

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590994

研究課題名（和文） 1型糖尿病発症を制御するHybrid Tregの同定

研究課題名（英文） Identification of hybrid Treg in type 1 diabetes

研究代表者

島田 朗 (SHIMADA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：60206167

研究成果の概要（和文）：

1型糖尿病の完治を目指すには、自己の膵β細胞の分化と自己免疫の制御の双方が不可欠である。本研究は、自己免疫の制御に、CXCR3 というケモカイン受容体を発現した免疫制御性 T 細胞（Hybrid Treg）が、1型糖尿病の発症を効率的に制御することを明らかにした。さらに、1型糖尿病患者末梢血リンパ球の Hybrid Treg は加齢性の増加が少なく、HLA DR9 を有する場合にインスリンペプチド特異的な IL-10 産生性が低いことも見出した。

研究成果の概要（英文）：

In order to cure type 1 diabetes, we need to obtain both beta cell proliferation and regulation of autoimmunity. We found the unique regulatory T cell which expresses CXCR3 on the surface called hybrid Treg regulates type 1 diabetes effectively. Moreover, we found that type 1 diabetics have less age-related increase of the hybrid Treg and peripheral blood lymphocytes from type 1 diabetics with HLA DR9 have shown low IL-10 production upon insulin peptide stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：1型糖尿病、免疫制御性 T 細胞、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、比較的若年者に多く発症し、罹病期間が長く、高率に合併症を引き起こす

ことから患者の生活の質を著しく低下させる難病である。我が国においても1型糖尿病は全糖尿病の約10-15%を占めることが日本

糖尿病学会 1 型糖尿病調査委員会により明らかにされており、以前にも増して本疾患の成因解明、さらには、本疾患の「完治」を目指したアプローチが求められている。「完治」を目指した治療としては、現在、世界では膵島移植が行われているが、慢性膵炎からインスリン依存状態となった患者に対する膵島移植など、自己免疫の関与のない状況での膵島の生着率は高いが、自己免疫の関与する場合には、まだまだ成績は芳しくなく、一度インスリンを離脱しても 5 年ともたない状況である。したがって、1 型糖尿病に対する膵島移植においても自己免疫の制御が不可欠である。我が国においては、この膵島移植もドナーの問題などを含めて推進が困難な状況であるが、ごく最近、動物レベルではあるが、自己の膵臓の外分泌腺から膵β細胞と同様の特徴、機能を持つ細胞を作ることができると報告された (Zhou Q et al, *Nature*, 2008)。すなわち、膵島移植が実施困難な状況でも完治に繋がる道ができたと言える。このような状況においては、なおのこと 1 型糖尿病における自己免疫の制御が真の「完治」に向けて、ますます重要になってきたことは言うまでもない。

本疾患は、T 細胞を主体とするリンパ球浸潤により膵β細胞が破壊される自己免疫疾患とされているが、T 細胞の免疫応答としては動物モデル (Shimada A et al, *Diabetes*, 1996) ならびにヒト双方において T-helper1 (Th1) タイプ優位となることが、糖尿病発症に繋がることをこれまでわれわれは明らかにし、「1 型糖尿病は Th1 病である」という疾患概念の確立に大きく貢献してきた。さらに、ヒト 1 型糖尿病において Th1 タイプのケモカインである CXCL10 (IP-10) の関与を明らかにした (Shimada, A et al, *Diabetes Care*, 2001) ことを受け、その

CXCL10 の中和抗体投与による糖尿病発症抑制を試み、発症促進系 (Morimoto J et al, *J Immunol*, 2004)、自然発症系 (Shigihara T et al, *J Immunol*, 2005) 双方において 1 型糖尿病の発症抑制に成功した。したがって、CXCL10 が本疾患において重要な役割を担っていることは明らかである。

この CXCL10 の受容体は、CXCR3 であるが、CXCL10 が作用するために必要なこの受容体をノックアウトすることで、この「CXCL10-CXCR3 カスケード」の 1 型糖尿病発症機構における意義を明らかにできると考え、東京大学松島先生より供与を受けた C57BL/6 バックグラウンドの CXCR3 ノックアウトマウスを NOD マウス (1 型糖尿病モデルマウス) と交配して、CXCR3 ノックアウト NOD マウスを作成し、検討を続けてきた (平成 19-20 年度 基盤研究 C)。その結果、CXCR3 ノックアウト NOD マウスでは、自然経過で早期において糖尿病症が促進され、さらに、このマウスの脾細胞を NOD-scid マウス (NOD マウスの遺伝背景を有し、T 細胞も B 細胞も欠如するマウス) へ養子移入すると移入されたレシピエントである NOD-scid マウスにおいて著しく激しい糖尿病を来すことが判明した。この事実は、CXCR3 陽性細胞分画に強力な免疫制御作用を有する細胞群が存在していたことの裏返しと考えられる。この際、CXCR3 ノックアウト NOD マウスの発症直前には、膵所属リンパ節に免疫制御に関与するサイトカインなどの発現が著しく、膵臓局所においては全く正反対の結果であったことから、CXCR3 を欠如することによって膵所属リンパ節から膵臓局所に免疫を制御する細胞が遊走できない状況になっていると考えられた。CXCR3 は元来 Th1 細胞に発現しているが、ごく最近、制御性 T 細胞も Th1 反応の強い環境下では CXCR3 を発現 (= Hybrid Treg) し、よ

り効率的に炎症を down regulation する可能性が感染症モデルでは指摘され始めている (Koch MR et al, *Nature Immunology*, 2009)。1 型糖尿病を含む自己免疫においてはこの点について明らかにされていないが、感染症モデルと同様に Hybrid Treg が上述の現象に関与している可能性がある。自己免疫を制御するために、免疫系全体を抑制する介入を行うと (自己免疫は制御できたとしても) 悪性腫瘍の出現などの大きな問題を引き起こすことが予測されるが、CXCR3 陽性細胞分画中の膵臓局所への遊走に特異的に関与する免疫制御性 T 細胞が同定できれば、この細胞群だけを増やして治療に供するなど、安全な免疫制御への道が開け、引いては、1 型糖尿病の完治に繋がることを期待される。

## 2. 研究の目的

1 型糖尿病の完治を目指すには、自己の膵  $\beta$  細胞の分化と自己免疫の制御の双方が不可欠である。本研究は、自己免疫の制御に、CXCR3 というケモカイン受容体を発現した免疫制御性 T 細胞 (Hybrid Treg) が、1 型糖尿病の発症を効率的に制御するのかどうかを明らかにするとともに、その分画中の膵島抗原特異的な細胞を同定することを目的とした。

CXCR3 陽性細胞分画中の膵臓局所への遊走に特異的に関与する免疫制御性 T 細胞が同定できれば、この細胞群だけを増やして治療に供するなど、安全な免疫制御への道が開け、引いては、1 型糖尿病の完治に繋がることを期待される。

## 3. 研究の方法

CXCR3 陽性免疫制御性 T 細胞 (Hybrid Treg) の膵島における局在、組織分布の検討に加え、実際に生体内で Hybrid Treg が糖尿病発症を制御するかどうかの検討を行った。さらに、

抗原特異性について検討した。

### (1) 免疫染色による Hybrid Treg の局在の同定

NOD マウスにおいて、膵臓を採取し、免疫染色を行い、Hybrid Treg の膵島周囲、膵島内における局在を検討した。具体的には、CXCR3 と Foxp3 (免疫制御性 T 細胞のマスタ一遺伝子) の二重染色による評価を行ったが、CXCL10 を始め、CXCL9、CXCL11 との関係も検討した。

### (2) Hybrid Treg の分布の検討

NOD マウスの CXCR3 陽性脾細胞、および、CXCR3 陰性脾細胞をフローサイトメーターにてソートアウトし、それぞれを NOD-scid マウスに養子移入した。レシピエントである NOD-scid マウスの生体内に十分に分布すると考えられる期間、すなわち、移入後、4-8 週程度経過観察し、その後、屠殺の上、膵臓、膵所属リンパ節、膵臓局所における CXCR3 陽性細胞の分布を検討した。(1)と同様、免疫染色を行い、CXCR3 と Foxp3 の二重染色 (二重陽性細胞 = Hybrid Treg) による評価の他、CXCL10 を始め、CXCL9、CXCL11 との関係も検討した。

### (3) CXCR3 陽性 CD4 細胞による糖尿病発症抑制の検討

NOD マウスにシクロフォスファミド (CY) を投与すると約 2 週間で糖尿病を発症することは古くから知られているが、このシステムにおいて、CXCR3 陽性 CD4 細胞を移入することによって、糖尿病発症を実際に制御するかどうかを検討した。具体的には、NOD マウスから CXCR3 陽性 CD4 細胞と CXCR3 陰性 CD4 細

胞とをフローサイトメーターにてソートアウトし、それぞれ、CY を投与した NOD マウスへ細胞移入し、CXCR3 陽性 CD4 細胞が糖尿病発症を抑制するかどうかを検討した (Hybrid Treg は数が少ないため、それを含む分画である CXCR3 陽性 CD4 細胞で検討した)。in vitro で増殖させた Hybrid Treg が確かに糖尿病発症を制御するのか、さらに、この分画の膵島抗原に対する特異性を検討した。

(4) in vitro で増殖させた Hybrid Treg による糖尿病発症抑制の検討

(3)と同様に、NOD マウスに CY を投与する発症促進システムにおいて、Hybrid Treg を移入することによって、糖尿病発症を実際に抑制するかどうかを検討した。この検討においては、一般認識されているように、免疫制御性 T 細胞の細胞表面マーカーとして CD25 を使用し、CD25 陽性 CD4 陽性細胞分画を免疫制御性細胞として扱った。具体的には、NOD マウスから CXCR3 陽性 CD25 陽性 CD4 細胞 (Hybrid Treg) と CXCR3 陰性 CD25 陽性 CD4 細胞とをフローサイトメーターにてソートアウトし、それぞれ、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2 を添加の上、7 日間培養し、増殖させた。増殖させたその 2 分画を、それぞれ、CY を投与した NOD マウスへ細胞移入し、Hybrid Treg が糖尿病発症を抑制するかどうかを検討した。

(5) 1 型糖尿病発症を制御する Hybrid Treg の抗原特異性の検討

前述のように in vitro で増殖させた Hybrid Treg、また、ヒト 1 型糖尿病患者末梢血リンパ球を抗原提示細胞とともに膵島

関連の自己抗原 (GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素)、インスリンペプチドなど) および、対照として無関係の抗原にて刺激し、その抗原特異性を検討した (自ら確立した細胞内サイトカイン染色法を用いた検討: 文部省科学研究費 (奨励研究 A) ヒト 1 型糖尿病における T 細胞機能異常の検討、平成 10-11 年度)。さらに、膵島抗原特異的 Hybrid Treg 同定のため、フローサイトメーターにて膵島抗原に反応した細胞のみをソートアウトして、その T 細胞受容体の同定を行うとともに、サイトカイン発現などの特徴を調べた。

#### 4. 研究成果

(1)免疫染色による Hybrid Treg の局在の同定

20 週齢の雌 NOD マウスにおいて、膵臓を採取し、免疫染色を行い、Hybrid Treg の膵島における局在を検討した。CXCR3 と CD4、Foxp3 と CD4 の二重染色による評価をそれぞれ行い、膵島の周囲に局在することが判明した。また、CXCL10 は主に膵β細胞に、また、CXCL9 は膵島周囲の血管内皮に、さらに、CXCL11 は単球系の細胞にそれぞれ発現していた。

(2)Hybrid Treg の分布の検討

NOD マウスの CXCR3 陽性脾細胞、および、CXCR3 陰性脾細胞をフローサイトメーターにてソートアウトし、それぞれを NOD-scid マウスに養子移入した後、8 週後に屠殺し、CXCR3 陽性細胞の分布を検討した。CXCR3 陽性脾細胞のみ膵島周囲に浸潤し、CXCR3 陰性脾細胞は、全く膵島には認められなかった。さらに、CXCR3 陽性脾細胞を移入されたレシピエントの膵島にのみ、Foxp3 陽性細胞を認

めた。すなわち、膵島局所への遊走には、CXCR3が必要であることが判明した。なお、CXCL10、CXCL9、CXCL11については、(1)と同様の結果であった。

#### (3) CXCR3 陽性 CD4 細胞による糖尿病発症抑制の検討

NOD マウスから CXCR3 陽性 CD4 細胞と CXCR3 陰性 CD4 細胞とをフローサイトメーターにてソートアウトし、それぞれ、糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞とともに NOD-scid マウスに養子移入し、それぞれの発症抑制効果を検討した。CXCR3 陽性 CD4 細胞を移入した場合に発症抑制傾向を認めた。次に、NOD マウスに CY (サイクロフォスファミド) を投与する発症促進システムにおいて、Hybrid Treg を移入することによって、糖尿病発症を抑制するかどうかを検討した。この際、免疫制御性 T 細胞の細胞表面マーカーとして CD25 を使用し、CD25 陽性 CD4 陽性細胞分画を免疫制御性細胞として扱った。NOD マウスから CD25 陽性 CD4 細胞 (Hybrid Treg を含む分画) と CXCR3 ノックアウト NOD マウスから CD25 陽性 CD4 細胞 (これらは全て CXCR3 陰性) とをソートアウトし、それぞれ、CY を投与した NOD マウスへ細胞移入し、糖尿病発症に与える影響を検討した。CY 投与 11 日目の時点で、NOD マウスからの CD25 陽性 CD4 細胞移入群では、全く発症がなかったのに対して、CXCR3 ノックアウト NOD マウスから CD25 陽性 CD4 細胞移入群では、30%に発症を認め、発症率にも有意な差を認めた。したがって、糖尿病発症抑制には、Hybrid Treg の存在が必要であることが示された。

#### (4) 1 型糖尿病発症を制御する Hybrid Treg の抗原特異性の検討

1 型糖尿病患者末梢血リンパ球を採取し、膵島関連自己抗原 (GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素)、インスリンペプチドほか) および、対照として無関係の抗原にて刺激し、その抗原特異性を検討した (自ら確立した細胞内サイトカイン染色法を用いた検討: 文部省科学研究費 (奨励研究 A) ヒト 1 型糖尿病における T 細胞機能異常の検討、平成 10-11 年度)。ただし、本システムは、一度に多くの反応性を検討することが困難であり、非常に多くの時間を要したため、ELISPOT 法を用い、これを主体に抗原特異的反応性を検討した。HLA DR9 を有する 1 型糖尿病患者は、対照に比して、インスリンペプチド (10-24、11-25) に対して IL-10 を産生する細胞数が、有意に少なかった。また、1 型糖尿病患者においては、Hybrid Treg 数の年齢に伴う増加が対照に比して少なかった。

なお、膵島抗原特異的 Hybrid Treg 同定のため、現在、フローサイトメーターにて膵島抗原に反応した細胞のみをソートアウトして、その T 細胞受容体の同定を行うとともに、サイトカイン発現などの特徴をさらに検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice. Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S,

- Narumi S, Matsushima K, Itoh H. Diabetologia. 2012 55(8):2238-45. doi: 10.1007/s00125-012-2547-8. 査読あり。
- 2) Analysis of the HLA and non-HLA susceptibility loci in Japanese type 1 diabetes. Yamashita H, Awata T, Kawasaki E, Ikegami H, Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Nakanishi K, Takahashi K, Kobayashi T, Kawabata Y, Miyashita Y, Kurihara S, Morita-Ohkubo T, Katayama S; Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics. Diabetes Metab Res Rev. 2011 27(8):844-8. doi: 10.1002/dmrr.1234. 査読あり。
- 3) A mimic of viral double-stranded RNA triggers fulminant type 1 diabetes-like syndrome in regulatory T cell-deficient autoimmune diabetic mouse. Tada A, Shimada A, Yamada T, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Irie J, Bluestone JA, Itoh H. J Immunol. 2011 187(10):4947-53. doi: 10.4049/jimmunol.1000837. 査読あり。
- 4) RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates beta-cell death in fulminant type 1 diabetes. Aida K, Nishida Y, Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Awata T, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Ichijo M, Akiyama D, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Itakura J, Fujii H, Endo T, Kobayashi T. Diabetes. 2011 60(3):884-9. doi: 10.2337/db10-0795. 査読あり。
- 5) CXC chemokine ligand 10 DNA vaccination plus Complete Freund's Adjuvant reverses hyperglycemia in non-obese diabetic mice. Oikawa Y, Shimada A, Yamada Y, Okubo Y, Katsuki T, Shigihara T, Miyazaki J, Narumi S, Itoh H. Rev Diabet Stud. 2010 7(3):209-24. doi: 10.1900/RDS.2010.7.209. 査読あり。
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) 1型糖尿病患者における末梢血CXCR3陽性制御性T細胞分画の検討、及川洋一ほか、第54回日本糖尿病学会、2011. 5. 19～5. 21、札幌
- 2) 劇症1型糖尿病膵 (FT1D) における自然免疫/獲得免疫関連分子の発現、西田頼子ほか、第54回日本糖尿病学会、2011. 5. 19～5. 21、札幌
- 3) 1型糖尿病の成因と予防 新しい展開と洞察 1型糖尿病の「治癒」は可能か、島田朗ほか、第54回日本糖尿病学会、2011. 5. 19～5. 21、札幌
- 4) 1型糖尿病の成因と予防 新しい展開と洞察 劇症1型糖尿病と緩徐進行1型糖尿病の膵 その異質性、会田薫ほか、第54回日本糖尿病学会、2011. 5. 19～5. 21、札幌
- 5) 1型糖尿病の新しい展開 1型糖尿病の膵病変 劇症1型糖尿病と緩徐進行1型糖尿病の対比から、会田薫ほか、第53回日本糖尿病学会、2010. 5. 27～5. 29、岡山
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
島田 朗 (SHIMADA AKIRA)  
慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)  
研究者番号: 6 0 2 0 6 1 6 7
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし