

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 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20934

研究課題名（和文）CD8陽性T細胞の分化に着目した1型糖尿病の進展抑制を目指した治療法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic strategies to inhibit the progression of type 1 diabetes mellitus by focusing on the differentiation of CD8-positive T cells.

研究代表者

宮地 康高（Miyachi, Yasutaka）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00801515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：1型糖尿病は、膵島炎を病理学的特徴とする自己免疫疾患で、CD8陽性T細胞は膵島炎で最も多く認める炎症細胞である。T細胞が分化するときに、転写因子FoxO1の重要性が報告されているが、1型糖尿病の病態へどのように関与しているかは明らかでない。研究代表者はFoxO1阻害薬で前処置したCD8陽性T細胞を刺激するとIFN γ の産生と分泌が減少することを確認した。

1型糖尿病モデル（NOD）マウスへのFoxO1阻害薬投与は、NODマウスの随時血糖値と体重に影響を与えなかった。膵臓組織切片の検討では、FoxO1阻害薬によりCD8T細胞を含むT細胞の膵島への浸潤は、対照と比較して明らかな差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子FoxO1がCD8T細胞の分化に加えて、IFN γ 産生と分泌に関与することが明らかとなった。一方で、1型糖尿病の病態にFoxO1がどの程度関与するかについては、今回は前糖尿病状態の個体に薬剤を投与したため、まだ結論がでない。今後は、糖尿病発症直前あるいは発症後の個体への薬剤投与を行い検証をすすめる予定である。

研究成果の概要（英文）：Type 1 diabetes is an autoimmune disease characterized by insulinitis and CD8-positive T cells are the most common inflammatory cells in insulinitis. FoxO1 is a transcription factor that is important for T cell differentiation. We confirmed that stimulation of CD8-positive T cells with FoxO1 inhibitors decreased IFN γ production and secretion. Administration of FoxO1 inhibitors to NOD mice did not affect blood glucose levels or body weight. Analysis of pancreatic tissue sections showed that FoxO1 inhibitors caused no apparent difference in the infiltration of T cells, including CD8 T cells, into the islets compared to controls.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：1型糖尿病 FoxO1 CD8陽性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は、膵島炎を病理学的特徴とする自己免疫疾患で、CD8T 細胞は膵島炎で最も多く認める炎症細胞である。はじめに、樹状細胞などの抗原提示細胞は膵島特異的な自己抗原を取り込む。つぎに、CD4T 細胞が抗原提示細胞から提示された自己抗原を認識して、ヘルパーT 細胞に分化する。ヘルパーT 細胞は、CD8T 細胞の分化を促し、分化した CD8T 細胞はインターフェロン(IFN)などを分泌し、β細胞を破壊する。

T 細胞が分化するときに、複数の転写因子が協調して働くが、転写因子 FoxO1 は主要なものとして知られている。実際、ナイーブ CD8T 細胞は、ウイルス感染などにより FoxO1 の転写活性が低下すると、エフェクターCD8T 細胞に分化することが報告されている (Immunity 2012;36:374-387)。同時に転写活性が維持されることが、メモリーCD8T 細胞への分化に必須であることも報告されている (Immunity 2013;39:286-297)。

一方で、転写因子 FoxO1 が 1 型糖尿病の病態にどのように関与しているかは明らかでない。

2. 研究の目的

1 型糖尿病モデル (NOD) マウス由来の T 細胞において FoxO1 がどのように細胞分化に関与しているかを明らかにし、FoxO1 が 1 型糖尿病の治療標的となるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

方法 1 .

NOD マウスの脾臓からリンパ球を回収後に、FoxO1 阻害薬 (2 種類 : A,B) を用いてリンパ球を前処置した。抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、細胞分化とサイトカイン産生をフローサイトメトリーで評価した。また、上記の実験で培養上清を回収し、サイトカイン濃度を測定した。

方法 2 .

6 週齢の NOD マウスに浸透圧ポンプ (アルゼット #1004) を用いて FoxO1 阻害薬 (B) を 4 週間皮下投与した。投与期間中に体重と血糖測定をおこなった。投与終了後に膵臓組織を採取し、ホルマリン固定して、パラフィン包埋した。膵臓組織切片は、抗インスリン抗体と抗 CD3 抗体、CD8 抗体を用いて免疫染色をおこなった。

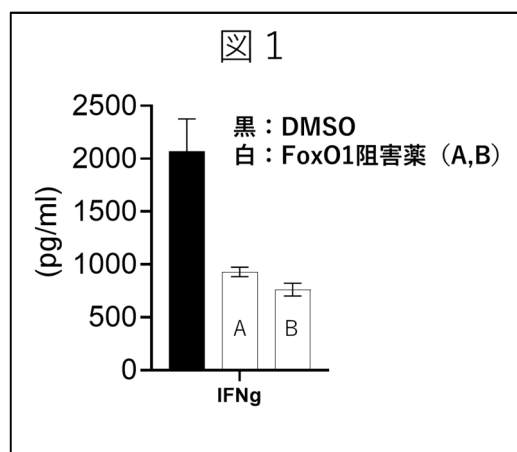
4. 研究成果

結果 1 .

方法 1 に基づいて、抗 CD3/CD28 抗体刺激 72 時間後のリンパ球 (脾細胞) を、フローサイトメトリー解析したところ、FoxO1 阻害薬はメモリー様 CD8T 細胞 (CD62L high, CD44 high) を 10 ~ 20% 程度減少させた。この結果は、T 細胞特異的 FoxO1 欠損マウスを用いた過去の報告と矛盾しないものと考えられた。

また、同じ実験系において、FoxO1 阻害薬は IFNγ 陽性 CD8T 細胞を減少させ、培養上清中の IFNγ 濃度を減少させた (図 1)。

これらの実験結果は、T 細胞受容体改変 NOD (NY8.3) マウス由来のリンパ球を膵島自己抗原 (IGRP) で刺激したときにも同様の結果が得られており、1 型糖尿病に特異的な実験系でも再現された。

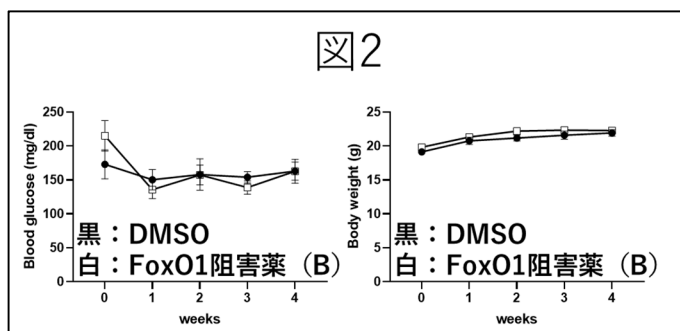


結果 2 .

方法 2 に基づいて、NOD マウスに FoxO1 阻害薬を 4 週間皮下に持続投与した。

4 週間の薬剤投与期間中に随時血糖値および体重増加は対照の DMSO 投与群と差は無く、薬剤の忍容性が確認された (図 2)。

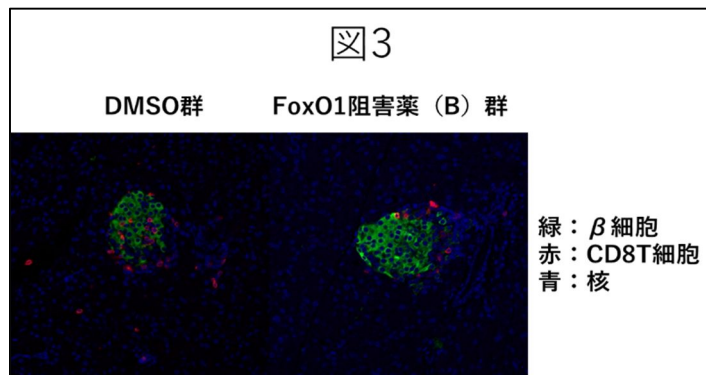
4 週間の薬剤投与後に、膵臓組織を採取し、組織切片の免疫染色を行った。FoxO1 阻害薬は、CD8T



細胞の浸潤に大きな影響を与えなかった(図3)。また、T細胞(CD3陽性細胞)の浸潤も明らかな変化は認めなかった。

本実験は、主に前糖尿病状態の若齢のNODマウスを用いて薬剤の忍容性を確認した。今後は、糖尿病発症直前あるいは発症後の個体への薬剤投与を行い、FoxO1が1型糖尿病の治療標的となるか否かの検証をすすめる予定である。

最後に、これまでの成果をもとに転写因子FoxO1の1型糖尿病モデル由来CD8T細胞における標的遺伝子を明らかにするために、現在RNA-seq解析を実行している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyachi Yasutaka, Kuo Taiyi, Son Jinsook, Accili Domenico	4. 巻 16
2. 論文標題 Aldo-ketoreductase 1c19 ablation does not affect insulin secretion in murine islets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260526	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi Yasutaka, Miyazawa Takashi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 HNF1A Mutations and Beta Cell Dysfunction in Diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23063222	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------