

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16292

研究課題名（和文）GLP-1受容体作動薬による免疫学的効果を介した代謝異常症の治療開発

研究課題名（英文）Development of treatment metabolic disorder through immunological effects mediated by GLP-1 receptor agonists

研究代表者

伊藤 新（Itoh, Arata）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：60528321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、GLP-1受容体作動薬が肝内免疫担当細胞、特にT細胞にアネルギーを誘導し過度の炎症起点が制御されNAFLDおよび全身の糖脂質代謝異常が是正されると仮説をたて、GLP-1受容体作動薬がもたらす免疫学的な変化の検証を目的とし遂行した。GLP-1受容体作動薬がT細胞Exhaustionに類似した表現型をもたらし、そして肝臓におけるT細胞のGLP-1受容体の役割として、非アルコール性脂肪肝疾患の形成に肝内T細胞活性化が寄与し、T細胞に発現するGLP-1受容体を介した介入により、T細胞へExhaustionをもたらし機序により同疾患の軽減効果をもたらしことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLP-1受容体は元来膵細胞に豊富に発現しておりインスリン分泌増強作用が主作用であることが知られているほかに、多面的な作用により代謝異常の改善に寄与するとされていたが、免疫担当細胞に発現しているGLP-1受容体の役割に関する報告は非常に少ない。本研究で証明した肝内のCD4あるいはCD8陽性T細胞のGLP-1受容体発現およびGLP-1受容体作動薬によるT細胞表現型の変化に関する発見により、まだ根治療法の乏しい非アルコール性脂肪肝疾患の治療選択肢のひとつとして今後発展できる可能性を含んでおり、学術的あるいは社会的に意義のある研究成果であるといえよう。

研究成果の概要（英文）：We previously invented a disease-model of hepatosteatosis, glucose tolerance and hyperlipidemia, typically observed in non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome, but without obesity, through activation of CD4-positive lymphocytes by anti-CD3 antibody administration in lean mice. The precise mechanisms, however, remained unclear. We investigated how GLP-1RA targets and suppresses T cells. Anti-CD3 antibodies significantly increased GLP-1R+ CD62L-CD44+ effector-memory CD4 and CD8 T cells in the liver and GLP-1RA protected from increasing number of those CD4 and CD8 T cells in the liver in vivo. Activated and in-vitro induced Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell subsets express GLP-1R. Activated splenic CD4-positive T cells and CD8-positive T cells in the presence of GLP-1RA in-vitro showed significantly less cell proliferation and cytokine production. GLP-1RA could target and suppress activated/memory T cells functionally, inducing T-cell exhaustion.

研究分野：免疫学

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 T細胞 GLP-1受容体 GLP-1受容体作動薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)) は肝障害を惹起する程度
のアルコール摂取歴がなく、その他ウイルス性肝炎など原因の明らかなものを除外した、肝への
脂肪沈着を認める肝疾患である。NAFLD は一般臨床では脂肪肝と称され、昨今メタボリック症
候群の一つの表現系であると考えられ、NAFLD を有する患者でメタボリック症候群を合併する
ものは 40%にも及ぶ。さらに近年は、この NAFLD が糖尿病発症の独立した誘因であるとする
疫学調査・臨床研究が相次いでいる (Diabetes56;984,2007, Diabetes Care31;1138,
31;1230,2008)。すなわち肝臓に脂肪蓄積が生じることこそが、その後の糖代謝異常に寄与する
因子であることが欧米人と日本人双方で明らかになっている。さらに糖尿病の改善は内臓脂肪
よりも肝臓の脂肪蓄積量の減少とよく相関することも明らかになっている
(Diabetes54;603,2005)。NAFLD の患者は非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic
steatohepatitis(以下 NASH)) と呼ばれる肝組織の炎症、壊死を伴う病態へ進行し、さらに肝硬
変、肝細胞癌を発症することから 21 世紀の癌の主因となると懸念されている。ウイルス性肝炎
が治療薬の進歩によりほぼ制圧可能となりつつある現在、NASH・NAFLD の解消は肝疾患のみ
ならず糖尿病および肝臓癌の予防・治療につながり、今後の日本人の疾病構造に与える影響は多
大と考えられる。

一方で、必ずしも肥満者全員に NAFLD が認められるわけではなく、NAFLD の原因を過剰
なエネルギー摂取のみとするのは困難であるとも考えられている。実際に、NAFLD の動物モデル
系でさえも感受性と抵抗性の種があることが知られている。

我々は T 細胞活性化抗体 (抗 CD3 抗体または T 細胞受容体抗体) のマウスへの投与で、肝内
免疫担当細胞を操作することが、NAFLD と NASH を誘導することを見出し報告した (Irie J
ら, J Exp Med;2006、Itoh A ら, J Diabetes Complications, 2017.)。これは NAFLD, NASH は
過剰なエネルギー摂取にて生じるとする既存の概念と全く異なるものであった。またさらに我々
は、肝内免疫担当細胞に GLP-1 受容体が強発現しており、本モデルにおいて GLP-1 受容体作動
薬リラグルトドを投与すると、NAFLD・NASH や糖代謝異常がすること、In vitro においてリ
ラグルトドは、活性化された CD4 陽性 T リンパ球のサイトカイン産生を用量依存的に直接抑制
することをも報告した (下図)。これらの知見は、GLP-1 シグナリングが摂餌量や体重管理と独
立して NAFLD・NASH の治療となることを示唆する。しかし一方で、GLP-1 シグナリングに
よる T 細胞の活性化抑制の機序および肝脂肪蓄積との関連性については不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、2 型糖尿病での炎症の主座は肝内免疫担当細胞であり、GLP-1 受容体作動
薬は肝内免疫担当細胞、特に T 細胞にアネルギーを誘導し過度の炎症起点が制御され NAFLD お
よび全身の糖脂質代謝異常が是正されると仮説をたて、GLP-1 受容体作動薬がもたらす免疫学的
な変化の検証を目的とし遂行した。

本研究は経口摂取による刺激で分泌される腸管 L 細胞から分泌された GLP-1 が、特に個体を
守るために外来抗原に常に暴露する頻度の高い肝臓や腸管上皮間 T 細胞に作用し、アネルギー
を誘導することで、過剰な免疫反応を抑制しつつも有害微生物や外来抗原への反応性を担保す
ると同時に、全身の代謝調節をも担う、という新たな学説を提唱するものである。

3. 研究の方法

(1) 抗 CD3 抗体投与後の肝内 T 細胞分画および脾内 T 細胞分画の GLP-1 受容体発現の検討

雌性 Balb/c マウスへ 10 μ g の抗 CD3 抗体を経静脈投与し、24 時間後に肝内リンパ球および
脾細胞を取り出し、T 細胞分画における GLP-1 受容体の発現をフローサイトメトリーで検討
した。

(2) ヘルパー CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における GLP-1 受容体発現の検討

雌性 Balb/c マウスの脾臓から抽出したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を in-vitro で各種サイトカ
イン存在下で Th1, Th2, Th17, 調節性 T 細胞に誘導し GLP-1 受容体の遺伝子発現および蛋白
発現をそれぞれ RT-PCR 法とフローサイトメトリーで解析した。また、脾臓から抽出した CD8
陽性 T 細胞についても in-vitro で抗 CD3/28 抗体で活性化し GLP-1 受容体の発現を同様に検
討した。

(3) GLP-1R 受容体作動薬の、Balb/c マウスの活性化 CD4 および CD8 陽性 T 細胞への直接効果お よび T 細胞表現型の変化

雌性 Balb/c マウスの脾臓から抽出した CD4 および CD8 陽性 T 細胞を Cell-Trace-Violet で
ラベリングしたのち、GLP1-RA 存在下で CD3/28 抗体を用いて活性化し、細胞表面マーカー
発現の変化や細胞増殖をフローサイトメトリーで解析した。また、サイトカインおよび免疫
応答に関する遺伝子発現および上清中のタンパク濃度をそれぞれ RT-PCR 法と ELISA 法で解
析した。

4. 研究成果

- (1) Balb/c マウスへの抗 CD3 抗体投与後、肝内 T 細胞において、GLP-1R+CD62L^{low} CD44^{high} Effector memory CD4 陽性 T 細胞および GLP-1R+CD62L^{low} CD44^{high} Effector memory CD8 陽性 T 細胞数の有意な増加を認めた。GLP-1 受容体作動薬を前投与したマウスでは、抗 CD3 抗体投与によるこれらの GLP-1R+Effector memoryCD4 および CD8 陽性 T 細胞の増加は有意に抑制され、抗 CD3 抗体非投与群と同程度の細胞数であった。一方で、脾臓内の T 細胞についても同様に解析したが、肝臓とは異なり、抗 CD3 抗体投与による GLP-1R+Effector memoryCD4 および CD8 陽性 T 細胞の増加は認められず、GLP-1 受容体作動薬の前投与による変化も認められなかった。
- (2) Balb/c マウスから抽出したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を in-vitro で分化させた Th1, Th2, Th17,そして調節性 T 細胞のいずれにおいても、GLP-1 受容体発現の有意な上昇を遺伝子レベル、蛋白レベルで認めた。一方、CD8 陽性 T 細胞についても活性化前に比較して活性化後に有意な GLP-1 受容体発現の上昇が遺伝子レベル、蛋白レベル共に認められた。
- (3) Balb/c マウスの脾臓から抽出した CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を GLP-1RA 存在下で CD3/28 抗体を用いて活性化したところ、GLP-1 受容体作動薬の添加用量依存性に CD4 および CD8 陽性 T 細胞の細胞増殖が抑制され、サイトカイン分泌が抑制された。

上記の結果は、我々が以前報告した、非肥満マウスへの、T 細胞を活性化する抗 CD3 抗体投与により誘導され GLP-1 受容体作動薬の前投与により軽減する肝脂肪蓄積という現象 (Itoh A ら, J Diabetes Complications, 2017.) が、肝内免疫細胞、特に T 細胞に発現した GLP-1 受容体を介して調節され得るという仮説に合致している。

検討を進めていく過程で、GLP-1 受容体作動薬が特に活性化あるいはエフェクターメモリー T 細胞上に発現している GLP-1 受容体へ直接作用し、アネルギーなどの T 細胞の機能変化をもたらす、その結果その結果脂肪肝を抑制するという、本研究の仮説を支持する重要な検討結果と考えていた (国際高血圧学会 2022 年 10 月京都にて学会発表)。しかし、特に(3)の検討を進めていく途上で、我々の予想に反して、CD4 陽性 T 細胞アネルギー誘導に重要な遺伝子である GRAIL や cbl-b の発現は変化を認めず、アネルギーの誘導という仮説の検証には更なる検討が必要と考えられた。一方で、CD8 陽性 T 細胞を用いた検討では、GLP-1 受容体作動薬の存在下で活性化した CD8 陽性 T 細胞で、PD-1 や Tim-3、LAG-3 といった Exhaustion マーカーが陽性となる CD8 陽性 T 細胞の増加を認めたため、GLP-1 受容体作動薬は CD8 陽性 T 細胞の GLP-1 受容体を介して Exhaustion をもたらす効果があるものと考えられた。Exhaustion はアネルギーとは異なる細胞表面マーカーの発現をきたすことが知られている (Huff, W. ら Int J Mol Sci.2019)ものの、細胞増殖の抑制および炎症性サイトカイン産生の抑制という点ではアネルギーに類似している。

近年小腸上皮内 T 細胞上に GLP-1R が発現しており、L 細胞から分泌された GLP-1 の全身への流入量を調節しているという報告 (He S. Nature. 2019) や、腸管における T 細胞依存性の免疫反応が小腸上皮内 T 細胞の GLP-1 受容体を介して修飾されるという報告 (Wong CK. ら Cell Metab 2022) から、活発な免疫応答が起きうる箇所での T 細胞における GLP-1 受容体の生理的意義の解明が進んできているが、GLP-1 受容体作動薬が GLP-1 受容体を介して T 細胞にこういった表現型をもたらすかは明らかでないとされている。

本研究の大きな成果として、GLP-1 受容体作動薬が T 細胞 Exhaustion に類似した表現型をもたらすこと、そして肝臓における T 細胞の GLP-1 受容体の役割として、非アルコール性脂肪肝疾患の形成に肝内 T 細胞活性化が寄与し、T 細胞に発現する GLP-1 受容体を介した介入により、T 細胞へ Exhaustion をもたらす機序により同疾患の軽減効果をもたらすことが示唆された。

今後の展望としては、in-vitro で Exhaustion を誘導した T 細胞を SCID マウスに選択的移入したのちに抗 CD3 抗体を投与し、脂肪肝が抑制されるか否かという検討を行い、英文誌に投稿する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Arata Itoh, Kazunari Yuki, Junichiro Irie, Hiroshi Itoh
2 . 発表標題 Glucagon-like peptide-1 suppresses activated effector memory T cell subsets in the fatty liver induced by anti-CD3-antibody administration in lean mice
3 . 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4 . 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------