

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17497

研究課題名(和文) GAD反応性T細胞を標的とした根治的1型糖尿病治療の開発

研究課題名(英文) Development of treatment targeting GAD autoreactive T cell in Japanese patients with type 1 diabetes

研究代表者

北川 功幸 (Kitagawa, Noriyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：50866241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らのグループで実施している大規模糖尿病患者コホートから急性発症1型糖尿病(1Aおよび1B)、緩徐進行1型糖尿病症例を選出し、BD RhapsodyシングルセルV(D)Jシーケンスを実施した。免疫シーケンスにより、1型糖尿病患者血中T細胞のTCRの解析を試み、GAD反応性のTCR配列を明らかにした。また、膵島抗原のオーバーラップペプチドを用いて、Ex vivoでT細胞刺激実験を実施し、1型糖尿病を持つ患者由来T細胞の反応性を比較、検討した。日本人1型糖尿病由来の末梢血T細胞がex vivoで活性化することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己反応性T細胞の免疫応答についての詳細や、病型・患者背景・治療などその他の要素との関連が明らかになれば、発症前診断や予防的治療、進展予防などの治療介入が可能になる可能性がある。本研究結果が、日本人1型糖尿病における自己抗原・自己反応性T細胞の存在、およびその免疫反応について明らかにする一助になりうるが、さらに多くの症例について検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, single-cell VDJ sequencing, we tried to identify the TCR sequences

of autoreactive T cells characteristic of Japanese type 1 diabetes mellitus (T1DM) and to clarify the pairing of TCR of peripheral blood mononuclear cells from patients with T1DM enrolled in our diabetic cohort study. And then, we performed ex vivo cytokine assay using overlapped peptide of pancreatic islet antigen. The reaction of T cells from patients with T1DM was compared. Peripheral T cells from Japanese T1DM were activated by overlapped peptide of pancreatic islet antigen.

研究分野：糖尿病

キーワード：1型糖尿病 自己反応性T細胞 T細胞受容体 シングルセルV(D)Jシーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病ではウイルスや細菌感染により誘導されたエフェクターT細胞の受容体 (TCR) が自己膵島抗原と交差反応を起すと考えられている (Cole DK, et al. *J Clin Invest.* 2016)。自己膵島抗原の代表として GAD があり、実際抗 GAD 抗体は1型糖尿病で最も高頻度に見られる自己抗体である (川崎英二ら、*糖尿病* 2013;56:584-589)。また、抗原提示細胞のリスクとして HLA があり、HLA-DR4 はその代表的リスクアレルである。このため、HLA-DR4 の抗原提示細胞が GAD を提示した場合に GAD を認識する TCR は自己膵島反応性 TCR と考えられ、この TCR を有するキラーT細胞、ヘルパーT細胞が1型糖尿病の自己免疫の本体と想定されている。

1型糖尿病の病態解明において、GAD を認識する TCR にどのようなバリエーションと共通性があるのかは根源的な課題であるが、わずかな種類の TCR しか同定されていない。例えば R164 と 4.13 の2つのクローンは HLA-DR4 で提示される GAD555-567 を認識する (Reijonen H, et al. *Diabetes.* 2002; Reijonen H, et al. *Diabetes.* 2004; Gebe JA, et al. *J Immunol.* 2009)

HLA と GAD のペプチド配列により、これを認識する TCR も異なってくる。実際我々は自己抗体を網羅的に探索する ProtoArray を用いた先行研究で、GAD 抗体陽性者において GAD65 か GAD67 いずれを認識するかは個々の症例で異なるという知見を得ている。また、1型糖尿病に対する HLA のリスクは欧米人と日本人では異なり、この観点から日本人1型糖尿病の GAD 反応性 TCR を同定するには日本人末梢血 T細胞での検討が必要だが、この試みは成功していない。

このようなアンメットニーズのもと開発されたシングルセル V (D) J シークエンスでは細胞レベルで V (D) J 領域を増幅、次世代シーケンサーで解析することで V (D) J の全長配列、細胞受容体 (BCR) の軽・重鎖ペアとアイソタイプ、TCR の 鎖および 鎖ペアおよび、同一細胞での遺伝子発現解析による活性化状態・細胞活動性の評価が可能である。

### 2. 研究の目的

日本人1型糖尿病における自己反応性 TCR を同定し、1型糖尿病の発症予防や膵島・膵臓移植の治療成績向上をもたらす新治療を開発することが本研究の目的である。すなわち、日本人1型糖尿病の病態の基盤となる自己反応性 T細胞の TCR を特定することで、今後、特定した TCR を有する症例への発症前介入が可能になる。自己反応性 T細胞の制御は膵島移植・膵臓移植治療成績を飛躍的に向上させる。また、細胞の機能が残存している1型糖尿病においては病態の進展を阻止することが可能になる。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. コホートからの対象者の選出

申請者らのグループで実施している大規模糖尿病患者コホートから急性発症1型糖尿病(1A および 1B)、緩徐進行1型糖尿病症例を選出し、BD Rhapsody シングルセル VDJ シークエンスを実施した。

#### 3.2. シングルセル VDJ シークエンス

末梢血はヘパリン採血で取得した。採取した全血から末梢血単核細胞 (PBMCs) を密度勾配遠心分離で分離し、カウントし、BD Rhapsody カートリッジにロードするために 650  $\mu$ L の冷サンプルバッファーに再懸濁した。BD Rhapsody Express システム (BD Biosciences, NJ, USA) を用いて、TCR 解析を伴う標的 scRNA-seq を実施した。ライブラリ作成は、BD Rhapsody Targeted mRNA and AbSeq Reagent Kit (BD Biosciences) を用いて、 $1 \times 10^4$  個の細胞をビーズ付きマイ

クロウエルプレートに捕獲した。続いて、BD Rhapsody VDJ CDR3 プロトコルに従って、細胞溶解、ビーズ回収、cDNA 合成、テンプレートスイッチング、Klenow 伸長、ライブラリ調製(ヒト T 細胞発現パネルと TCR 遺伝子ライブラリを用いた標的遺伝子ライブラリ)を行なった。最終的にプールしたライブラリに 20%の PhiX コントロール DNA をスパイクして配列の複雑性を高め、その後 HiSeq X Ten シーケンサー (イルミナ社製) で配列決定 (75 bp × 225 bp ペアエンド) した。

### 3-3. データ解析

配列から得られた FASTQ ファイルは、Seven Bridges Platform (<https://www.sevenbridges.com/d>) の BD Rhapsody Targeted Analysis Pipeline with V(D)J processing incorporated (BD Biosciences) を用いて処理した。まず、低品質のリードペアをリード長、平均塩基品質スコア、最高塩基頻度に基づき除去した。高品質な R1 リードは、細胞ラベルとユニーク分子識別子 (UMI) 配列を同定するために解析した。高品質な R2 リードは、Bowtie2 プログラムを用いて、ImMunoGeneTics information system® (IMGT.org) の参照パネル配列 (Human T cell Expression panel) および TCR 遺伝子セグメントとアライメントした。CDR3 の決定には、IGblast を使用した。同一の細胞標識、同一の UMI 配列、同一の遺伝子を持つリードをアセンブルした。得られたカウントは、BD Biosciences 社が開発したエラー補正アルゴリズム (recursive substitution error correction (RSEC) および distribution-based error correction (DBEC)) にかげられた。Rhapsody パイプラインで得られた DBEC 補正後の分子数データを SeqGeq version 1.6.0 に取り込んだ。品質管理として発現遺伝子数が少ない細胞を死細胞として除外した。その後、Seurat プラグインを使用して SeqGeq の次元削減と不偏クラスタリングを行った。Seurat では使用したすべての遺伝子を含むように設定し、QC 関数、log 正規化、UMAP (uniform manifold approximation and projection) を使用して次元削減を行った。Seurat プラグインを使用して UMAP、発現増加もしくは低下している遺伝子のリスト、PBMC 遺伝子モデルを用いたアノテーション情報などのデータを出力した。さらにクラスタリング解析は、手動でキュレーションを行い完了した。各細胞のクラスタ情報と TCR CDR3 情報の統合は、SeqGeq の VDJExplorer プラグインを用いて実施した。遺伝子の構造多様性のパラメータとして、Shannon index  $H'$  を算出した。

### 自己反応性 T 細胞と自己抗原ペプチドのオーバーラップペプチド混合液を用いた *ex vivo* assay

KAMOGAWA-DM コホート研究において同意が得られた 1 型糖尿病患者から、ヒト末梢血単核球 (Human PBMC) を採取・保存した。Human PBMC を用いたサイトカインアッセイを実施、フローサイトメトリー (FACS) で各症例の免疫細胞の分画を定量的に評価した。Human PBMC をヒト GAD65, IA-2, insulin のオーバーラップペプチド混合液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で刺激培養した。T 細胞分画ごとに IFN 産生細胞、TNF 産生細胞を FACS により検出した。

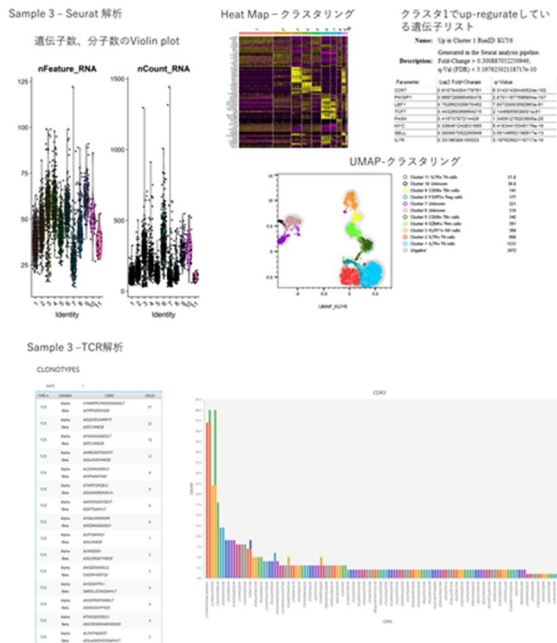
## 4. 研究成果

### シングルセル mRNA イミュノフェノタイピングにより血中 T 細胞の分化経路が判明

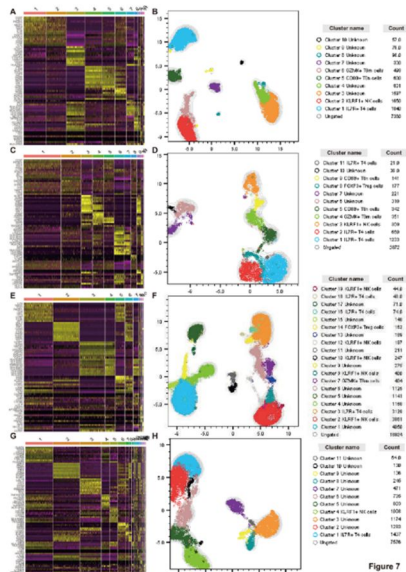
免疫シークエンスにより、1 型糖尿病患者血中 T 細胞の TCR の解析を試みた (図 1, 2)。CD8 陽性細胞および FOXP3 陽性細胞について、TCR のクローンを解析した。そして、1 型糖尿病患者の血中 T 細胞の表現型には特徴があることを示した。

Seurat を用いた PBMCs 解析を施行。Seurat plug-in in SeqGeq を用いて、1 型糖尿病患者由来 PBMCs の分類を行った。1 型糖尿病患者の血中 T 細胞の表現型には特徴があることを示した (図 3)。

(図 1)



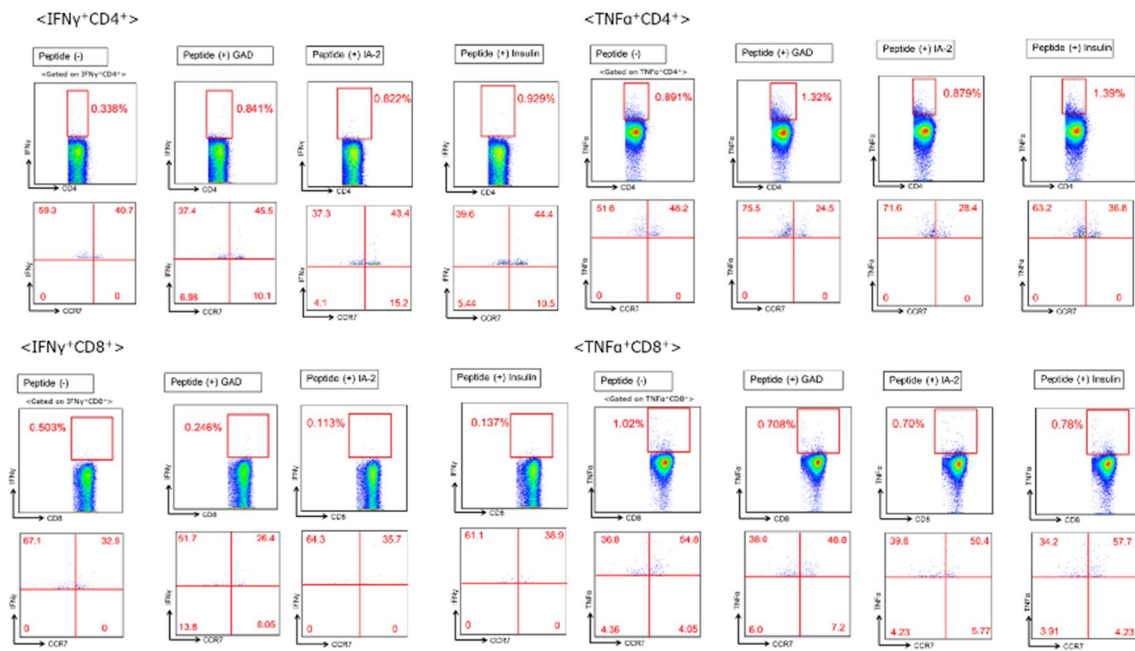
(図 2)



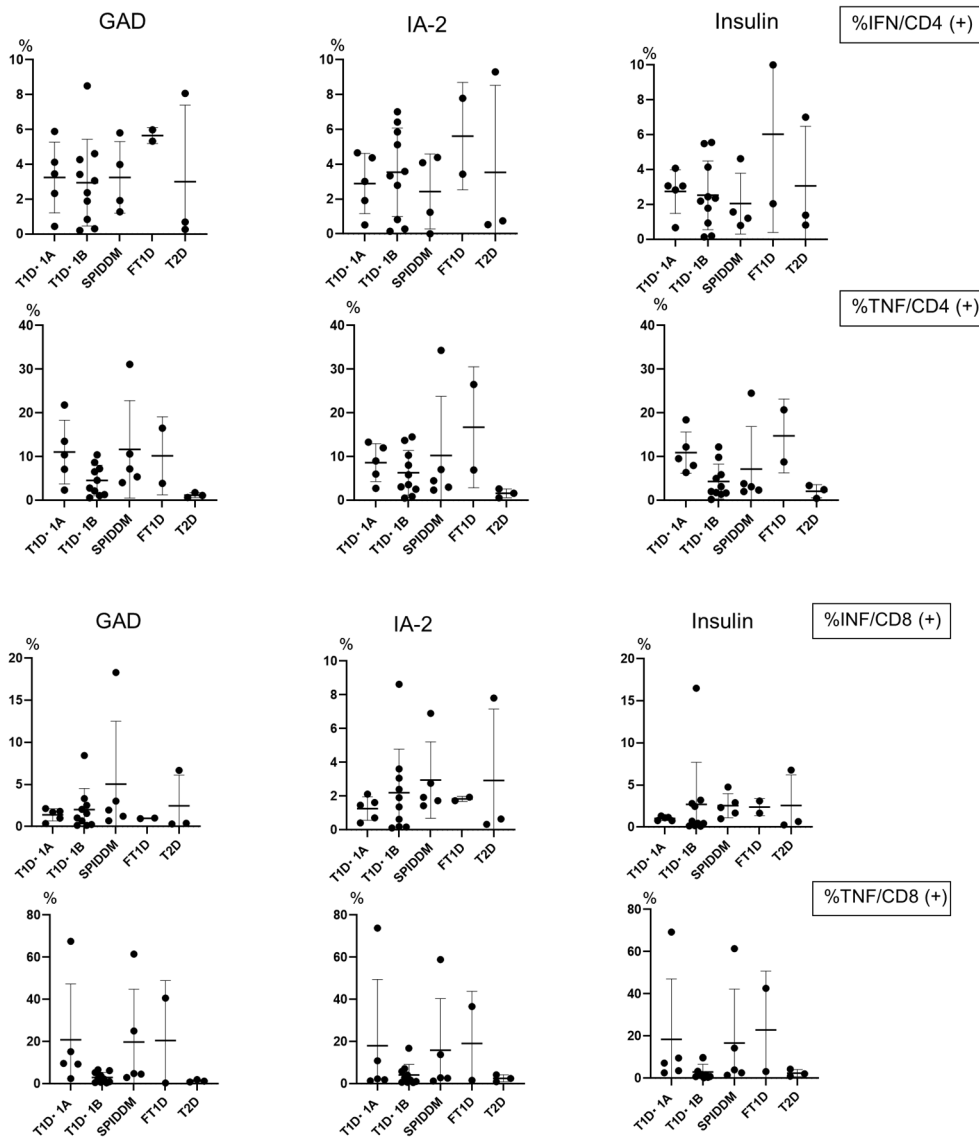
(図 3)

Ex vivoでT細胞刺激実験を実施し、1型糖尿病を持つ患者由来T細胞の反応性を比較、検討

患者PBMCをヒトGAD65、IA-2、insulinのオーバーラップペプチド(1µg/ml)で刺激して、T細胞分画ごとにIFN $\gamma$ 産生細胞、TNF $\alpha$ 産生細胞をBD CANTO™ IIを用いて、マルチカラーフローサイトメトリーにより検出した。1型糖尿病患者由来の末梢血T細胞では、T細胞分画ごとにGAD65、IA-2、insulinに反応しIFN $\gamma$ もしくはTNF $\alpha$ を産生することを確認した。症例ごとにGAD65、IA-2、insulinに対する反応性及び高反応性のT細胞分画が異なることを観測した。舘島抗原のオーバーラップペプチドライブラリーを用いた効率の良い抗原刺激により、1型糖尿病患者由来の末梢血T細胞が*ex vivo*で活性化することを示した(図4)。



(図 4) 1 型糖尿病患者由来の末梢血 T 細胞が *ex vivo* で活性化することを示した。



(図 5) 1 型糖尿病患者由来の末梢血 T 細胞では、GAD65, IA-2, insulin の各ペプチド刺激により、IFN 産生 and/or TNF 産生 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞が増加することを確認した。

シングルセルシーケンスにより、GAD 反応性の TCR 配列を明らかにした。1 型糖尿病患者の血中 T 細胞の表現型には特徴があることを示した。また、膵島抗原のオーバーラップペプチドを用いた効率の良い抗原刺激により、日本人 1 型糖尿病由来の末梢血 T 細胞が *ex vivo* で活性化した。しかしながら、本研究は、*Ex vivo* の実験結果に基づく検証であるため、生体内での実際の反応を必ずしも反映しない。オーバーラップペプチドの効果については、症例によっては、それまでの治療内容や治療期間の影響を受ける可能性がある。自己反応性 T 細胞の免疫応答についての詳細や、病型・患者背景・治療などその他の要素との関連が明らかになれば、発症前診断や予防的治療、進展予防などの治療介入が可能になる可能性がある。本研究結果が、日本人 1 型糖尿病における自己抗原・自己反応性 T 細胞の存在、およびその免疫反応について明らかにする一助になりうるが、さらに多くの症例について検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北川 功幸, 岡村 拓郎, 橋本 善隆, 中西 尚子, 濱口 真英, 福井 道明
2. 発表標題 脂肪酸がヒト自然リンパ球の増殖に及ぼす影響を解明する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北川功幸, 濱口真英, 今井暖, 松井崇晃, 岡村拓郎, 北川暢子, 福井道明
2. 発表標題 1型糖尿病における自己膵島抗原反応性T細胞の解析
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

〔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
---------	---------