

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19543

研究課題名(和文)自然炎症・免疫軸に係る糖尿病性血管障害の分子動態の臨床意義の解明

研究課題名(英文)Clinical significance of molecular dynamics of diabetic angiopathy related to Innate Lymphoid cell (ILC).

研究代表者

牛込 恵美(白石恵美)(Ushigome, Emi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80440890

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):動脈硬化誘発飼料(F2HFD1)を負荷した動脈硬化モデルマウス(ApoE KOマウス)において、Group1,2,3 ILC(ILC1,2,3)の比率は組織ごとに異なっていた。動脈硬化巣を含む大動脈及び血液ではILC1が優位、精巣上体周囲脂肪組織ではILC2が優位であった。  
多施設多目的前向きコホート(KAMOGAWA cohort)に参加している2型糖尿病患者及び正常耐糖能者の末梢血におけるILC比率を比較検討した。2型糖尿病患者においてILC2の比率が高い傾向にあった。また、正常耐糖能者に比し2型糖尿病患者ではILC2/ILC1比及びILC2/ILC3比は高く、個体間でばらつきがあった。

研究成果の概要(英文):In Apolipoprotein E knockout (ApoE KO) mice fed with an atherogenic diet (F2HFD1), the percentage of various ILC subsets from ILCs was varied. ILC1 frequencies were increased in thoracic aorta and blood, and ILC2 frequencies were increased in epididymal fat.  
We performed a case-control study to examine the frequency of peripheral blood ILC subset in patients with type 2 diabetes compared with those in healthy individuals using KAMOGAWA-DM cohort. ILC2 frequencies were increased in T2DM relative to the total peripheral blood ILC (Lin- CD127+) population and total live CD45+ lymphocytes. The ratio of ILC2 to ILC1 or ILC3 was varied widely and was increased in the peripheral blood of patients with type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病

キーワード：自然免疫リンパ球 糖尿病 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

**糖尿病生命予後改善には、動脈硬化・大血管障害の予防が重要である。**申請者らは5年以上、1500例を超えるコホート研究により、糖尿病患者の生命予後を左右する合併症予防には血圧変動管理による大血管障害予防の重要性を世界で初めて報告し、**動脈硬化における持続的炎症による血管障害制御の重要性を明確にした**【申請者牛込ら J Hum Hypertension, 2014, Hypertens Res, 2014, J Diabetes Inves, 2013、など14報】。糖尿病合併症の進行予防は国家の医療財政上、最重要課題である。

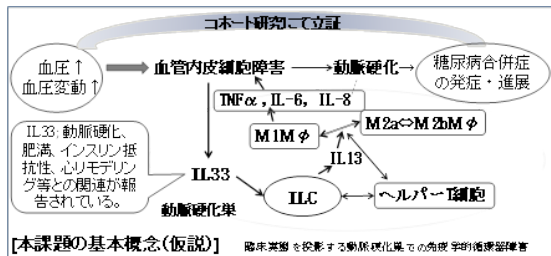
**先端免疫学知見と臨床実態を連関させた動脈硬化・大血管障害の予防法の提供**

多くの難治性疾患において免疫学的破綻の関与が推定されているが、古典的獲得免疫の概念のみでは新規創薬標的の創出は難しい。最近、自然免疫/自然炎症を担う自然リンパ球(Innate Lymphoid cell, ILC)の循環器・血管系疾患における役割の重要性が注目されている。動脈硬化、インスリン抵抗性、肥満(脂肪組織増大)などとの関連が報告されつつある。Group2 Innate Lymphoid cell (ILC2)の活性化において重要な働きをするIL33は、新規的治療標的として世界的に競争が激化しつつある(Hanら, J. Immunol., 2015, Halim, Int Immunol., 2015, Zeydaら, Nature Com., 2012, Hasanら, BMC Immunol, 2014)。



**糖尿病合併症予防のための動脈硬化薬の自然炎症の制御研究への準備**

血圧変動が血管内皮障害を介し、障害内皮巣局所に持続的炎症を惹起し、糖尿病合併症の発症・進展に係ることは、申請者らの大規模コホート研究で推定されるに至った。



2. 研究の目的

糖尿病合併症として動脈硬化・大血管障害の予防は生命予後を改善させるために重要で

ある。動脈硬化の病態として、動脈硬化巣におけるマクロファージとヘルパーT細胞のかわり、血管内皮障害の重要性は認識されている。古典的獲得免疫概念のみでは動脈硬化病態制御は未だ困難である。本研究においては、自然免疫/自然炎症を担うILCに注目し、動物モデルにおける病巣と末梢血 ILC の対応付けによる末梢血診断法の開発、糖尿病大型コホートを活用し、ヒト末梢血 ILC が動脈硬化評価マーカーとなるか検討する。もって、自然炎症を担うILCの分子動態の臨床意義を明確にし、斬新な創薬標的を描出する。

3. 研究の方法

1. 動物モデルにおける病巣 ILC と末梢血 ILC の対応付けによる末梢血診断法の開発

動物モデルにより末梢血 ILC と動脈硬化の病態進展および動脈硬化巣における ILC と関連を検討する。

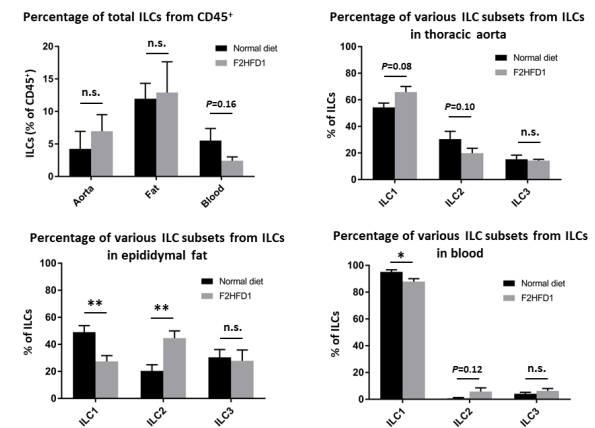
2. 大規模糖尿病コホートを活用してヒト末梢血 ILC が動脈硬化評価マーカーとなるか検討

2013年より開始している糖尿病患者に特化した大規模コホート研究(KAMOGAWA-DM cohort study)における保存血清・血球を用いて、IL33/可溶性IL33受容体ST2および末梢血 ILC サブセット比率の糖尿病患者における動態を評価する。

4. 研究成果

1. 動脈硬化モデルマウスにおける病巣 ILC

動脈硬化誘発飼料(F2HFD1)を負荷した動脈硬化モデルマウス(ApoE KO マウス)において、Group1,2,3 ILC (ILC1,2,3)の比率は組織ごとに異なっていた。動脈硬化巣を含む大動脈及び血液では ILC1 が優位、精巣上体周囲脂肪組織では ILC2 が優位であった。(図1)

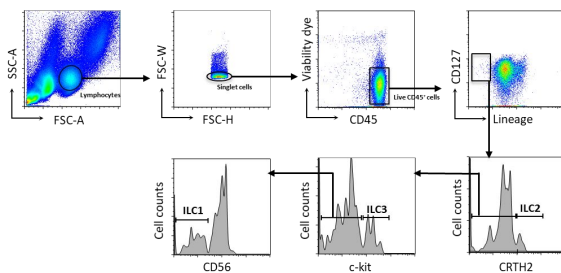


(図1) Normal diet もしくは F2HFD1 を負荷した ApoE KO マウスにおける病巣 ILC 比率

2. ヒト末梢血 ILC 評価法の検討

末梢血を採取、パーコール密度勾配遠心により単核球分画を抽出した。抽出した単核球分

画は、生細胞を染色後、表面抗原を染色、マルチカラーフローサイトメーターにて解析した。FSC、SSCによりリンパ球分画を選択後、生 CD45 陽性細胞を選択した。リンパ球・顆粒球・単球系細胞に対する表面抗原を Lineage-specific marker とし、CD127 陽性 Lineage-specific marker 陰性の場合を自然リンパ球とした。自然リンパ球において CRTH2 陽性の場合を ILC2、CRTH2 陰性分画において c-kit 陽性の場合を ILC3、c-kit 陰性 CD56 陰性の場合を ILC1 とした。(図 2)



(図 2) マルチフローサイトメーターを用いた ILC1, 2, 3 の解析方法

### 3. 大規模糖尿病コホートでのヒト末梢血 ILC の評価

多施設多目的前向きコホート (KAMOGAWA cohort) に参加している 2 型糖尿病患者及び正常耐糖能者の末梢血における ILC 比率を比較検討した。2 型糖尿病患者において ILC2 の比率が高い傾向にあった。(図 3)

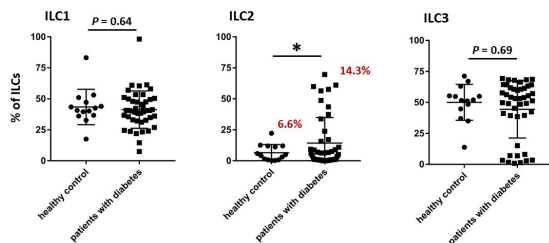


図 3

また、正常耐糖能者に比し 2 型糖尿病患者では ILC2/ILC1 比及び ILC2/ILC3 比は高く、個体間でばらつきが大きかった。(図 4)

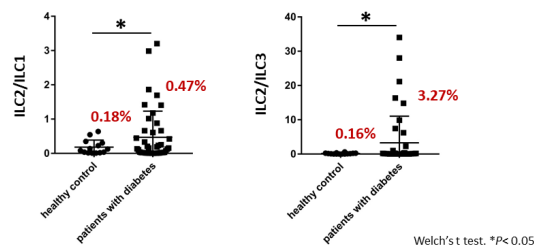


図 4

### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

生込恵美、福田拓也、濱口真英、田中武兵、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明・動脈硬化モデルマウスの大動脈および脂肪組織における自然リンパ球の検討. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018 年 5 月 25 日 (東京).

大藪知香子、濱口真英、北川功幸、福田拓也、生込恵美、田中武兵、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明・2 型糖尿病患者における自然リンパ球の解析. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018 年 5 月 25 日 (東京).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
(府立医大の WEB アドレスを

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
生込 恵美 (Ushigome Emi)  
京都府立医科大学 医学研究科 糖尿病治療学講座 講師

研究者番号：80440890

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )