

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09854

研究課題名(和文) 1型糖尿病におけるテラーメイド制御性T細胞誘導法の探索

研究課題名(英文) Induction of the responsible antigen-specific regulatory T cells in 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・特命教授

研究者番号：30640528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病の3病型(急性発症・劇症・緩徐進行性)における膵島特異的T細胞を網羅的に解析することで各病型における細胞性免疫の関与を明らかにし、その反応を制御する制御性T細胞誘導法を探索することを目的とした。急性発症1型糖尿病(AT1D)群における膵島特異的Th1発現や劇症1型糖尿病(FT1D)群におけるTr1反応の欠落などの知見が得られ、FT1D群では膵島特異的CD8陽性T細胞が著明に活性化していた。これら病型別の基盤データを元に、患者の単球より樹立した樹状細胞を責任抗原で教育し、同患者由来のCD4陽性T細胞と共培養することで制御性T細胞の誘導が可能かを試みるアッセイを構築し、解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は自己免疫による膵島細胞(インスリン分泌細胞)の破壊によって発症する疾患であるが、原因不明な点が多い。本研究では、1型糖尿病の各タイプ(急性発症型、緩徐進行型、劇症型)では自己免疫反応が異なり、急性発症型や劇症型では膵島細胞の破壊に関与する病原性の免疫反応が強いことを発見した。また劇症型では自己免疫を制御するブレーキの働きが弱っていることも判明した。この研究データをもとに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患者の血液を用いて研究を続けており、これが達成され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 is to identify islet antigen-specific T cell responses in the three subtypes of type 1 diabetes (T1D); acute onset (AT1D), slowly progressive (SP1D), and fulminant T1D (FT1D); and to induce the responsible antigen-specific regulatory T cells. We found that islet antigen-specific Th1 responses were up-regulated in AT1D and FT1D, and the specific Tr1 cell responses were diminished in FT1D. Furthermore, FT1D displayed the highest frequencies of islet antigen-specific CD8 T cells among the three subtypes of T1D. We are currently trying the induction of the antigen-specific regulatory T cells by using autologous dendritic cells that were differentiated from monocyte by using cytokines and educated with the responsible antigen peptides.

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 型糖尿病は自己免疫による膵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る急激な高血糖および深刻な血管合併症を併発する。唯一の標準治療であるインスリン治療の中断は生命の危機に直結する。革新的な補充療法として、膵島移植が開発され、インスリン治療からの離脱も可能であるが、移植後 5 年間、膵島機能を維持できる症例は約 10%に過ぎない。つまり、慢性期の膵島機能不全が問題であり、その主因は移植膵島に対する自己免疫の再燃と考えられている。そこで、1 型糖尿病に対しては補充療法のみではなく、発症時、または膵島移植後に、膵島の破壊を抑える根治的な治療法が望まれており、そのためには膵島に対する自己免疫の制御が必須である。

膵島の破壊を引き起こす自己免疫の主役は膵島抗原特異的 T 細胞である。GAD65 などの膵島由来の自己抗原を樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞が T 細胞に提示することにより、病原性 T 細胞 (Teff) が活性化されて膵島を破壊する。ただし、1 型糖尿病には発症様式の異なる 3 病型 (急性発症・劇症・緩徐進行) が存在し、各病型においてどの程度この細胞性免疫が関与しているかは不明である。

1 型糖尿病に対する免疫療法としては、シクロスポリンや抗 CD3 抗体などを用いた免疫抑制療法、インスリン経鼻・経口投与や GAD-alum ワクチンといった抗原特異的免疫療法が試みられてきたが長らく有効性は示されなかった。近年、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンと G-CSF 製剤の併用 (J Clin Invest 2015;125:448-455) や自家ポリクローナル制御性 T 細胞療法 (Sci Transl Med. 2015 ;25:ra189) において膵細胞機能を保持する効果が示唆されており、飛躍的な進歩として注目されている。しかし、これらは全身の免疫抑制を来す治療法であり、感染症や長期的な発癌など安全性を慎重に評価する必要がある。効率的に膵島を標的にした免疫療法の開発が望まれている。マウスを用いた研究では、インスリン抗原で教育した未熟樹状細胞 (Clin Exp Immunol 2010;160:331-9) や、制御性サイトカインで教育した樹状細胞 (Clin Immunol 2011;139: 336-49) が糖尿病の発症を抑制する事が報告され、上記の課題を克服する自家免疫細胞療法として臨床応用が望まれている。本研究では、個々の患者における責任抗原 (エピトープ) を用いることで自家免疫細胞療法をテーラーメイド化することを提案する。

2. 研究の目的

目的 1: 日本人 1 型糖尿病の 3 病型における膵島抗原特異的 T 細胞の網羅的解析

1 型糖尿病 3 病型 (急性発症・劇症・緩徐進行) および健常人において *EpiMax* を行う事で、各症例群における T 細胞のエピトープ、フェノタイプ、機能を網羅的に解析する。各群における T 細胞反応を比較することで、3 病型における細胞性免疫の関与を明らかにする。*EpiMax* とは、申請者らが開発した新しい抗原特異的 T 細胞の解析法では、(1) 複数の抗原ペプチド刺激によるエピトープの同定、(2) 多種サイトカイン同時測定による T 細胞タイプ (Th1 など) の決定、(3) 活性化 CD4・CD8 陽性 T 細胞の同定といった包括的な情報を得ることができる。

目的 2: 自家樹状細胞を用いたテーラーメイド制御性 T 細胞の誘導

個々の 1 型糖尿病患者において、サブテーマ 1 で同定した責任抗原と制御性サイトカインで教育した自己血由来の樹状細胞を用いて抗原特異的制御性 T 細胞の誘導を試みる。

3. 研究の方法

3-1. 日本人 1 型糖尿病における膵島抗原特異的 T 細胞反応の解析

3-1-1. 症例の設定

- 1) 1 型糖尿病患者 (急性発症: 20 例、劇症: 20 例、緩徐進行: 20 例) および対照健常人 (20 例) をリクルートする。
- 2) 患者群と健常人群の間で性別・年齢・HLA-DR 遺伝子型に有意差が生じないように設定する。

3-1-2. 検体の収集

- 1) 患者および健常人の末梢静脈血より比重遠心法を用いて末梢血単核球 (PBMC) を単離し、液体窒素タンクにて解析に使用するまで保存する。

3-1-3. 新たな手法による膵島抗原特異的 T 細胞の解析: *EpiMax*

- 1) 凍結 PBMC を融解し、膵島抗原ペプチドで刺激する。使用する膵島抗原は、Insulin, GAD65, IGRP, ZnT8 の 4 種類で、CD4 陽性および CD8 陽性の各 T 細胞をターゲットとした 8~20 mer のアミノ酸配列を持つ合成ペプチド (4~6 ペプチド/抗原) を使用する。
- 2) 培養後、マルチプレックスサイトカインアレイにて T 細胞からのサイトカイン分泌を複数測定することで、各病型における自己免疫性 T 細胞の責任抗原・エピトープやフェノタイプを決定する。
- 3) フローサイトメトリーにて、CD4 および CD8 陽性 T 細胞内のサイトカイン発現を解析する。

3-2. 自家樹状細胞を用いた病原性 T 細胞反応の制御

- 1) PBMC より磁気ビーズを用いて、CD14 陽性単球を単離する。
- 2) 単球を GM-CSF、IL-4、制御性サイトカイン (IL-10、TGF- β 等) の存在下で培養し、制御性樹状細胞を作成する。
- 3) 作成した制御性樹状細胞を各症例における責任抗原ペプチドで教育し、膵島抗原特異性を与えた後に収穫する (図 5)。
- 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、制御性 T 細胞の誘導 (Foxp3 発現、IL-10・TGF- β 産生の増加) および炎症性 T 細胞反応の抑制 (IFN- γ ・IL-17 産生の抑制) を試みる。

4. 研究成果

1 型糖尿病は膵島特異的 T 細胞による膵 β 細胞の破壊を主因とする自己免疫疾患とされているが、ヒトにおいて責任抗原や誘発される細胞性免疫反応については未解明な点が多い。本研究では、日本人 1 型糖尿病の 3 病型 (急性発症・劇症・緩徐進行性) における膵島特異的 T 細胞を網羅的に解析することで各病型における細胞性免疫の関与を明らかにし、その反応を制御するテラーメイド制御性 T 細胞誘導法を探索することを目的とした。

急性発症 1 型糖尿病 (AT1D): 20 例、緩徐進行 1 型糖尿病 (SP1D): 17 例、劇症 1 型糖尿病 (FT1D): 18 例、健常コントロール (ND): 17 例の各患者より単離した末梢血単核球 (PBMC) を、CD4 および CD8 陽性 T 細胞を標的とし GAD65、Preproinsulin (PPI)、IGRP、ZnT8 の各膵島抗原ペプチドで刺激し、サイトカイン発現の解析を行った。CD4 陽性 T 細胞の解析では、AT1D 群において GAD65 抗原や PPI 抗原に特異的な IFN- γ 産生 T 細胞 (Th1) の発現が亢進しており、FT1D 群においては、全ての膵島抗原に対する IL-10 産生 T 細胞 (Tr1) の反応が欠落していた。SP1D 群では、IL-13 産生 T 細胞 (Th2) の発現亢進を誘導する膵島抗原として GAD65 と IGRP が同定された。以上の結果は、2018 年 6 月に第 78 回米国糖尿病学会にて口演発表し、現在論文投稿中である。

また、CD8 陽性 T 細胞の解析では、AT1D 群、FT1D 群でのみ、IGRP および ZnT8 特異的 CD8 陽性 T 細胞の有意な活性化がみられ、その反応は FT1D 群で最も強かった。この結果は、2019 年 9 月の第 55 回欧州糖尿病会議にて発表した。

これらの病型別の細胞性免疫反応の差異を示した既報はなく、1 型糖尿病の主因である自己免疫を制御する方法を検討するにあたって、非常に重要な基盤データとなった。

さらに、これらの基盤データを元に制御性 T 細胞誘導の試みた。具体的には、患者 PBMC より樹立した単球由来の樹状細胞を責任抗原で教育し、同患者由来の CD4 陽性 T 細胞と共培養することで制御性 T 細胞の誘導が可能かを試みるアッセイを構築しており、解析を実施した。今後も解析を継続予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koji Maruyama, Daisuke Chujo, Koji Watanabe, Akitsu Kawabe, Takehiro Sugiyama, Mitsuru Ohsugi, Akiyo Tanabe, Kohjiro Ueki, Hiroshi Kajio	4. 巻 Epub ahead
2. 論文標題 Evaluation of cellular and humoral autoimmunity before the development of type21 diabetes in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 Epub ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Daisuke Chujo, Akitsu Kawabe, Nobuyuki Takahashi, Maya Matsushita, Chiharu Tsutsumi, Fumitaka Haseda, Akihisa Imagawa, Toshiaki Hanafusa, Kunimasa Yagi, Masayuki Shimoda, Kohjiro Ueki, Hiroshi Kajio
2. 発表標題 Distinct Phenotypes of Islet Antigen-Specific CD4+ T Cells among the Three Subtypes of Type 1 Diabetes
3. 学会等名 78th American Diabetes Association Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中條大輔
2. 発表標題 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18回日本先進糖尿病治療研究会/第16回1型糖尿病研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Chujo, Akitsu Kawabe, Nobuyuki Takahashi, Maya Matsushita, Chiharu Tsutsumi, Fumitaka Haseda, Akihisa Imagawa, Toshiaki Hanafusa, Kunimasa Yagi, Masayuki Shimoda, Kohjiro Ueki, Hiroshi Kajio
2. 発表標題 Distinct Phenotypes of Islet Antigen-Specific CD4+ T Cells among the Three Subtypes of Type 1 Diabetes
3. 学会等名 The 78th American Diabetes Association Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----