



## ANALYSIS OF PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE INSULITIS IN NOD MICE : ADOPTIVE TRANSFER EXPERIMENTS OF INSULITIS IN ILI AND NOD NUDE MICE

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 守孝 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1520">http://hdl.handle.net/10271/1520</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 243号	学位授与年月日	平成 8年 9月 6日
氏名	中村守孝		
論文題目	<p>ANALYSIS OF PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE INSULITIS IN NOD MICE : ADOPTIVE TRANSFER EXPERIMENTS OF INSULITIS IN ILI AND NOD NUDE MICE  (NOD マウスにおける自己免疫性膵島炎発現の病因分析: ILI ノードマウスと NOD ノードマウスにおける膵島炎の養子移入実験)</p>		

博士(医学) 中村守孝

論文題目

ANALYSIS OF PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE INSULITIS IN NOD MICE: ADOPTIVE TRANSFER EXPERIMENTS OF INSULITIS IN ILI AND NOD NUDE MICE

(NOD マウスにおける自己免疫性膵島炎発現の病因分析: ILI ヌードマウスと NOD ヌードマウスにおける膵島炎の養子移入実験)

論文の内容の要旨

【はじめに】非肥満型糖尿病 (NOD) マウスはインスリン依存性糖尿病 (IDDM) のモデル動物として作出され、その膵島炎発現とそれに続いて起こる膵島  $\beta$  細胞の破壊は膵島  $\beta$  細胞に対して特異的に成立した細胞性免疫に基づく自己免疫性機序によるものであることが知られている。一方、ILI マウスは NOD マウスと同じクローズドコロニー (Jcl:ICR) から作出された近交系マウスで、膵島炎・糖尿病発症に最も強い影響を与える主要組織適合性 (MHC) 遺伝子が NOD マウスと一致するにも関わらず、ILI マウスでは膵島炎の発現がみられない。今回、我々はこれら両種のマウスの免疫機構の異同につき比較検討し、ILI マウスで欠損する膵島炎疾患感受性遺伝子の座につき考察を加えたのでここに記述する。

【材料と方法】NOD マウス、ILI マウス、NOD ヌードマウス (NOD-*nu/nu*) 及び ILI ヌードマウス (ILI-*nu/nu*) は我々の実験動物施設において継代飼育された。ILI マウスは加藤秀樹博士 (実験動物中央研究所) より提供された。ILI マウス雌に Balb/c ヌードマウス (Balb/c-*nu/nu*) 雄を交配して得られた (ILI  $\times$  Balb/c-*nu/nu*) F<sub>1</sub> マウス同士を交配して ILI-*nu/nu* (M1) を作出し、更に (ILI  $\times$  M1) F<sub>1</sub> 同士を交配して ILI-*nu/nu* (M2) を作出した。同様にして ILI-*nu/nu* (M3~M10) 及び NOD-*nu/nu* (M11) を作出した。

脾リンパ球・マクロファージ分画 (脾細胞) は、10%胎仔牛血清加 RPMI-1640培養液により調整した浮遊液を用いた。

CD4陽性 T 細胞は、Mini MACS システム及び抗 CD4磁気マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, ドイツ) を用いて分離・抽出した。脾細胞及び CD4陽性 T 細胞は200  $\mu$  l の RPMI-1640 に浮遊させ、腹腔内注入により養子移入した。対照群には RPMI-1640を200  $\mu$  l 注入した。

胸腺原基は、胎生16~18日の胎児マウスから得られたものを1.5mM-deoxyguanosine で処理しヌードマウスの腎被膜下に移植した。

T 細胞のサブセットについては、CD4 (9861SB; GIBCO BRL, Gaithersbury, MD)、CD8<sub>a</sub> (9868SB; GIBCO BRL)、Thy1.1 (Meiji, Tokyo, 日本)、Thy1.2 (Meiji) 及び H-2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup> (CL9007A; Cedarlane, Ontario, カナダ) に対する単クローン性抗体によって細胞を染色し、EPICS Profile (Coulter Electronics, Miami, FL) を用いて、フローサイトメトリーによる分析を行った。

【結果】IDDM 発症 NOD マウスの脾細胞を ILI-*nu/nu* (M10) 4 匹に移入し、2 匹で膵島炎を惹起し得た。惹起し得なかった2 匹では、NOD マウスの T 細胞である Thy1.2陽性細の残存数はそれぞれの脾細胞の3.6%、0.2%であった。ILI-*nu/nu* (M5-7) 15匹で行なった同実験では、膵島炎惹起には6%以上の NOD-T 細胞の存在を必要とするという結果をえている。しかし、Balb/c-*nu/nu* 4 匹への移入では、膵島炎は惹起され得なかった。更に、IDDM 発症 NOD マウスの CD4陽性 T 細胞を移入した ILI

-*nu/nu* (M10) 4匹中2匹で膵島炎を惹起し得た。このことから、NOD と ILI には共通の標的抗原が発現していることが判明した。

NOD マウスの胸腺を移植した ILI-*nu/nu*29匹中20匹で ILI マウスの成熟 T 細胞である Thyl.1陽性細胞の数が ILI-*nu/nu* のそれより多く、移植胸腺は機能したと考えられ、ILI マウスの胸腺を移植した NOD-*nu/nu*21匹中12匹でも同様の理由で移植胸腺は機能したと考えられたが、いずれの場合も膵島炎は惹起され得なかった。つまり、NOD マウスの胸腺で教育された ILI-*nu/nu* の T 細胞も ILI マウスの胸腺で教育された NOD-*nu/nu* の T 細胞も膵島炎を惹起し得なかったことになる。

ILI マウスの脾細胞を生後4～5日齢の NOD マウスに移入した結果、雌16匹中15匹で、雄12匹中前例で膵島炎が観察され、対照群と差がなく、ILI マウスの脾細胞による膵島炎発現抑制の要素は除外され得る。

【結論】 ILI マウスは膵島炎発現に関わる標的抗原を発現しているが、膵島炎を惹起する T 細胞の成熟は ILI マウスにおいては T 前駆細胞と胸腺の両者において抑えられている。

### 論文審査の結果の要旨

インスリン依存性糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus ; IDDM) の発症の際には細胞性免疫に基づく自己免疫性膵島炎が好発するが、標的抗原の発現性や、主要組織適合性 (MHC) 遺伝子や膵島炎疾患感受性遺伝子の関与などについては不明な点が多い。申請者は IDDM のモデル動物である非肥満型糖尿病 (non obese diabetes ; NOD) マウス、それと同じクローズドコロニー (Jcl : ICR) 由来の ILI マウス、それぞれのヌードマウスや交配雑種を用い、NOD-T 細胞の養子移入法による膵島炎の発症とその標的抗原の発現性を、胸腺移植による胸腺内での T 細胞教育の成立の観点から解析した。

申請者の口頭発表と論文内容に関し審査した結果、評価された内容は次のとおりである。

- (1) 用いた材料、および方法は本研究目的を解明するために適切であり、また、精度や再現性などにも問題は無いと判断された。すなわち、実験動物としては、NOD マウス、ILI マウス、それぞれのヌードマウス、およびその交配雑種 (NOD-*nu/nu*、ILI-*nu/nu*) を用いた。養子移入実験は脾細胞、あるいは脾細胞浮遊液から Mini MACS システムと抗 CD4磁気マイクロビーズ法で分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞をそれぞれ腹腔内に投与して施行した。胸腺移植は胎生16～18日齢胸腺原基をヌードマウスの腎被膜下に移植して行った。なお、T 細胞亜群は各種膜抗原に対する単クローン抗体を用いて、EPICS profile による flow cytometry で解析した。
- (2) IDDM 発症 NOD マウスの脾細胞、あるいは CD4<sup>+</sup>T 細胞の ILI-*nu/nu* マウス (M10) への養子移入により、それぞれ4匹中2匹で膵島炎が惹起された。しかし、Balb/c-*nu/nu* マウスへの移入では惹起されなかった。この事実から申請者は NOD マウスと ILI マウスには共通の標的抗原が発現されていると推論した。
- (3) NOD マウスの胸腺原基の移植を受けた ILI-*nu/nu* マウスや、ILI マウスの胸腺移植を受けた NOD-*nu/nu* マウスでも、Thyl.1<sup>+</sup>成熟 T 細胞が増加し胸腺移植が機能していたが、いずれの場合も膵島炎は惹起されなかった。また、ILI マウス脾細胞の生後4～5日齢の NOD マウスへの移入実験では、ほとんど全例で膵島炎が観察された。これらの所見から申請者は、いずれのマウスの胸腺で教育された T 細胞でも膵島炎誘発能を欠如していると考え、さらに ILI マウスで膵島炎が発現しない原因として、標的抗原が発現されているにもかかわらず胸腺内において何らかの機序で標的抗原反応性 T 細

胞の分化・成熟が選択的に抑制されているためである、と推論した。

本論文は NOD マウスと ILI-*nu/nu* マウス間の脾細胞、あるいは T 細胞の養子移入実験系と、胸腺移植法の両方をたくみに利用し、自己免疫性膵島炎の発症とその抑制機構の解明を試み、胸腺内での T 細胞教育の重要性を明らかにした点において、高い評価が与えられた。残された問題を明らかにし、さらに研究を発展することが期待された。

審査の過程において申請者に対し次のような質疑がなされた。

- 1) NOD マウス脾細胞の ILI-*nu/nu* マウスへの養子移入実験において、惹起された膵島炎局所でリンパ球浸潤像と  $\beta$  細胞の選択的破壊像を組織学的に確認したか
- 2) 同上養子移入実験において、他臓器（甲状腺や顎下腺など）でリンパ球浸潤はみられないか
- 3) 膵島炎発症率に性差が認められるか、また NOD マウスの IDDM が雌に好発する理由について
- 4) 膵島炎の程度と糖尿病発症率との相関について
- 5) ラ氏島  $\beta$  細胞に対してキラー活性を発揮する T 細胞亜群と、その作用機序について
- 6) 膵島炎の発症機序と標的抗原について
- 7) ILI マウス T 細胞中に膵島炎や IDDM の抑制細胞が存在する可能性
- 8) NOD マウス T 細胞中に含まれる IDDM 特異的 T 細胞クローンを分離し、*in vitro* 系においてキラー活性を測定できないか

以上の質疑に対し申請者はほぼ適切な解答をおこなったので、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと審査委員全員が判定した。

論文審査担当者	主査	教授	山下	昭			
	副査	教授	金子	榮蔵	副査	教授	筒井祥博
	副査	講師	大橋	弘幸	副査	講師	田港朝彦