

| | |
|------------------|---|
| Title | 1型糖尿病における標的抗原としてのInsulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) の検討 |
| Sub Title | |
| Author | 児玉, 桂一(Kodama, Keichi) 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.3 (2005. 9) ,p.T245- T256 |
| 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=AN00069296-20050901-0245 |

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 型糖尿病における標的抗原としての
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

こ だま けい いち
児 玉 桂 一

(平成 16 年 12 月 14 日受付)

Key Word : type 1 diabetes mellitus, IGF-1, nonobese diabetic mouse

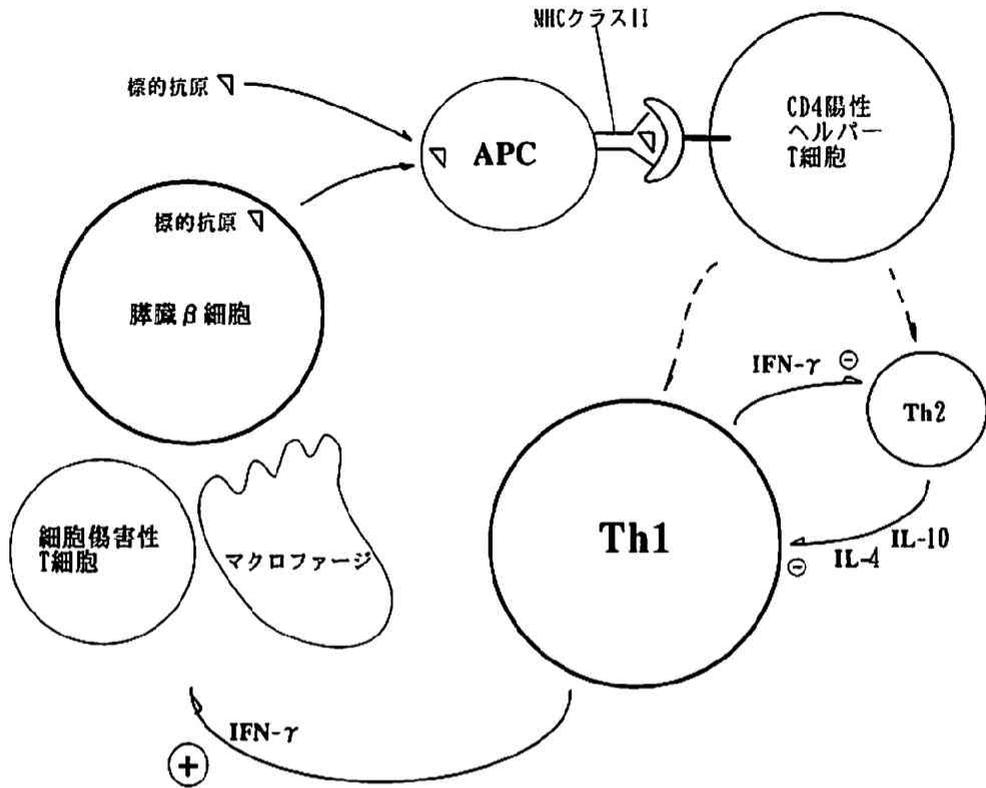
現在、我が国では糖尿病患者数が全国で約 1620 万人に達すると言われ (1)、長期の高血糖状態が虚血性心疾患、脳血管障害などの動脈硬化性疾患や腎不全といった致命的疾患に罹患するリスクを高めることが知られている (2, 3)。このうち、中高年の肥満者に多く発症する 2 型糖尿病が全体の 90% 以上を占め、小児や若年者に多く発症する 1 型糖尿病は数% に過ぎないが、1 型糖尿病患者は年間に少なくとも 500 人が発症しており、その総数は決して少なくない (4)。

肥満が原因となってインスリン抵抗性を生じ相対的なインスリンの欠乏によって高血糖状態となる 2 型糖尿病と異なり、1 型糖尿病は自己免疫的機序によりインスリンを分泌する膵ランゲルハンス島 (膵島) の β 細胞自体が破壊されることによってインスリンの絶対的欠乏が生じ、著明な高血糖状態に陥る疾患である。よって、1 型糖尿病の治療にはインスリンの投与が不可欠であり、適切なインスリン治療を行わなかった場合、代謝失調に至り致命的となるため、かつてはインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus : IDDM) と呼ばれていた (5)。実際、1920 年代に糖尿病患者へのインスリン投与が臨床応用されるまで、多くの 1 型糖尿病患児が発症後数週間で亡くなっていたが、現代ではインスリン治療が一般的に定着し、また、各種の合併症に対する医療、治療技術が進歩したことによりその生命予後は格段に改善された。しかし、最近の 1 型糖尿病患児の累積死亡率を調べた長期予後の報告によれば、依然、急

性合併症や腎症による 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 (6, 7)、さらに、生命予後が大幅に改善された反面、慢性的な高血糖状態による合併症の出現が増え、30 歳以上の 1 型糖尿病患者においては、心血管障害によって死亡する例が増加しており、その死亡リスクは一般人口の 10 倍以上になるとされている (8)。このように、小児や若年層に多く発症する 1 型糖尿病は血糖状態を良好に保つため頻回のインスリン注射を長期間必要とするだけでなく、また、そのコントロールが容易でないため、多くの急性、慢性的の合併症が出現することから、患者の生活の質 (Quality of Life : QOL) を著しく低下させると言え、1 型糖尿病の発症メカニズムの解明と発症予防法や根本的治療法の確立に向けた取り組みは今後の糖尿病研究において最重要課題のひとつと考えられる。

現在、1 型糖尿病の発症機序として nonobese diabetic (NOD) マウスの研究から得られた知見に基づいた第 1 図のようなモデルが考えられている (9)。すなわち、自己免疫機序による膵島の β 細胞破壊の最初のステップは抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) が β 細胞 (もしくはその他の細胞) から抗原を取り込み、それをプロセスした後、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) クラス II 分子を介して T 細胞に提示することにより開始される。T 細胞表面には T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) が存在し、MHC クラス II-抗原と結

本論文は、Kodama K, Shimada A, Funae O, Morimoto J, Irie J, Shigihara T, Oikawa Y, Tokui M, Watanabe K, Saruta T : Insulin-like growth factor -1 (IGF-1) - derived peptide protects against diabetes in NOD mice. *Autoimmunity* 37 : 481-7, 2004 の一部を含む (<http://www.tandf.co.uk> を参照)。



第1図 1型糖尿病の発症機序のモデル

合することにより T 細胞が活性化される。活性化される T 細胞は T-ヘルパー (Th) 細胞と呼ばれ、表面マーカーは CD4 陽性を示し、Th1, Th2 といった2つのサブセットに抗原刺激を受けた後、分化することが知られている。一般に Th1 細胞は主にウイルスや細胞内のバクテリアに細胞障害性に反応し、Th2 細胞は IgG, IgM などの抗体産生により細胞外のバクテリアなどに反応する細胞であるとされており、1型糖尿病の発症前には膵島抗原の刺激を受けたこれらの細胞は膵島周囲に集合し、まず膵島周囲炎の状態が形成され、この時点で初期感作に関わった抗原だけでなく他の多様な膵島内抗原(総じて標的抗原と呼ぶ)に反応する T 細胞も出現する。しかし、この両 T-ヘルパー (Th) 細胞による膵島周囲炎が直接、膵島β細胞の破壊に繋がるわけではなく、発症直前に何らかの原因により Th1/Th2 のバランスが Th1 優位になることによりβ細胞の傷害(膵島内炎)が生じると考えられている(10)。つまり、Th1 細胞は IFN- γ (インターフェロン- γ)、IL-2 (インターロイキン-2)、TNF- α (腫瘍壊死因子) といったサイトカインを分泌することによりマクロファージ、CD8 陽性 T 細胞などの細胞障害性細胞を活性化し、これらの細胞(マク

ロファージ、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞)が膵島内に浸潤することによりβ細胞が直接もしくは間接的に破壊されるのだが、これに対し Th2 細胞は IL-4, IL-10 といったサイトカインを産生することにより Th1 細胞の機能を制御してβ細胞の破壊(糖尿病の発症)を抑制しているとされている(11)。

このような1型糖尿病の発症機序から糖尿病の予防法を考えた場合、重要なポイントとして1)マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞といったエフェクター細胞の排除、機能抑制、2)初期感作抗原に対する末梢性免疫寛容の誘導、3)Th2 細胞を初めとするサブプレッサー T 細胞の賦活化、などが挙げられる(9)。1)についてはサイクロスポリン(12)や抗 IFN- γ 抗体(13)の投与などが試みられており一定の効果を確認しているが、根本的な治療ではなく積極的な抑制効果は期待できないと思われる。これに対し、2)は標的抗原の中でも最初の T 細胞の感作に関わる抗原を、膵島周囲炎が生じる前に、投与することにより T 細胞の抗原に対する反応性の消失(アナジー)を誘導するものであり、もし、これが成功すれば膵島炎は一切起こることはなく1型糖尿病は完全に抑制され、根本的な治療に繋がるものと考えられる(ただし、

現時点では初期感作抗原が何であるかは確定されていない。3)については候補標的抗原を投与することにより抗原反応性のTh2細胞を優位に誘導し、膵島炎の程度にはあまり影響がないものの、β細胞の破壊は免れるという方法である。実際、2)と3)の治療法開発を目指してIDDMの第一近親者にインスリンを発症前に投与して糖尿病の発症を予防する大規模試験(14)がアメリカで実施されており、今後、1型糖尿病の根本的治療や発症予防に繋がると考えられる標的抗原の確定に関する研究はさらに重要性を増してくるものと思われる。

これまでの1型糖尿病における標的抗原(マクロファージに貪食されT細胞に提示されるペプチド)を検索する研究ではグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase: GAD)(以下、GADと略す)(15, 16)、インスリン(とくにB鎖の9-23)(17-19)、熱ショック蛋白(heat shock protein)(20-22)などの膵島β細胞内の蛋白とその中の特定のミノ酸配列が候補抗原として提唱されてきたが、未だこれが確定されるまでには至っていない。そこで、著者は視点を変え、T細胞の初期の感作が膵島の外で起こり、これが膵島へのT細胞(リンパ球)の浸潤(膵島炎)と膵島β細胞の破壊の原因となる可能性を考え、その膵島外標的抗原の候補としてインスリン様成長因子(Insulin-like growth factor-1: IGF-1)(以下、IGF-1と略す)の可能性に着目した。IGF-1は主に肝臓で産生され、インスリンにホモロジー(相同性)を持つ70個のミノ酸からなるペプチドであるが、その内容は高度にインスリンとホモロジーのある部分とホモロジーのない部分に分かれている。著者はIGF-1こそ最初の標的抗原であり、IGF-1に対するT細胞の感作は最初このインスリンとホモロジーのない部分で生じ、それが膵島炎における免疫反応の過程でT細胞の反応性がインスリンと高度にホモロジーのある部分に移行(エピトープ拡大)し、これが糖尿病の発症(インスリン反応性のヘルパーT細胞の出現及びβ細胞の破壊)に繋がっていくのではないかと推察し、今回の実験系を立案した。

著者は、今回の実験でヒト1型糖尿病の病因研究のため繁用されてきたモデル動物の一つであるNODマウスを使用した。NODマウスは膵島細胞抗体に代表される種々の1型糖尿病と同様の自己抗体が血清中から検出されており、ヒト1型糖尿病に類似した性質を数多く持つ優れたモデル動物である。NODマウスでは生後5~6週頃より、膵島へのリンパ球(T細胞、マクロファージ)の浸潤(膵島炎)を認め、生後12週齢以降に顕性糖尿病を発症し、累積糖尿病発症率は雌性で30週齢頃まで

に約70%に達する。著者はこの雌性マウスを使用して、膵島炎の出現する前の4週齢の段階でIGF-1、GAD、インスリンといった候補抗原を免疫賦活剤のアジュバント(incomplete Freund's adjuvant: IFA)(以下、アジュバントと略す)とともに皮下投与し、その後の糖尿病の発症抑制効果、膵島炎の程度を観察し、脾細胞の各種抗原蛋白に対するTh1タイプのサイトカイン反応(IFN-γ)とTh2タイプのサイトカイン反応(IL-4)を検討し、膵島炎の起こっている膵臓局所のサイトカイン発現(IFN-γ(Th1タイプ)及びIL-4、IL-10(Th2タイプ))を検討した。

対象および方法

動物

4週齢の雌性NODマウスを日本クレア(東京)から購入し、慶應義塾大学医学部動物センターにて、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、本実験は動物実験委員会の承認を得た(承認番号021017(2002年))。

実験1: 1型糖尿病の標的抗原としてのIGF-1の検討

(1) 糖尿病発症率

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1(n=13; 藤沢薬品工業の大熊博士より供与、70個の全てのミノ酸配列を含む)(以下、whole IGF-1と称す)、GAD(n=15; RSR社、英国)、レギュラーインスリン(n=12; ノボノルディスクファーマ社、デンマーク)といった候補抗原蛋白(12.5 μg/匹)を免疫賦活剤であるアジュバントと混和して皮下に注射した。対照として抗原を何も加えないもの(アジュバント(IFA)のみ)を皮下注射した群(n=21)を用意した。全てのマウスにおいて尿糖が12週齢より36週齢まで、週に2回テステープ(塩野義、大阪)にて検査され、この中から尿糖陽性のものについてさらに血糖が簡易血糖測定器(グルテストエース: 三和科学、名古屋)を用いて測定され、血糖値が250 mg/dl以上となったものを糖尿病と判定し、各投与群における36週齢までの糖尿病発症率が検討された。

(2) 膵組織における膵島炎の評価

糖尿病の発症経過を観察後、36週齢で糖尿病未発症マウスを屠殺して、膵組織を摘出し、10%ホルマリンに固定してパラフィンに包埋した。標本は各検体につき

5片作製され、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、光学顕微鏡下で膵島炎の程度を下記の基準に従い評価した。各マウスにつき少なくとも33個の膵島が盲目的に検査された。

<膵島炎の評価基準>

正常膵島：膵島内およびその周囲にリンパ球浸潤を認めない。

膵島周囲炎：膵島周囲にリンパ球の浸潤を認めるが、膵島内には認めない。

膵島内炎：膵島内にリンパ球の浸潤を認める。

(3) フローサイトメーターによる脾細胞のサイトカイン反応の評価

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、候補抗原蛋白(12.5 µg/匹)(whole IGF-1 (n=3), GAD (n=3), インスリン (n=3))をアジュバントと混和して皮下投与し、対照としてアジュバントのみを投与した群(n=2)を用意した。

これらのマウスを8週齢で屠殺して無菌的に脾臓を摘出し、ピンセットを用いて遊離細胞に単離し、5%仔牛胎児血清、ペニシリン100万U/ml、ストレプトマイシン100 mg/lを含んだRPMI-1640(Gibco社、米国)(以下、メジウム)に浮遊させた。この遊離脾細胞をメジウム200 µlあたり 1×10^6 個に調整後、96穴マイクロプレート(コーニング、米国)に分注し、さらに、これを刺激するためwhole IGF-1, GAD, もしくはインスリンを最終濃度がそれぞれ10 µg/mlになるようにして加えた。対照として刺激ペプチドを何も加えないものを用意した。その後、37°C, 5%CO₂存在下で、72時間培養し、終了4時間前にプレファルジンA(Sigma社、米国)を最終濃度が10 µg/mlになるようにして添加し、培養終了後、各穴より150 µlの検体を5 mlの試験管に採取し、さらに、CYchrome 標識抗CD4抗体(H129.19; Pharmingen社、米国)を加えて、室温で15分間反応させた。この後、FACS lysing solution(Becton-Dickinson社、米国)を4 ml添加、10分間静置し、0.1%仔牛胎児血清加リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄後、500 µlのFACS permeabilizing solution(Becton-Dickinson社)を加え室温暗所で10分間反応させた。さらに、0.1%仔牛胎児血清加リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した後、細胞内サイトカインを染色するため、FITC 標識抗IFN-γ抗体(IgG1; Pharmingen社)とPE (phycoerythrin) 標識抗IL-4抗体(IgG2b; Pharmingen社)を各3 µl添加して、暗所、室温下で30分間反応させた。対照としてFITC 標識IgG1とPE 標識IgG2bを加えたものを別に用意した。

これらの染色された細胞からフローサイトメーター(FACScan, Becton-Dickinson社)を用いて生細胞表面のCD4抗原をもとにCD4陽性T細胞を選定し、その中でさらに細胞内サイトカインの蛍光強度を測定して、カットオフ値に基づいてIFN-γ陽性細胞、IL-4陽性細胞を特定した。各群において少なくとも50,000個のCD4陽性T細胞がカウントされ、各サイトカインの陽性細胞率を50,000個のCD4陽性T細胞のうちに含まれる陽性細胞の数で表現した。

(4) 膵臓局所のサイトカイン発現の半定量的リアルタイムPCR解析

前述の脾細胞のサイトカイン反応の評価実験(実験1(3))で使用されたマウス(8週齢で屠殺)より脾臓と同時に膵臓が分離された。この膵臓からRNAがRneasy Mini Kit(Qiagen社)にて抽出され、それらのRNAは全てNot I-d(T)とFirst-Strand cDNA synthesis kit(ファーストストランドcDNA合成キット; Pharmacia Biotech社、英国)を用いて逆転写され、ファーストストランドcDNAが作成され、サイトカインmRNA(メッセンジャーRNA)の半定量PCR解析に供されるまで-80°Cで冷凍保存された。

次に、得られたファーストストランドcDNAを鋳型としてIFN-γ, IL-4, IL-10の3つのサイトカインについてmRNAの半定量的測定がTaqMan Fluorogenic Detection System(PE Applied Biosystems, 米国)によるリアルタイム Polymerase Chain Reaction(PCR)法を用いて行われた(23)。すなわち、これらのサイトカインに対するプローブの5'側は蛍光リポーターの6-carboxylfluorescein(FAM)で、3'側はクエンチャー(消光分子)のcarboxytetramethylrhodamine(TAMRA)で修飾されており(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(Takara, 大津)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という仕組みになっている。この蛍光量をABI Prism 7700 sequence detector(PE Applied Biosystems)を用いて測定することにより、目的遺伝子の増幅の程度をリアルタイムに定量し、目的のmRNA量を間接的に同定するのが半定量的リアルタイムPCR解析の原理である。この実験では、対照としてβ-actinのmRNA量も同時に測定され、各

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

| 遺伝子名 | 5'プライマー | 3'プライマー | TaqMan プローブ |
|--------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| β-アクチン | 5'-CAACGTC ACACTTCAT GATGGA-3' | 5'-TCCAGCCT TCCTTCTTG GGTA-3' | 5'-TGTAGTT TCATGGATG CCACAGGAT TCC-3' |
| IFN-γ | 5'-CAGCAAC AGCAAGGCG AAA-3' | 5'-GCTTCCTG AGGCTGGAT TCC-3' | 5'-AGGTCAA CAACCCACA GGTCCAGCG- 3' |
| IL-10 | 5'-CACAAAG CAGCCTTGC AGA-3' | 5'-GTAAGAG CAGGCAGCA TAGCA-3' | 5'-AAGAGAG CTCCATCAT GCCTGGCTC A-3' |
| IL-4 | 5'-TCTCATG GAGCTGCAG AGACTCT-3' | 5'-GCTCTTT AGGCTTTCC AGGAAGT-3' | 5'-CTGCACCA TGAATGAGT CCAAGTCCA CA-3' |

サイトカイン mRNA のレベルは β-actin の mRNA 量に対する比で補正して示された (尚, 本研究で使用したプライマーと TaqMan プローブを第1表に示した)。

実験2：IGF-1 内エピトープ同定の試み

実験1にて1型糖尿病におけるIGF-1の標的抗原としての可能性が示唆されたが、本実験ではIGF-1のどの部位がエピトープ(マクロファージのMHCクラスII分子に結合してヘルパーT細胞に提示されるペプチド)として機能しているのかを明らかにするためIGF-1をインスリンとホモロジー(相同性)のある部分(IGF-1 8-23: AELVDALQFVCGDRGF)とホモロジーのない部分(IGF-1 24-41: YFNKPTGYGSSRRAPQT, IGF-1 50-70: RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA)に分け、3種類のペプチドを合成し(旭テクノグラス、千葉)、これらの合成ペプチドを各々NODマウスに投与して実験1と同様に糖尿病発症率、膵島炎、脾細胞のサイトカイン反応、膵局所のサイトカイン発現等を評価した。

(1) 糖尿病発症率

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1 8-23 (n=15)、IGF-1 24-41 (n=15)、IGF-1 50-70 (n=15)といったIGF-1の一部を構成するペプチド(12.5 μg/匹)をアジュバントと混和して皮下投与した。対照として抗原を何も加えないもの(アジュバントのみ)

を皮下注射した群(n=21)を用意した。実験1と同様に糖尿病の発症を判定し、各投与群における37週齢までの糖尿病発症率を検討した。

(2) 膵組織における膵島炎の評価

各群で糖尿病の発症経過を観察後、37週齢で糖尿病未発症マウスを屠殺して、膵組織を摘出し、実験1と同様に膵島炎の程度を評価した。

(3) フローサイトメーターによる脾細胞のサイトカイン反応の評価

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1合成ペプチド(12.5 μg/匹)(IGF-1 8-23 (n=3)、IGF-1 24-41 (n=3)、IGF-1 50-70 (n=3))をアジュバントと混和して皮下投与し、対照としてアジュバントのみを投与した群(n=2)を用意した。

これらのマウスを8週齢で屠殺して無菌的に脾臓を摘出、遊離細胞に単離し、実験1と同様の方法でwhole IGF-1, GAD, インスリン, IGF-1合成ペプチド(IGF-1 8-23, IGF-1 24-41もしくはIGF-1 50-70)といった各刺激に対するサイトカイン反応がフローサイトメーターを用いて評価された。

(4) 膵臓局所のサイトカイン発現の半定量的リアルタイムPCR解析

前実験(実験2(3))で使用されたマウスから膵臓も同時に分離され、IFN-γ, IL-4, IL-10といったサイトカインのmRNAのレベルが実験1と同様に半定量的リアルタイムPCR解析を用いて測定された。

統計処理

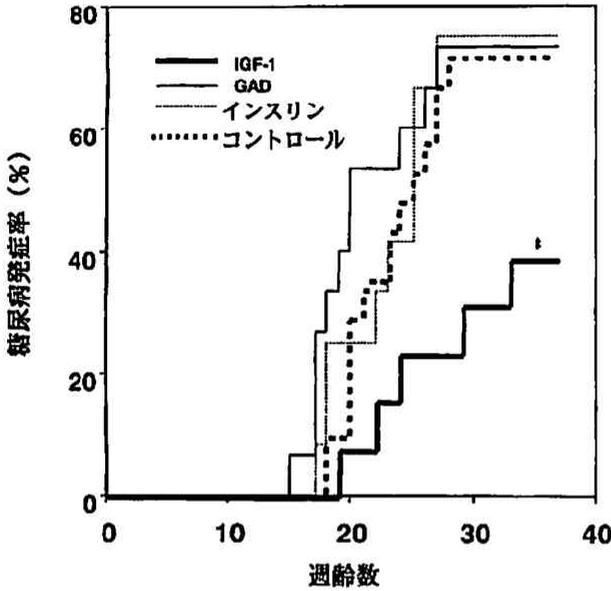
全ての結果は、平均値±標準誤差で表示した。糖尿病発症率の各群間の比較にはKaplan-Meier testを用い、膵島炎の程度、脾細胞のサイトカイン反応、膵局所のサイトカイン発現の各群間比較にはMann-Whitney U testを使用した。p値<0.05を統計学的に有意差があると判定した。

成 績

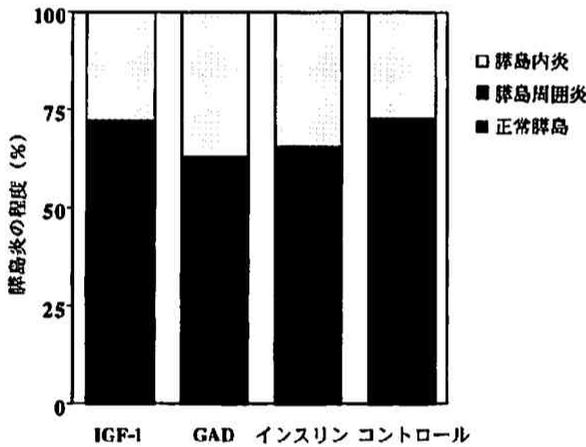
実験1：1型糖尿病の標的抗原としてのIGF-1の検討

(1) whole IGF-1投与による糖尿病発症抑制効果の検討

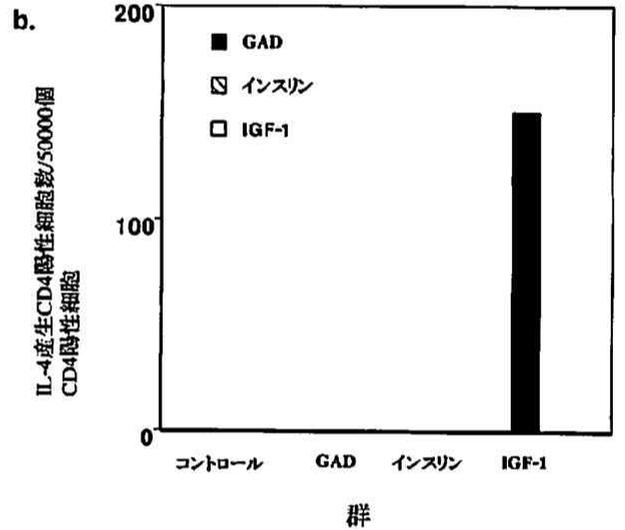
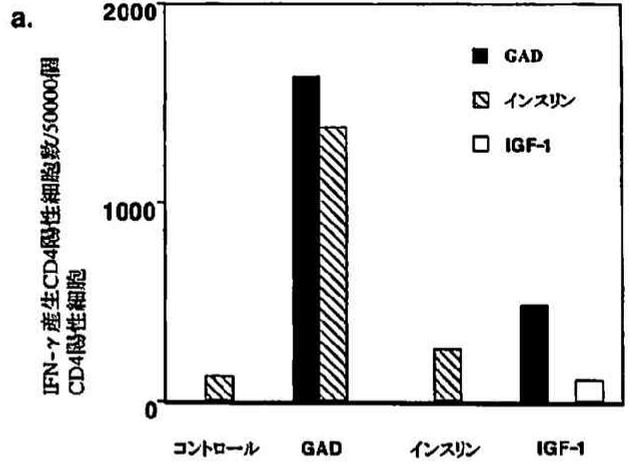
1型糖尿病の候補抗原であるwhole IGF-1 (n=13)、GAD (n=15)、インスリン (n=12)を4週齢の雌性NODマウスに投与したところ、36週齢までの糖尿病の累積発症率はwhole IGF-1投与群で38.5% (5/13)、GAD投与群で73.3% (11/15)、インスリン投与群で



第2図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群における36週齢までの累積糖尿病発症率。
* $p < 0.05$ vs. GAD, インスリン, コントロール群 (Kaplan-Meier test).



第3図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群の36週齢の時点での糖尿病未発症マウスにおける膵島炎の有無と程度 (IGF-1投与群 (n=8): 正常膵島 67.7%, 膵島周囲炎 4.8%, 膵島内炎 27.5%; GAD投与群 (n=4): 正常膵島 50.0%, 膵島周囲炎 13.2%, 膵島内炎 36.8%; インスリン投与群 (n=3): 正常膵島 56.6%, 膵島周囲炎 9.4%, 膵島内炎 34.0%; コントロール群 (n=6): 正常膵島 61.2%, 膵島周囲炎 11.9%, 膵島内炎 26.9%).



第4図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群における脾細胞の抗原特異的サイトカイン反応。(a) IFN- γ 産生 CD4陽性細胞数, (b) IL-4産生 CD4陽性細胞数.

75.0% (9/12), 対照群で71.4% (15/21) と IGF-1 投与群で他群と比較して有意に糖尿病発症率が抑制されていた (第2図: Kaplan-Meier test; $p < 0.05$).

(2) 膵島炎の評価

36週齢で各群の糖尿病未発症のマウスについて膵島炎の有無と程度を評価したところ, 統計学的に有意な差は認められなかったが, IGF-1投与群で膵島炎が他群と比較して抑制されている (正常膵島が多い) 傾向が認められた (第3図).

第2表 IGF-1, GAD の各投与群における膵臓局所の Th1/Th2 サイトカイン発現比

| 群 | IFN γ /IL-4 | IFN γ /IL-10 |
|-------|----------------------|----------------------|
| IGF-1 | 2.8×10^{-6} | 4.2×10^{-3} |
| GAD | 7.8 | 28.6 |

(3) 脾細胞の候補抗原刺激に対するサイトカイン反応の検討

1型糖尿病の候補抗原 (whole IGF-1 (n=3), GAD (n=3), インスリン (n=3)) を皮下投与されたマウスから脾細胞を8週齢で分離し、各々の候補抗原 (whole IGF-1, GAD もしくはインスリン) によって刺激したのち、フローサイトメーターを用いて CD4 陽性 IFN- γ 産生ヘルパー T 細胞 (Th1 タイプ) と CD4 陽性 IL-4 産生ヘルパー T 細胞 (Th2 タイプ) の数を測定し、候補抗原刺激に対するサイトカイン反応を検討した。

第4図に示すように whole IGF-1 投与群において GAD 刺激に対する IL-4 産生 CD4 陽性細胞 (Th2 タイプのヘルパー T 細胞) が多く認められ (150/50,000 CD4 陽性細胞), GAD 投与群では GAD 刺激 (1,625/50,000 CD4 陽性細胞) とインスリン刺激 (1,375/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) が多数出現し、インスリン投与群でもインスリン刺激 (260/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) が認められた。

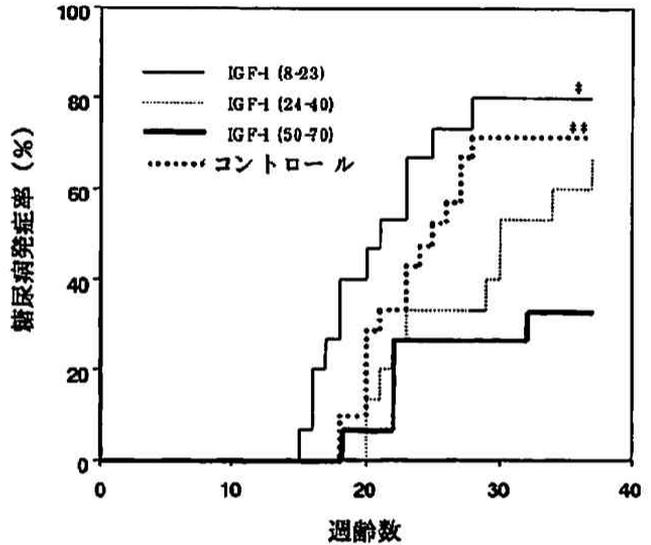
(4) 膵臓局所におけるサイトカイン発現の検討

実験1(3)で使用された各群のマウスから膵臓を同時に採取し、膵臓(局所)における Th1 タイプ (IFN- γ) と Th2 タイプ (IL-4, IL-10) のサイトカイン mRNA レベルを測定した。IGF-1 投与群において Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 タイプのサイトカインの発現が優位の状態) が GAD 投与群と比較して認められた (第2表参照)。

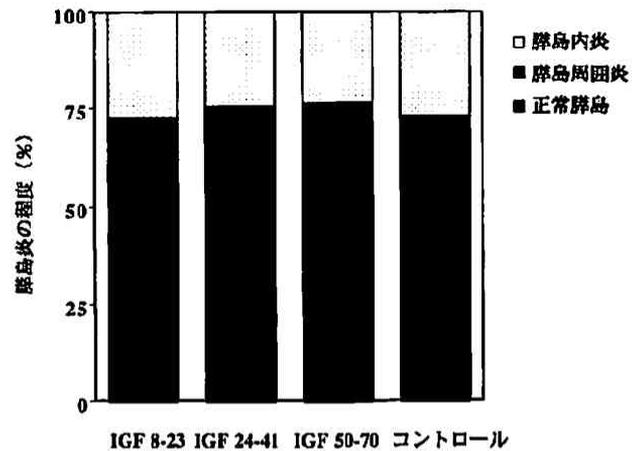
実験2: IGF-1 内エピトープ同定の試み

(1) IGF-1 構成ペプチド投与による糖尿病発症抑制効果の検討

実験1において著者は IGF-1 の皮下投与によって Th2 タイプのサイトカイン反応が誘導されることにより糖尿病の発症が抑制される可能性を示した。そこで、IGF-1 のどの部位のペプチド鎖が実際にエピトープとし



第5図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70 の各合成ペプチド, IFA (コントロール) の投与群における36週齢までの累積糖尿病発症率。*p<0.01 vs. IGF-1 50-70 合成ペプチド投与群, **p<0.02 vs. IGF-1 50-70 合成ペプチド投与群 (Kaplan-Meier test)。



第6図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70 の各合成ペプチド, IFA (コントロール) の投与群の糖尿病未発症マウスにおける膵島炎の有無と程度 (IGF-1 8-23 投与群 (n=3): 正常膵島 53.8%, 膵島周囲炎 19.2%, 膵島内炎 26.9%; IGF-1 24-41 投与群 (n=5): 正常膵島 54.5%, 膵島周囲炎 21.2%, 膵島内炎 24.2%; IGF-1 50-70 投与群 (n=10): 正常膵島 68.3%, 膵島周囲炎 8.3%, 膵島内炎 23.3%; コントロール群 (n=6): 正常膵島 61.2%, 膵島周囲炎 11.9%, 膵島内炎 26.9%)。

て発症抑制に関わっているのか検討するため、IGF-1をインスリンとホモロジーのある部分 (IGF-1 8-23) とない部分 (IGF-1 24-41 と IGF-1 50-70) に分割して3種類のペプチドを合成して4週齢の雌性 NOD マウスに投与した。各群の37週までの糖尿病の累積発症率は IGF-1 50-70 投与群で 33.3% (5/15), IGF-1 8-23 投与群で 80.0% (12/15), IGF-1 24-41 投与群で 66.6% (10/15), 対照群で 71.4% (15/21) と IGF-1 50-70 投与群で他群と比較して有意に糖尿病発症率が抑制された (第5図: Kaplan-Meire test; $p < 0.01$)。

(2) 膵島炎の評価

37週齢で各群の糖尿病未発症のマウスについて膵島炎の有無と程度を評価したところ、統計学的に有意な差は認められなかったが、IGF-1 50-70 投与群で膵島炎が他群と比較して抑制されている (正常膵島が多い) 傾向が認められた (第6図)。

(3) 脾細胞の候補抗原刺激に対するサイトカイン反応の検討

IGF-1 構成ペプチド (IGF-1 8-23 (n=3), 24-41 (n=3), 50-70 (n=3)) を皮下投与されたマウスから脾細胞を8週齢で分離し、各々の候補抗原 (whole IGF-1, GAD, インスリン, IGF-1 8-23, 24-41, 50-70) によって刺激したのち、フローサイトメーターを用いて

第3表 IGF-1 8-23, 50-70 の各合成ペプチド投与群における膵臓局所の Th1/Th2 サイトカイン発現比

| 群 | IFN γ /IL-4 | IFN γ /IL-10 |
|-------------|--------------------|---------------------|
| IGF-1 8-23 | 2.8 | 2.6 |
| IGF-1 50-70 | 1.3 | 1.6 |

CD4 陽性 IFN- γ 産生ヘルパー T 細胞もしくは CD4 陽性 IL-4 産生ヘルパー T 細胞の数を測定した。

第7図に示すように、IGF-1 50-70 投与群において GAD 刺激 (2,705/50,000 CD4 陽性細胞), インスリン刺激 (1,865/50,000 CD4 陽性細胞), IGF-1 8-23 刺激 (2,320/50,000 CD4 陽性細胞), IGF-1 50-70 刺激 (2,605/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IL-4 を産生する CD4 陽性細胞 (Th2 タイプのヘルパー T 細胞) が数多く認められた。

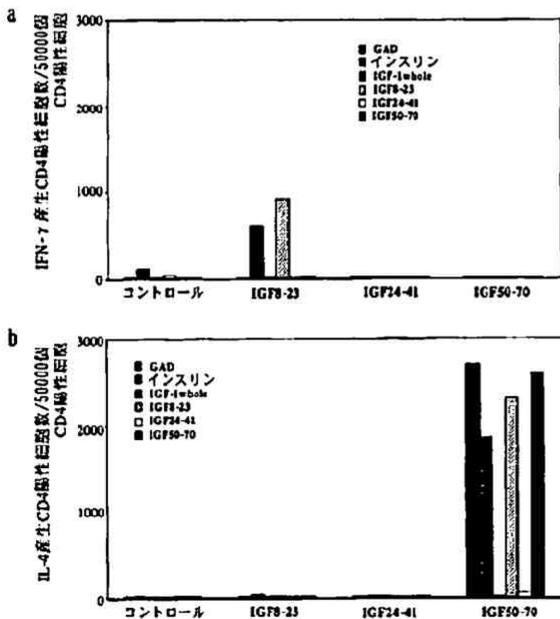
IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) に関しては IGF-1 8-23 投与群においてインスリン刺激 (610/50,000 CD4 陽性細胞) と IGF-1 8-23 刺激 (930/50,000 CD4 陽性細胞) に対して比較的多く認められ、コントロール群においてはインスリン刺激 (125/50,000 CD4 陽性細胞) と IGF-1 8-23 刺激 (45/50,000 CD4 陽性細胞) に対して少数認められた。

(4) 膵臓局所におけるサイトカイン発現の検討

実験2(3)で使用された各群のマウスから膵臓も同時に採取され、膵臓 (局所) における Th1 タイプ (IFN- γ) と Th2 タイプ (IL-4, IL-10) のサイトカイン mRNA レベルを測定した。IGF-1 50-70 投与群において Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 優位の状態) が IGF-1 8-23 投与群と比較して認められた (第3表参照)。

考 察

これまでの1型糖尿病の研究において、糖尿病発症プロセスの最初のトリガーとなる標的抗原 (マクロファージに貪食され MHC クラス II 分子を介してヘルパー T 細胞に提示されるペプチド) の候補として、GAD (15, 16), インスリン (17, 18), 熱ショック蛋白 (20-22) などの β 細胞内の蛋白質が提唱されてきたが、未だその全容が解明されるには至っていない。そこで、著者は仮説として、膵島 (β 細胞) の外でヘルパー T 細胞の初期の感作が起こり、これが膵島周囲へのリンパ球の浸潤 (膵島周囲炎) の最初の原因となり、ヘルパー T 細



第7図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70 の各合成ペプチド、IFA (コントロール) の投与群における脾細胞の抗原特異的サイトカイン反応。(a) IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数、(b) IL-4 産生 CD4 陽性細胞数。

胞の反応性が膵島(β細胞)の中の蛋白にエピトープ拡大することによって糖尿病の発症(β細胞の破壊)に至るという可能性を提唱し、その候補として膵島外(肝臓)で主に産生されインスリンと高度なホモロジーを有するIGF-1に着目した。もし、IGF-1が1型糖尿病における最初の標的抗原として機能しているならば、1型糖尿病のハイリスク者へのIGF-1の先行投与により糖尿病の発症を免疫寛容(アナジー)の誘導により完全に予防できる可能性があり、1型糖尿病の根本的治療への道を開くものと思われた。

1型糖尿病のモデル動物であるNODマウスに対する予防的IGF-1投与について、これまでいくつかの研究が報告されているが、そのどれもが長期にわたり(2~3週間)、頻回に、高用量(100 μg/匹以上)のIGF-1を投与し続けており、その生理学的な効果については検討されているものの、免疫学的な意義については評価されておらず、標的抗原としての可能性を推察するには不十分なものであった(24-26)。そこで、今回、著者はIGF-1の1型糖尿病における標的抗原としての可能性を検討する目的でIGF-1を免疫賦活剤アジュバントと混合して若齢の、未だ膵島炎の起こっていないNODマウスに1回だけ少量皮下投与する実験を行った(実験1)。IGF-1が実際に初期のヘルパーT細胞の感作に関わっているなら、IGF-1投与により免疫寛容(アナジー)が誘導され膵島炎と糖尿病の発症が完全に抑制されると考えられたが、著者の実験では糖尿病の発症は他群(GAD投与群、インスリン投与群)と比較して有意に抑制されたものの、膵島炎の程度に関しては有意な差は認められなかった。また、IGF-1投与マウスにおける脾細胞のサイトカイン反応の実験では、GAD刺激に対するTh2タイプのサイトカイン反応(IL-4の放出)が誘導され、膵組織におけるサイトカイン発現の実験ではIGF-1投与群においてTh2タイプのサイトカインの発現が優位の状態が8週齢(膵島周囲炎が明らかになる頃)の段階で認められた。これらのことは、NODマウスに対するIGF-1の投与は自己免疫の反応過程を初期の段階で停止させるのではなく、他の膵島内抗原(とくにGAD)に対して反応する免疫抑制性細胞(Th2タイプのサイトカインを放出しTh1を制御するヘルパーT細胞)を誘導することによって糖尿病の発症(Th1によるβ細胞の免疫学的破壊)を膵島周囲炎の段階で抑制していると考えられた。つまり、当初の著者の仮説に反して1型糖尿病の発症においてIGF-1は最初の標的抗原としては機能していないが、IGF-1はβ細胞内でも産生されているという報告もあり(26)、IGF-1がヘルパー

T細胞のエピトープ拡大の過程における抗原カスケードのひとつとして重要である可能性が示唆された。また、以前、Funaeら(27)がNODマウスの自然経過の中の糖尿病の発症とGAD刺激に対する脾細胞のTh2タイプのサイトカイン反応の低下が相関していることを示したが、これは今回の著者の実験結果と合致するものであると考えられ、GADに対して反応する免疫抑制細胞が誘導されることが糖尿病の発症抑制にとって重要である可能性が示唆された。このことは取りも直さずGADの1型糖尿病発症における標的抗原としての重要性を示しているが、一方で、今回の実験ではGADともうひとつの候補抗原インスリンの皮下投与群のマウスにおいて糖尿病の発症抑制が起こらず、GADについてはむしろ促進されている傾向を認めた。この結果は、これまでの多くの研究者によって行われたGAD(28, 29)、やインスリン(30-33)のNODマウスへの投与実験において糖尿病発症抑制効果を認めたとことと論を異にしているが、著者は、この結果の相違はGADやインスリンの候補抗原としての可能性を決して否定するものではないと考えている。つまり、これらの発症に与える効果の不一致は投与用量(高容量か、低容量か)や投与経路(皮下注射か、腹腔内注射か、胸腺内投与か)、あるいは投与時期(膵島炎出現前か、後か)の違いによってTh1もしくはTh2優位のTリンパ球が誘導されたことにより生じたものであり(34)、GADやインスリンの抗原性とは関わりのないことと推察された。また、特に、他の研究者がGADの高用量投与(100 μg/匹)で発症抑制を認めていることに反して、我々の実験系の低容量投与(12.5 μg/匹)ではGADによって発症が促進されている傾向が認められたことを考えると、今後GADやインスリンなどの候補抗原を1型糖尿病の発症リスクの高い若年者に予防的に投与する臨床試験に応用する上でその投与量によっては糖尿病の発症を促進する可能性が示唆されたと言え、今後この種の介入試験では、その投与方法に細心の注意を払う必要があると思われた。

次に、著者は、このIGF-1投与による糖尿病の発症抑制がIGF-1のインスリンに対するホモロジーによるものなのかIGF-1に特異的なものなのかを検討するために実験2を行った。以前、ある研究グループが自己免疫糖尿病の細胞移入モデルにおけるインスリン、IGF-1投与による糖尿病発症抑制の実験系で、IGF-1の糖尿病発症抑制効果の成因として1)β細胞の再生促進、2)胸腺上皮細胞の機能変化、3)胸腺細胞の分化に与える影響などの生理学的効果を挙げていたが、その標的抗原としての役割について免疫学的に論じられてはいなかった

(35). 一方、今回の実験系では IGF-1 はアジュバントとともに皮下に1回しか投与しておらず、また、インスリンの同量、同経路の投与では発症抑制を認めていないことから、IGF-1 独自の免疫学的な効果によって発症が抑制されている可能性が高いと考えられた。そこで、著者は IGF-1 を、インスリン内の糖尿病の発症に関わるエピトープとして重要とされる B 鎖の 9-23 ペプチド鎖 (30-34) とホモロジーを有する IGF-1 8-23 とインスリンと全くホモロジーを有しない IGF-1 24-41 と IGF-1 50-70 の3つのペプチド群に分類し、それぞれを NOD マウスに投与して糖尿病の発症抑制効果、脾細胞の抗原特異的なサイトカイン反応、膵組織におけるサイトカイン発現について検討した。その結果、インスリンとホモロジーのない IGF-1 50-70 投与により糖尿病の発症が抑制され GAD 刺激に対してだけでなく、インスリン、IGF-1 8-23 と IGF-1 50-70 刺激に対しても脾細胞 Th2 タイプの反応が誘導され、膵局所においては Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 優位の状態) が認められていることが示された。一方、インスリンとホモロジーのある IGF-1 8-23 投与では糖尿病の発症が促進されインスリンと IGF-1 8-23 刺激に対する脾細胞の Th1 タイプの反応が誘導された。これらの結果は IGF-1 8-23 投与群ではインスリンとのホモロジー (インスリン様の効果) によって発症促進効果が認められたことを示唆していると思われるが、IGF-1 50-70 投与群では IGF-1 に特異的なアミノ酸配列が NOD マウスにおける糖尿病発症抑制に重要な役割を演じていると考えられた。このことは IGF-1 50-70 のペプチドが Th2 タイプの反応 (膵島内抗原反応性の免疫抑制性細胞の誘導) を介して糖尿病の発症予防をもたらすペプチドとして重要であるだけでなく、1型糖尿病の候補抗原のアミノ酸配列のひとつとして検討されるに値するものであることを示しているものと思われた。ただし、抗原特異的な T 細胞の反応性が IGF-1 50-70 皮下投与群と whole IGF-1 投与群において一致しない部分があるため、糖尿病発症抑制効果のメカニズムが両者において異なる可能性は否定できない。

当初、膵島の外で T 細胞の初期感作が IGF-1 のインスリンとホモロジーのない部分によって生じていると想定し、この実験系を計画したが、結果的には、IGF-1 が直接、初期の段階で糖尿病の発症に関わっている可能性は低いということが示された。しかし、whole IGF-1 もしくは IGF-1 50-70 投与によって膵島炎の程度は有意に減少しないものの、GAD に対する Th2 タイプの反応性が増大することにより糖尿病の発症が抑制される

ことから、

1) IGF-1 は糖尿病発症の最初のヘルパー T 細胞の感作には関わっていないが、1型糖尿病の発症過程における抗原カスケードの途中の段階に存在する。

2) IGF-1 の全配列の中でも IGF-1 50-70 ペプチドのアミノ酸配列が IGF-1 に特異的で1型糖尿病の発症過程における抗原として重要である。

という二つの可能性が示唆されたと言える。今後、IGF-1 50-70 のどの部分が MHC クラス II 抗原と強い親和性を有しているかなどを明らかにすることにより、IGF-1 もしくは IGF-1 50-70 の1型糖尿病発症のリスクを有する若年者への投与が免疫学的に発症を予防する手段として臨床応用される道が開けるものと期待している。

総括

1. 1型糖尿病における標的抗原としての IGF-1 の可能性を検討する目的で4週齢 (糖尿病発症以前) の雌性 NOD マウス (1型糖尿病のモデルマウス) に whole IGF-1 を皮下に注射し、その糖尿病発症に及ぼす影響を検討し、whole IGF-1 投与群において糖尿病発症率が他の候補抗原 (GAD, insulin) 投与群やコントロール群に比して有意に低いことが示された。

2. 次に、IGF-1 のどの部分が糖尿病の発症抑制に関与しているのか明らかにする目的で IGF-1 を構成する3種類のペプチド (8-23: AELVDALQFVCGDRGF 24-41: YFNKPTGYGSSRRAPQT, 50-70: RSCDLRR LEMYCPLKPAKSA) を皮下に注射し、その糖尿病の発症に及ぼす影響を検討し、IGF-1 50-70 投与群において糖尿病発症率が他の2種類のペプチド (8-23, 24-41) 投与群やコントロール群に比して有意に低いことが示された。

3. IGF-1 の一部を構成する3種類の各ペプチド (8-23, 24-41, 50-70) を投与されたマウスの脾細胞において、その抗原特異的刺戟に対するサイトカイン反応を検討したところ IGF-1 50-70 ペプチド投与群において GAD, インスリン, IGF-1 ペプチド (8-23, 50-70) 刺戟に対する Th2 タイプのサイトカイン反応が誘導されることが示された。

以上のことより IGF-1 を構成するペプチドのうち、特に 50-70 のペプチドが1型糖尿病の発症に関与する抗原のひとつとして重要であることが示唆された。また、同時に1型糖尿病の発症を抑制する治療法の手段として

IGF-1 50-70 の投与が有効である可能性が示された。

謝 辞

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孝男教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し、直接、御指導、御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。また、最後に本研究に御助言、御協力を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室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。

なお、本研究のうち、膵臓局所のサイトカインの検討については慶應義塾大学医学部内科学教室嶋原寿一先生が著者と同等の貢献者である。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成14年糖尿病実態調査。2003。
- 2) Gu K, Cowie CC, Harris MI : Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 21 : 1138-45, 1998
- 3) 佐々木陽, 上原ます子ほか：15年間にわたるインスリン非依存型糖尿病の追跡調査。(1) 糖尿病患者の生命予後と死因の変化。 *糖尿病* 39 : 31-38, 1996
- 4) Matsuura N, Fukuda K, Okuno A, Harada S, Fukushima N, Koike A, et al : Descriptive epidemiology of IDDM in Hokkaido, Japan : the Childhood IDDM Hokkaido Registry. *Diabetes Care* 21 : 1632-6, 1998
- 5) 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
- 6) International analysis of insulin-dependent diabetes mellitus mortality : a preventable mortality perspective. The Diabetes Epidemiology Research International (DERI) Study. *Am J Epidemiol* 142 : 612-8, 1995
- 7) 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 : 758-60, 1996
- 8) Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, et al : The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results. *Diabetes* 33 : 271-6, 1984
- 9) 小林哲郎：インスリン依存型糖尿病の予防。 *分子糖尿病学の進歩* : 144-150, 1997
- 10) 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 : 1063-7, 1996
- 11) 島田朗：IDDM 発症への免疫学的アプローチ。 *分子糖尿病学の進歩* : 89-93, 1996
- 12) Mori Y, Suko M, Okudaira H, Matsuba I, Tsuruoka A, Sasaki A, et al : Preventive effects of cyclosporin on diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 29 : 244-7, 1986
- 13) Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, et al : Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmunity* 4 : 237-48, 1991
- 14) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346 : 1685-91, 2002
- 15) Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, et al : Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366 : 69-72, 1993
- 16) 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 : 72-5, 1993
- 17) Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R : Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39 : 933-7, 1990
- 18) 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 USA* 88 : 10252-6, 1991
- 19) Daniel D, Gill GR, Schloot N, Wegmann D : Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 25 : 1056-1062, 1995
- 20) 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 USA* 87 : 1576-80, 1990
- 21) 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 USA* 88 : 3088-91, 1991
- 22) Elias D, Cohen IR : Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343 : 704-6, 1994
- 23) Overbergh L VD, Waer M, Mathieu C : Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11 : 305-312, 1999
- 24) Kaino Y, Hirai H, Ito T, Kida K : Prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by short-term

- and high-dose IGF-I treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11 : 267-72, 1998
- 25) Kaino Y, Hirai, H, Ito, T, Kida, K : Insulin-like growth factor I (IGF-I) delays the onset of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Res Clin Pract* 34 : 7-11, 1996
- 26) Bergerot I, Fabien, N, Maguer, V, Thivole, C : Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin Exp Immunol* 102 : 335-40, 1995
- 27) 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. *J Autoimmunity* 34 : 45-52, 2001
- 28) Quinn A, McInerney, B, Reich, EP, Kim, O, Jensen, KP, Sercarz, EE : Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes. *J Immunol* 166 : 2982-91, 2001
- 29) 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 : 330-7, 1996
- 30) 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 : 164-71, 2001
- 31) Heath V, Hutchings, P, Fowell, DJ, Cooke, A, Mason, DW : Peptides derived from murine insulin are diabetogenic in both rats and mice, but the disease-inducing epitopes are different : evidence against a common environmental cross-reactivity in the pathogenicity of type 1 diabetes. *Diabetes* 48 : 2157-65, 1999
- 32) Ramiya V, Shang, XZ, Pharis, PG, Wasserfall, CH, Stabler, TV, Muir, AB, Schatz, DA, Maclaren, NK : Antigen based therapies to prevent diabetes in NOD mice. *J Autoimmun* 9 : 349-56, 1996
- 33) 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 USA* 93 : 956-60, 1996
- 34) Hutchings P, Cooke, A : Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. *J. Autoimmunity* 11 : 127-30, 1998
- 35) Bergerot I, Fabien, N, Thivolet, C : Effects of insulin like growth factor-1 and insulin on effector T cells generating autoimmune diabetes. *Diabetes Metab* 22 : 235-9, 1996
-