

【目的】 1型糖尿病では、自己膵島抗原に反応するエフェクターT細胞の出現がその病態の本質と考えられている。自己膵島抗原に反応する特有のT細胞受容体(TCR)を有するエフェクターT細胞が、モノクローナルに活性化していることが想定されている(Cole DK, et al. J Clin Invest. 2016)。すなわち、1型糖尿病において病因となるTCRを有するT細胞を同定し、除去することが予防および治療法の確立につながる。TCRとの抗原結合部位は、遺伝子再構成により決定され、ヒトの体内では 10^{10} オーダーの多様性を獲得している。従来、これらの膨大な数に及ぶ抗原受容体のレパートリーの全容を知ることは困難であったが、核酸シークエンス技術の飛躍的發展により、所望の細胞集団に発現されているTCRの遺伝子配列を個々のクローンのレベルで同定することが可能となった。現在、このような網羅的免疫シークエンス技術が、免疫応答の*in vivo*モニタリングや抗体医薬品・ワクチン・細胞医薬品等の創薬に応用されつつあり、今後もさまざまな医療の領域に大きな革新をもたらすことが期待されている。本研究では日本人1型糖尿病における特徴的な自己反応性T細胞のTCR配列をシングルセルVDJシークエンスにて明らかにするとともに同定した自己膵島反応性T細胞が膵β細胞に対して実際に免疫応答を行うことを*ex vivo*およびヒト化マウスを用いて確認する。これらの研究により1型糖尿病の予防法を開発する。

【方法】 我々のグループで実施している大規模糖尿病患者コホート・KAMOGAWA-DMコホート研究から日本人GAD抗体陽性1型糖尿病症例4例を選出した。BD Rhapsody・VDJシークエンス用アプリケーションにより単一細胞化し、分子バーコード化cDNAライブラリーを作製する。作製したcDNAはマクロジェンに外注の上、次世代シークエンス(NGS)を実施する。得られたシークエンスはBDパイプラインによりリードカウント情報のデータマトリックスを取得し、SeqGeqにて解析した。TCR配列の多様性については相同性検索によるV領域、D領域、J領域遺伝子の決定、アミノ酸変換、リード数集計を実施し、各群の多様性を比較することで、日本人1型糖尿病においてclonal expansionを起こしているV領域、D領域、J領域遺伝子を解析した。さらにほかの1型糖尿病患者4名の末梢血単核球に特異的自己抗原の候補であるGAD65、IA-2、insulinのオーバーラップペプチドを投与、食食させ抗原提示させ、抗原特異的T細胞の活性化を単一細胞分析で解析した。

【結果】 1型糖尿病患者のCD8⁺T細胞で発現が増加している遺伝子は、主に細胞傷害性関連遺伝子(PRF1、GZMH、ITGB2、NKG7、CTSW、CST7)であり、一方でCD4、CD7、CD5、HLA-A、CD27、IL-32の発現が減少していることが示された。また、オーバーラップペプチド刺激により、CD8⁺T細胞ではAIM2、CD70、CD27、CCNB1、CCR1、BCL2、CD5、CD3GなどのCDマーカーやケモカインに関する遺伝子発現はinsulin群とGAD群で上昇し、FASLG、BCL2、LTB、GZMK、ICOS、IL12RB2、CD70、IL6などのサイトカインに関する遺伝子発現はIA-2群で上昇した。

自己反応性T細胞を標的とした1型糖尿病発症予防法の開発

