

氏 名	長 谷 田 文 孝
(ふりがな)	(はせだ ふみたか)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 24 年 2 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Low CTLA-4 expression in CD4 ⁺ helper T-cells in patients with fulminant type 1 diabetes (劇症1型糖尿病患者のCD4陽性ヘルパーT細胞ではCTLA-4が低発現している)
論文審査委員	(主) 教授 石 坂 信 和 教授 吉 田 龍 太 郎 教授 浮 村 聡 教授 樋 口 和 秀

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

劇症1型糖尿病は、極めて急激な膵β細胞破壊により内因性インスリン分泌が枯渇して発症する糖尿病の一亜型である。現在まで、劇症1型糖尿病の患者末梢血においてβ細胞反応性のTリンパ球が増加していることや、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、Tリンパ球、マクロファージを中心とした細胞浸潤が認められたり、エンテロウイルスの存在が確認されることが明らかとなっている。このような事実から、劇症1型糖尿病の発症機序として、ウイルス感染により惹起された免疫機構の活性化により、膵β細胞が急激に破壊されると考えられている。劇症1型糖尿病発症の引き金となるウイルスとして、エンテロウイルスのみならず様々なウイルスが報告されている。このことは、ウイルス感染が引き金とはなるものの、宿主側の免疫反応がより重要であることを示唆す

る。そこで、抑制型補助刺激分子の cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)に着目した。CTLA-4 は、免疫反応調節の中核である制御性 T 細胞を介した外因性の経路と、エフェクターT 細胞自身の T 細胞受容体からのシグナルを調節する内因性の経路で、T 細胞の活性化抑制、増殖抑制を担っている。また、CTLA-4 はその遺伝子多型と劇症 1 型糖尿病の関連が報告されている。

これらの事実から、劇症 1 型糖尿病患者においては、CTLA-4 に何らかの異常が存在し、ウイルス感染を引き金とした免疫機構の過剰な活性化につながり、膵β細胞傷害を惹起するのではないかという仮説に至った。

《目 的》

劇症 1 型糖尿病患者における CD4 陽性ヘルパーT 細胞(CD4⁺T 細胞)における CTLA-4 発現とその機能について明らかにする。

《対象と方法》

劇症 1 型糖尿病患者(F) 16 名(平均年齢 45±15 歳)、自己免疫性 1 型糖尿病患者(1A)14 名(44±14 歳)、2 型糖尿病患者(T2) 10 名(60±13 歳)、健常者(C)20 名(43±15 歳)において、末梢血から単離したリンパ球を免疫染色し、fluorescence-activated cell sorter (FACS)を用いて全 CD4⁺T 細胞および制御性 T 細胞(CD4⁺CD25^{high}T 細胞)とエフェクターT 細胞(CD4⁺CD25⁻T 細胞)の CTLA-4 発現レベルを解析した。また、CD4⁺CD25^{high}T 細胞と CD4⁺CD25⁻T 細胞を 1:1、0:1 の比率で、抗 CD3、CD28 抗体の刺激下で培養することで、CD4⁺CD25^{high}T 細胞による CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖抑制能を検討した。さらに、CD4⁺CD25⁻T 細胞単独で刺激培養した際の増殖能を測定し、CTLA-4 発現レベルとの関係を検討した。CTLA-4 遺伝子多型に関しては、CT60 と exon1+49 の 2 つの一塩基多型を PCR-RFLP 法を用いて解析した。

《結 果》

各群における CD4⁺T 細胞内 CTLA-4 の発現率は次の通りであった：F；中央値 6.8% vs 1A；10.6% (P=0.0097)、T2；9.0% (P=0.0092)、C；15.0% (P=0.0002)。すなわち、劇症 1 型糖尿病患者において、CD4⁺T 細胞内 CTLA-4 の発現が他の 3 群と比較して有意に低下していた。CTLA-4 の発現は CD4⁺CD25^{high}T 細胞、CD4⁺CD25⁻T 細胞内においても同様に低下していた(P<0.05)。CD4⁺CD25^{high}T 細胞による CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖抑制能は、3 群間で有意差を認めなかった(F vs 1A vs C)。CD4⁺CD25⁻T 細胞内の CTLA-4 発現レベルとその増殖能は、負の相関関係にあった(P<0.05、R=-0.4473)。CTLA-4 発現レベルと CTLA-4 多型(CT60、exon1 +49)との関連は認めなかった。

《考 察》

本研究では、劇症 1 型糖尿病患者末梢血における CD4⁺T 細胞の CTLA-4 発現が低下していた。この CTLA-4 発現低下は CD4⁺CD25^{high}T 細胞、CD4⁺CD25⁻T 細胞内においても同様に認められた。これらの事実は、CTLA-4 発現低下が劇症 1 型糖尿病の診断マーカーとして活用できる可能性があることを示しており、さらには、劇症 1 型糖尿病の臨床経過でみられるような免疫機能の過剰な活性化やその後起こる極めて急激な膵β細胞破壊を説明し得る。また、CD4⁺CD25^{high}T 細胞による CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖抑制能には差を認めず、CD4⁺CD25⁻T 細胞内の CTLA-4 発現レベルとその増殖能が負の相関関係にあったことから、CTLA-4 の発現低下は、CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖促進を介して膵β細胞傷害を加速させる可能性が示された。

《結 語》

劇症 1 型糖尿病患者において、CD4⁺T 細胞における CTLA-4 の発現が他の 3 群と比較して有意に低下していた。この CTLA-4 の発現低下は、エフェクターT細胞である CD4⁺CD25⁻T細胞の増殖を促進し、劇症 1 型糖尿病における膵β細胞傷害を加速させる可能性がある。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

劇症 1 型糖尿病は、ウイルス感染を引き金として極めて短期間に膵β細胞が破壊されて発症すると考えられているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。今回申請者は、劇症 1 型糖尿病の発症機序の仮説として、宿主側の免疫機構の異常に着目し、患者末梢血における制御性 T 細胞(CD4⁺CD25^{high}T 細胞)とエフェクター T 細胞(CD4⁺CD25⁻T 細胞)の cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)発現を検討し、さらに各細胞群における刺激時の増殖抑制能と増殖能を検討した。その結果、劇症 1 型糖尿病患者末梢血における CD4⁺T 細胞における CTLA-4 発現低下と、CD4⁺CD25⁻T 細胞における増殖促進を明らかにした。これらの事実から、CTLA-4 発現低下がウイルス感染を引き金とした免疫機構の過剰な活性化につながり、膵β細胞の極めて急激な破壊を惹起する可能性が示唆された。

本研究は、糖尿病患者において CD4⁺CD25⁻T 細胞における CTLA-4 発現の低下を示した最初の研究であり、これによる CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖促進は、劇症 1 型糖尿病の発症機序解明に重要な知見を与えるものである。また、劇症 1 型糖尿病の診断マーカーとしての臨床応用に新たな可能性を提示したと言える。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Immunology Letters 139(1-2): 80-86, 2011