

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08558

研究課題名（和文）膵島内環境における細胞代謝変化と自己免疫性糖尿病進展の関連性の検討

研究課題名（英文）Exploring the relationship between changes in cellular metabolism within the pancreatic islet environment and the progression of autoimmune diabetes

研究代表者

二里 哲朗 (Niri, Tetsuro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：10782550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：IRF4遺伝子欠損BDC2.5Tg NODマウスより採取したCD4+ T細胞の養子移入実験において、養子移入されたレシピエントの膵島浸潤細胞を解析し、IRF4の用量依存性によるT細胞の増殖及び、Th1/Th17両陽性細胞への分化を促進するという新たな知見を得た。さらに、in vitroでは、強刺激抗原と抗原提示細胞を加えて刺激した結果、IRF4欠損群において、わずかにT細胞分裂能の低下を認めたものの、生体内で認めたIRF4用量依存性の極端な細胞増殖やT細胞分化は認めなかった。一方で、TCR刺激条件下において、IRF4欠損CD4+ T細胞は、好氣的解糖系能が低下することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原特異的BDC2.5 CD4+ T細胞におけるIRF4発現用量依存性の糖尿病進展形成の要因として、活性化T細胞の機能変化と、解糖系優位の代謝変化の関連性が示唆された。IRF4発現調整そのものを目的とした治療は、広範な免疫不全などの副作用が危惧される。しかし、今回我々が示したT細胞代謝活性化の抑制など、IRF4関連の免疫細胞を標的とした1型糖尿病治療開発や、T細胞マーカーとしてのIRF4発現モニタリングによる機能的T細胞診断など、今後の臨床応用への展望が期待される。

研究成果の概要（英文）：In adoptive transfer experiments using CD4+ T cells harvested from IRF4-deficient BDC2.5Tg NOD mice, analysis of the islet-infiltrating cells of adoptively transferred recipients revealed new insights into IRF4 dose-dependent T cell proliferation and promotion of differentiation into Th1/Th17 double-positive cells. Furthermore, in vitro stimulation experiments with strong antigens showed a slight decrease in T-cell proliferation capacity in the IRF4-deficient group, although extreme cell proliferation and T-cell differentiation dependent on IRF4 dosage were not observed. Additionally, under TCR stimulation conditions, the aerobic glycolysis capability of IRF4-deficient CD4+ T cells was reduced.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：NODマウス 1型糖尿病 膵島自己免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 1型糖尿病の治療開発の現状と Interferon regulatory factor 4; IRF4 への着目

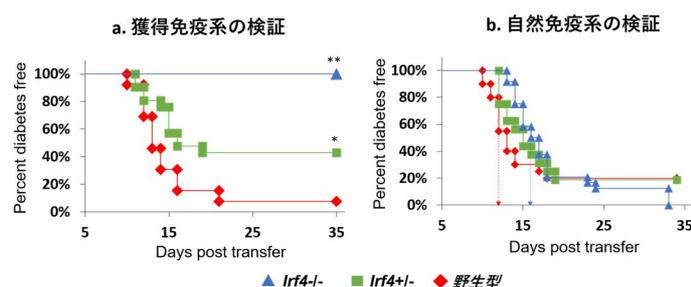
1型糖尿病は、膵細胞が特異的に破壊される自己免疫疾患である。これまでに、免疫担当細胞を標的にした様々な生物学的製剤の有効性を検討する大規模臨床試験が実施されたが、十分な有効性が確認できていない。また、我々の行った NOD マウスを用いた探索的研究では、免疫細胞における主要サイトカインのエフェクター機能欠損により糖尿病の発症を部分的に抑制する効果が認められたが、完全な発症抑制効果は認められなかった (Kuriya et al. Diabetologia. 2013)。さらに強力な抑制法の探索のため、我々は獲得免疫系 (T 細胞、B 細胞など)、自然免疫系 (樹状細胞など) の免疫担当細胞における増殖・分化に重要な役割を果たすパイオニア転写因子 IRF4 に着目した。そして、IRF4 遺伝子欠損 NOD マウスでは、ホモ欠損だけでなくヘテロ欠損でも膵島炎と糖尿病の発症をほぼ完全に制御するという結果を見出した (Akazawa et al. Diabetologia. 2015)。

(2) 膵島抗原特異的 BDC2.5 TCR トランスジェニック NOD マウスにおける 1 型糖尿病発症の抑制

上記の報告では、IRF4 遺伝子欠損による糖尿病の抑制効果が、獲得免疫系細胞・自然免疫系細胞のこういった役割変化によるのかは不明であった。そこで我々は、膵島抗原特異的 CD4⁺ T 細胞における IRF4 の発現が 1 型糖尿病の自己免疫を規定すると仮説を立て、下記の検討を行った。膵島自己抗原を標的とした抗原特異的 CD4⁺ T 細胞クローンの T 細胞受容体 (TCR) 発現マウス“BDC2.5 TCR トランスジェニック (Tg) NOD”において、野生型/ IRF4 ヘテロ欠損口/ホモ欠損マウスを作製し、それぞれの CD4⁺ T 細胞をドナーとして、免疫不全マウス“Rag1KO NOD”をレシピエントとした養子移入を行った。その結果、興味深いことに、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の IRF4 発現用量依存性に糖尿病が誘発された。一方、野生型 CD4⁺ T 細胞を野生型/ヘテロ欠損口/ホモ欠損

Rag1 KO NOD に移入した実験では、IRF4 ホモ欠損レシピエントにおいて糖尿病発症が遅延したものの、発症率に差を認めなかった (右図)。

以上より、我々は、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞上の IRF4 発現量が、糖尿病進展を規定することに着目し、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の役割を詳細に解析することを計画した。



a. IRF4(-/-,+/-,野生型)-BDC2.5 CD4⁺ T細胞の野生型Rag1 KOマウスへの養子移入
結果: IRF4^{-/-}にて完全抑制、IRF4^{+/-}にて50%抑制を確認
b. 野生型-BDC2.5 CD4⁺ T細胞のIRF4(-/-,+/-,野生型) Rag1 KOマウスへの養子移入
結果: IRF4^{-/-}にて有意な発症遅延を認めたが、累積発症率に有意差無し

2. 研究の目的

我々は、ヒトの 1 型糖尿病において中心的な役割を果たす、膵島抗原特異的 CD4⁺ T 細胞において、パイオニア転写因子“IRF4”発現の抑制により、糖尿病誘導能が用量依存性に抑制されることを確認した。今回、このモデルを用いて IRF4 の発現量と T 細胞のエフェクター機能や代謝変化との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵島抗原特異的 CD4⁺T 細胞上の IRF4 発現による増殖能・機能発現の解析

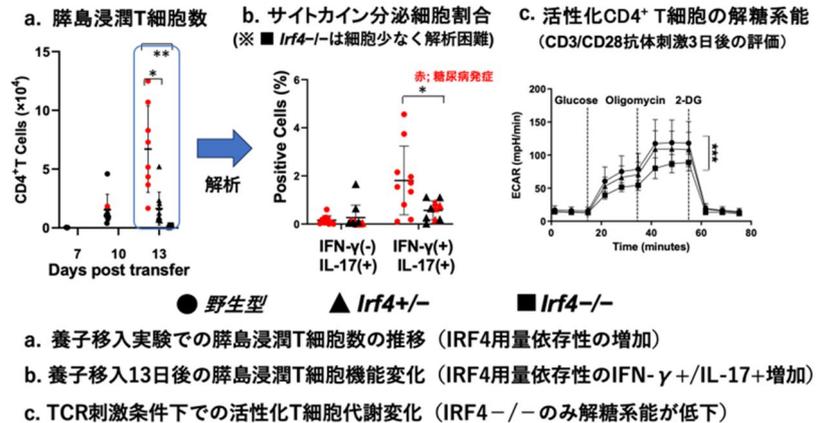
BDC2.5 CD4⁺ T 細胞の IRF4 発現依存性による糖尿病発症進展抑制効果のさらなる解析を行なった。具体的には、野生型、*Irf4*^{+/-}-BDC2.5NOD マウスのナイーブ CD4⁺T 細胞 (5.0×10^3 個) を同週齢の Rag1KO NOD マウスに養子移入を行い、糖尿病発症直前の膵島浸潤 T 細胞の機能を評価した。それぞれの細胞群の細胞増殖能を測定し、さらに活性化マーカー、エフェクター機能性変化 (サイトカイン; IFN- γ 、IL-17) をフローサイトメーターにて解析した。*in vitro* の系では、IRF4 欠損マウスから単離した CD4⁺T 細胞を既知の膵島自己抗原ペプチドで抗原刺激後、T 細胞増殖能やサイトカイン発現を同様に検討した。

(2) BDC2.5CD4⁺T 細胞代謝制御解析

in vitro 反応系の 3 群の CD4⁺T 細胞 (野生型、*Irf4*^{+/-}、*Irf4*^{-/-}) を用い、細胞外フラックスアナライザーを用いて、酸素消費速度によるミトコンドリア呼吸状態、細胞外酸化速度による解糖系状態を計測し、IRF4 遺伝子発現量の違いにより T 細胞の代謝状態がどう変化するかを検証した。

4. 研究成果

右図に示すように、膵島浸潤 T 細胞は養子移入後、経時的に増殖し、13 日時点で比較した際には、IRF4 用量依存性の T 細胞増殖と、Th1(IFN- γ 産生細胞)/Th17(IL-17 産生細胞) 両陽性細胞への分化を促すという新たな知見を得た (右図 a, b)。



さらに、*in vitro* では、強刺激抗原と抗原提示細胞を加えて刺激した結果、IRF4 欠損群において、わずかに T 細胞分裂能の低下を認めたものの、生体内で認めた IRF4 用量依存性の極端な細胞増殖や T 細胞分化は認めなかった。一方で、TCR 刺激条件下において、IRF4 欠損 CD4⁺ T 細胞は、好氣的解糖系能が低下することがわかった (上図 c)。これらの結果から、IRF4 を介した糖尿病発症には、活性化 CD4⁺ T 細胞の解糖系能への代謝シフトにともなう増殖および機能分化が深く影響するのではないかと推察した。

今後、CD4⁺ T 細胞の IRF4 発現量をモニタリングすることによる 1 型糖尿病発症予知や、T 細胞のエフェクター機能のみならず、T 細胞代謝を標的とした 1 型糖尿病治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 二里 哲朗, 井上 信一, 錦戸 慎平, 赤澤 諭, 三輪 昌輝, 古林 正和, 由井 克之, 川上 純, 阿比留 教生
2. 発表標題 転写因子IRF4の抗原特異的CD4+T細胞と自然免疫系細胞を介した糖尿病進展に与える影響の検討
3. 学会等名 第65回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二里 哲朗, 井上 信一, 錦戸 慎平, 赤澤 諭, 三輪 昌輝, 古林 正和, 由井 克之, 阿比留 教生, 川上 純
2. 発表標題 転写因子IRF4の抗原特異的CD4+T細胞および自然免疫系細胞への関与と自己免疫性糖尿病進展への役割について
3. 学会等名 第19回 1型糖尿病研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二里 哲朗, 井上 信一, 錦戸 慎平, 赤澤 諭, 三輪 昌輝, 古林 正和, 川上 純, 阿比留 教生
2. 発表標題 NODマウスにおける転写因子IRF4の獲得免疫系と自然免疫系細胞への多面的関与による自己免疫性糖尿病の進展制御について
3. 学会等名 第36回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tetsuro Niri, Shin-Ichi Inoue, Shinpei Nishikido, Satoru Akazawa, Masaki Miwa, Masakazu Kobayashi, Norio Abiru
2. 発表標題 Pleiotropic roles of transcription factor IRF4 on diabetogenic CD4+ T cells and innate immune cells in the development of autoimmune diabetes
3. 学会等名 19th Immunology of Diabetes Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二里 哲朗, 錦戸 慎, 赤澤 諭, 三輪 昌輝, 古林 正和, 阿比留 教生
2. 発表標題 IRF4の抗原特異的CD4+T細胞および自然免疫系細胞を介した1型糖尿病における免疫制御機構の解析
3. 学会等名 第20回日本先進糖尿病治療研究会・第18回1型糖尿病研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuro Niri, Shinpei Nishikido, Satoru Akazawa, Masaki Miwa, Masakazu Kobayashi, Norio Abiru
2. 発表標題 Role of the transcription factor IRF4 on diabetogenic CD4+ T cells and innate immune cells in the development of autoimmune diabetes
3. 学会等名 18th Immunology of Diabetes Congress (国際学会)
4. 発表年 2021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	阿比留 教生 (Abiru Norio) (00380981)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	赤澤 諭 (Akazawa Satoru) (50549409)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教 (17301)	

	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
研究協力者	井上 信一 (Inoue Shin-Ichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	由井 克之 (Yui Katsuyuki)		

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