

# インスリン自己免疫抗体の産生機序に関する研究

(研究課題番号 63570550)

平成1年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成2年3月

研究代表者 植田 太郎

(東京女子医科大学医学部第3内科学講師)

## は し が き

インスリン自己免疫症候群におけるインスリン自己抗体の産生機序は現在なお不明である。

我々は本命題に対し、まず抗原（インスリン）側の異常の有無を検討するために、本症候群患者の血中インスリンを逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）にて解析した。

ついで、本症候群の誘発に関連が想定されている sulfhydryl (SH) 基薬剤のインスリンに対する直接効果を *in vitro* で検討した。また、S-S 結合を有するインスリン受容体への当該薬剤の影響を機能面から併せ検討した。

さらに、本症候群患者の疾患感受性素因についてHLA抗原タイプの特異性から分析を試みた。

研究課題

インスリン自己免疫抗体の産生機序に関する研究

(課題番号63570550)

平成1年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成2年3月

研究組織

研究代表者 植 田 太 郎（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者 江 口 洋 子（東京女子医科大学医学部助手）

研究経費

昭和63年度 800千円

平成1年度 900千円

計 1700千円

# 研 究 発 表

## (1) 学会誌等

Taro Wasada, Yoko Eguchi, Sumiko Takayama, Kenshi Yao and Yukimasa Hirata

Reverse phase high performance liquid chromatographic analysis of circulating insulin in the insulin autoimmune syndrome.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 66:153-158, 1988

Taro Wasada, Yoko Eguchi, Sumiko Takayama, Kenshi Yao, Yukimasa Hirata and Sadao Ishii

Insulin autoimmune syndrome associated with benign monoclonal gammopathy; Evidence for monoclonal insulin autoantibodies.

Diabetes Care 12:147-150, 1989

植田太郎、嶺井里美、大森安恵、平田幸正

赤血球のインスリン結合に及ぼす SH 基薬剤の影響

Peptide Hormones in Pancreas 9:61-66, 1989

江口洋子

インスリン自己免疫症候群におけるインスリン自己抗体の Scatchard 解析について

東京女子医科大学雑誌 59:1296-1305, 1989

江口洋子、平田幸正、荷見澄子、他

日本におけるインスリン自己免疫症候群140例のうち報告のみられた26例の HLA 抗原タイプについての統計的分析

糖尿病 32:887-892, 1989

(2) 口頭発表

植田太郎、嶺井里美、大森安恵、平田幸正

赤血球のインスリン結合に及ぼす SH 基薬剤の影響

第9回膵ホルモン研究会1988年9月26日

植田太郎、江口洋子、高山澄子、八尾建史、平田幸正

インスリン自己免疫症候群における血中インスリンの HPLC 解析

第85回日本内科学会総会1988年4月2日

江口洋子、荷見（高山）澄子、八尾建史、平田幸正

我国におけるインスリン自己免疫症候群113例の臨床的統計

第31回日本糖尿病学会総会1988年5月26日

# 研 究 成 果

## 1 抗原すなわちインスリンの構造異常の有無に関する検索

### 1) インスリン自己免疫症候群患者の血中インスリンの HPLC 解析

本症候群の患者血中に抗原となりうる異常インスリンが存在するか否かについて、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて検討した。

(対象)

対象は6例のインスリン自己免疫症候群患者で、臨床像および主要データを Table 1 に示した。血清の  $^{125}\text{I}$ -インスリン結合率は49-86%(PEG 法)、総抽出 IRI は3501~790613pmol/Lであった。症例2は goldthioglucose, 症例4, 5は methimazole 使用例であり、症例6は偶然の機会にインスリン抗体が発見されたが、インスリン治療歴および自発性低血糖を経験しない症例である。対照として、ヒトおよびウシ・ブタインスリンで治療中のインスリン抗体価高値の4例およびインスリン抗体を持たない高インスリン血症2例についても比較検討した。

<方法>

インスリン自己免疫症候群では、症例6は別として、自発性低血糖発作時期の血清について検討した。血清1.0~3.5mlを Bio-Gel P-30カラム(1.5×76cm)、IM 酢酸でゲル濾過し各分画について immunoreactive insulin (IRI) を測定した。遊離インスリンのピーク分画をプールし、凍結乾固後、10mM 塩酸に再溶解して HPLC 試料とした。

逆相 HPLC は Waters Associates (Milford, MA, USA) 社製の各 units を使用し、カラムは  $\mu$ Bondapak (C<sub>18</sub>、0.39×30cm、10 $\mu$ m) を用いた。移動相は0.1% TFA と acetonitrile 29% (isocratic)、および29-60% linear gradient 系で解析した。流速1ml/min、isocratic 相は0.4ml/tube、gradient 相は0.8ml/tube でそれぞれ分取した。[Ala<sup>B26</sup>、Thr<sup>B30</sup>]-bovine、bovine、human、porcine [Leu<sup>A3</sup>]-human 及び human proinsulin の各標準品を混合し本条件下に波長214nm

Patient no.	Age (yr)/sex	Duration of hypoglycemia	<sup>125</sup> I]Human insulin binding to serum (%) <sup>a</sup>	IRI (pmol/L)		CPR (pmol/L)	Ig Class [κ (%)/λ (%)] <sup>b</sup>	Comment
				Total	Free			
<b>A. Insulin autoimmune syndrome</b>								
1	71/M	38 days	86.0	53,813	438 <sup>c</sup>	7,944	IgG/47.7/36.8	Diabetic GTT <sup>d</sup>
2	52/F	>5 yr	73.2	16,503	73	3,476	IgG/52.3/35.1	Normal GTT, goldthioglucose used for bronchial asthma
3	64/M	>2 yr	82.4	6,307	43	1,159	IgG/1.2/22.3	Monoclonal gammopathy
4	49/M	26 days	72.8	5,094	44	2,979	IgG/39.8/14.1	Methimazole therapy for hyperthyroidism
5	31/M	1.5 yr	67.5	790,613	99	63,552	IgG/40.0/8.4	Diabetic GTT, methimazole therapy for hyperthyroidism
6	68/F		49.0	3,501	72	1,324	IgG/20.5/4.1	
<b>B. Diabetes and insulin treatment</b>								
7	63/M		58.2	1,873	65	199		Porcine insulin (30 U/day)
8	73/F		48.1	1,815	79	99		NPH-type human insulin (20 U/day)
9	52/F		34.9	223	108	1,225		Lente-type human insulin (24 U/day)
10	38/M		35.8	1,421	93	0		Porcine/bovine insulin (36 U/day)
<b>C. Hyperinsulinemia</b>								
11	13/F		3.3	1,306 → 6,364	(After meal)	1,192		Insulin resistance syndrome (type A)
12	60/F		1.9	316 → 2,246	(After glucose)	927		Unknown etiology

<sup>a</sup> (<sup>125</sup>I]Human insulin (10,000 cpm) was incubated with serum, and the mixture was precipitated with 12.5% Polyethylene Glycol 6000. The antibody titer was expressed as a percentage (bound to total ratio).

<sup>b</sup> Serum samples were preincubated with (<sup>125</sup>I]human insulin and then precipitated with specific antiserum to human IgG, IgM, and κ- and λ-light chains.

<sup>c</sup> At hypoglycemic attack (plasma glucose, 1.4 mmol/L).

<sup>d</sup> Glucose tolerance test.

Table 1 対象の臨床的特徴と主要検査データ

で分析すると、各ピークは上の順番に出現し、明確に分離された。したがって、以下の検討では最も容出の早い [Ala<sup>B26</sup>, Thr<sup>B30</sup>] -bovine インスリンを内部標準として各試料に添加し、その IRI ピークを基準として相互に比較することにより同定した。

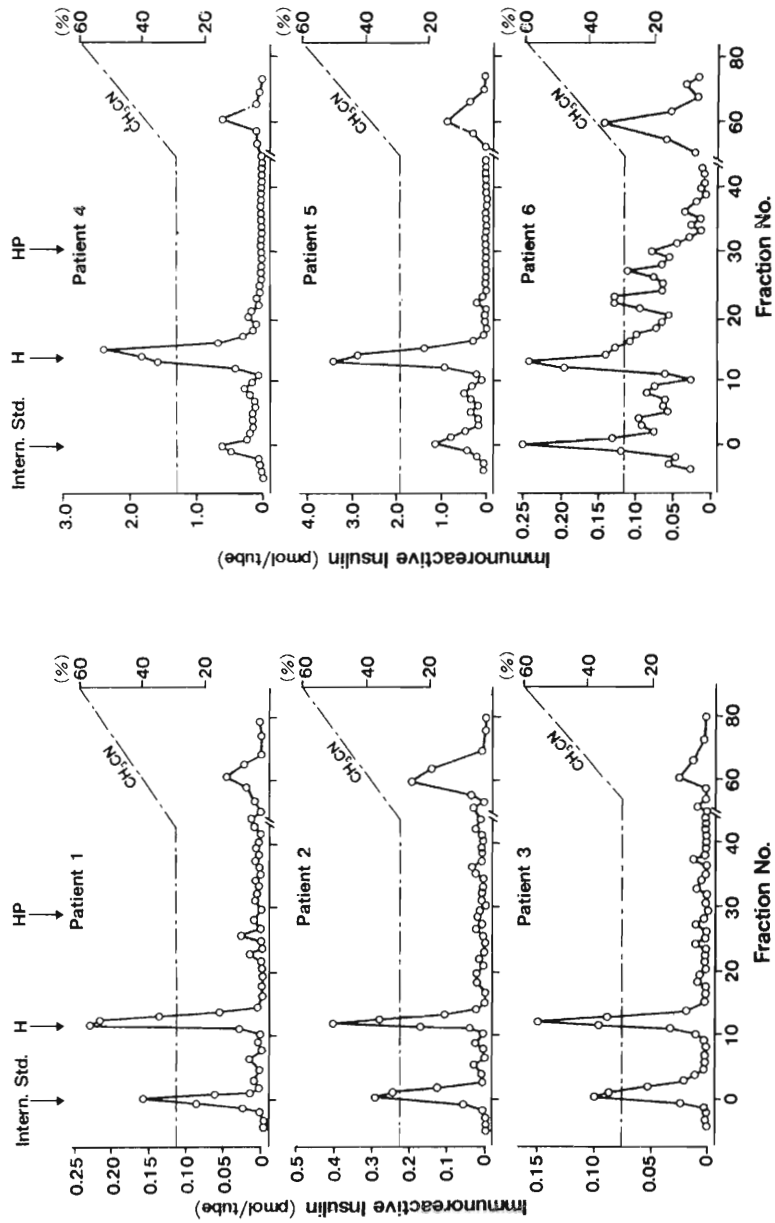
#### 〈結果〉

Fig.1 はインスリン自己免疫症候群6例における IRI の溶出パターンを示す。いずれも acetonitrile 29% (isocratic) で、内部標準から13番目の合成ヒトインスリン標品と一致する位置に IRI の主要ピークが認められた。また同時に、後半の gradient 相 (CH<sub>3</sub>CN 38%近傍) にも疎水性の強い IRI の小ピークが全例に共通して認められた。

Fig.2 はインスリン治療中の患者で、使用したインスリンの動物種に一致した主要インスリンピークを認めると同時に、後半の gradient 相で、インスリン自己免疫症候群の場合と全く同一の位置に小さな疎水性のピークが検出された。

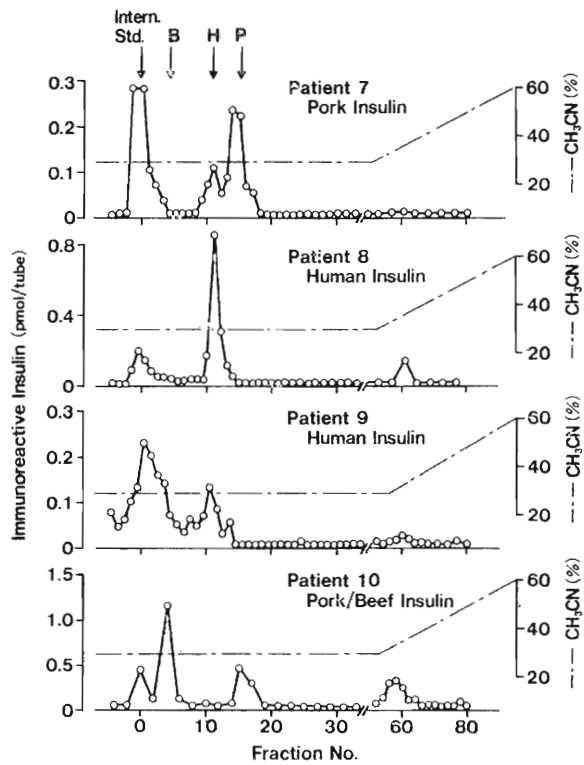
Fig.3 は高インスリン血症例を示すが、いずれもヒトインスリンに一致するピークの他に、1例では明らかに gradient 相に同様な小ピークが認められた。





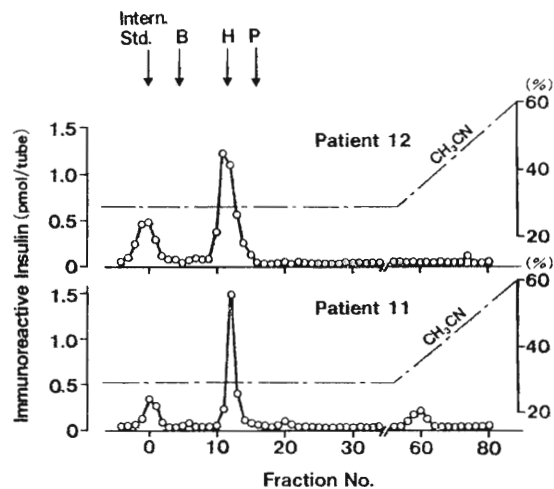
RP-HPLC profiles of serum IRI in the six patients with the insulin autoimmune syndrome. Fraction number was adjusted according to the elution position of the internal standard (Intern. Std.; fraction 0), which was (Ala<sup>B26</sup>, Thr<sup>B30</sup>)bovine insulin. H, Semisynthetic human insulin; HP, biosynthetic human proinsulin.

Fig. 1 インスリン自己免疫症候群患者 (6例) における血中インスリンのHPLC溶出パターン



RP-HPLC profiles of serum IRI from four insulin-treated diabetic patients. Intern. Std., Internal standard ([Ala<sup>B26</sup>, Thr<sup>B30</sup>]bovine insulin); B, bovine insulin; H, human insulin; P, porcine insulin.

Fig. 2 インスリン治療中の糖尿病患者（4例）における血中インスリンのHPLC溶出パターン



RP-HPLC profiles of serum IRI in two patients with endogenous hyperinsulinemia.

Fig. 3 高インスリン血症患者（2例）における血中インスリンのHPLC溶出パターン

## 2) インスリンの構造と機能に及ぼす SH 基薬剤の影響

インスリン自己免疫症候群のユニークな一面として、本邦報告例110例中の $\frac{1}{3}$ および国外報告例16例中の $\frac{1}{4}$ の症例では、methimazole, tiopronin, glutathione あるいは、D-penicillamine などいずれも構造中に sulfhydryl (SH) 基を有する薬剤の使用と関連して発症している臨床的事実が注目される。

理論的には、これら薬剤の SH 基とインスリン分子の disulfide (S-S) 結合が thiol-disulfide 交換反応によって S-S 結合が開裂し、異常インスリン分子が生じる結果、抗体産生につながる可能性が示唆されている。

したがって、我々は SH 基薬剤がインスリン構造を変化させるか否かについて、in vitro の直接効果を HPLC で検討した。ついで、同じく S-S 結合をその重要なドメインに有するインスリン受容体 (赤血球) およびリガンド ( $^{125}\text{I}$ -insulin) に対する影響をインスリン-受容体結合能の機能面から検討した。

### (1) インスリン構造に対する methimazole の影響

#### <方法>

合成ヒトインスリンを methimazole 8.8 mM 存在下および非存在下に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中で 37°C、24時間ゆっくりと振とうし、凍結乾燥し、HPLC の溶出パターンを 214nm の吸光度で検出した。

#### <結果>

Fig.4 に示す如く、高濃度 methimazole に曝露されたインスリンの HPLC カラム保持時間は、対照 (methimazole 非存在下) のそれと全く同一で、不変であった。

### (2) リガンド ( $^{125}\text{I}$ -insulin) に対する影響

#### <方法>

標識ヒトインスリン ( $^{125}\text{I}$ -insulin) を各種 SH 基薬剤 (methimazole, D-penicillamine, captopril, tiopronin) 各 1mM と、37°C、12時間反応させ、その後の赤血球への結合性の変化を検討した。

## 2) インスリンの構造と機能に及ぼす SH 基薬剤の影響

インスリン自己免疫症候群のユニークな一面として、本邦報告例110例中の $\frac{1}{3}$ および国外報告例16例中の $\frac{1}{4}$ の症例では、methimazole, tiopronin, glutathione あるいは、D-penicillamine などいずれも構造中に sulfhydryl (SH) 基を有する薬剤の使用と関連して発症している臨床的事実が注目される。

理論的には、これら薬剤のSH基とインスリン分子のdisulfide (S-S) 結合が thiol-disulfide 交換反応によってS-S結合が開裂し、異常インスリン分子が生じる結果、抗体産生につながる可能性が示唆されている。

したがって、我々はSH基薬剤がインスリン構造を変化させるか否かについて、in vitroの直接効果をHPLCで検討した。ついで、同じくS-S結合をその重要なドメインに有するインスリン受容体(赤血球)およびリガンド( $^{125}\text{I}$ -insulin)に対する影響をインスリン-受容体結合能の機能面から検討した。

### (1) インスリン構造に対する methimazole の影響

〈方法〉

合成ヒトインスリンを methimazole 8.8 mM 存在下および非存在下に、0.1 M リン酸緩衝液(pH7.4)中で37°C、24時間ゆっくりと振とう静置した後、凍結乾燥し、HPLCの溶出パターンを214nmの吸光度で検出した。

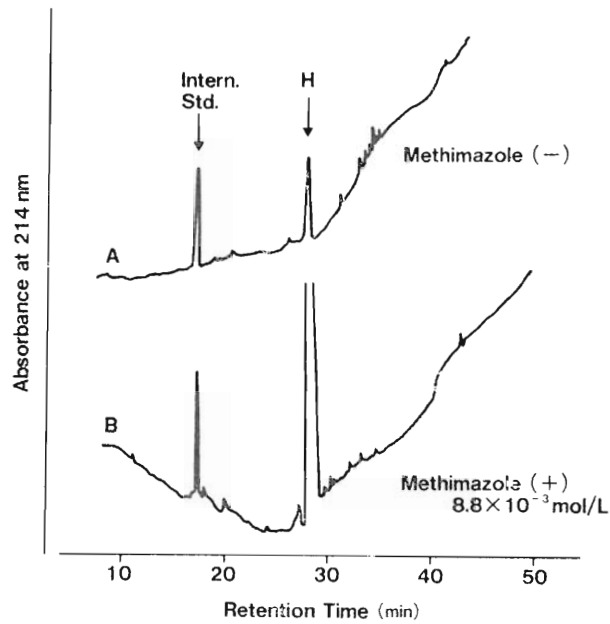
〈結果〉

Fig.4 に示す如く、高濃度 methimazole に曝露されたインスリンのHPLCカラム保持時間は、対照(methimazole非存在下)のそれと全く同一で、不変であった。

### (2) リガンド ( $^{125}\text{I}$ -insulin) に対する影響

〈方法〉

標識ヒトインスリン ( $^{125}\text{I}$ -insulin) を各種SH基薬剤 (methimazole, D-penicillamine, captopril, tiopronin) 各1mMと、37°C、12時間反応させ、その後の赤血球への結合性の変化を検討した。



Comparison by absorbance rate at 214 nm of the RP-HPLC elution profile of insulin incubated with (B) and without (A) methimazole ( $8.8 \times 10^{-3}$  mol/L) in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C for 24 h.

Fig. 4 メチマゾール処理と非処理ヒトインスリンの HPLC 特性

〈結果〉

Fig. 5 に示すごとく、各種 SH 基薬剤の影響はまちまちで、methimazole は本条件下ではリガンドのウサギ赤血球に対する結合性には全く影響を与えず、一方、D-penicillamine はリガンドの受容体結合能を完全に失活させた。captopril, tiopronin はそれぞれ 低濃度および高濃度インスリン存在下で 結合性を 若干低下および上昇させた。

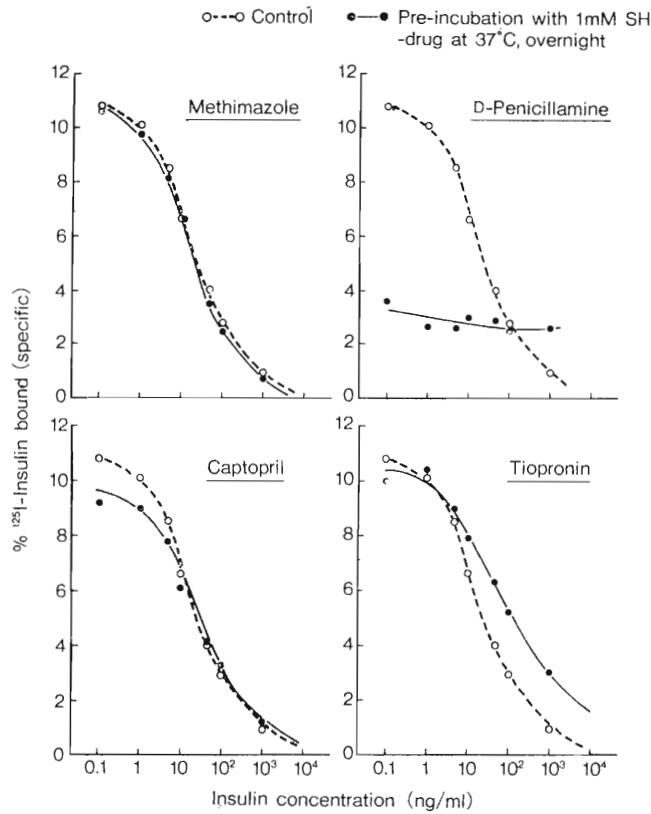


Fig. 5 SH 基薬剤(1mM)と pre-incubate したリガンド (<sup>125</sup>I -insulin)の赤血球インスリンレセプターへの結合性

### (3) 赤血球インスリンレセプターに対する影響

#### 〈方法〉

ウサギ赤血球浮遊液を SH 基薬剤 (0、25、250 $\mu$ M、5、25mM) と 37°C、30 分間 incubate し、終了後十分に洗浄した赤血球についてインスリン結合能を測定した。

#### 〈結果〉

Fig. 6 に示すごとく、methimazole は今回検討した濃度範囲では、赤血球インスリン受容体にほとんど影響を与えなかった。一方、D-penicillamine、captopril、tiopronin はいずれも低濃度 ( $\mu$ M) でインスリン結合を高め、高濃度 (mM) では低下させる所見を呈した。

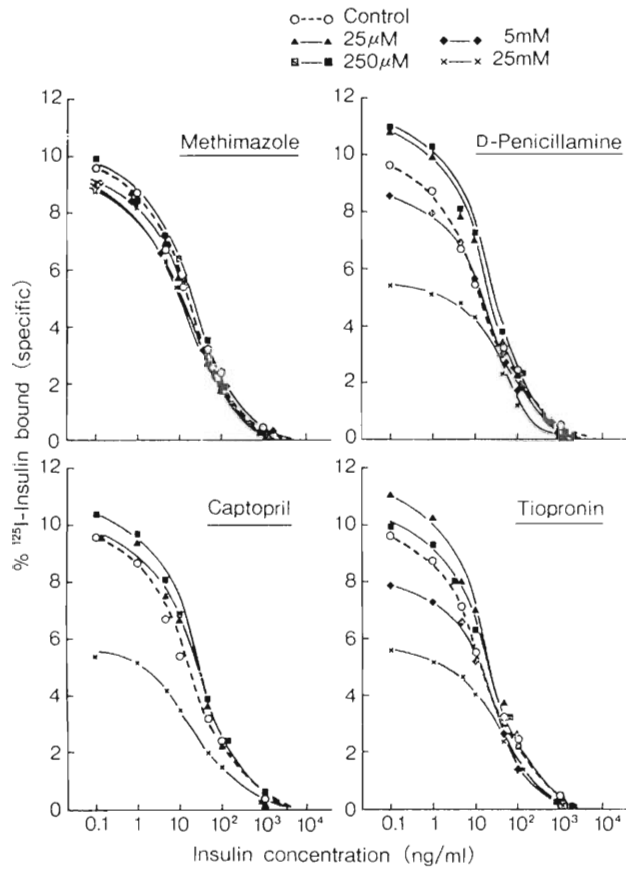


Fig. 6 SH 基薬剤と pre-incubate した赤血球のインスリン結合性

## 2 患者個体の疾患感受性素因に関する検討

インスリン自己免疫症候群には疾患感受性を高める特定の遺伝子が関与するかどうかについて検討するため、HLA 抗原タイプを解析した。

〈方法〉

対象は1970年から1988年3月までに本邦で論文発表されたもの、およびアンケート調査により判明したインスリン自己免疫症候群140例中、HLA 抗原タイプの検討が行われた26例である。

〈結果〉

Table 2に示す如く、インスリン自己免疫症候群におけるHLA-A11, B15(Bw62)、Cw4、DR4の出現頻度は一般人口におけるこれらの出現頻度に比較して有意に高かった。また、SH基を含む薬剤使用群と非使用群との間にはHLA抗原タイプ特にB15(Bw62)、Cw4、DR4については差を認めなかった(Table 3)。

Table 2 本邦インスリン自己免疫症候群26症例におけるHLA抗原タイプ

Patient	reported	sex	age	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	drugs**
MH*	1970 (Hirata <sup>11</sup> )	M	47	24	w52 w62	w1 w3	4 w6	
TO	1978 (Takei <sup>21</sup> )	F	8		15 w54			
IM	1980 (Sakamoto <sup>31</sup> )	M	71	9	15 40	w4		tiopronin
MN	1981 (Kouno <sup>33</sup> )	M	68	9		w4		
HI	1982 (Inomata <sup>41</sup> )	F	72	2 11	15 w61	w3 w4		glutathione
MF	1982 (Inomata <sup>41</sup> )	F	52	11 w33	15 w35	w3 w4		tiopronin
II	1983 (Awaya <sup>121</sup> )	F	25	9	5			methimazole
TK	1984 (Fukushima <sup>151</sup> )	F	52	11 w33	44 w62	w4	4 w13	
MS	1984 (Shibata <sup>161</sup> )	M	31	11 26	w35 w62	w3 w4	2 4	methimazole
KT	1985 (Otsuka <sup>171</sup> )	F	62	11 w24	w54 w62	w1 w3	4	tiopronin
AN	1985 (Nakamura <sup>181</sup> )	F	58	w24	w52 w61	w3	4	glutathione
TN	1985 (Sato <sup>51</sup> )	F	71	w24	w52 w62	w4	2 4	glutathione
SO	1986 (Yoshikawa <sup>191</sup> )	M	45	24	w22 w62	w1 w4	1 2	methimazole
MN	1987 (Kato <sup>201</sup> )	M	61	11 w33	w48 w58	w3	w52 w53	
NY	1987 (Ishikawa <sup>211</sup> )	M	36	2 24	35 w54	w1	4	tiopronin
HU	1988 (Tsukuda <sup>221</sup> )	M	43	24 26	w62	w3 w4	2 4	tiopronin
MK	1988 (Kawanishi <sup>231</sup> )	F	48	2 w24	w62	w3 w4		tiopronin
KT	1988 (Fuzihira <sup>241</sup> )	F	39		w62	w4	4	methimazole
IY	1987 (Ishigaki)	F	82	11	w62	w4		
ST	1987 (Tsuchida)	M	71	11 24	w52 w62	w4		
SM	1987 (Ishikawa)	F	80	2 24	w62	w3	4 w13	
TI	1987 (Takagi)	M	47	11 24	44 w62	w4	4 w9	
FH	1987 (Ito)	F	46		w62	w4	4	methimazole
HA	1987 (Tanigawa)	M	83	11 24	w52 w62	w4	4	
MY	1987 (Kurahashi)	F	61	w24 26	w35 w61	w3	4 w9	tiopronin
FM	1987 (Kanzaki)	F	53	w24 w31	15 w54	w1 w4		methimazole

\* HLA typing was performed in 1987. B15=Bw62 in Japanese<sup>4</sup>, A24=Aw24=A9 in Japanese<sup>4</sup>

\*\* Drugs containing a SH group used before the first attack of hypoglycemia



Table 3 SH 基薬剤使用例 (Drug+) と非使用例 (Drug-) における HLA 抗原タイプの比較

HLA	IAS	general population	$\chi^2$ -test	RR	drug	IAS	$\chi^2$ -test
A 11	10/23 (43.5 %)	112/645 (17.4 %)	p<0.01	3.7	+	4/14(28.6 %)	p<0.05
					-	6/9 (66.7 %)	
B 15 (Bw 62)	20/25 (80.0 %)	134/650 (20.6 %)	p<0.001	15.4	+	12/16( 75 %)	n.s.
					-	8/9 (88.9 %)	
Cw 4	17/24 (70.8 %)	65/635 (10.2 %)	p<0.001	21.3	+	10/15(66.7 %)	n.s.
					-	6/9 (66.7 %)	
DR 4	14/16 (87.4 %)	175/439 (39.9 %)	p<0.001	10.6	+	9/10( 90 %)	n.s.
					-	5/6 (83.3 %)	

IAS=Insulin autoimmune syndrome. n.s.=not significant

## 考 察

インスリン自己免疫症候群の一部の患者血中には異常インスリンの存在が報告され、自己抗体産生の原因となりうる可能性が示唆されている。今回の我々の成績も、検討した本症候群6例全例に疎水性 variant インスリンの存在を確認した。しかし、我々はヒトインスリンおよびブタ、ウシインスリンで治療中の高抗体価症例においても、またインスリン抗体を有しない高インスリン血症症例においても、インスリン自己免疫症候群と全く同様の異常 IRI 分画を検出した。したがって、この疎水性の IRI 分子種は必ずしもインスリン自己免疫症候群に特異的な異常インスリン成分とは断定し難いと考えられる。もちろん、これは標準ヒトインスリンやプロインスリンを直接希塩酸に溶解し、HPLC で展開溶出した場合には出現しないことから、単に HPLC の処理過程における artifact とも考えにくく、血中での産物のように思われる。またこのものの存在はインスリン抗体とも無関係であると推定される。さらに A 鎖 C 端アスパラギン残基の取れた (desamidoinulin) の溶出部位とも異なること、およびこの IRI 分画は CPR 活性を欠くことからプロインスリンとも別であるといえる。今後、さらに詳細な characterization が必要である。

次に、インスリン自己免疫症候群の一部は SH 基を有する薬剤の使用と関連して誘発されるという極めて興味深い一面が明らかにされている。したがって、SH 基薬剤の薬理学的および免疫学的検討が今後の重要な課題の一つであろう。

SH 基は S-S 結合と相互に交換反応を起こすことから、複数の S-S 結合を分子内に有するインスリン構造への影響を調べた。SH 基薬剤の中でインスリン自己免疫症候群の発症と最も関連の深い methimazole ( $8.8 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) については、HPLC 上インスリンの構造には直接変化を及ぼさなかった。リガンド ( $^{125}\text{I}$ -insulin) に対する効果では、Dpenicillamine はおそらくインスリンの S-S 結合を完全に解離し、その受容体結合能を失活させたのに対し、同濃度 (1mM) の methimazole は何ら有意の影響も及ぼさず、SH 基薬剤の効果には個別に大きく異なることが明らかになった。したがって、これらの成績を総合すると、インスリン分子は少なくとも通常の有効血中濃度においては SH 基薬剤に抵抗性であり、構造変化をこうむることなく機能を維持しうると推測される。このことから、SH 基薬剤が異常インスリンを生成し自己抗体の産生を促すという想定は否定的と考えられる。

今回の調査によって、我国の本症候群には HLA-A11、B15(Bw62)、Cw4、DR4 が高頻度に出現することが明らかになり、疾患感受性を規定する遺伝子背景の存在することが示唆された。また、従来 SH 基を有する薬剤により誘発された本症候群患者では何らかの素因の存在が推論されたが、SH 基を有する薬剤使用の有無による患者の HLA 抗原タイプには差は認められなかった。

## まとめ

- 1 インスリン自己免疫症候群に特異的な異常抗原(インスリン)の存在は証明されなかった。ただし、HPLC 上疎水性を示すインスリン様免疫活性物質の同定は 今後に残された課題である。
- 2 SH 基薬剤によりインスリン分子やインスリン受容体構造(いずれも S-S 結合を有する)が修飾を受ける可能性は否定的であった。
- 3 インスリン自己免疫症候群患者には 個体の疾患感受性を規定する特定の HLA 抗原タイプの存在することが判明した。

今後、本症候群の免疫機構の詳細な研究が必要である。