

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591345

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病の成因解明 制御性T細胞の量的・質的異常とその制御

研究課題名(英文) Research on the pathogenesis of fulminant type 1 diabetes - investigation of quantitative and qualitative abnormalities of regulatory T cell -

研究代表者

花房 俊昭 (Hanafusa, Toshiaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：60164886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫寛容の中核的な役割を担う制御性T細胞(Treg)には、3つのサブタイプ(a-Treg, r-Treg, non-Treg)が存在することが明らかとなり、私どもは自己免疫性1型糖尿病(T1AD)、劇症1型糖尿病(FT1D)、2型糖尿病、健常者(HD)を対象とし、その量的・質的異常について検討した。その結果、3つのサブタイプの中で最も免疫制御において重要な役割を担うa-Treg比率がT1ADで有意に高値であり、a-Tregの抑制機能はT1AD、FT1DでHDと比較して有意に低下していた。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T-cells (Tregs) play a central role in T-cell mediated immune response and the development of type 1 diabetes. CD4+FOXP3+ T-cells are composed of three phenotypically and functionally distinct subpopulations; r-Tregs, a-Tregs and non-Tregs. We aimed to clarify the frequency of these three subpopulations in CD4+FOXP3+ T-cells and the function of a-Tregs. We examined 20 patients with type 1A diabetes (T1AD), 15 patients with fulminant type 1 diabetes (FT1D), 20 patients with type 2 diabetes (T2D) and 30 healthy control subjects (HC). The frequency of a-Tregs was significantly higher in T1AD, but not in FT1D, than the controls. Further, the proportion of a-Tregs among CD4+FOXP3+ T-cells was significantly higher in patients with T1AD with detectable C-peptide but not in patients with T1AD without it and with FT1D. A proliferation suppression assay showed that a-Tregs were functionally impaired both in FT1D and in T1AD.

研究分野：糖尿病 免疫学

キーワード：自己免疫性1型糖尿病 劇症1型糖尿病 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 劇症1型糖尿病は、研究代表者らが世界に先駆けて発見・確立した新しい疾患単位である。劇症1型糖尿病の患者末梢血における膵細胞反応性のTリンパ球が増加していること、発症直後に死亡した劇症1型糖尿病剖検膵組織においては、膵島および膵外分泌領域へのTリンパ球、マクロファージを中心とした細胞浸潤が存在することが明らかになっている。また、同じ劇症1型糖尿病患者剖検膵組織において、エンテロウイルスのRNAが発現していることも明らかになっている。さらに、研究代表者らは劇症1型糖尿病患者末梢血においてCD4⁺T細胞内のCytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)の発現が低下しており、これがeffector T細胞の増殖と相関することを明らかにした。このような事実から、劇症1型糖尿病では、ウイルス感染が引き金となり、ウイルスに感染した膵細胞に対する免疫機構が活性化・亢進し、膵細胞が急激に破壊されることが想定される。

(2) 劇症1型糖尿病発症の引き金となるウイルスとして、エンテロウイルスをはじめとした様々なウイルスが報告されている。この事実は、劇症1型糖尿病の膵細胞傷害に、特定のウイルスにより直接膵細胞が破壊されるという機構が、存在しているとしても補助的であり、ウイルス感染が引き金となった宿主側の過剰な免疫反応がより重要であることを示唆する。一方、制御性T細胞の量的・質的異常は、免疫学において、免疫寛容調節の中核となる概念であるが、現在までの研究代表者らの検討では、CTLA-4の発現異常にもかかわらず、制御性T細胞 (Treg)の量 (CD3⁺FoxP3⁺制御性T細胞)や制御性T細胞 (CD4⁺CD25^{high}T細胞)の抑制機能には異常を認めなかった。

(3) 最近、制御性T細胞はさらに細分化され、3つのサブタイプ (CD45RA⁺FoxP3^{low} resting Treg ; r-Treg, CD45RA⁺FoxP3^{high} activated Treg ; a-Treg and CD45RA⁻FoxP3^{low} nonsuppressive T-cell ; non-Treg)が存在し、それらの機能が大きく異なるという新しい知見が報告された。このことから、研究代表者らが検討していたCD4⁺CD25^{high}制御性T細胞には、純粋な制御性T細胞として免疫抑制能を有するa-Treg以外に、免疫抑制能を有さないその他の細胞が含まれていたことが推測される。そこで研究代表者らは、3つのサブタイプの中でも、免疫制御に最も大きく関与するa-Tregに着目し、劇症1型糖尿病患者においては、この細胞に量的・質的異常が存在し、effector T細胞の増殖亢進を制御できず、免疫機構の過大な活性化につながり、膵細胞傷害を惹起するのではないかといい仮説に至った。

2. 研究の目的

(1) 宿主側の免疫異常に焦点をあて、免疫調節の中核的な役割を担う制御性T細胞を3つのサブタイプ別に解析することで、劇症1型糖尿病における膵細胞傷害機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 当院外来通院中の劇症1型糖尿病患者15名、自己免疫性1型糖尿病患者20名、2型糖尿病患者20名、健常者20名を対象とし、末梢血におけるサブタイプ別制御性T細胞数を明らかにする。サブタイプを分離するためのマーカーとして、CD4、CD25、CD45RA、FoxP3を用いる。Fluorescence activated cell sorting (FACS)にてCD4⁺FoxP3⁺T cellと3つのサブタイプ (CD45RA⁺FoxP3^{low} resting Treg ; r-Treg, CD45RA⁺FoxP3^{high} activated Treg ; a-Treg and CD45RA⁻FoxP3^{low} nonsuppressive T-cell ; non-Treg)比率を測定する。

(2) CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める 3 つのサブタイプ (a-Treg, r-Treg, non-Treg) の比率を算出し、インスリン分泌能 (C-peptide) との関連を検討する。

(3) a-Treg の effector T cell 増殖抑制能を検討する。患者末梢血から単離したリンパ球を、FACS により a-Treg (CD4⁺CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻Treg) と effector T cell に分離し、各細胞群の混合比率を振り分け、抗 CD3、抗 CD28 抗体の刺激下で培養する。³H 標識チミジンの取り込みを測定して細胞増殖能を評価する。また、培養上清中の免疫抑制性サイトカイン (IL-10) と sCTLA-4 を ELISA にて測定し、各割り付けられた培養環境下での有意なサイトカイン産生を明らかにする。

4. 研究成果

(1) a-Treg 比率は、自己免疫性 1 型糖尿病患者 (T1AD) において、劇症 1 型糖尿病患者 (FT1D)、2 型糖尿病患者 (T2D)、健常者 (HC) と比較して有意に高値であった (各 P < 0.05)。

CD4⁺FoxP3⁺ T cell、r-Treg、non-Treg 比率はいずれも、4 群間 (T1AD vs FT1D vs T2D vs HC) で有意差を認めなかった。

(2) 3 つのサブタイプの動態を解析するために、CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める 3 つのサブタイプの比率を算出したところ、T1AD において CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める a-Treg 比率は、他の 3 群 (vs FT1D、vs T2D、vs HC) に比較して有意に高値 (各 P < 0.05) であり、一方で r-Treg は T1AD において FT1D と HC と比較して有意に低値であった (各 P < 0.05) (図 1a)。

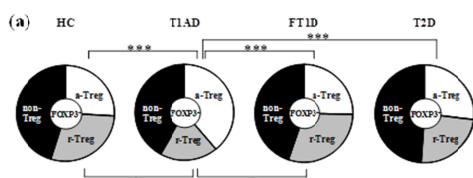


図 1a. CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める 3 つのサブタイプ (a-Treg、r-Treg、non-Treg) の比率

また、CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める a-Treg 比率とインスリン分泌能との関連を検討したところ、a-Treg 比率はインスリン分泌能の残存している (C-peptide > 0.01ng/dl) T1AD において、インスリン分泌の枯渇している (C-peptide < 0.01) T1AD、FT1D、T2D、HC と比較して有意に高値であった (各 P < 0.05) (図 1b)。

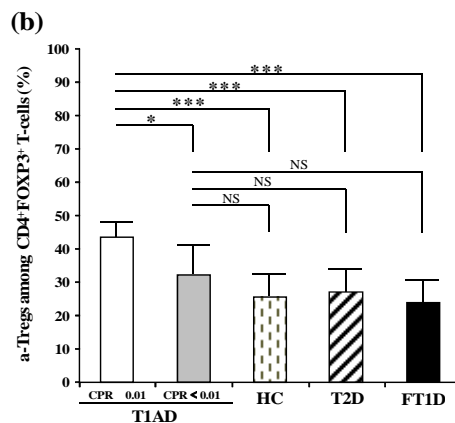


図 1b. 自己免疫性 1 型糖尿病をインスリン分泌能別に解析した CD4⁺FoxP3⁺ T cell に占める a-Treg 比率

(3) 3 つのサブタイプの中でも、免疫制御に最も大きく関与する a-Treg の effector T cell 増殖抑制機能は、T1AD と FT1D の両群で HC と比較して有意に低下していた (各 P < 0.05) (図 1c)。

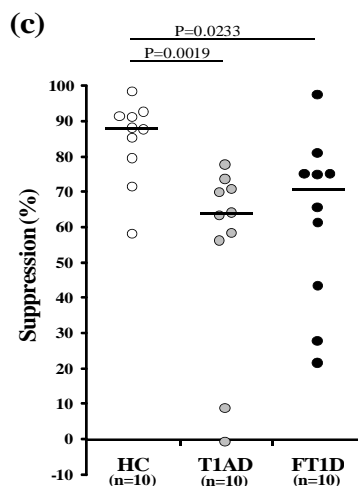


図 1c. a-Treg による effector T cell 増殖抑制試験

また、培養上清中の免疫抑制性のサイトカインの IL-10 濃度は 3 群間 (T1AD vs FITD vs HC) で有意差を認めなかった。sCTLA-4 濃度は、T1AD において FITD と HC と比較して有意に高値であった (各 $P < 0.05$)。

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 1 件)

Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T.

CD4⁺ CD45RA⁻ FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes.

Clin Exp Immunol. 2013 Aug;173(2):207-16. doi: 10.1111/cei.12116. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

長谷田文孝、今川彰久、藤澤玲子、宮里 舞、別所 恵、忌部 尚、堤 千春、佐野寛行、大西峰樹、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭
1 型糖尿病における

CD4+CD45RA+FOXP3low resting 制御性 T 細胞の量的・質的検討

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会
2014.5.22-24

大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル
(大阪)

長谷田文孝

1 型糖尿病における制御性 T 細胞の検討
糖尿病と血管合併症研究会 2013.11.8
金沢大学(金沢)

長谷田文孝、今川彰久、藤澤玲子、宮里 舞、別所 恵、忌部 尚、堤 千春、佐野寛行、大西峰樹、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭
1 型糖尿病における

CD4+CD45RA+FOXP3low resting 制御性 T 細胞の量的・質的検討

第 11 回 1 型糖尿病研究会 2013.10.26-27
軽井沢プリンスホテルウエスト(長野)

長谷田文孝、今川彰久、堤千春、佐野寛行、大西峰樹、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭：
劇症 1 型糖尿病における

CD4+CD45RA-Foxp3high activated 制御性 T 細胞の量的・質的検討

第 56 回日本糖尿病学会. 2013.5.16-18
ホテル日航熊本(熊本)

長谷田文孝、今川彰久、堤千春、三柴裕子、寺前純吾、花房俊昭
劇症 1 型糖尿病における

CD4+CD45RA-Foxp3high activated 制御性 T 細胞の量的・質的検討

第 10 回 1 型糖尿病研究会 2012.11.3-4
唐津市文化体育館文化ホール(佐賀)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花房 俊昭 (Hanafusa Toshiaki)
大阪医科大学医学部 教授
研究者番号：60164886

(2) 研究分担者

佐野 寛行 (Sano Hiroyuki)
大阪医科大学医学部 助教
研究者番号：205564345

(3) 研究協力者

長谷田 文孝 (Haseda Fumitaka)
大阪医科大学医学部 ポストドクター