

氏 名	糸 川 玲 子
(ふりがな)	(いとかわ れいこ)
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 27 年 7 月 29 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 programmed cell death-1 (PD-1) expression in peripheral CD4 ⁺ T cells in Japanese patients with autoimmune type 1 diabetes (日本人自己免疫性 1 型糖尿病患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現の低下)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 槇 野 茂 樹 教授 小 野 富 三 人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

1 型糖尿病は、自己免疫の関与が明らかな「自己免疫性」と、その関与が不明な「特発性」に大別される。自己免疫性 1 型糖尿病 (T1AD) の成因として、T 細胞を介した自己免疫機序による膵 β 細胞の破壊が考えられている。

Programmed cell death-1 (PD-1) は、T 細胞の増殖及び活性化抑制を担う抑制性補助刺激分子の一つである。PD-1 は同様な機能を有する分子である cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) より強力な T 細胞活性化抑制能を有するとの報告があり、PD-1 経路の抑制は、過剰な T 細胞の増殖や活性化を介した自己免疫応答の活性化を促進させる。1 型糖尿病モデルマウス (NOD (non-obese diabetic) マウス) では、PD-1 の欠損が糖尿病の発症率を増加させることが報告されているが、ヒトの 1 型糖尿病患者においては PD-1 に関する報告は少ない。

一方、T1AD の疾患感受性遺伝子である Class II HLA 遺伝子やインスリン遺伝子、CTLA-4 遺伝子などに加え、申請者の共同研究者らは、日本人 T1AD において PD-1 遺伝子の 4 つの多型（834D/I、7625C/T、7785C/T、8185[TGC]*n*）を同定し、PD-1 遺伝子も T1AD に関与することを示している。このうち 7785C/T 多型は、アミノ酸置換を伴わない多型であるが、T1AD の発症に対し保護的な効果を示すとの報告がされている。しかし、PD-1 遺伝子の多型と PD-1 分子の発現との関連については未だ明らかではない。

《目 的》

T1AD における末梢血中の CD4 陽性 T 細胞での PD-1 の発現を、他の病型と比較して明らかにするとともに、PD-1 の発現が PD-1 遺伝子の 7785C/T 多型と関連しているか否かを検討することを目的とした。

《対象と方法》

当院外来通院中及び入院中の T1AD 患者 22 名、劇症 1 型糖尿病 (FT1D) 患者 15 名、2 型糖尿病 (T2D) 患者 19 名、及び健常対照者 (HC) 29 名を対象とした。

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) により測定した。また末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を magnetic beads を用いて分離し、RNA 抽出後に、CD4 陽性 T 細胞における PD-1 mRNA 発現量を TaqMan RT-PCR 法を用いて測定した。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 (T1AD 21 名、FT1D 15 名、HC 27 名)において、末梢血から DNA を抽出し、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。

《結 果》

CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 陽性細胞率の中央値は、T1AD において他の 3 群に比し有意に低値であった (T1AD 4.2 vs. FT1D 6.0 %, $p=0.0450$; T1AD 4.2 vs. T2D 5.8 %, $p=0.0001$)。

p=0.0098 ; T1AD 4.2 vs. HC 6.0%, p=0.0018) 。また、CD4 陽性 T 細胞中の PD-1mRNA 発現量の中央値は、T1AD において HC に比し有意に低値であった(T1AD 0.584 vs. HC 1.877, p=0.0023)。

次に、前述の対象者 63 名において、PD-1 遺伝子多型の一つである 7785C/T 多型と 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、PD-1 陽性細胞率の中央値は、C/C 群において、C/T 及び T/T 群に比べ有意に低値であった (C/C 群 4.1% vs. C/T and T/T 群 5.9%, p=0.0016)。しかし、T1AD のみでは、PD-1 陽性細胞率の中央値は、7785C/C 群と C/T 及び T/T 群の 2 群間の比較において有意差を認めなかった。

また、7785C/T 多型の allele 及び genotype 頻度の T1AD、FT1D、HC の 3 群間で有意差は認められなかった。

《考 察》

本研究では、T1AD における CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 発現低下が明らかになった。PD-1 の発現が低下すれば、T 細胞の過剰な増殖や活性化がもたらされ、T 細胞による β 細胞破壊を惹起する可能性が示唆される。末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現の低下は、自己免疫性疾患である関節リウマチ患者や SLE 患者において報告されている。また動物モデルにおいても、PD-1 欠損マウスは種々の自己免疫表現型を示すとの報告があり、本研究の成績と矛盾しない。また、PD-1 陽性細胞率の検討と PD-1 mRNA 発現量の検討において結果に差異が認められた理由として、PD-1 陽性細胞率の検討では、細胞表面における PD-1 発現のみを FACS にて解析し、細胞内における発現は検討していないことが影響している可能性が考えられた。

PD-1 遺伝子多型と PD-1 発現の関連については、T1AD、FT1D 及び HC の全ての群を対象者とした検討では、7785C/C 多型を有する群において CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 発現率が有意に低下していた。しかし、T1AD 患者のみでは、PD-1 発現率と 7785C/C 多型との間に有意な関連を認めず、PD-1 遺伝子の 7785C/C 多型は PD-1 発現の低下と関連するが、T1AD における PD-1 発現の低下を説明し得なかった。

申請者の共同研究者らは、特発性に分類されている FT1D では CD4 陽性 T 細胞中の CTLA-4 の発現が低下していることを報告している (Immunol Lett 2011)。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、PD-1 は T1AD で、CTLA-4 は FT1D で各々発現低下していることを考慮すると、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。

《結 語》

末梢血中の CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 陽性細胞率は、日本人 T1AD において他の 3 群と比較して有意に低値であった。T1AD に認められた CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現の低下は、T 細胞活性化及び増殖促進を介して糖尿病発症に寄与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

自己免疫性 1 型糖尿病 (T1AD) の成因として、T 細胞を介した自己免疫機序による膵 β 細胞の破壊が考えられている。Programmed cell death-1 (PD-1) は、T 細胞の抑制性補助刺激分子の一つであり、PD-1 経路の抑制は、過剰な T 細胞の増殖や活性化を介した自己免疫応答の活性化を促進させるが、ヒトの 1 型糖尿病患者においては PD-1 に関する報告は少ない。今回申請者らは、T1AD における PD-1 発現低下が糖尿病の発症に寄与している可能性に着目し、患者末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における PD-1 の発現について検討し、さらに PD-1 の発現と PD-1 遺伝子の 7785C/T 多型と関連について検討した。その結果、T1AD における末梢血中の CD4 陽性 T 細胞中の PD-1 発現低下を明らかにし、この PD-1 発現低下により T 細胞の過剰な増殖や活性化がもたらされ、T 細胞による膵 β 細胞破壊を惹起する可能性が示唆された。また、T1AD、劇症 1 型糖尿病及び健常対照者群の対象者 63 名では、7785C/T 多型の C/C 多型を有する群において PD-1 発現が有意に低下していたが、T1AD 患者のみを対象とした検討では有意な関連を認めず、7785C/C 多型は PD-1 発現の低下と関連するが、T1AD における PD-1 発現の低下を説明し得なかった。

本研究は、病型別に PD-1 の発現について検討した最初の研究であり、T1AD における PD-1 発現低下を明らかにし、その発現低下が全疾患群において PD-1 遺伝子多型である 7785C/T 多型の C/C 多型と関連していること示した。この PD-1 発現低下は T1AD の発症機序の更なる解明に重要な知見を与えるものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項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)

Clinical & Experimental Immunology 180(3): 452-457, 2015