

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860760

研究課題名(和文) 劇症1型糖尿病の発症機序：PD-1の異常に関する遺伝学的・免疫学的解析

研究課題名(英文) Etiology of fulminant type 1 diabetes -genetic and immunological analysis of PD-1

研究代表者

堤 千春 (Tsutsumi, Chiharu)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：90636078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、T細胞活性化制御に関与する重要な分子であるPD-1に着目し、遺伝学的・免疫学的観点より劇症1型糖尿病(FT1D)の発症機構の解明を試みた。PD-1遺伝子多型(7785C/T)は、自己免疫性1型糖尿病(T1AD)との関与が示唆されたが、FT1Dとの関連は認めなかった。一方、末梢血CD4陽性T細胞のPD-1陽性率は、T1ADで低値であったが、FT1Dでは低値ではないこと、PD-1mRNA発現量は、T1ADにおいて低値であることを明らかにした。T1ADにおいては、PD-1の発現低下がT細胞の活性化を介して、膵細胞破壊を惹起する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated PD-1, which plays an important role in T-cell immune regulation, from genetical and immunological aspects to elucidate the pathogenesis of fulminant type 1 diabetes (FT1D). We found that one polymorphism (7785C/T) in PD-1 gene was associated with autoimmune type 1 diabetes (T1AD), but not with FT1D. PD-1 positivity was significantly lower in CD4+ T-cells in patients with T1AD, but not in those with FT1D. In addition, PD-1 mRNA was significantly lower in CD4+ T-cells in patients with T1AD. These results indicate that low PD-1 expression may be associated with the destruction of beta cells in patients with T1AD via increased T-cell activation.

研究分野：糖尿病

キーワード：劇症1型糖尿病 PD-1 PD-L1 PD-L2 自己免疫性1型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象とする「劇症 1 型糖尿病」は、日本人糖尿病患者から発見した 1 型糖尿病に属する新しい疾患単位である(N Engl J Med. 2000)。わずか 1 週間以内で膵 β 細胞がほとんど消失し、極めて急激に糖尿病を発症するため、診断が遅れると致死的な救急疾患である。糖尿病の最重症型である本疾患の病態を解明することは、有効な治療法の開発へと発展させるためにも喫緊の課題といえる。

劇症 1 型糖尿病の発症を規定する因子として、Class II HLA 遺伝子に加え、免疫機構の活性化抑制に中心的な役割を担う Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) の遺伝子多型との関連を認めている。さらに、72% の症例に先行感染症状を認め、膵組織におけるエンテロウイルス RNA の存在、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の存在が報告されていることから、劇症 1 型糖尿病の急速な膵 β 細胞傷害には、「ある特定の遺伝子を有するものにおける、ウイルス感染を契機とする宿主の過剰な免疫反応が関与している」との仮説を立てている。しかし、本疾患の発症機構はいまだ解明されていない。

最近、当研究室は、劇症 1 型糖尿病患者末梢血において CTLA-4 の CD4+T 細胞内での発現が低下しており、これが effector T 細胞の増殖を加速させることを報告し、免疫調節因子と 1 型糖尿病発症様式の関連について明らかにした。一方、CTLA-4 と同じく免疫機構の活性化抑制の中核となる分子として、Programmed cell death-1 (PD-1) がある。私どもは、日本人において既に同定されている PD-1 の遺伝子多型について、1 型糖尿病の病型別に検討した結果、第 5 エクソンに存在する SNP の 1 つが、自己免疫性 1 型糖尿病に比べ劇症 1 型糖尿病で有意に高頻度であることを見出していた。PD-1 のリガンドである PD-L1 は、抗原提示細胞だけでなく膵臓

を含む末梢実質臓器にも発現し、広範な発現パターンを示すため、PD-1 は CTLA-4 に比べて、より幅広い免疫抑制能力をもつと考えられている。これらのことから、PD-1 あるいはそのリガンドである PD-L1, PD-L2 の異常が、ウイルス感染に対する免疫機構の活性化に関与し、急激な膵 β 細胞傷害を引き起こすのではないかと着想するに至った。

本研究が達成されれば、劇症 1 型糖尿病における新たな遺伝因子の同定や、PD-1 系を中心とした免疫機構の解明に資することができる考えた。

2. 研究の目的

本研究では、CTLA-4 と同様に免疫機構の活性化抑制を担う PD-1 およびそのリガンドである PD-L1, PD-L2 に着目し、劇症 1 型糖尿病患者を対象に、1) PD-1, PD-L1, PD-L2 遺伝子多型について明らかにするとともに、2) 末梢血 CD4+T 細胞における PD-1 発現について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PD-1, PD-L1, PD-L2 の遺伝子多型解析

対象は、日本糖尿病学会劇症 1 型糖尿病調査研究委員会による診断基準(糖尿病 2005)を満たす劇症 1 型糖尿病患者 43 名と健常対照者 158 名に加え、β 細胞が破壊されるがその機序が劇症 1 型糖尿病とは異なる自己免疫性 1 型糖尿病患者 47 名とした。対象者の末梢血白血球から抽出した DNA を用いて、日本人 1 型糖尿病において関連が報告されている 4 種類の PD-1 遺伝子多型 (834 D/I, 7625 C/T, 7785 C/T, 8185[TGC]_n) (Hiromine Y et al. Metabolism 2007)、PD-L1 および PD-L2 遺伝子多型 (既知の 30 SNPs) について、TaqMan 法を用いてタイピングを実施し、関

連解析を行った。さらに、新規の疾患感受性の遺伝子多型を同定するため、一部の患者において、上記解析で関連を認めた SNP を含む PD-L1 および PD-L2 領域について、次世代シーケンサーにより詳細な塩基配列を解析し、関連解析を行った。

(2) 末梢血 CD4+T細胞における PD-1 発現の検討

対象は、劇症 1 型糖尿病患者 15 名、自己免疫性 1 型糖尿病患者 22 名、2 型糖尿病患者 19 名、及び健常対照者 29 名とした。

末梢血より単離したリンパ球を免疫染色し、CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 陽性細胞率をフローサイトメトリー (FACS) により評価した。また末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における PD-1 mRNA 発現量を TaqMan RT-PCR 法を用いて評価した。次に、CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 陽性細胞率を測定した対象者からランダムに抽出した 63 名 (自己免疫性 1 型糖尿病 21 名、劇症 1 型糖尿病 15 名、健常対照者 27 名) において、末梢血から DNA を抽出し、PD-1 遺伝子多型の一つである 7785C/T 多型について TaqMan 法による SNP 解析を実施し、FACS により得られた PD-1 陽性細胞率との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) PD-1, PD-L1, PD-L2 の遺伝子多型解析

PD-1 遺伝子多型のうち 7785C/T の TT 多型は、自己免疫性 1 型糖尿病で有意に低頻度であったが、劇症 1 型糖尿病とは有意な関連を示さなかった。また、他の遺伝子多型は劇症 1 型糖尿病、自己免疫性 1 型糖尿病ともに関連を認めなかった。このことより、PD-1 遺伝子は、日本人急性発症 1 型糖尿病の病型の違いに關与する可能性が示唆された。

次に、7785 C/T 多型と CTLA-4 遺伝子あるいは Class II HLA 遺伝子型との関連を層別化解析により検討した結果、CTLA-4 遺伝子の +49GG 多型、CT60GG 多型 および HLA-DR4-DQ4 ハプロタイプを有する自己免疫性 1 型糖尿病において、劇症 1 型糖尿病および健常対照者と比較して、PD-1 遺伝子の 7785T/T 多型が各々有意に低頻度であった。HLA-DR4 や CTLA-4 +49GG 多型、CT60GG 多型は、自己免疫性 1 型糖尿病において疾患感受性を示すことが報告されていることから、PD-1 遺伝子の 7785T/T 多型は、自己免疫性 1 型糖尿病の疾患抵抗性に寄与する可能性が示唆された。

一方、PD-L1 および PD-L2 遺伝子については、TaqMan 法および次世代シーケンサーを用いた詳細な塩基配列の解析結果に基づき、関連解析を行った。その結果、PD-L1 および PD-L2 遺伝子領域のうち、既知の SNP も含めて少なくとも 90 個の遺伝子多型を同定した。これらのうち、これまでに 1 型糖尿病との関連が報告されていない多型が確認され、健常対象者に比し劇症 1 型糖尿病で有意に高頻度であった ($p < 0.05$ (投稿準備中))。

(2) 末梢血 CD4+T細胞における PD-1 発現の検討

劇症 1 型糖尿病患者 (FT1D) 末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における PD-1 陽性細胞率は、2 型糖尿病 (T2D) 健常対照者 (HC) との比較では有意差を認めず、自己免疫性 1 型糖尿病患者 (T1AD) において、他の 3 群に比し有意に低値であった (図 1)。

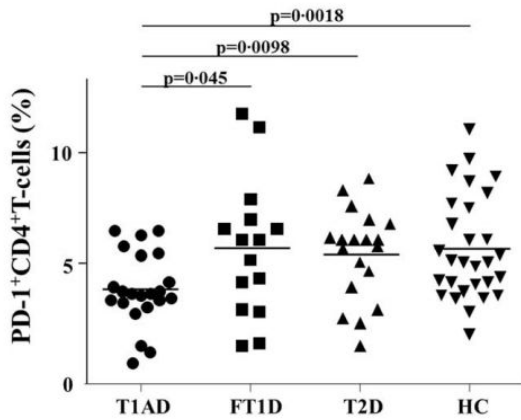


図 1. PD-1 陽性細胞率の病型別検討

また、CD4 陽性 T 細胞中の PD-1mRNA 発現量は、自己免疫性 1 型糖尿病において健常対照者に比し有意に低値であった。

次に、前述の対象者 63 名において、PD-1 遺伝子多型 (7785C/T) と CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現との関連を検討したところ、7785C/C 多型は PD-1 発現の低下との関連を認めた (図 2)。

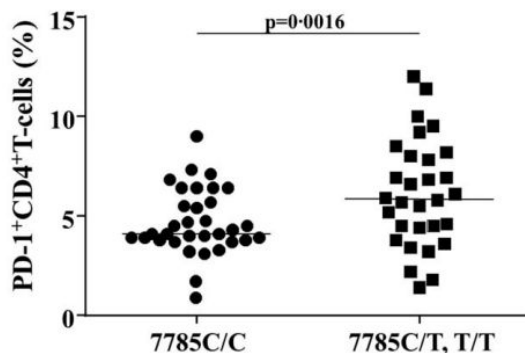


図 2. 7785C/T 多型と PD-1 陽性細胞率

しかし、自己免疫性 1 型糖尿病患者のみでの検討では、PD-1 発現率と 7785C/C 多型との間に有意な関連を認めず、自己免疫性 1 型糖尿病における PD-1 発現の低下を 7785C/C 多型では説明し得なかった。また、7785C/T 多型の allele 及び genotype 頻度は、自己免疫性 1 型糖尿病、劇症 1 型糖尿病、健常対照者の 3 群間の比較で有意差は認められなかった。

まとめ

CTLA-4 は劇症 1 型糖尿病で発現低下する (Haseda F, et al. Immunol Lett 2011) ことが示されているが、今回の研究では、PD-1 は自己免疫性 1 型糖尿病で発現低下していることを明らかにした。PD-1 と CTLA-4 は共に T 細胞の抑制性補助刺激分子として働くが、発現低下を認める分子の違いが病型の違いに寄与している可能性が示唆された (Fujisawa R, et al. Clin Exp Immunol. 2015)。

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)

弘田 弘子, 堤 千春, 木股 宏恵, 渡邊 大督, 忌部 尚, 高本 晋吾, 柴崎 早枝子, 佐野 寛行, 大西 峰樹, 古川 恵三, 寺前 純吾, 今川 彰久, 坂根 貞樹, 花房 俊昭. 発症前に相対的高インスリン血症を伴う低血糖を認めた劇症 1 型糖尿病の 1 例. 糖尿病 Vol. 59 (2016) No. 4 p. 210-217. 査読有

<http://doi.org/10.11213/tonyoby.59.210>

Fujisawa R, Haseda F, Tsutsumi C, Hiromine Y, Noso S, Kawabata Y, Mitsui S, Terasaki J, Ikegami H, Imagawa A, Hanafusa T. Low programmed cell death-1(PD-1) expression in peripheral CD4+ T cells in Japanese patients with autoimmune type 1 diabetes. Clin Exp Immunol. 2015 Jun; 180(3):452-457.

査読有

doi: 10.1111/cei.12603.

花房俊昭, 堤 千春, 寺前純吾. 1 型糖尿病の診断と治療の進歩. 日本医師会雑誌 第 143 巻第 8 号 1655-1659, 2014-11. 査読無

堤 千春、花房俊昭. 疾患と看護がわかる看護過程 ナーシングプロセス 1 型糖尿病. Clinical Study (クリニカルスタディ) 35(1), 8-15, 2014-01. 査読無

Tsutsumi C, Imagawa A, Onishi M, Sano H, Nakagawa S, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. Glycated albumin as a useful clinical biomarker for glycemic variability in type 1 diabetes assessed by continuous glucose monitoring. Diabetol Int. 2013 Sep; 4(3):156-159. 査読有
DOI 10.1007/s13340-013-0108-0

[学会発表](計 11 件)

Inaba Y, Tsutsumi C, Haseda F, Fujisawa R, Mitsui S, Terasaki J, Hanafusa T. Influence of glycemic variability on endothelial progenitor cells from peripheral blood of patients with diabetes. The International Diabetes Federation 23rd World Diabetes Congress (IDF2015), Vancouver Convention Centre (Vancouver, Canada) Dec 2nd, 2015.

堤 千春、稲葉惟子、佐野寛行、栗栖義賢、宮脇正博、三柴裕子、今川彰久、寺前純吾、中嶋秀人、花房俊昭. 乳癌を早期に発見し得た Stiff-person 症候群合併急性発症 1 型糖尿病(第 2 報): GAD 抗体による免疫組織学的検討. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 23 日、大阪国際会議場(大阪市)

弘田弘子、堤 千春、渡邊大督、高本晋吾、柴崎早枝子、古川恵三、寺前純吾、今川彰久、坂根貞樹、花房俊昭. 発症前に低血糖を伴う膵炎症状を来した劇症 1 型糖尿病の一例. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 23 日、大阪国際会議場(大阪市)

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. 1 型糖尿病における CD4+CD45RA+FOXP3^{low} 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 年 5 月 22 日、大阪国際会議場(大阪市)

藤澤玲子、長谷田文孝、堤 千春、廣峰義久、能宗伸輔、川畑由美子、三井しのぶ、寺前純吾、池上博司、今川彰久、花房俊昭. 自己免疫性 1 型糖尿病患者末梢血 CD4 陽性 T リンパ球における PD-1 の低発現と PD-1 遺伝子多型に関する検討(第 2 報). 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 22 日、大阪国際会議場(大阪市)

Fujisawa R, Haseda F, Tsutsumi C, Hiromine Y, Noso S, Kawabata Y, Mitsui S, Terasaki J, Ikegami H, Imagawa A, Hanafusa T. Low Expression level of Peripheral CD4+PD-1+T-cells in Japanese Patients with Type 1A Diabetes. The 13th International Congress of the Immunology of Diabetes Society, Mantra Lorne (Lorne, Australia) Dec 8th, 2013.

Fujisawa R, Haseda F, Tsutsumi C, Hiromine Y, Noso S, Kawabata Y, Mitsui S, Terasaki J, Ikegami H, Imagawa A, Hanafusa T. Low Expression of PD-1 (Programmed cell death-1) in Peripheral CD4+ T-cells in Japanese Patients with Type 1A Diabetes. 73rd Scientific Sessions of American Diabetes Association, McCormick Place (Chicago, IL, USA) June 23, 2013.

堤 千春、今川彰久、廣峰義久、能宗伸輔、川畑由美子、三井しのぶ、長谷田文孝、寺前

純吾、池上博司、花房俊昭. 日本人 1 型糖尿病における PD-1 遺伝子多型の検討(第 2 報). 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、熊本市国際交流会館(熊本市)

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 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、ホテル日航熊本(熊本市)

藤澤玲子、長谷田文孝、堤千春、廣峰義久、能宗伸輔、川畑由美子、三井しのぶ、寺前純吾、池上博司、今川彰久、花房俊昭. 1 型糖尿病患者末梢血の CD4 陽性 T リンパ球における PD-1 の発現. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、熊本市国際交流会館(熊本市)

堤千春: ランチョンセミナー「CGM からみた 1 型糖尿病外来診療における HbA1c, GA の活用法」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、つるやホール(熊本市)

〔図書〕(計 1 件)

堤千春、花房俊昭

2 章「糖尿病の概念・疫学・診断・成因・病態」 5. 1 型糖尿病—病態. 糖尿病学 2015 年 5 月初版第 1 刷発行 P.172-187

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

堤千春 (TSUTSUMI, Chiharu)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90636078

(2)研究分担者

なし

研究者番号:

(3)連携研究者

なし

研究者番号:

(4)研究協力者

花房俊昭 (HANAFUSA, Toshiaki)
今川彰久 (IMAGAWA, Akihisa)
長谷田文孝 (HASEDA, Fumitaka)
藤澤玲子 (FUJISAWA, Reiko)