

氏 名（本籍）	新 田 能 郎
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 4 8 5 号
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻
学位論文題目	抑制性サイトカイン遺伝子導入による自己免疫性 糖尿病発症の制御

（主 査）

論文審査委員	教授 田 林 暁 一	教授 豊 田 隆 謙
	教授 岡 本 宏	

# 論文内容要旨

ヘルパー T 細胞タイプ 1 (Th1) とタイプ 2 (Th2) のバランスが Th1 優位となることが自己免疫性糖尿病の疾患モデルとして知られる nonobese diabetic (NOD) マウスの発症に重要な役割を持つことが示唆されている。しかし Th1 誘導性または抑制性サイトカインは、その投与方法の差異で糖尿病発症に対する効果が異なり、一致した結果が得られていなかった。サイトカインを全身的に大量に反復投与する実験系には、血中濃度の高度の変動が繰り返されるためにそのサイトカインの生理的役割が反映されない可能性があること、予測し難い全身の免疫系への影響がありうること、等の問題点があると考えられた。

本研究では、まず (I) Th1 抑制性サイトカインである interleukin (IL) -10 の発現プラスミド DNA を若年 NOD マウスに筋注し、IL-10 を低いレベルではあるが持続的に供給することで自己免疫性糖尿病の発症を抑制し得るかどうかを明らかにすることを第 1 の目的とした。またこの手法により Th1 抑制性サイトカインによる発症抑制が明らかとなった場合、本疾患の自然発症過程に膵島局所で Th1 誘導性サイトカインである IL-12 の関与が示唆されるが、この点を明らかにするためには、膵島局所においてのみ IL-12 の作用を抑える実験系が更に必要と考えられた。そこで次に、(II) IL-12 に対して拮抗阻害作用を持つ IL-12p40 を膵島で発現するトランスジェニック (Tg) NOD マウスを作製し、そのマウスの糖尿病発症率を検討することにより、本疾患の自然発症過程において膵島炎局所で IL-12 が重要な役割を持つかどうかを明らかにすることを第 2 の目的とした。

(I) 筋細胞における強い発現が確認されているベクターである pCAGGS に、マウス IL-10 の cDNA を組み込み IL-10 発現プラスミド (pCAGGS-IL 10) を作製した。雌 NOD マウス 124 匹を対象とし、56 匹は pCAGGS-IL 10 を、53 匹は pCAGGS のみの筋注を行い、残り 15 匹は無処置とした。筋注を 3, 5 週齢に施行後の糖尿病発症率は、pCAGGS-IL 10 筋注群では pCAGGS 筋注群と比較し有意に抑制され ( $p < 0.001$ )、pCAGGS 筋注群の発症率が 83 % に達した 24 週齢の時点で、pCAGGS-IL 10 筋注群では 17 % であった。尚、pCAGGS 筋注群の発症率は無処置群と比較し有意差はなかった。また両筋注群の膵島炎進展度 (13 週齢時) は同等であったことから、浸潤細胞が異なる可能性が示唆された。プラスミドからの IL-10 mRNA の発現は、筋組織の RT-PCR 法により確認した。血清 IL-10 濃度の測定は ELISA 法で行い、IL-10 の低い持続的な発現により糖尿病発症が効果的に抑制されることが明らかとなった。

(II) ラットグルカゴンプロモーターの下流にマウス IL-12p40 の cDNA を組み込んだ導入遺

伝子 Glu-IL12p40 を用いて、NOD マウスの膵 $\alpha$ 細胞で IL-12p40 を発現する Tg マウスを作製し糖尿病発症率を検討した。対照群には negative littermates (non-Tg マウス) を用いた。17 系統得られた Tg マウスのうち、RT-PCR 法及びウェスタンブロット法によって導入遺伝子の発現を膵島において確認した 1 系統を繁殖させ、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> の雌を解析したところ、Tg マウスでは non-Tg マウスと比較し有意な発症抑制効果が認められ ( $p < 0.02$ )、non-Tg マウスの発症率が 67% に達した 23 週齢の時点で Tg マウスでは 8% であった。Tg マウスの膵島炎進展度は、11 週齢の時点で non-Tg マウスと比較し軽度であった。また血清 IL-12p40 濃度は両者間に有意差はなく、発現した IL-12p40 は膵島以外の臓器では IL-12 の作用を拮抗阻害していないと推定された。

以上の 2 つの実験より以下の 2 つの結論が得られた。

(I) IL-10 発現プラスミドの若年 NOD マウスに対する筋注により、IL-10 が低いレベルで持続的に発現され、自己免疫性糖尿病の発症は効果的に抑制される。Th1 抑制性サイトカインである IL-10 は投与が持続的であれば、従来の蛋白大量反復投与方法により低いレベルでの供給で効果が認められることが示された。またプラスミド DNA 筋注法によるサイトカイン投与は、自己免疫疾患の病態の制御に有用な遺伝子治療法であると考えられた。

(II) IL-12 の拮抗阻害作用をもつ IL-12p40 を NOD マウスの膵島局所において血清濃度を上昇させないレベルで発現させると、自己免疫性糖尿病の発症は効果的に抑制される。このことから本疾患の自然発症過程において、膵島炎局所では Th1 誘導性サイトカインである IL-12 が作用していることが示された。

## 審査結果の要旨

自己免疫疾患の病態の解明と制御に関する論文である。自己免疫性糖尿病の優れた疾患モデルである nonobese diabetic (NOD) マウスに、2種の遺伝子導入技術 [DNA 筋注法, トランスジェニック (Tg) マウス法] を用いて、ヘルパー T 細胞タイプ 1 (Th1) 抑制性サイトカイン [interleukin (IL)-10, IL-12p40] を発現させ、糖尿病発症に対する効果を検討した。

IL-10 発現プラスミド DNA の筋注を若年期に施行した NOD マウスの発症率は有意に抑制された ( $p < 0.001$ )。従来、DNA 筋注法は発現レベルが低く、全身的に蛋白を供給することは困難であったが、本研究では、筋細胞で強い活性を持つ pCAGGS を用い、プピバカイン前処置を併用することにより発現を高める工夫を行っている。DNA 筋注法による自己免疫の制御が初めて成功した点は重要である。また、従来のサイトカイン投与実験は、血中半減期が一般に短いことから (IL-10: ~20min.), サイトカイン蛋白を大量頻回に投与する手法が主流であったが、投与直後の高度な血中濃度の上昇とその後の急激な低下が繰り返され、生理的役割が反映されない危険性があった。この点を改善するため DNA 筋注法を用いた結果、Th1 抑制性サイトカイン (IL-10) は投与が持続的であれば従来の蛋白大量反復投与方法よりはるかに低いレベルでの供給で効果が認められることが明らかとなった。これは新たな知見である。

上記実験などにより、糖尿病自然発症過程に Th1 の関与が示唆されたため、Th1 誘導性サイトカインである IL-12 の拮抗阻害作用をもつ IL-12p40 を NOD マウスの膵島局所で発現させる Tg マウスを作製したところ、Tg マウスでは negative littermates (non-Tg マウス) と比較し有意な発症抑制効果が認められた ( $p < 0.02$ )。これまで自然発症過程に IL-12 が関与することを示す良い実験系がなく、IL-12 遺伝子を欠落させたノックアウトマウスを解析する手法も免疫系全体への影響が避けられない問題が指摘されていた。本研究では、Tg マウスの血清 IL-12p40 濃度は non-Tg と同等であり (ELISA 法)、また導入遺伝子の異所性発現はなかったことから (RT-PCR 法)、発現した IL-12p40 は膵島局所以外では、IL-12 の作用を拮抗妨害していないと考えられ、膵島局所においてのみ IL-12 の作用を抑える独創的な実験系を樹立することにより、糖尿病自然発症過程において、膵島炎局所で Th1 誘導性サイトカインである IL-12 が重要な役割をもつことを示した。

本研究は、自己免疫性糖尿病の病態の解明と制御に関する重要な知見を提供するものであり、臨床的意義も大きく、学位に値すると考えられる。