



Title	臍島β細胞特異的CD4 T細胞クローンを用いたNOD-scidマウスへの糖尿病移入
Author(s)	吉田, 謙二
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39826">https://hdl.handle.net/11094/39826</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	吉田 謙二
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12380 号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	脾島β細胞特異的CD4 T細胞クローニングを用いたNOD-scidマウスへの糖尿病移入
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三
	(副査) 教授 平野 俊夫 教授 宮坂 昌之

## 論文内容の要旨

## 【目的】

I型糖尿病は自己反応性T細胞による脾ランゲルハンス島β細胞の破壊の結果引き起こされる一種の自己免疫疾患である。発症機序は大きく2つのステージ、すなわち、自己の成分に反応するT細胞が脾島に存在する自己抗原を認識して活性化される初期相と自己免疫性脾島炎が起こった後、脾島β細胞が完全に破壊され、糖尿病が発症するまでのエフェクター相に分けることができる。後者の機構を *in vivo* で解明するために、I型糖尿病モデルNODマウスよりNOD-scidマウスを作製し、それをレシピエントとして、NODマウス由来の種々のリンパ球集団あるいは脾島反応性CD4 T細胞クローニングを移入し、糖尿病再構築実験を行った。また、さらに、これら脾島反応性CD4 T細胞の機能的多様性を解析した。

## 【方法ならびに結果】

NOD-scidマウスの作製：CB17-scidマウスをNODマウスに戻し交配することによりNOD-scidマウスを作製した。N3～N4世代でNOD-scidマウスのscid/+の雌の約60%以上が糖尿病を発症し、疾患感受性遺伝子の全てを有していると考えられた。移入実験には、N6世代以上のNOD-scidマウスを用いた。

NODマウス脾細胞の移入：20週令以上の雌のNODマウス脾細胞よりMACS(magnetic cell separation)を用いてT細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞集団に分離した。各々の細胞をNOD-scidマウスに静注し、21日および35日後にシクロフォスファミド(CY)処理し、糖尿病の発症を調べた。NODマウス脾細胞およびT細胞を移入した場合、7週目までに全てのマウスが糖尿病を発症した。CD4 T細胞を移入した場合、脾細胞およびT細胞を移入した場合に比して糖尿病発症が遅れたが、糖尿病を誘導することができた。しかし、CD8 T細胞を移入したレシピエントは糖尿病を発症しなかった。

脾島反応性CD4 T細胞クローニングの移入：5種の脾島反応性CD4 T細胞クローニング(4-1-K1, 4-1-E2, 7-10-D3, 4-1-G4, 4-1-L6)を使用した。単独移入の場合には各クローニング  $4 \times 10^6$  個を2週間に3回腹腔内に移入し、最後の移入から3週間後に脾島炎を調べた。次いで、単独移入で最も強い脾島炎を誘導することができた4-1-L6 T細胞クローニングについては同様の細胞数を9回移入する実験も行った。さらに、これらのT細胞クローニングを混ぜ、同様に腹腔内に移入し、糖尿病の発症を調べた。脾島反応性CD4 T細胞クローニングを単独で移入することにより、NOD-scidマウスに脾島炎を誘導することができ、T細胞クローニング浸潤部位でのβ細胞の消失

が見られた。しかし、その程度は個々のT細胞クローンにより異なり、糖尿病発症までは至らなかった。また、9回移入した場合も、3回移入に比して強い膵島炎が観察されたが、全く浸潤していない膵島も認められ、糖尿病発症まで至らなかった。これらのT細胞クローンのうち4種を混ぜて移入した場合、T細胞クローンの浸潤している膵島の割合が単独移入では20%～60%であるのに対し約80%と高く、さらに観察を続けると8週目までに全てのマウスが糖尿病を発症した。

NODマウス由来T細胞と膵島反応性CD4T細胞クローンとの同時移入：NODマウス脾臓より分離したCD4T細胞またはCD8T細胞をNOD-scidマウスに静注し、さらに、膵島反応性CD4T細胞クローンの1つである4-1-E2T細胞クローンを腹腔内に移入し、21日および35日後にCY処理し、糖尿病の発症を調べた。膵島反応性CD4T細胞クローンとNODマウスCD4T細胞を同時に移入すると、NODマウスCD4T細胞の単独移入よりも糖尿病の発症が早くなり、36日目までに全てのマウスが糖尿病を発症した。一方、膵島反応性CD4T細胞クローンとNODマウスCD8T細胞を同時に移入した場合、糖尿病を発症するマウスは観察されなかった。以上の結果から、膵島反応性CD4T細胞クローンは他のCD4T細胞と協調して効率良く膵島を破壊することが明らかとなった。

膵島反応性CD4T細胞クローンの機能解析：膵島反応性CD4T細胞クローンを抗CD3抗体(2C11)で刺激し、サイトカイン遺伝子の誘導をRT-PCRにより測定した。その結果、各クローンはいずれもIFN- $\gamma$ を産生し、IL-4を産生しなかった。また、4-1-L6, 7-10-D3および4-1-G4ではIL-6とIL-10の産生がみられた。一方、Fas発現トランスフェクタントを用いた細胞傷害性アッセイの結果、4-1-K1と4-1-E2はFas依存性細胞傷害活性を有していた。すなわち、これらのT細胞クローンは2種の機能的グループ、典型的なTh1細胞(4-1-K1, 4-1-E2)とIFN- $\gamma$ に加えIL-6とIL-10を産生するT細胞(4-1-L6, 7-10-D3, 4-1-G4)に分かれることが判明した。

### 【総括】

これまでの糖尿病の移入実験では、内因性リンパ球の関与の可能性が捨てきれないものであった。そこで、我々はこの可能性をなくすためにT細胞およびB細胞の欠損するNOD-scidマウスを作製し、このマウスをレシピエントとした糖尿病の再構築実験を試みた。その結果、NODマウスの糖尿病移入にはB細胞は関与しておらず、CD4T細胞のみでも膵島 $\beta$ 細胞を破壊し、糖尿病を発症させることができることが明らかとなった。この結果は、CD4T細胞クローンを用いた実験によって確認されたが、T細胞クローンで糖尿病を誘導するには複数のクローンを同時に移入することが必要であった。糖尿病移入に複数のT細胞クローンが必要である理由として現在2つの可能性が考えられる。まず第1に自然発症の膵島炎における浸潤T細胞のTCRが非常に多様であることが知られており、今回用いたT細胞クローンも異なるTCRを発現していることから、糖尿病に至る膵島破壊には多様な特異性を持つT細胞集団が必要なのかもしれない。第2に今回の解析から、T細胞クローンは2種の機能的グループに分けられることが明らかになった。したがって、このような異なる機能を持つCD4T細胞の協調が効率的な糖尿病の発症に関与している可能性も十分考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ヒトのI型糖尿病の発症機構ならびにその治療法を確立する上で、ヒトのそれと同様な病態を示すNODマウスを用いた実験は非常に有用である。本研究では、I型糖尿病の膵島炎から糖尿病発症に至る機構をin vivoで解析するために、これまでに行われてきたin vivoでの糖尿病移入実験における問題点を解消する方法として、NODマウスの遺伝的背景を持つT細胞およびB細胞が欠損したSCIDマウスを作製し、種々の細胞を移入することによる糖尿病再構築実験を行い、CD4T細胞のみで糖尿病を誘導する系を確立した。また、この系を用いて、膵島細胞にMHCクラスII-I-A分子拘束的に反応するCD4T細胞クローンでも膵島炎を誘導できるが、糖尿病を誘導するには複数のT細胞の同時移入が必要であることを示した。さらに、膵島反応性CD4T細胞クローンの機能を解析し、用いたT細胞クローンは少なくとも、典型的なTh1T細胞でFas依存性細胞傷害活性を示すクローンとTh1細胞が産生するサイトカインの他にIL-6およびIL-10を産生するクローンの2つのグループに分けられることを明らかと

した。これらのクローンはいずれも異なるT細胞レセプターを発現していることが明らかとなっている。従って本研究は、NODマウスにおける効率的な糖尿病発症には、膵島反応性CD4 T細胞の特異性の多様性だけではなく、それらの機能的多様性も大きく寄与している可能性を示唆しており、I型糖尿病の治療法を考える上でも重要な知見と考えられ、十分学位に値するものである。