

## 5. NOD マウスの免疫・病理

東海大学医学部免疫学教室

渡辺賢治, 垣生園子

### はじめに

ヒトの糖尿病は、インスリン依存性のIDDMと、インスリン非依存性のNIDDMに大別される。これら二つの病型は発症年齢、発病の仕方、臨床像、病理、遺伝に差異が見られることから、別々の疾患単位と考えられている。

IDDMの臨床的特徴としては、1. 多くは若年者。2. 自己のインスリン分泌はほとんど欠損する。3. ケトosisを起こしやすく、治療にインスリンが必要。インスリンを中断すれば速やかにケトアシドーシスを起こし、ついには昏睡となる。4. しばしばICA, ICSPAなどの自己抗体が陽性に出る、が挙げられる。

IDDMの発症機構には自己免疫機序が強く示唆されており、特にそれに関わる一つの遺伝子としてHLAあるいはHLAと強く連鎖する遺伝子領域が疾患の発症を規定しているとも考えられているが、詳細に関しては不明である<sup>1,2)</sup>。

その研究にはモデル動物が必要である。現在IDDMのモデル動物として、NODマウス、BBラット、CHAチャイニーズハムスターなどが使われている。このうちNODマウスはICRマウスを起源とするCTSマウスの亜系で近交系として日本人により確立された自然発症のIDDMのモデル動物である<sup>3)</sup>。本稿ではこのマウスの特徴を病理・免疫学的立場からヒトとの比較において紹介する。

### 1. 膵島炎と浸潤細胞

発症直後の小児IDDM患者の膵島にリンパ球浸潤が見られることを初めて報告したのはWarrenで、この病理学的所見にinsulinitisなる名称を与えたのはMeyenburgである<sup>4)</sup>。Bottazzoらは、膵島に浸潤している細胞はT細胞が主体で、その多くは細胞傷害性T細胞あるいはサブプレッサーT細胞であるがヘルパーT細胞やNK (natural killer)細胞も存在し、また、IgG産生細胞が血管から膵島周囲にかけて認められるとともに膵島細胞自体には免疫グロブリンの沈着が認められたと報告した<sup>5)</sup>。

一方NODマウスの糖尿病もヒトにおけるIDDMのように、前駆症状のない状態で突然出現する。その発症は12週齢頃より始まり30週齢における累積発症率は雄で20%以下、雌で80%前後と雌雄差がみられる。NODマウスでも糖尿病の発症に先行して膵島炎を起こす。

NODマウスにおける膵島炎は4週齢ごろより始まり単核細胞の浸潤は膵島の一部より膵島を取り囲むように進展する(図1)。9週齢時には雌雄ともほぼ100%近くのNODマウスに膵島炎が出現する<sup>3)</sup>。しかし浸潤の程度は同一週齢でもマウスにより、また同一マウスでも膵島により差が認められる。膵島に浸潤している細胞はT細胞が主体でそのうちヘルパーT細胞がほとんどであり、他に免疫グ

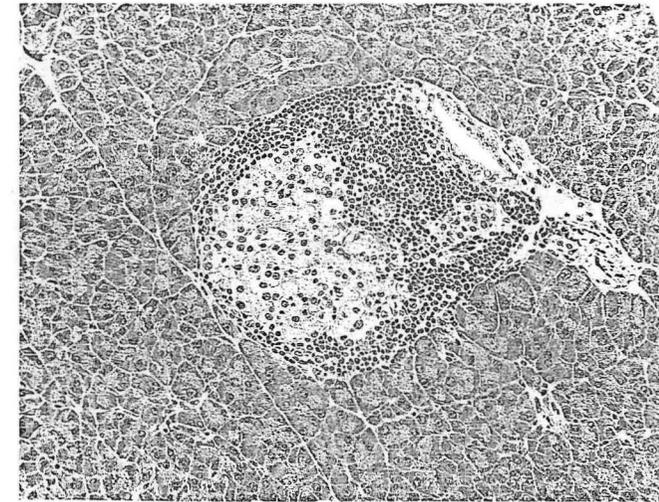


図1 12週齢雌性NODマウスの膵病理所見  
膵島を取り囲むようにリンパ球浸潤が見られる。  
(HE染色, ×200)

ロブリン保有細胞やNK細胞がみられると報告された<sup>6)</sup>。一方抗IgMで染色される細胞が優位であるとの報告もある<sup>7)</sup>。Signoreらの詳細な研究によると浸潤リンパ球subsetは週齢数と関係なくIgM陽性細胞が優位であったと報告している<sup>8)</sup>。我々はB細胞の検索のため抗IgM抗体ではなく抗B220で染色したところ、膵島炎の初期からB220陽性細胞は存在した。同時期に出現するThy1.2陽性細胞はL3T4陽性細胞がLyt2陽性細胞に比して優位であった(図2)。

このように膵島炎浸潤細胞の内訳は様々であるが膵島炎はT細胞依存性の自己免疫疾患であるとの見方が強い。このことはヌードNODマウスで膵島炎の認められないこと<sup>9)</sup>、糖尿病NODマウスの細胞による糖尿病の移入が可能であることにより支持されている<sup>10,11)</sup>。さらに抗L3T4抗体<sup>12,13)</sup>や、抗Lyt2抗体<sup>14)</sup>の投与により糖尿病の発症は阻止されることから、糖尿病誘発にはL3T4陽性細胞、Lyt2陽性細胞の両方が関与していると考えられる<sup>11)</sup>。

### 2. MHC分子の発現と膵島炎の関連性

BottazzoらはIDDM患者の剖検で膵島細胞が新たにIa抗原(HLA-DR抗原)を発現していると報告し<sup>5)</sup>、膵β細胞膜表面上に、通常認められないはずのMHC Class II抗原が発現し(aberrant expression)、その発現したClass IIをT細胞が直接認識し、自己免疫反応を引き起こす、という仮説を提唱している。FoulisらはIDDM患者の膵細胞にDR抗原の発現を認めたが<sup>15)</sup>、それに先立ちClass Iのhyperexpressionが起こり、引き続き膵島炎が惹起される。膵島炎には必ずしもClass IIのaberrant expressionを伴うとは限らずClass IIのaberrant expressionは必ずしもfirst eventとはいえないと結論している<sup>16)</sup>。

NODマウスにおいても、Class II抗原が膵島細胞に発現しているか否かに関しては見解は一致していない。生後5日目より24週齢までのNODマウスすべてにClass II抗原が発現しているとの報告がある<sup>17)</sup>一方、どの時期に

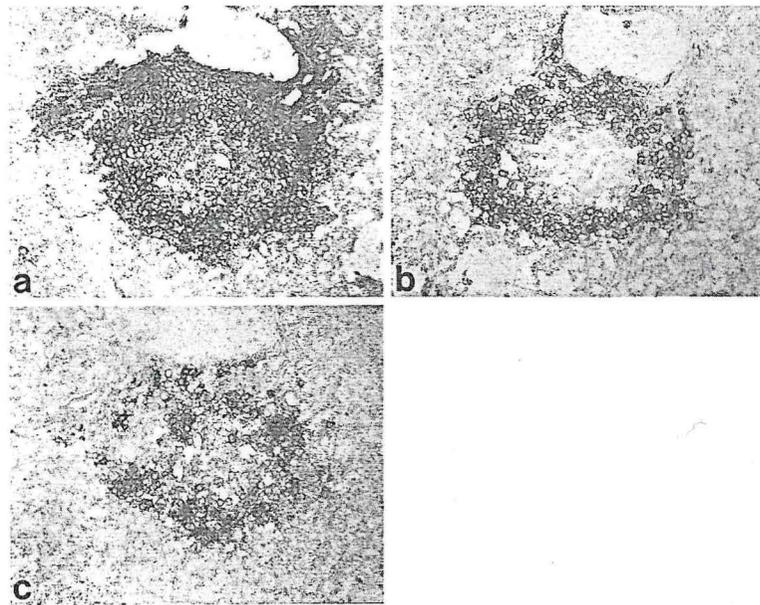


図2 酵素抗体法による18週齢雄性NODマウスの膵島浸潤リンパ球subsetの分布  
 a : Thy 1.2陽性細胞(ABC法, ×400)  
 b : L3T4陽性細胞 ( " )  
 c : Lyt2陽性細胞 ( " )

においてもClass IIのaberrant expressionは認められないという報告<sup>9, 18)</sup>や、糖尿病BBラットでは電顕的にClass II抗原陽性のインスリン顆粒含有細胞はβ細胞を貪食したmonocyteであるという報告<sup>19)</sup>などNODではClass IIのaberrant expressionに否定的である。

β細胞におけるClass II抗原の発現が膵島炎のinitiatorと成りえるかどうかを証明するためにβ細胞にのみClass II抗原を発現させたtransgenicマウスによる検討がなされている。Sarventnicら<sup>20)</sup>やLoら<sup>21)</sup>はそれぞれ過剰量のI-A抗原やI-E抗原を発現させたtransgenicマウスを作製したところ、これらのマウスでは膵島が萎縮して糖尿病が発症したが膵島炎は起こらなかった。一方、Class II抗原を過剰発現したtransgenicマウスでも膵

島炎を伴わない膵島萎縮と糖尿病発症が認められた。Böhmeら<sup>22)</sup>は膵β細胞のClass II抗原量が静止期のBリンパ球と同程度という生理的な量を発現させたtransgenicマウスを作製したが、このマウスは糖尿病も膵島炎も認められなかった。これらの実験結果はtransgenicという特殊な条件ではあるが、Class II抗原のaberrant expressionのみでは膵β細胞に対する自己免疫反応が発動しないことを示唆している。

一方、KolbらはBBラットにて膵島炎初期、すなわちリンパ球が浸潤する以前にまずmacrophageが膵島に遊走してくることを報告し<sup>23)</sup>、macrophageによる膵ラ氏島自己抗原の提示が膵島炎のinitial lesionであるとしている。NODマウスにおいても、macrophage

に対して選択的毒性を有するシリカ<sup>24)</sup>の投与により、糖尿病および膵島炎が抑制されることからmacrophageが膵島炎に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>25, 26)</sup>。

### 3. 膵島破壊のエフェクター

免疫電顕による観察によれば、Lyt2陽性細胞傷害性T細胞が直接膵β細胞を傷害していると報告されている<sup>27)</sup>。また、膵島に浸潤している細胞をrecombinant IL2で増殖させるとLyt陽性でNODマウス膵島に傷害性を持つリンパ球が誘導された<sup>28)</sup>。われわれはperforin (pore forming protein)に対するモノクローナル抗体を用い、膵島細胞浸潤細胞中にperforin保有細胞が存在することを証明した(投稿中)。Youngら<sup>29)</sup>はpolyclonalな抗perforin抗体を用いやはり膵にperforin陽性細胞を見出し、それらはLyt2陽性細胞であったと述べている。これらの事実から膵ラ氏島β細胞破壊のeffector細胞としてLyt2陽性細胞は有力な候補と思われるがperforin保有のLyt2陽性細胞はpopulationが少なく、これのみで膵島破壊の全てが説明できるかどうかは疑問である。

以上MHC拘束性の膵破壊機序とともに、以下のようなMHC非拘束性の膵破壊機序が考えられている。発症直後のNODマウスではADCC活性が高まっていることが観察されている<sup>30)</sup>。またcyclophosphamide誘発糖尿病NODマウスでADCC活性、NK活性の上昇を認めている<sup>31)</sup>。またその他、膵島破壊のeffectorと考えられているものにはIL1<sup>32, 33)</sup>が挙げられる。Rabinovichら<sup>34)</sup>はIL-1β, IFN-γ, TNF単独では膵島障害作用は認められないが、IL-1βとIFN-γもしくはIL-1βとTNFを組み合わせることにより膵島細胞傷害を示

すと報告している。岡本ら<sup>35, 36)</sup>は膵β細胞の破壊機序として膵β細胞で生じたfree radical oxygenがDNAを破壊すると説明している。これらcytokineやfree radical, 免疫担当細胞が複雑に絡み合ってβ細胞の破壊を起こすものと考えられる。

### 4. 免疫遺伝学的知見

NODマウスにおける糖尿病発症は100%ではないが膵島炎発症はほぼ100%である。牧野らはこのことに着目しNODマウスとsister strainであるNONマウス、NODマウスと血縁関係のないC57BL/6との交配実験の結果、NODマウスの糖尿病発症には少なくとも2個の劣性遺伝子が関与していることを示し、一つはマウス第17染色体上にあって、MHCに連鎖しており、もう一つは第9染色体上にあり、Thy1に連鎖した遺伝子であることを示した<sup>37)</sup>。NODマウスのMHCはユニークである。Class IはK<sup>d</sup>D<sup>b</sup>でNOD特有のものではないが、Class IIはEα遺伝子発現がmRNAレベルで欠失しておりそのためI-E分子は細胞表面に発現されていない<sup>38)</sup>。Eβは存在しているが、そのハプロタイプは不明である。このためI-Eを発現しているマウスでは胸腺でclonal deletionが起こるべきVβ5等の特殊なTcRを有するT細胞クローンが、NODマウスにおいては除去されることなく末梢に出ている(図3)。I-Aについては遺伝子が単離され塩基配列が決定されている<sup>39)</sup>。そしてAα鎖はBALB/cと同じdハプロタイプであることがわかった。Aβ鎖は大部分dハプロタイプであるが、いくつかのアミノ酸は特有であり、特に第56, 57番目のアミノ酸配列が他のマウスではPro, Aspとなっているのに対し、NODではHis, Serとなっていることが明ら

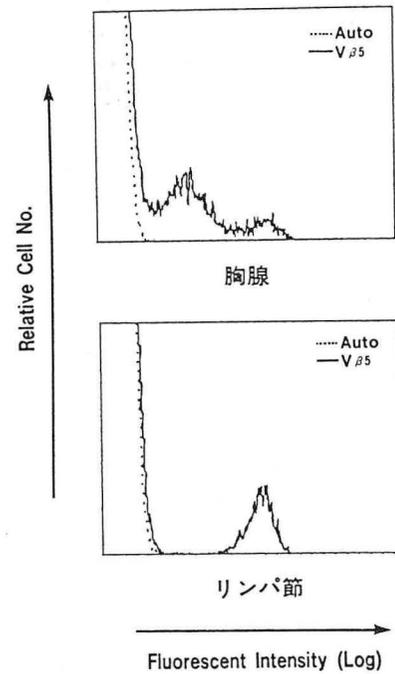


図3 NODマウス胸腺・リンパ節のVβ陽性細胞のフローサイトメトリー解析

かとなった。マウスのAβ鎖はヒトのHLAのDQβ鎖に相当すると考えられている。コーカシア人のIDDMの90%以上がDQβ鎖の57番目がAsp以外のアミノ酸、たとえばSerなどにかわっている。そして57番目のアミノ酸がAspであると糖尿病抵抗性となる<sup>40)</sup>。日本人ではDQβ鎖の57番目がAspである頻度が高いためIDDMが少ないと考えられた。しかし日本人の場合、IDDMであってもこの57番目がAspとなっている頻度が高く、Toddらの報告に合わない結果が得られた<sup>41)</sup>。いずれにしてもNODマウスの知見がコーカシア人のIDDM患者と類似しておりAβ鎖の異常が膵島炎と関係があると考えられている。

最近、自己免疫疾患モデル動物において特定のMHCとTcR usageと疾患との間に関連があることが知られてきた<sup>42,43)</sup>。Experimental autoimmune encephalitis (EAE)では、autoreactiveなT cell cloneが得られている

が、そのほとんどが同じTcR Vβ鎖を発現している<sup>43)</sup>。Janewayら<sup>44)</sup>は膵島炎を起こしている浸潤リンパ球からクローン化したリンパ球がVβ5を発現するL3T4<sup>+</sup>, Lyt2<sup>+</sup> T細胞であり、このクローンをX線照射した幼若NODマウスに移入したところ糖尿病を誘発することができたと報告している。中野らの膵島浸潤細胞はmonoclonalではなくheterogeneousな集団でTcR Vβ6, Vβ8, Vβ11などが認められたと報告している<sup>45)</sup>。またNODマウスにTcR Vβ8に対するモノクローナル抗体を投与したところ膵島炎が抑えられたとの報告もあり<sup>46)</sup>、NODマウスのTcR Vβに関しては一致した見解が得られておらず、NODマウスの糖尿病発症機構としてEAEマウスをモデルとしたようなモノクローナルなTcRを発現するTリンパ球で説明することは困難かもしれない。

I-Eの欠損がNODマウスにおける膵島炎発症に関与しているか否かを明らかにする目的でI-Eadを導入したトランスジェニックマウスを作製した。その結果、膵島炎発症を阻止できた。ただし導入遺伝子は、リンパ球やマクロファージには発現されていたが、膵島細胞には発現されていなかった。I-Eの欠損がNODマウスにおける膵島炎発症に強い関わりをもっている可能性が示唆され、今後の研究が待たれる。

#### 文 献

- 1) Kawa, A. In: Clinicogenetics Genesis of Diabetes Mellitus. Excerpta Medica, Amsterdam. p105, 1983.
- 2) Pak, C.Y., Eun, H-M., McArthur, R.G. and Yoon, J-W. Lancet 1: 1, 1988.
- 3) Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y. and Katagiri, K. Exp. Anim. 29: 1, 1980.
- 4) 野中恭平 代誌 15: 29, 1987.

- 5) Bottazzo, G.F., Dean, B.M., McNally, J.M., Mackay, E.F., Swift, P.G.F. and Gamble, D.R. N. Engl. J. Med., 313: 353, 1985.
- 6) Miyazaki, A., Hanafusa, T., Yamada, K., Miyagawa, J., Fujino-Kurihara, H., Nakajima, H., Nonaka, K. and Tarui, S. Clin. Exp. Immunol. 60: 622, 1985.
- 7) Kanazawa, Y., Komeda, K., Sato, S., Mori, S., Akanuma, K. and Takaku, F. Diabetologia 27: 113, 1984.
- 8) Sigore, A., Pozzili, P., Gale, E.A.M., Andeani, D. and Beverley, P.C.L. Diabetologia 32: 282, 1989.
- 9) Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y. and Hayashi, Y. Exp. Anim. 35: 495, 1986.
- 10) Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C. and Bach, C. J. Exp. 166: 823, 1987.
- 11) Miller, B.J., Appel, M.C., O'neil, J.J. and Wicker, L.S. J. Immunol. 140: 52, 1988.
- 12) Wang, Y.I., Hao, L. and Gill, R.G. Diabetes 36: 535, 1987.
- 13) Koike, T., Itoh, Y., Ishii, T., Ito, I., Takabayashi, K., Maruyama, N., Tomioka, H. and Yoshida, S. Diabetes 36: 539, 1987.
- 14) Charlton, B., Bacelj, A. and Mandel, T. Diabetes 37: 930, 1988.
- 15) Foulis, A.K. and Farquharson, M.A. Diabetes 35: 1215, 1986.
- 16) Foulis, A.K. and Farquharson, M.A., Hardman, R. Diabetologia 30: 303, 1987.
- 17) Hanafusa, T., Fujino-Kurihara, H., Miyazaki, A., Yamada, K., Nakajima, H., Miyagawa, J., Kono, N. and Tarui, S. Diabetologia 30: 104, 1987.
- 18) Signore, A., Cooke, A., Pozzili, P., Butcher, G., Simpson, E. and Beverley, P.C.L. Diabetologia 30: 902, 1987.
- 19) Int'Veld, P.A. and Pipeleers, D.G. J. Clin. Invest. 82: 1123, 1988.
- 20) Sarventnic, N., Liggitt, D., Pittis, S.L., Hansen, S.E. and Stewart, T.A. Cell 51: 773, 1988.
- 21) Lo, D., Burkly, L.C., Widera, G., Cowing, C., Flavell, R.A., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. Cell 53: 159, 1988.
- 22) Böhme, J., Haskins, K., Stecha, W., Van Ewijk, W., LeMeur, M., Gelingher, P., Benoist, C. and Mathis, D. Science 244: 1179.
- 23) Hanenberg, H., Kolb-Bachofen, V., Kantweg, G., et. al. Diabetologia 32: 126, 1989.
- 24) Levy, M.H. and Wheelock E.F. J. Immunol. 115: 41, 1975.
- 25) Charlton, B., Bacelj, A. and Mandel, T.E. Diabetes 37: 930, 1988.
- 26) Lee, K-U., Amano, K. and Yoon, J-W. Diabetes 37: 989, 1988.
- 27) Shimizu, J., Ikehara, S., Toki, J., Ohtsuki, H., Yasumizu, R. and Hamashima, Y. Acta. Histochem. Cytochem. 20: 9, 1987.
- 28) Nagata, M., Yokono, K., Hayakawa, M., Kawase, Y., Hatamori, N., Ogawa, W., Yonezawa, K., Shii, K. and Baba, S. J. Immunol. 143: 1155, 1989.
- 29) Young, L.H.Y., Peterson, L.B., Wicker, L.S., Persechini, P.M. and Young J.D-E. J. Immunol. 143: 3994, 1989.
- 30) Nakajima, H., Yamada, K., Hanafusa, T., Fujino-Kurihara, H., Miyagawa, J., J., Miyazaki, A., Saito, R., Minami, Y., Kono, Nonaka, K., Tochino, Y. and Tarui, S. Immunol. Lett. 12: 91, 1986.
- 31) 丸山太郎, 柳川達生, 浅葉義明, 武井 泉, 片岡邦三, 石井寿晴 糖尿病動物 3: 28, 1989.
- 32) Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T., Molving J., Halqvist, S., Wogensens, L. and Egeberg, J. Diabetes Care 11(suppl. 1): 16, 1988.
- 33) Bendzen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J.H., Dinarello C.A. and Swenson, M. Science 232: 1545, 1988.

- 34) Pukel, C., Baquerizo, H. and Rabinovitch, A. *Diabetes* 37: 133, 1988.
- 35) Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H. *Nature* 294: 284, 1981.
- 36) Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A. and Okamoto, H. *J. Biol. Chem.* 257: 6084, 1982.
- 37) Makino, S., Muraoka, Y., Kishimoto, Y. and Hayashi, Y. *Exp. Anim.* 34: 425, 1985.
- 38) Hattori, M., Buse, J.B., Jackson, R.A., Glimcher, L., Dorf, M.E., Minami, M., Makino, S., Horiwaki, K., Kuzuya, H., Imura, H., Strauss, W.M., Seidman, J.G. and Eisenbarth, G.S. *Science* 231: 233, 1986.
- 39) Atkinson, M. A. and Maclaren, N.K. *Diabetes* 37: 1587, 1988.
- 40) Todd, J.A., Bell, J.I. and McDevitt H.O. *Nature* 329: 599, 1987.
- 41) Awata, T., Kuzuya, K., Masuda, A., Iwamoto, Y., Kanazawa, Y., Okuyama, M. and Juji, T. *Diabetes* 39: 266, 1990.
- 42) Singer, P.A., McEvelly, R. J. and Noonan D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 7018, 1986.
- 43) Acha-Orbea, H., Mitchel, D.J., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, M.K., Zambil, S.S., McDevitt, H.O. and Steinman, L. *Cell* 54: 263, 1988.
- 44) Reich, E-P., Sherwin, R.S., Kanagawa, O. and Janeway, C.A. *Nature* 341: 326, 1989.
- 45) 中野直子, 菊谷 仁, 西本宏史, 金川修身, 岸本忠三 日本免疫学会総会・学術集会記録 19: 81, 1989.
- 46) Bacelj, A., Charlton, B. and Mandel, T.E. *Diabetes* 38: 1492, 1989.
- 47) Nishimoto, H., Kikutani, H., Yamamura, K. and Kishimoto, T. *Nature* 328: 432, 1987.