

インスリン依存型糖尿病における 64 KD 抗体と glutamic acid decarboxylase の関連について

川崎 英二*¹ 渡部 素生*^{1,*2} 斎藤 和子*^{1,*2} 矢野まゆみ*¹
瀧野 博文*¹ 魚谷 茂雄*¹ 松本 一成*¹ 奥野信一郎*¹
高尾 幸男*¹ 横田 厚*¹ 山口 義彦*¹ 赤澤 昭一*¹
長瀧 重信*¹

要約：64KD 抗体陽性インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 患者 10 例 (男性 4 例, 女性 6 例) において, 64KD 抗体とその対応抗原と言われている GABA 合成酵素 glutamic acid decarboxylase (GAD) との反応性を ³⁵S-methionine 標識 rat islet を用いた免疫沈降法における吸収試験によって検討した。GAD は, 2 つの isoform (GAD₆₅, GAD₆₇) を含む rat brain GAD と recombinant rat GAD₆₇ を用いた。10 例中 7 例 (70.0%) において 64kDa のバンドは recombinant rat GAD₆₇ では吸収されず, rat brain GAD で完全に吸収された。また, 1 例 (10.0%) において recombinant rat GAD₆₇ でのみ若干の吸収を認め, 2 例 (20.0%) では recombinant rat GAD₆₇, rat brain GAD のいずれにおいても吸収されなかった。IDDM 患者血中に存在する 64KD 抗体は, ほとんどの症例において GAD₆₅ を認識することが示唆されるが, GAD を認識しない症例も認められ, このことは 64KD 抗体が不均一であることを示している。

Key words : ① 64KD 抗体 ② glutamic acid decarboxylase ③ インスリン依存型糖尿病 (IDDM)

[糖尿病 36(7) : 507~513, 1993]

緒 言

インスリン依存型糖尿病 (IDDM) は, 自己免疫機序に基づく膵 β 細胞の特異的破壊の結果発症すると考えられている。IDDM 患者血中には, 抗ラ氏島抗体 (ICA) やインスリン自己抗体 (IAA) などの膵ラ氏島構成成分に対する自己抗体が発症前より検出される。膵ラ氏島の分子量 64,000 の蛋白に対する自己抗体 (64 KD 抗体) もそのひとつであり, IDDM の発症早期には 70~80% に検出される^{1,2)}。近年, この自己抗体の対応抗原が脳およ

びラ氏島 β 細胞に存在する GABA 合成酵素 glutamic acid decarboxylase (GAD) であると報告され³⁾, さらに GAD には GAD₆₅, GAD₆₇ という 2 つの isoform が存在することが知られている^{4,5)}。今回我々は, IDDM 患者血清中の 64 KD 抗体の GAD に対する反応性を rat brain GAD と recombinant rat GAD₆₇ を用いて検討した。

*¹ 長崎大学医学部第一内科 (〒 852 長崎市坂本 1 丁目 7 番 1 号)

*² 三菱油化株式会社筑波総合研究所 (〒 300-03 茨城県稲敷郡阿見中央 8 丁目 3 番 1 号)

受付日: 平成 4 年 12 月 4 日

採択日: 平成 5 年 3 月 29 日

Table 1 Clinical characteristics on IDDM subjects

No.	Age (yrs)	Sex	Duration (yrs)	C-peptide* (ng/ml)	HLA-DR	ICA (JDF units)	64KA (% control)
1	43	M	10	<0.1	DR9	160	71
2	29	M	0.2	0.5	DRw6, DRw8	320	100
3	51	F	7	0.6	DR1	160	38
4	47	F	4	1.2	DRw8, DR9	160	54
5	28	F	19	<0.1	DR4	<2.5	80
6	31	M	12	0.3	DR9	160	84
7	38	M	1	0.9	DR9	80	83
8	54	F	13	<0.1	DRw8	1280	120
9	68	F	15	<0.1	DR3, DR4	20	32
10	49	F	19	<0.1	DR6, DR9	<2.5	130

* Serum C-peptide level at 3 min after injection of glucagon, ICA : islet cell antibodies, 64KA : 64K antibodies.

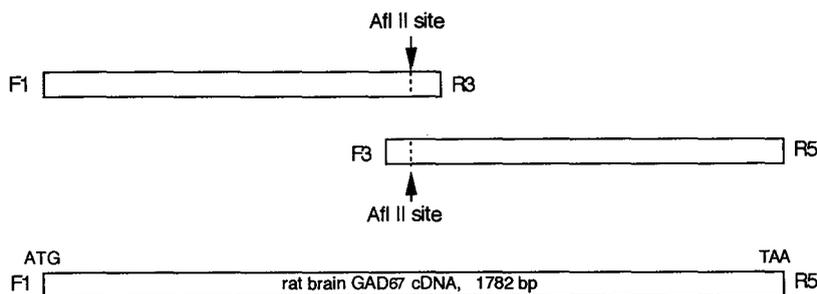


Fig. 1 Cloning strategy for obtaining rat brain GAD₆₇ cDNA

対象と方法

1. 対象

対象は、1982年から1990年までに長崎大学第一内科を受診した IDDM 患者のうち、³⁵S-methionine 標識 rat islet を用いた免疫沈降法によって 64 KD 抗体陽性と確認されている 10 例 (男性 4 例, 女性 6 例) で, IDDM の発症年齢は 9 ~ 53 (32.9 ± 12.8) (Mean ± SD) 歳, 罹病期間は 0.2 ~ 19 (10.1 ± 6.7) 年であった. 対象 10 例の臨床的特徴を Table 1 に示す. IDDM の診断は発症時のケトアシドーシスの存在, インスリン必要量, 食後血中 C ペプチド値, 24 時間尿中 C ペプチド排泄量, グルカゴン負荷に対する血中 C ペプチドの反応を参考にして行なった.

2. 64 KD 抗体測定法

ラット単離ラ氏島を ³⁵S-methionine にて標識し, Triton X-114 にて可溶化した後 IDDM 血清と protein A-Sepharose を用いた免疫沈降法によって測定した. 64 KD 抗体のレベルをデンスト

メーターにて定量化し, 64 KD 抗体強陽性の発症早期 IDDM 患者血清の 64 kDa のバンドに対するパーセントとして表わした⁶⁾.

3. recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD の作製

recombinant rat GAD₆₇ は, 逆転写 PCR 法を用いて rat GAD₆₇ の cDNA を作製し大腸菌発現系により作製した. すなわち, Julien⁷⁾ らによって発表された rat brain GAD₆₇ の塩基配列より数個の oligonucleotide primer を作製し, rat brain から抽出した total RNA と M-MLV reverse transcriptase (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) を用いて逆転写 PCR 法にて 2 つの fragment F1R3 および F3R5 を増幅した. そして, 制限酵素 Afl II 部位にて 2 つの fragment を ligation し, 完全鎖長の rat GAD₆₇ cDNA を得た (Fig. 1). 得られた cDNA は, 発現ベクター pUEX-2 へ組み込み, 大腸菌 JM109 へ transformation 後, recombinant rat GAD₆₇ を β

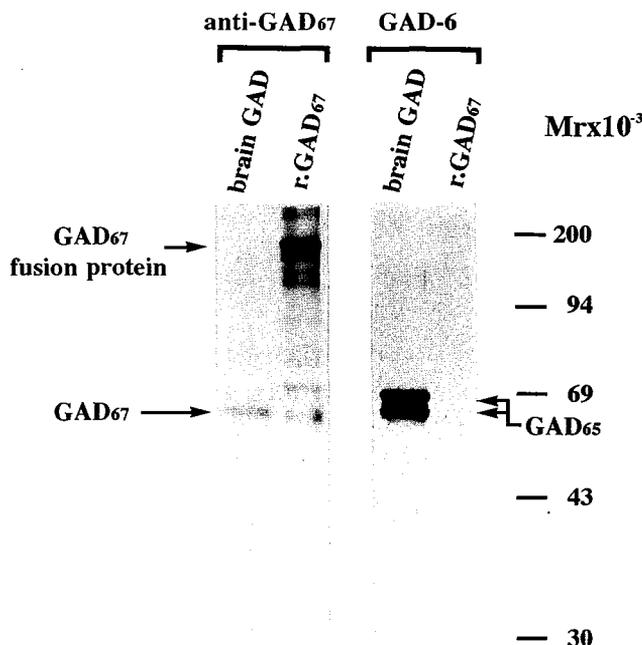


Fig. 2 Western blotting of recombinant rat GAD₆₇ and rat brain GAD
 brain GAD : rat brain GAD
 r. GAD₆₇ : recombinant rat GAD₆₇
 anti-GAD₆₇ : anti-cat GAD₆₇ antiserum
 GAD-6 : GAD-6 monoclonal antibody

-galactosidase の融合蛋白として作製した, rat brain GAD は, 部分精製の rat brain GAD を抗原として作製された GAD-1 モノクローナル抗体 (American Type Culture Collection) の immunoaffinity column を用いた, Gottlieb らの方法⁸⁾に準じて, rat brain の homogenate より精製したものを使用した. これら 2 種の GAD は, recombinant cat brain GAD を抗原として作製された, GAD₆₇ を特異的に認識する抗 GAD₆₇ 抗血清 (Chemicon International Inc.) および rat brain GAD を抗原として作製された, GAD₆₅ を特異的に認識する GAD-6 モノクローナル抗体 (University of Iowa) を用いて Western blotting 法を行ない, その抗原性を確認した.

4. recombinant rat GAD₆₇, rat brain GAD による吸収試験

抗 GAD₆₇ 抗血清 10 μ l と recombinant rat GAD₆₇ 1 μ g, 10 μ g または rat brain GAD 0.1 μ g, 1 μ g, および 64 KD 抗体陽性 IDDM 血清 10 μ l と

recombinant rat GAD₆₇ 5 μ g または rat brain GAD 1 μ g を室温にて 1 時間 preincubation し, その後 ³⁵S-methionine で標識した rat islet の可溶性蛋白 100 μ l と 4 °C にて一晩反応させた. その後, 生じた免疫複合体を 100 μ l の protein A-Sepharose にて沈降させ, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い, fluorography によって 64 kDa のバンドの有無を検索した. さらに, バンドの強さをデンストメーターにて定量化し, 64KD 抗体測定法に用いた陽性コントロールに対するパーセントとして表わした.

5. recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD の Western blotting

recombinant rat GAD₆₇ 3 μ g, rat brain GAD 250 ng を Laemmli buffer⁹⁾ (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) に溶解し 8 % SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜へ 4

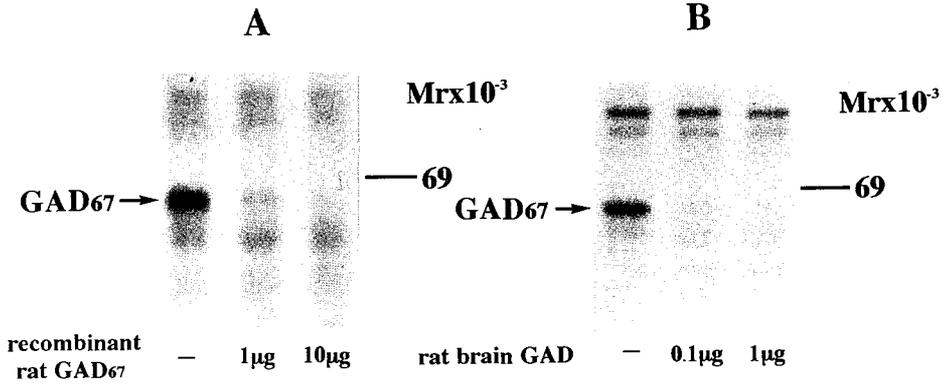


Fig. 3 Immunoadsorption test for anti-cat GAD₆₇ antiserum using recombinant rat GAD₆₇ (A) and rat brain GAD (B)

時間 electro-blotting を行った. ニトロセルロース膜は, 0.1% Tween 20 を含む 5% スキムミルク溶液によって 4°C で一晩 blocking し, 抗 GAD₆₇ 抗血清 (1:1000) および GAD-6 (1:1000) を一次抗体に, 抗ウサギ IgG (Fab')₂ (1:1000), 抗マウス IgG 抗体 (1:1000) をそれぞれ二次抗体として ECL ウェスタンブロットティングシステム (Amersham) によって検出した.

6. ICA 測定法

ヒト臍 (血液型 O 型) 新鮮凍結切片とペルオキシダーゼ標識プロテイン A を用いた酵素抗体法¹⁰⁾ にて測定し, 抗体価を JDF units に換算して表わした.

結果

1. recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD を用いた Western blotting (Fig. 2)

Fig. 2 に示すように recombinant rat GAD₆₇ は, 抗 GAD₆₇ 抗血清でのみ β-galactosidase との融合蛋白である分子量約 18 万のバンドが検出されたが, rat brain GAD は抗 GAD₆₇ 抗血清にて分子量約 60,000 のバンドが, また GAD-6 モノクローナル抗体にて分子量約 60,000 と 65,000 のバンドが検出され, rat brain GAD には GAD₆₅, GAD₆₇ の 2 つの isoform が含まれることが確認された.

2. recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD による抗 GAD₆₇ 抗血清の吸収試験 (Fig. 3)

Fig. 3-A, B に示すように recombinant rat GAD₆₇, rat brain GAD のいずれにおいても 64 kDa のバンドはそれぞれの蛋白の用量依存性に吸収された.

3. recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD による IDDM 患者血清中の 64 KD 抗体の吸収試験 (Fig. 4)

Table 2 に示すように, 対象 10 例中 7 例においては ³⁵S-methionine 標識 rat islet の可溶化蛋白によって検出される 64 kDa のバンドは recombinant rat GAD₆₇ では吸収されず, rat brain GAD によって完全に吸収された. しかし, 1 例では recombinant rat GAD₆₇ で若干の吸収を認め, 2 例においては recombinant rat GAD₆₇, rat brain GAD のいずれにも吸収されなかった. なお, recombinant rat GAD₆₇ で若干吸収された 1 例においてはさらに大量の GAD₆₇ にて吸収したが吸収の程度は変らなかった. また, 全く吸収されなかった血清において, さらに大量の抗原にて吸収したが, それでも 64 kDa のバンドは全く吸収されなかった. Fig. 4 にその代表例として症例 1, および症例 2 の結果を示している. lane 2 および 5 は recombinant rat GAD₆₇ にて吸収しているが, 64 kDa のバンドは吸収されていない. しかし, lane 3 および 6 に示すように rat brain GAD では 64 kDa のバンドは完全に吸収されて

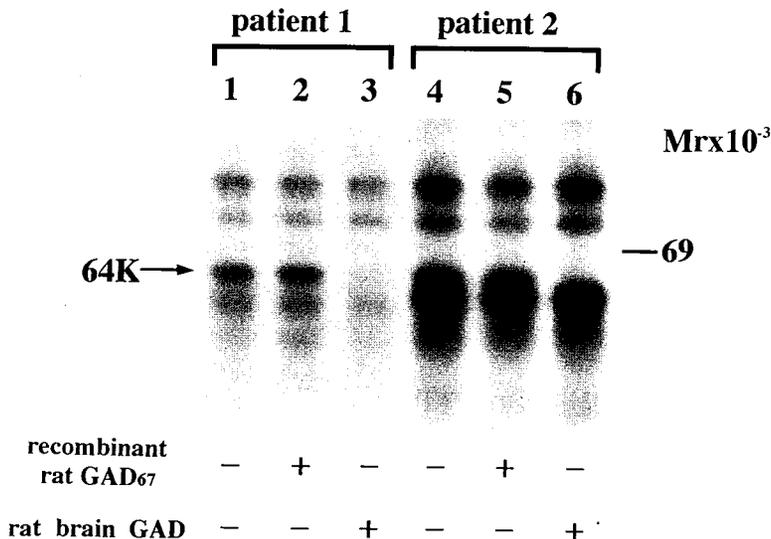


Fig. 4 Immunoadsorption test for 64K antibody-positive IDDM sera using recombinant rat GAD₆₇ and rat brain GAD lanes 1,4 ; ; not adsorbed, lanes 2,5 ; preadsorbed with 5 μg of recombinant rat GAD₆₇, lanes 3,6 : preadsorbed with 1 μg of rat brain GAD, lanes 1~3 ; patient 1, lanes 4~6 ; patient 2. 64K antibodies in both serum were immunoadsorbed only by rat brain GAD.

Table 2 Results of immunoadsorption test using recombinant rat GAD₆₇ and rat brain GAD

No.	64KA* (% control)	64KA level after immunoadsorption (% control)	
		r. GAD ₆₇	b. GAD
1	71	71	0
2	100	100	0
3	38	38	0
4	54	54	0
5	80	80	80
6	84	84	0
7	83	83	83
8	120	120	0
9	32	32	0
10	130	68	130

64KA : 64K antibodies, r. GAD₆₇ : recombinant rat GAD₆₇, b. GAD : rat brain GAD.

* levels of 64K antibodies before immunoadsorption.

いる。64 kDa のバンドの吸収の有無と 64 KD 抗体の強さ、ICA 抗体価、HLA-DR タイプとは無関係であった。

考案

64 KD 抗体は IDDM の発症前より検出され、ICA とともに IDDM の予知マーカーとして重要な自己抗体である。近年、この自己抗体の対応抗原が GAD であると報告され³⁾、また GAD には GAD₆₅、GAD₆₇ という異なった遺伝子にコードされた 2 つの isoform が存在することが知られている^{4,5)}。そこで今回我々は、recombinant rat brain GAD₆₇、および rat brain より immunoaffinity column により精製した GAD を用いて、IDDM 患者血清中の 64 KD 抗体の対応抗原について、³⁵S-methionine 標識 rat islet を用いた免疫沈降における吸収試験によって検討した。それぞれの GAD は GAD₆₇ のみを認識する抗 GAD₆₇ 抗血清、および GAD₆₅ のみを認識する GAD-6 モノクローナル抗体により Western blotting を行った結果、recombinant rat GAD₆₇ は GAD₆₇ のみを、rat brain GAD は GAD₆₅、GAD₆₇ の両方を含んでいることが確認された。また、それぞれの GAD は抗 GAD₆₇ 抗血清を用量依存性に吸収した。なお、Fig. 2 の rat brain GAD において、

抗 GAD₆₇ 抗血清, GAD-6 の両者で分子量約 60,000 のバンドが検出されているが, これはここには示していないが rat brain GAD 精製後, 時間とともに増加することより GAD₆₅, GAD₆₇ が degradation をきたしたものと考えられる.

これらの GAD を用いて 10 例の IDDM 患者血清中の 64 KD 抗体を吸収したところ, 64 kDa のバンドは 7 例において rat brain GAD でのみ, 1 例では recombinant GAD₆₇ でのみ吸収され, 他の 2 例ではどちらの GAD においても全く吸収されなかった. このことは, IDDM 患者の 64 KD 抗体の対応抗原はほとんどの症例で GAD₆₅ であることを示唆しており, Kaufman¹¹⁾ らの報告と一致する. しかし, 64 KD 抗体の対応抗原が GAD₆₅ であることを証明するためには, ヒト豚ラ氏島由来の GAD₆₅ を用いた抗 GAD 抗体の測定が必要である. 最近, Karlsen ら¹²⁾ は, ヒト豚ラ氏島には GAD の 2 つの isoform のうち GAD₆₅ のみが発現していると報告している. 今回, 我々の結果において rat brain GAD では 64 kDa のバンドが吸収されず, recombinant rat GAD₆₇ にて若干吸収された症例がみられた. この症例における 64 KD 抗体の対応抗原は, GAD₆₅ とは homology がなく, GAD₆₇ と homology のある分子量 64 kDa のラ氏島蛋白であると考えられるが, human islet にもやはり rat islet や human brain と同様に GAD₆₇ が存在し, それが 64 KD 抗体の対応抗原となっている可能性も否定できない. 一方, recombinant rat GAD₆₇ および rat brain GAD のいずれにおいても 64 KD 抗体が吸収されない例では, GAD 以外の分子量 64 kDa のラ氏島蛋白を対応抗原としていると考えられ, これらの結果は 64 KD 抗体が不均一であることを示唆している. また, 今回の検討において 64 KD 抗体の GAD による吸収の有無と ICA の抗体価との間には相関関係を見出すことができなかったが, IDDM において ICA と 64 KD 抗体の抗体価は弱い相関関係があると報告されており^{2,6)}, さらに我々の preliminary な検討において, ICA の染色性が GAD によって block される ICA も見出されている. このことは, ICA と 64 KD 抗体の関係を考える上で非常に興味深いことである.

今後, human islet 由来の GAD を用いた抗 GAD 抗体の測定法が開発されることにより, 64 KD 抗体の不均一性がさらに明らかになるものと思われる.

謝 辞

この研究を推行するにあたり, rat brain GAD を分与して戴いたヘキストジャパン医薬総合研究所尾形研二先生に, また多大な御助言を賜りました長崎大学医学部細菌学教室・森内良三先生に深謝致します. なお, 本論文の要旨は第 35 回日本糖尿病学会年次学術集会にて発表した.

文 献

- 1) Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298 : 167-169
- 2) Christie M, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Dahlquist G, Lernmark Å, Baekkeskov S (1988) Antibodies to a Mr-64,000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 31 : 597-602
- 3) Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, de-Camilli P (1990) Identification of the 64 K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347 : 151-156
- 4) Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylase. *Neuron* 7 : 91-100
- 5) Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJK, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ (1992) Two human glutamate decarboxylase, 65 kDa GAD and 67 kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 2115-2119
- 6) Kawasaki E, Moriuchi R, Takino H, Okuno S, Takao Y, Maeda Y, Yokota A, Yamamoto H, Chikuba N, Akazawa S, Miyamoto T, Nagataki S (1992) Autoantibodies to 64,000-Mr islet cell protein in long-term Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35 : 748-752
- 7) Julien JF, Samama P, Mallet J (1990) Rat brain glutamic acid decarboxylase sequence deduced

- from a cloned cDNA. *J Neurochem* 54 : 703-704
- 8) Gottlieb DI, Chang YC, Schwob JE (1986) Monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 8808-8812
- 9) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680-685
- 10) Takahashi A, Tsujihata M, Yokota A, Yamaguchi Y, Ueda Y, Akazawa S, Miyake S, Nagataki S (1986) A new method of detection of islet cell antibodies (ICA) using peroxidase-labeled protein A, and incidence of ICA in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29 : 378-382
- 11) Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ (1992) Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89 : 283-292
- 12) Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Disteche CM, Adler DA, Bärmeier H, Mathewes S, Grant FJ, Foster D, Lernmark Å (1991) Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8337-8341

Abstract

Relationship between 64 K Antibodies and Glutamic Acid Decarboxylase in Insulin-Dependent Diabetes

Eiji Kawasaki^{*1}, Motoo Watanabe^{*1,*2}, Kazuko Saitoh^{*1,*2}, Mayumi Yano^{*1}, Hirofumi Takino^{*1}, Shigeo Uotani^{*1}, Kazunari Matsumoto^{*1}, Shinichiro Okuno^{*1}, Yukio Takao^{*1}, Atsushi Yokota^{*1}, Yoshihiko Yamaguchi^{*1}, Shoichi Akazawa^{*1} and Shigenobu Nagataki^{*1}

^{*1} The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan

^{*2} Mitsubishi Petrochemical Co., LTD., Tsukuba Research Center, Ibaraki, Japan

In 10 of 64 K antibody-positive sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), we examined the relationship between 64 K antibodies and glutamic acid decarboxylase (GAD), which is the target antigen of these autoantibodies, with an immunoadsorption test using immunoprecipitation of ³⁵S-methionine-labeled rat islet protein. Rat brain GAD containing two isoforms of GAD (GAD₆₅ and GAD₆₇), and recombinant rat GAD₆₇, were studied. Of these 10 individuals, 7 (70%) showed completely blocked immunoadsorption of the 64 K autoantigen only by rat brain GAD, 1 (10%) partial blockage with recombinant rat GAD₆₇ and 2 (20%) showed no blockage with either GAD. These results suggest that most 64 K antibody-positive IDDM recognize GAD₆₅ and that there is heterogeneity of 64 K antibodies.