

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08525

研究課題名（和文）1型糖尿病に対する膵島特異的自家樹状細胞ワクチン開発のための基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of islet-specific dendritic cell vaccination for type 1 diabetes

研究代表者

中條 大輔（Chujo, Daisuke）

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：30640528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：日本人の1型糖尿病発症における責任膵島抗原エピトープを明らかにし、その抗原エピトープで教育した自家樹状細胞を用いて膵島抗原特異的病源性T細胞活性の制御を試みることを目的とした。解析の結果、急性発症1型糖尿病患者においてGAD65: 115-127、GAD65: 247-266、プレプロインスリン: C19-A3、プレプロインスリン: C22-A5が責任抗原エピトープとして同定され、GAD65: 247-266特異的Th1細胞反応は他のエピトープ特異的反応と比較して優位に亢進していた。そこで、GAD65: 247-266ペプチドで教育した樹状細胞で病源性T細胞反応を制御するアッセイを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病はインスリンを産生する膵島細胞が自己免疫によって破壊され、自身のインスリンが分泌されなくなる難治性疾患である。本研究では、自己免疫の中心的役割を担う、すなわち膵島細胞の破壊を司る免疫細胞（病源性T細胞）を活性化させる引き金を同定した。この引き金と体内の細胞を上手く利用し、1型糖尿病の発症に関わる自己免疫反応を抑えることが可能かどうかについても研究を続けており、これが可能になれば自己免疫による膵島細胞の破壊を防ぐような新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify responsible islet antigen-specific T cell epitopes in Japanese patients with type 1 diabetes (T1D), and to regulate the pathogenic T cells by using regulatory dendritic cells educated with responsible epitopes. In our analyses, we identified GAD65: 115-127, GAD65: 247-266, Preproinsulin: C19-A3, and Preproinsulin: C22-A5 as responsible T cell epitopes in Japanese T1D patients. Furthermore, the frequencies of GAD65: 247-266-specific Th1 cells were significantly higher than those specific for other responsible epitopes. Based on these results, we established the assay to regulate the pathogenic T cell responses by using autologous regulatory dendritic cells educated with GAD65: 247-266.

研究分野：糖尿病・代謝学

キーワード：1型糖尿病 自己免疫 T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 1型糖尿病の病態と治療上の課題

1型糖尿病は自己免疫による膵β細胞の破壊を主因とし、内因性インスリンの絶対的欠乏によって発症する高血糖症候群である。標準治療はインスリンの自己注射による補充療法であり、その中断は生命の危機に直結する。治療上の最大の課題一つは、発症後にも膵β細胞破壊が継続することにより内因性インスリンが枯渇すると、綿密なインスリン治療を行なっても血糖変動が不安定となり、重症低血糖や高血糖緊急症に陥りやすくなることである。内因性インスリンの枯渇に対しては膵島移植が実施されることがあるが、欧米の成績でも移植後3年間膵島機能を維持できる症例は50%にも満たず、その主因は自己免疫の再燃と推察されている。つまり、患者QOLの向上や治癒を目指す上では、発症時(将来的には発症前にも)から移植後までのあらゆるステージで自己免疫を制御することが必須であるが、1型糖尿病においては膠原病等の他の自己免疫疾患と異なり、免疫学的介入法が確立されていない。

### (2) 1型糖尿病における自己免疫機序と免疫学的介入の可能性

膵β細胞の破壊は膵島抗原特異的T細胞を中心とした細胞性免疫によって引き起こされる。膵島由来の自己抗原を抗原提示細胞がHLAを介してCD4陽性およびCD8陽性T細胞に提示することによってT細胞が活性化され、膵β細胞を攻撃すると推測されている。1型糖尿病の各病型(急性発症・緩徐進行・劇症)において、責任抗原や誘発されるT細胞反応について不明な点が多かったが、申請者はこれらを独自に開発したEpiMaxアッセイ(Chujo et al. PLoS One 2013; 8, Chujo et al. Clin Immunol 2015; 161)で解析し、各病型に特異的なCD4陽性T細胞反応を同定した(H29~R1 科研費 基盤研究C; Chujo et al. J Clin Endocrinol Metab 2020; 105)。この解析では、急性発症1型糖尿病における膵島抗原特異的Th1反応の亢進、緩徐進行1型糖尿病における膵島特異的Th2反応の亢進、劇症1型糖尿病における膵島特異的制御性T細胞(Tr1)反応の極度の低下がみられ、これらの結果は本研究の重要な基盤データとなる。

海外では30年以上にわたり免疫抑制剤や抗原ワクチンを用いた免疫療法の臨床試験が多数行われたが、近年まで有効性を示した報告はなかった。2015年に抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリン(ATG)とG-CSF製剤の併用によって膵島機能が1年間保持されたという画期的な報告がなされ(Haller et al. J Clin Invest 2015; 125)、申請者も発症早期1型糖尿病を対象とした両剤による臨床試験を実施している。一方、これらは全身の免疫状態を修飾する治療法であり、安全性と効率を高めるには膵β細胞を標的とした特異的免疫療法の開発が望まれる。そこで今回、先述の解析データを基盤とし、T細胞に認識される抗原中のアミノ酸配列(責任抗原エピトープ)を同定し、それを用いたテラーメイド自家樹状細胞による病原性T細胞反応の制御を試みる。

## 2. 研究の目的

### (1) 目的1: 1型糖尿病発症に関わるT細胞反応を誘発する責任抗原エピトープの同定

申請者がこれまで同定した各患者において膵島抗原特異的T細胞反応を誘発する膵島抗原(複数のエピトープを含む)を、各エピトープレベルに分解した抗原ペプチドを用いて、再び同じ患者でT細胞反応を解析することによって、責任抗原エピトープを同定する。目的2で抗原特異的制御性T細胞の誘導を目指すことからCD4陽性T細胞をターゲット。

### (2) 目的2: 責任抗原エピトープで教育した自家樹状細胞による細胞性免疫反応の制御

個々の1型糖尿病患者において、目的1で同定した責任抗原エピトープで教育した自己結由来の制御性樹状細胞を樹立し、それを用いて病原性T細胞反応の抑制および制御性T細胞の誘導を試みることで、疾患の進展阻止や予防に繋がるワクチン開発の基盤データを得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 1型糖尿病発症に関わるT細胞反応を誘発する責任抗原エピトープの同定

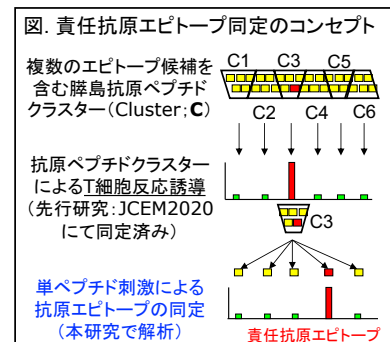
#### <対象症例と検体>

1型糖尿病の各病型における膵島抗原特異的T細胞反応を、複数の候補エピトープを含む抗原

(抗原ペプチドクラスター) レベルで同定した先行研究で用いた対象症例 (急性発症: 20 例、劇症: 18 例、緩徐進行: 18 例) および対照健常人 (17 例) の末梢血単核球 (PBMC) が液体窒素タンクに凍結保存されており、これらを用いる。各病型および健常人の間で年齢、性別、HLA-DR 遺伝子型に有意差がないよう設定されている。免疫細胞療法の開発目的が自己インスリン分泌の保持であることを鑑み、急性発症 1 型糖尿病と緩徐進行 1 型糖尿病を中心に研究を行う (劇症 1 型糖尿病は、発症時にすでに自己インスリン分泌が枯渇しているため)。

#### <責任抗原エпитープの同定: EpiMax>

目的 2 で抗原特異的制御性 T 細胞の誘導を目指すことから CD4 陽性 T 細胞をターゲットとする。先行研究において、個々の患者で CD4 陽性 T 細胞反応を誘発した膵島抗原をピックアップし、その抗原中の候補エпитープに該当する抗原ペプチド (図) で T 細胞反応を誘発し、責任抗原エпитープを同定する。



- ① 膵島抗原中の候補エピトープに該当するアミノ酸配列からなる 8~20mer の抗原ペプチド (単ペプチド; GAD65: 10 種、Preproinsulin: 6 種、IGRP: 4 種、ZnT8: 4 種) を作成する。

- ② 先行研究データをもとに各症例において選択された①の抗原ペプチドで PBMC を刺激・培養し、48 時間後にマルチプレックスサイトカインアレイを用いて上清中のサイトカイン分泌 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10, TNF- $\alpha$  等) を測定する。
- ③ IL-2 存在下にさらに 5 日間培養した後に、フローサイトメトリーにて CD4 陽性 T 細胞中のサイトカイン発現 (IL-10, IL-13, IL-17, INF- $\gamma$ ) を解析する。
- ④ ②と③のデータより CD4 陽性 T 細胞反応を誘発する責任抗原エピトープを同定する。

#### (2) 責任抗原エピトープで教育した自家樹状細胞による細胞性免疫反応の制御

目的 1 で同定した患者個々の責任抗原エピトープで教育した樹状細胞の樹立と、それを用いた病原性 T 細胞反応の制御および制御性 T 細胞の誘導を試みる。

- ① 対象患者の PBMC より磁気ビーズを用いて、CD14 陽性単球を単離する。
- ② フローサイトメトリーにて CD14 陽性単球の純度を確認した後、単球を IL-4、GM-CSF、活性型ビタミン D3 等の存在下で培養し、制御性樹状細胞 (To1DC) を樹立する。
- ③ To1DC をサイトカインを用いて成熟化させ、責任抗原ペプチドと共培養し教育することで抗原特異性を与えた後に収穫する。
- ④ ①と同一症例の PBMC より磁気ビーズを用いて、CD4 陽性 T 細胞を単離する。
- ⑤ ③で収穫した樹状細胞で CD4 陽性 T 細胞を刺激し、病原性 T 細胞反応の抑制 (IFN- $\gamma$ ・IL-17 産生の抑制) と制御性 T 細胞の誘導 (Foxp3・PD-1 発現および IL-10 産生の増加) を試みる。
- ⑥ ビタミン D3 や責任抗原等を用いない対照樹状細胞を用いて同様のアッセイを行い、抗原特異的 To1DC を用いた場合との間で、⑤のサイトカイン等の発現率を統計学的に比較することで To1DC の有効性を評価する。

#### 4. 研究成果

まず初めに、凍結保存されている、急性発症 1 型糖尿病患者: 20 名、劇症 1 型糖尿病患者: 18 名、緩徐進行 1 型糖尿病患者: 18 名、対照健常人: 17 名から採取した末梢血単核球 (PBMC) を用いて、責任抗原エピトープを明らかにするためのアッセイを構築した。申請者の先行研究では膵島抗原ペプチドを複数含むペプチドクラスターを用いて抗原レベルでの解析を実施したが、今回は、その先行研究で T 細胞反応を誘発したクラスターに含まれる各ペプチド単体での刺激を行うことで、類似のアッセイが成立することの確認と、エピトープの同定を試みた。アッセイにおける至適ペプチド濃度を決定した後、膵島抗原の単ペプチドで患者 PBMC を IL-2 存在下で刺激・培養し、フローサイトメトリーにてサイトカイン産生 T 細胞の割合を解析したところ、アッセイは成立し、エピトープの同定が可能であることが確認された。

次に上記のアッセイを用い、実際の症例の PBMC を用いて、抗原ペプチドクラスター GAD65-C1 に含まれる抗原ペプチド GAD65-p1~p5、およびプレプロインスリン (PPI) -C3 に含まれる抗原ペプチド PPI-p6~p11 で刺激したところ、GAD65-p1 (アミノ酸配列: 115-127: 以後 GAD65: 115-127 と表記) の刺激によって IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞 (Th1) の強い反応が見られ、当該症例では、これを責任抗原エピトープと判断することができた。これらの結果は、第 64 回日本糖尿病学会年次学術集会のシンポジウムおよび第 21 回日本先進糖尿病治療・1 型糖尿病研究会のリサーチ

シンポジウムにて発表された。

その後、膵島抗原特異的 Th1 反応が亢進していることが想定される急性発症 1 型糖尿病患者を対象に絞り込み、計 20 名の患者の PBMC を用いて同様の解析を継続した。その結果、3 名で GAD65: 115-127 が、16 名で GAD65: 247-266 が、3 名で PPI: C19-A3 が、3 名で PPI: C22-A5 が責任抗原エピトープとして挙げられた。また、GAD65: 247-266 特異的 Th1 細胞反応は他のエピトープ特異的の反応と比較して優位に亢進していた。これらの結果の一部は、第 57 回糖尿病学の進歩および第 97 回日本糖尿病学会中部地方会のシンポジウムにて発表され、結果の総括については、2024 年 6 月に開催予定の 84th American Diabetes Association Scientific Sessions で発表予定となっている。

これらのデータをもとに、GAD65: 247-266 をターゲットとし、GAD65: 247-266 特異的 Th1 反応を制御するためのアッセイを確立した。具体的には研究対象者由来の単球にサイトカイン等を添加し作成した制御性樹状細胞を同抗原ペプチドで教育し、その樹状細胞で同一対象者の Th1 反応を制御する試みであり、解析を実施してきた。今後もこのアッセイを用い、解析を継続予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中條大輔
2. 発表標題 1型糖尿病の発症機構Up-to-date 膵島特異的細胞性免疫を中心に
3. 学会等名 第57回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中條大輔
2. 発表標題 日本人1型糖尿病における膵島特異的細胞性免疫
3. 学会等名 第21回日本先進糖尿病治療・1型糖尿病研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中條大輔
2. 発表標題 Potential for immune intervention in type 1 diabetes
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中條大輔
2. 発表標題 1型糖尿病に対する免疫修飾療法の可能性
3. 学会等名 第97回日本糖尿病学会中部地方会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	戸邊 一之  (TOBE Kazuyuki)  (30251242)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	

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
---------	---------