

氏 名 (本籍)	かわもと しゅん すけ 川 本 俊 輔
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1768 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 26 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	Suppression of Th1 cell activation and prevention of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by local expression of viral interleukin-10 (Viral Interleukin-10 遺伝子導入による自己免疫性糖尿病の発症抑制とその機序の検討)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教授 田 林 暁 一 教授 高 井 俊 行

教授 岡 本 宏

# 論文内容要旨

## 研究背景および研究目的

CD4陽性リンパ球は、産生するサイトカインの種類により主として2つの亜集団, Helper T cell type 1 (Th1) および Helper T cell type 2 (Th2) に分類される。Th1は主にIFN- $\gamma$ を産生し細胞性免疫に関わり, Th2は主にIL-4を産生し液性免疫に関わるとされている。Th1は, 自己免疫性糖尿病のモデル動物であるNon-obese diabetic (NOD) マウスにおいて, 自己免疫性膵島炎の発生と, それに引き続く膵 $\beta$ 細胞の破壊に, 深く関わっているとされる。そのため, Th1を抑制することで, NODマウスの自己免疫性糖尿病が抑制できないかという試みがなされてきた。

実際, Th1抑制性サイトカインであるIL-10を投与すると, NODマウスの糖尿病発症が効果的に抑制された。ところが, 膵島局所にIL-10を過剰発現するトランスジェニックマウスでは, 反対に膵 $\beta$ 細胞の破壊が進み, 糖尿病発症が促進された。これは, IL-10がTh1を抑制するだけでなく, CD8陽性リンパ球, 肥満細胞, Bリンパ球に対しては刺激活性も有するためと考えられている。

一方, EBウイルスの遺伝子にコードされるviral IL-10 (vIL-10)は, IL-10と高い相同性を示し, IL-10と同様にTh1を抑制するが, 免疫刺激活性はIL-10と比べて非常に弱いと報告されている。そのため, vIL-10はNODマウスの自己免疫性膵島炎において, IL-10とは異なる作用を及ぼす可能性が考えられた。

そこで本研究では, vIL-10のNODマウスの糖尿病発症に及ぼす影響を検討し, その機序を明らかにすることを目的とし, vIL-10とIL-10との作用の違いを考察する。

## 研究方法

- ① ラットグルカゴンプロモーターの下流にvIL-10のcDNAを組み込んだ導入遺伝子を作成し, マイクロインジェクション法にてNODマウスの受精卵の前核に注入し, 膵 $\alpha$ 細胞でvIL-10を発現するトランスジェニックNODマウス (Glu-vIL-10 Tg) を作製した。
- ② 発現の確認されたGlu-vIL-10 Tgを繁殖させ, 雌の糖尿病発症率を40週令まで追跡した。
- ③ 羊洗浄赤血球を用いた遅延型過敏反応を測定し, 発現されたvIL-10の免疫系全体への影響を検討した。
- ④ 雌のGlu-vIL-10 Tgの膵臓の組織切片を作製し, 膵島炎の程度を比較した。
- ⑤ 雌のGlu-vIL-10 Tgの膵臓の凍結切片を作製し, 細胞表面マーカーに対する抗体で免疫組織染色を行い, 浸潤細胞の種類を検討した。
- ⑥ 雌のGlu-vIL-10 Tgの膵臓からRNAを抽出し, 定量的RT-PCR法にて, 膵浸潤細胞の割合やサイトカインパターンを検討した。
- ⑦ 10週令の雄のGlu-vIL-10 Tgにサイクロフォスファミドを投与し, 糖尿病が誘導できるか検討した。

## 研究結果

- ① 2系統の独立したトランスジェニックマウス (Glu-vIL-10 Tg) が得られ、Western Blot 法にて膵島での vIL-10 の発現と分泌を確認した。
- ② 雌の糖尿病発症率は 2 系統共に、Glu-vIL-10 Tg において有意に ( $p < 0.001$ ) 抑制された。
- ③ 羊洗浄赤血球に対する遅延型過敏反応では、Glu-vIL-10 Tg と対照群とで有意な差はなかった。
- ④ Glu-vIL-10 Tg の膵組織像では、膵島周囲に強い細胞浸潤を認めたが、膵島内部への細胞浸潤を伴う膵島炎の程度は、対照群に比して軽度であった。
- ⑤ 細胞表面マーカーに対する免疫組織染色では、膵島周囲の浸潤細胞は主に CD4 陽性 T リンパ球と B220 陽性 B リンパ球であった。
- ⑥ 定量的 RT-PCR 法での検討では、Glu-vIL-10 Tg の膵臓では CD4 の mRNA 量が対照群に比して有意に増加しており、また IL-12p40 の mRNA 量が有意に減少していた。
- ⑦ サイクロフォスファミド投与にて雄の Glu-vIL-10 Tg に速やかに糖尿病を誘導できた。

## 結 論

膵 $\alpha$ 細胞で vIL-10 を発現するトランスジェニック NOD マウスの解析により、IL-10 トランスジェニック NOD マウスとは異なり、自己免疫性糖尿病の発症が効果的に抑制されることが明らかになった。一方、サイクロフォスファミド投与にてこのトランスジェニック NOD マウスに糖尿病が誘導できたことから、vIL-10 発現遺伝子の遺伝子導入により NOD マウスの疾患感受性遺伝子が不活化された可能性は低く、このトランスジェニック NOD マウスの解析により、vIL-10 の自己免疫性糖尿病抑制作用とその機序が明らかにできると考えられた。

まず、羊洗浄赤血球に対する遅延型過敏反応で変化がみられなかったことから、膵島での vIL-10 の発現は、全身的な細胞性免疫を抑制したのではなく、膵島局所での自己免疫反応を抑制したと考えられた。組織学上、CD4 陽性 T リンパ球と B220 陽性 B リンパ球を中心とした細胞浸潤が膵島周囲に認められたが、膵 $\beta$ 細胞の破壊につながる膵島内部への細胞浸潤は抑制されていた。また、膵でのサイトカイン産生も、IFN- $\gamma$  の産生増加はみられず、Th1 を誘導する IL-12p40 は抑制されていた。

つまり、膵 $\beta$ 細胞の周囲に CD4 陽性 T リンパ球が多いにも関わらず、その Th1 としての活性化が vIL-10 により効果的に抑制され、その結果として膵 $\beta$ 細胞の破壊と自己免疫性糖尿病の発症が抑制されたと考えられた。

## 研究の意義・独創的な点

本研究は、EB ウイルス由来のサイトカインである viral IL-10 を遺伝子導入により NOD マウスの膵島局所に作用させた点が独創的であり、Th1 優位な自己免疫反応における viral IL-10 の有効性を示すものである。また、cellular IL-10 と viral IL-10 との *in vivo* での作用の違いについての理解にも役立つと思われる。

## 審査結果の要旨

CD4 陽性 T リンパ球のなかで、主に細胞性免疫に関わる Helper T cell type 1 (Th1) は、ウイルス感染防御などに役立つばかりでなく、強力な炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  を産生し、移植片に対する急性拒絶反応や臓器特異的自己免疫反応における組織障害に深く関わっていることが明らかになっている。この Th1 の活性化を抑制することにより、移植片の生着期間の延長効果や臓器特異的自己免疫疾患の発症抑制効果が期待されている。

本研究では、EB ウイルスの遺伝子にコードされる viral IL-10 の *in vivo* での Th1 抑制作用を明らかにするために、I 型（自己免疫性）糖尿病のモデルである Non-obese diabetic (NOD) マウスを用い、腓ラ氏島局所で viral IL-10 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析している。viral IL-10 の発現の確認されたトランスジェニックマウスは、独立した 2 系統が樹立され、それぞれの系統で有意差をもって自己免疫性糖尿病発症抑制効果を確認している。さらに、免疫組織化学的手法により浸潤細胞の同定や、mRNA の定量により浸潤細胞量やサイトカインの定量化を行ない、Th1 の活性化が抑制されていることを明らかにしている。対照には、導入遺伝子の伝わらなかった同腹仔を性・週齢を揃えて使用しており、厳密な比較がなされている。本論文では、これらの実験結果を統計学的に評価しているだけでなく、そのひとつひとつを科学的に考察し、さらには、これまでの知見とも対比させ、結論を導き出している。

本論文は、臓器特異的自己免疫反応に対する viral IL-10 の *in vivo* での抑制作用を新たに証明したものであり、さらに、cellular IL-10 との比較においても、viral IL-10 がより優れた治療効果を発揮する可能性を示唆するものである。論文の構成も整っており、学位に値するものである。