL-2産生量もNAC投与群で対照群に比し有意に増加していた（NAC投与群； 6459 ± 821 pg/ml，対照群； 4214 ± 1328 pg/ml， $p=0.015$ ，Mann-Whitney U検定，第9図）。IL-4産生量には両群間で有意な差を認めなかった（NAC投与群； 322 ± 50 pg/ml，対照群； 350 ± 77 pg/ml）。

6. NACが*in vitro*でのリンパ球のサイトカイン産生に与える影響

NACの*in vitro*でのリンパ球のサイトカイン産生に与える影響を評価するため，CD4陽性またはCD8陽性リンパ球を，糖尿病を発症したNODマウスの脾臓より得て，抗CD3抗体と抗CD28抗体にて刺激し同時にNACを最終濃度1 mmol/lで添加した。IFN- γ ，IL-2産生量はNACの添加にて増加したがIL-4産生量は両群間で同程度であった（IFN- γ ；対照0.31 ng/ml，NAC添加0.62 ng/ml，IL-2；対照0.04 ng/ml，NAC添加0.81 ng/ml，IL-4；対照0.13 ng/ml，NAC添加0.23 ng/ml，第10図）。CD8陽性細胞によるIFN- γ 産生量も同様にNACの添加で増加した（対照0.29 ng/ml，NAC添加1.21 ng/ml，第10図）。

7. NACの投与が腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量に与える影響

免疫担当細胞の細胞内グルタチオン量に対するNAC投与の影響を検討するため，細胞移入後14日目に腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量を検討した。NAC投与群では対照群に比し細胞内グルタチオン含有量が多い細胞が増加していた（第11図）。



第11図：細胞移入後14日目のNOD-scidレシピエントの腹腔浸出細胞のグルタチオン含有量の比較
腹腔より無菌的に洗浄回収した腹腔浸出細胞をモノクロロバイマンで染色し，細胞内グルタチオン濃度を蛍光強度で評価した。

考 察

NACは古くから臨床で去痰薬として広く使用されているチオール含有抗酸化薬であり，またアセトアミノフェン中毒に対する治療薬としても推奨されている¹¹⁾。NACの詳細な代謝経路は明らかとなっていないが，*in vitro*では細胞内に取り込まれ分解され，システインを細胞に供給することで，グルタチオン合成を促進すると考えられており，また*in vivo*では経口投与された後は小腸より吸収され，システインとなることが知られている¹¹⁾。慢性腎不全の患者の造影剤による腎障害の軽減や¹²⁾，透析患者の心血管事故の予防など有益な報告が多く¹³⁾，抗酸化作用によるものと考えられている。

糖尿病治療に関して，2型糖尿病モデルマウスにおいてNACの経口投与によるインスリン分泌機能の保護効果が報告されており，糖尿病状態での酸化ストレスによる膵 β 細胞のアポトーシスをNACが防ぐという機序が考えられている²⁴⁾。またアロキサソ投与により膵 β 細胞破壊を誘導し糖尿病を誘発するモデルマウスの検討でも，NACの経口投与で膵 β 細胞破壊が予防できるとされている²⁵⁾。自己免疫1型糖尿病に対する影響に関しては，NACを若週令のNODマウスに投与すると糖尿病発症が抑制されるとの報告があるが¹⁴⁾，NACは免疫担当細胞にも影響し，T細胞の増殖，IL-2産生を促進すること¹⁵⁾，リンパ球の活性酸素産生を促進することが知られ

ており¹⁶⁾、NACの投与が逆に自己免疫疾患を増悪させる可能性も予想された。

本研究で著者は、糖尿病を発症し細胞傷害性のリンパ球を有しているNODマウスの脾細胞をNOD-scidレシピエントへ移入し、糖尿病を移入させる系を用いて、NACが自己免疫糖尿病を促進することを明らかにした²²⁾。細胞移入にて病態を移入する系は、免疫担当細胞の*in vivo*における役割を検討する時に用いられるが¹⁸⁾⁻²⁰⁾、NODマウスの糖尿病移入の系においては移入する細胞数、移入する細胞を採取するドナーの週令に糖尿病移入の可否は影響される。実際本研究においても、8週令のNODマウスから得た脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントにおいては、糖尿病移入に要した期間は糖尿病発症後のマウスをドナーに用いた場合に比し長くなり、またレシピエントの糖尿病累積発症率は低くなった(第2図)。これは著者の以前の報告とも一致した²⁶⁾。本研究ではドナー側のNODマウスの条件を均一化するため、明らかに細胞傷害性のリンパ球が存在し活性化されていると考えられる糖尿病発症後のNODマウスをドナーに用いた。実際にこのドナーを用いた場合の対照群のNOD-scidレシピエントへの糖尿病移入に要した時間、移入率は同じ細胞数を移入した他者の報告と一致しており²⁷⁾、よってNACが糖尿病移入を促進するとする本研究の結果を支持するものと考えられた。

著者はNACが糖尿病移入を促進する機序を解明すべく、免疫応答の目標となる膵局所、ならびに末梢として脾細胞を検討した。NACの投与によりレシピエントの糖尿病発症時には、膵局所と末梢の両所のリンパ球のサイトカインプロファイルにIFN- γ 産生の増強が認められた。しかし細胞移入後14日目では末梢でのリンパ球の構築、サイトカインプロファイルには差を認めないにも関わらず膵島のリンパ球浸潤は増悪しており、これは特異的に膵局所でリンパ球の集積、増殖をNACが促進したことを示唆していると考えられた。NACの投与が*in vivo*において膵島自己反応性T細胞の増殖を膵局所で促し、膵島の破壊を増悪させたと解釈しうる所見である。糖尿病発症後のNODマウスより得た脾CD4陽性細胞の*in vitro*での刺激によるIL-2産生がNACの添加にて増強されたことや、NAC群の膵島にCD8陽性細胞浸潤が有意に多く見られたことは、この可能性を支持するものと考えられた。またCD8陽性リンパ球に対してNACが腫瘍細胞やウイルスに対する傷害性を増強するとする他者の報告とも一致した^{28), 29)}。

Tヘルパーリンパ球の機能、特にT-helper cell type 1/T-helper cell type 2(以下Th1/Th2と略す)バラ

ンスについては、NACが抗原提示細胞の細胞内グルタチオン量を増加し、Th1タイプの応答を誘導する、との報告が*in vivo*および*in vitro*でなされている³⁰⁾。一方で*in vitro*でBALB/cマウスの脾細胞のサイトカインプロファイルがNACの添加でTh2タイプとなるとの報告もあり、一致した意見を見ていない³¹⁾。本研究では、*in vivo*と*in vitro*の両方でNACの投与がNODマウスではTh1タイプの応答を誘導することを示した。糖尿病発症後のNODマウスはTh1タイプの応答を示し、BALB/cマウスはTh2タイプの応答を示す傾向にあることが報告されており¹⁷⁾、NACのTh1/Th2バランスに対する影響は、遺伝的背景に規定されているサイトカイン応答パターンを増強している可能性が考えられる。NODマウスでは、良性膵島炎期にはTヘルパーリンパ球はTh2タイプの応答を示し、その後の破壊性膵島炎期にはTh1タイプ応答期が誘導されるとされている¹⁷⁾。それゆえ、NAC投与の効果は投与する時期に依存すると予測され、著者の検討では、NACによる糖尿病移入の促進は糖尿病未発症NODマウスの脾細胞を移入した際には認められなかった。これはその時期のNODマウスが良性膵島炎期にあり、Tリンパ球応答がTh1タイプに偏移していなかったためと考えられた。

また以前著者は本研究と同様の移入の系を用いて、NODマウスの腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量がNODマウスの膵 β 細胞への自己免疫応答の程度を反映することを報告した²⁶⁾。本研究でも同様に腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量を検討したところ、NAC投与群では対照群に比し細胞内グルタチオン含有量が多い細胞が増加していることを見出した。これはグルタチオン含有量が多いマクロファージがTh1タイプの応答を誘導するとする報告と一致する^{14), 30)}。またグルタチオン含有量が多いマクロファージにおいては一酸化窒素やIFN- γ の産生量が多い、との報告と併せて考えると¹⁴⁾、NACの投与が膵局所でマクロファージへのシステインの供与となり、細胞傷害性を増強した可能性も考えられる。その他にもシステインの供給がメチオニンの合成を促進し、Sアデノシルメチオニン経路を活性化しDNAのメチル化に影響し細胞機能の変化をもたらした可能性もある³²⁾。

結論として、著者は1型糖尿病モデルマウスにおいてNACの投与が疾患を悪化させる可能性を示した。NACの投与は非特異的にシスチンやシステインを活性化されたリンパ球やマクロファージに供給し、膵 β 細胞に対する細胞性免疫応答を増悪させると考えられる。近年ヒトの2型糖尿病と思われる患者の中にも、1型糖尿病患

者に認められる自己抗体抗グルタミン酸脱炭酸酵素 glutamic acid decarboxylase 抗体を有し、膵β細胞にリンパ球浸潤を認め³³⁾、徐々に膵β細胞機能が低下する緩徐進行1型糖尿病患者が存在することが報告されており³⁴⁾、通常の典型的1型糖尿病患者のみならず、これらの緩徐進行1型糖尿病患者へのNACの投与は病態を悪化させる可能性がある。NACは広く使用されている薬剤で有益な効果も多く報告されているが、NACの投与時には自己免疫疾患患者の病態を悪化させる可能性も念頭に置く必要があると考えられた。

総括

1型糖尿病において抗酸化薬 N-acetyl-cysteine (NAC) の影響を検討する目的で、糖尿病を発症した NOD マウス (1型糖尿病モデル動物) の脾細胞を NOD-scid マウス (レシピエント) へ移入し、さらにレシピエントへNACを投与してその影響を検討した。

1. NACの投与はレシピエントへの糖尿病移入を有意に促進した。しかし細胞移入前のNACの投与のみでは同様の効果は認めなかった。

2. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与はリンパ球の膵β細胞浸潤を増悪させた。特にCD8陽性細胞の浸潤が増強されていた。

3. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与は膵臓でのIFN-γのmRNA発現量を増加させた。さらにレシピエントの糖尿病発症時には、NACの投与は膵臓でのIFN-γのmRNA発現量を有意に増加させた。

4. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与はレシピエントの脾臓でのCD4、CD8陽性細胞数に影響を与えなかった。またレシピエントの脾細胞の抗CD3抗体刺激によるサイトカイン産生にも影響を与えなかった。

5. レシピエントの糖尿病発症時には、NACの投与はレシピエントの脾細胞の抗CD3抗体刺激によるIFN-γ、IL-2産生量を有意に増加させた。

6. 糖尿病発症NODマウスの脾細胞より得たCD4、CD8陽性リンパ球を抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激し、NACを添加したところ、IFN-γ、IL-2産生量が有意に増加した。

以上より、NACはリンパ球機能に影響することにより1型糖尿病の病期を進行させる可能性が示唆された。

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猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関して直接ご指導、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46回日本糖尿病学会年次学術集会(2003年、富山)にて発表した。

本論文は Irie J, Shimada A, Oikawa Y, Shigihara T, Saruta T : N-acetyl-cysteine accelerates transfer of diabetes into non-obese diabetic scid mice. *Diabetologia* 47 : 1803-1809, 2004 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) Melton LJ III, Palumbo PJ, Chu CP : Incidence of diabetes mellitus by clinical type. *Diabetes care* 6 : 75-86, 1983
- 3) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR : Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 317 : 1390-1398, 1987
- 4) 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
- 5) Mathis D, Vence L, Benoist C : β-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414 : 792-798, 2001
- 6) Nomikos IN, Wang Y, Lafferty KJ : Involvement of O₂ radicals in "autoimmune" diabetes. *Immunol Cell Biol* 67 : 85-87, 1989
- 7) Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, Kanagawa O, Unanue ER : Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice : Aminoguanidine-sensitive and resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8992-8995, 1993
- 8) Fukuda M, Ikegami H, Kawaguchi Y, Sano T, Ogihara T : Antioxidant, probucol, can inhibit the generation of hydrogen peroxide in islet cells induced by macrophages and prevent islet cell destruction in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun* 209 : 953-958, 1995
- 9) Piganelli JD, Flores SC, Cruz C, Koepf J, Batinic-Haberle I, Crapo J, Day B, Kachadourian R, Young R, Bradley B, Haskins K : A metalloporphyrin-based

- superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. *Diabetes* 51 : 347-355, 2002
- 10) Daaboul J, Schatz D : Overview of prevention and intervention trials for type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 4 : 317-323, 2003
 - 11) Meister A : Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal ; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* 51 : 155-194, 1991
 - 12) Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W : Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 343 : 180-184, 2000
 - 13) Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W : The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 107 : 992-995, 2003
 - 14) Murata Y, Amao M, Hamuro J : Sequential conversion of the redox status of macrophages dictates the pathological progression of autoimmune diabetes. *Eur J Immunol* 33 : 1001-1011, 2003
 - 15) Eylar E, Rivera-quinones C, Molina C, Baez I, Molina F, Mercado CM : N-acetylcysteine enhances T cell functions and T cell growth in culture. *Int Immunol* 5 : 97-101, 1993
 - 16) Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, Fuente MD : Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 73 : 797-804, 2002
 - 17) Shimada A, Charlton B, Edwards CT, Fathman CG : β -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y : Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35 : 855-860, 1986
 - 21) 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
 - 22) Irie J, Shimada A, Oikawa Y, Shigihara T, Saruta T : N-acetyl-cysteine accelerates transfer of diabetes into non-obese diabetic scid mice. *Diabetologia* 47 : 1803-1809, 2004
 - 23) Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C : Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11 : 305-312, 1999
 - 24) Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M : Beneficial effects of antioxidants in diabetes. *Diabetes* 48 : 2398-2406, 1999
 - 25) Ho E, Chen G, Bray TM : Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J* 13 : 1845-1854, 1999
 - 26) 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
 - 27) Tarbell KV, Lee M, Ranheim E, Chao CC, Sanna M, Kim SK, Dickie P, Teyton L, Davis M, McDevitt H : CD4+ T cells from glutamic acid decarboxylase (GAD)65-specific T cell receptor transgenic mice are not diabetogenic and can delay diabetes transfer. *J Exp Med* 196 : 481-492, 2002
 - 28) Yim CY, Hibbs JB, McGregor JR, Galinsky RE, Samlowski WE : Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2. *J Immunol* 152 : 5796-5805, 1994
 - 29) Boon ACM, Vos AP, Graus YMF, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME : In vitro effect of bioactive compounds on influenza virus specific B- and T-cell responses. *Scand J Immunol* 55 : 24-32, 2002
 - 30) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C : Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3071-3076, 1998
 - 31) Monick MM, Samavati L, Butler NS, Mohning M, Powers LS, Yarovinsky T, Spitz DR, Hunninghake GW : Intracellular thiols contribute to Th2 function via a positive role in IL-4 production. *J Immunol* 171 : 5107-5115, 2003
 - 32) Singh SM, Murphy B, O'Reilly RL : Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex disease : from cancer to schizophrenia. *Clin Genet* 64 : 451-460, 2003
 - 33) Shimada A, Imazu Y, Morinaga S, Funae O, Kasuga A, Atsumi Y, Matsuoka K : T-cell insulinitis found in anti-GAD65+ diabetes with residual beta-cell function. A case report. *Diabetes Care* 22 : 615-617, 1999
 - 34) 小林哲郎, 佐藤謙, 赤澤昭一 : 糖尿病の分類における1型の位置付け. *糖尿病* 41 : A11-A13, 1998