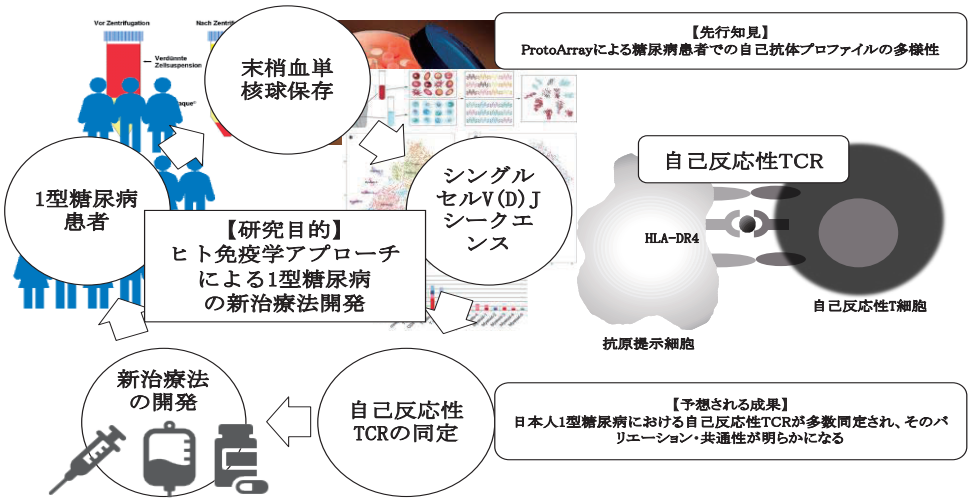
59　自己反応性T細胞を標的とした1型糖尿病予防法の開発	福井　道明

【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発展により、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、貪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



59. 自己反応性 T 細胞を標的とした 1 型糖尿病予防法の開発

福井　道明

京都府立医科大学 内分泌・代謝内科学

Key words：1 型糖尿病，シングルセル VDJ シークエンス，オーバーラップペプチド，エフェクターT 細胞

緒　言

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。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発展により、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* で確認する。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

1．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 配列の同定（2021 年度）

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（ターゲット群：S1～4）、非 1 型糖尿病症例 1 例（コントロール群：S0）を選出した。

シングルセル VDJ シークエンス：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した。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）を実施した。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。T 細胞受容体（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した。

2. 自己反応性 T 細胞と自己抗原を用いた *ex vivo* assay（2022 年度）

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末梢血白血球に投与、貪食させ、抗原提示させた。オーバーラップペプチドライブラリーを用いた抗原特異的 T 細胞の活性化を単一細胞分析で解析した。

シングルセルシークエンス：上記サイトカインアッセイを実施し、IFNγ 産生細胞を CliniMACS® Cytokine Capture System にて収集した。オーバーラップペプチドライブラリーに反応し IFNγ を産生する細胞及び抗原刺激前の細胞を収集し、BD Rhapsody により単一細胞化した。BD Rhapsody™ T cell response mRNA パネル・BD Rhapsody™ TCR プロファイリング・BD® AbSeq を、マルチプレックスキットを用いて適応し、分子バーコードの上 cDNA ライブラリ

ーを作製した。作製した cDNA はイルミナ™ 300 サイクルキットを使用して 75×225 ペアードエンドで NextSeq を実施、FASTQ ファイルを得た。FASTQ ファイルは BD Seven Bridges™にアップロードし、アセンブル・マッピングの上リードカウント情報に変換した。リードカウント情報をダウンロードし、SeqGeq にアプライすることで取得情報の可視化を行った。

結　果

1. 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 配列の同定

1）$CD8^+$T 細胞および $FOXP3^+$細胞の TCR クロノタイプ

$CD8^+$T 細胞と $FOXP3^+$細胞における TRAV と TRAJ の遺伝子組換え、TRBV と TRBJ の遺伝子組換えを調べた。$CD8^+$T 細胞の TRA と TRB の CDR3 は、S1 では AGAISNNDMR と ASSVGSGTDEQF、S2 では VVRARPPWSGGADGLT と ASTPSPGYEQY、S3 では AFSGGYQKVT と ASSLAGEGSGTGELF、S4 では VVSAFFSGGSYIPT と ASSSSRDRGNYEQY と最も頻繁に観察できた。$FOXP3^+$細胞では、S1 は AMRFKSGYNKLI と ASSPPTSGASYEQY、S2 は ALSSNDYKLS と ASTLDGPGSPLH、S3 は GFSSGSARQLT と ASSFGRYEQY、S4 は AAGRGNNRLA と ASSRTGGGYGYT であった。

2）1 型糖尿病患者の血液中における T 細胞の遺伝子発現の特徴

4 つのサンプルの $CD8^+$T 細胞または $FOXP3^+$細胞において、健常者（S0）と比較して上昇した遺伝子発現を検討した。S0 と比較した全遺伝子発現をヒートマップに示した。S1 の $CD8^+$T 細胞で発現が上昇している遺伝子は *PRF1*、*GZMH*、*ITGB2*、*NKG7*、*SELPLG*、S2 のそれは *GZMH*、*ITGB2*、*PRF1*、*NKG7*、*GNLY*、S3 のそれは *ITGB2*、*GZMH*、*SELL*、*PRF1*、*SELPLG*、S4 のそれらは *GZMH*、*CTSW*、*PRF1*、*ITGB2*、*CX3CR1* であることがそれぞれ判明した。逆に、S1 と S2 の $CD8^+$T 細胞で発現が低下した遺伝子は、それぞれ *CD7*、*CD4*、*CD5*、*CD27*、*CD69* であり、S3 と S4 のそれは *CD7*、*CD4*、*CD5*、*CD27*、*TRAC* であった。$FOXP3^+$細胞で発現が上昇した遺伝子は、S1 では *HLA-DMA*、*IL4R*、*LIF*、*TNFRSF4*、*IL31*、*HLA-DMA*、*IL4R*、*TRIB2*、*LIF*、*TNFRSF4*、S3 では *HLA-DMA*、*IL4R*、*TNFRSF4*、*LIF*、*PRDM1*、S4 では *HLA-DMA*、*IL4R*、*TRIB2*、*LIF*、*TNFRSF4* それぞれであった。S1 の $FOXP3^+$細胞で発現低下している遺伝子は *CD4*、*CD7*、*CD5*、*HLA-A*、*IL32* であり、S2、S3、S4 のそれは *CD4*、*CD7*、*CD5*、*HLA-A*、*CD27* であった。

2. 自己反応性 T 細胞と自己抗原を用いた *ex vivo* assay

1）シングルセルシークエンスによる $CD8^+$、$CD4^+$T 細胞の解析

$CD8^+$および $CD4^+$T 細胞の数が、オーバーラップペプチドでの刺激によってどのように変化するかを、シングルセルシークエンスによって調査した。図 1A の NC、Insulin、IA-2、GAD 群の全 T 細胞、$CD8^+$T 細胞、$CD4^+$T 細胞の UMAP プロットである。NC 群の $CD4^+$T 細胞における $CD8^+$の比率は、オーバーラップするペプチド群のそれよりも有意に低かった（図 1B）。さらに、NC 群の TCR レパートリーの Shannon index は、insulin 群、IA-2 群、GAD 群のそれよりも有意に高かった（図 1C）。NC 群、insulin 群、IA-2 群、GAD 群の CDR3 長を図 1D にプロットした。Insulin、IA-2、GAD 群の CDR3 長さの Shannon 指数は、NC 群のそれよりも有意に低かった（図 1E）。

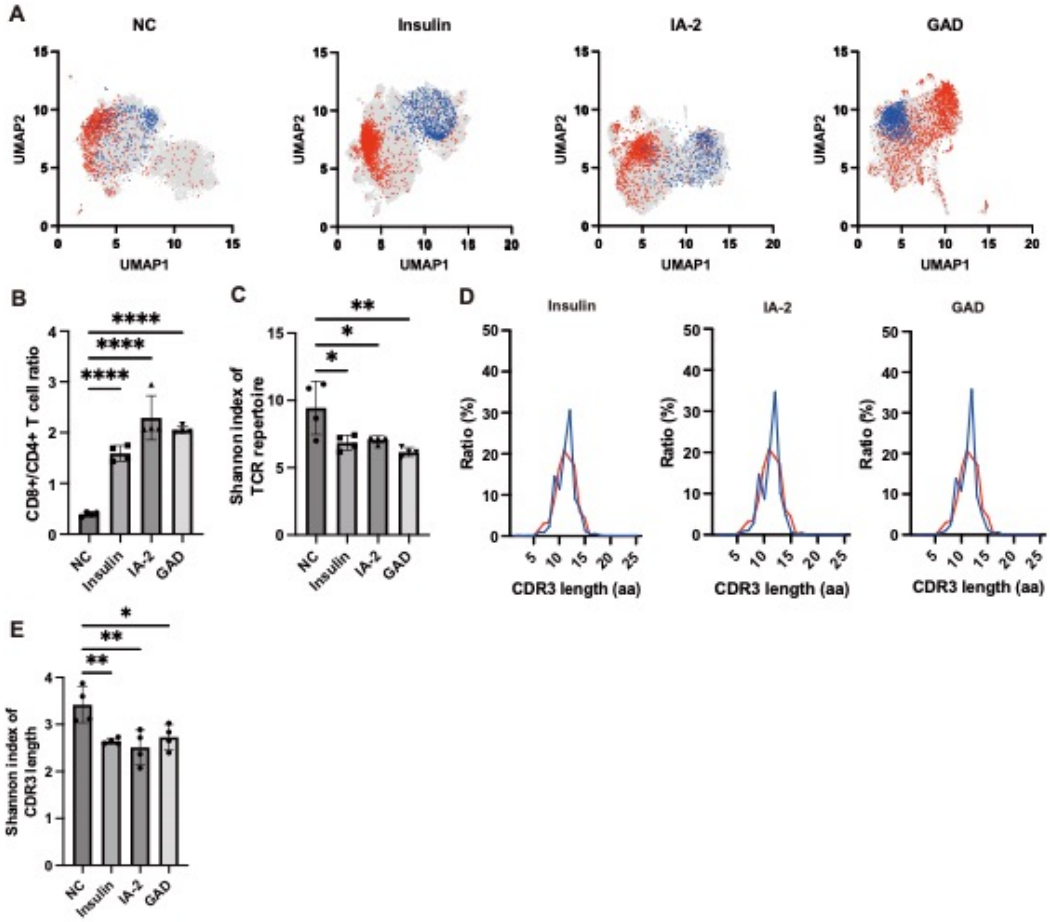


図 1. オーバーラップペプチドを投与した 1 型糖尿病患者由来 $CD8^+$T 細胞における TCR レパートリーの多様性の欠如

A） NC の全 T 細胞、$CD8^+$T 細胞、$CD4^+$T 細胞を示す UMAP プロット。Insulin、IA-2、GAD 群（全 T 細胞、$CD8^+$T 細胞、$CD4^+$T 細胞はそれぞれグレー、赤、青）。

B） $CD8^+$／$CD4^+$T 細胞の比率を示す。

C） $CD8^+$T 細胞における TCR レパートリーの Shannon 指数。

D） NC、insulin、IA-2、GAD 群の $CD8^+$T 細胞の CDR3 長をプロットし、X 軸にアミノ酸（aa）単位の CDR3 長、Y 軸に頻度を示した（重なった曲線は NC と重なったペプチドで処理した群をそれぞれ赤と青で示す）。

E） $CD8^+$T 細胞における CDR3 長のシャノン指数。

データは、平均値±SD 値で示し、Holm-Šídák の多重比較検定による 1-way ANOVA で分析した（B、C、E）。
*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.0001。

2）$CD8^+$T 細胞のクラスタリング解析

SeqGeq の Seurat プラグインを用いて、1 型糖尿病患者の $CD8^+$T 細胞データをクラスター化した。

その結果、免疫プロファイリング遺伝子 397 個の転写レベルでの発現から、ナイーブ、NK 細胞様、制御性 T 細胞、メモリー、エフェクター、エフェクターメモリー、セントラルメモリーの 7 つの $CD8^+$T 細胞クラスターを得ることができた。さらに、7 つのクラスターのうち、エフェクターメモリー$CD8^+$T 細胞における遺伝子発現を検討した（図 2A および B）。

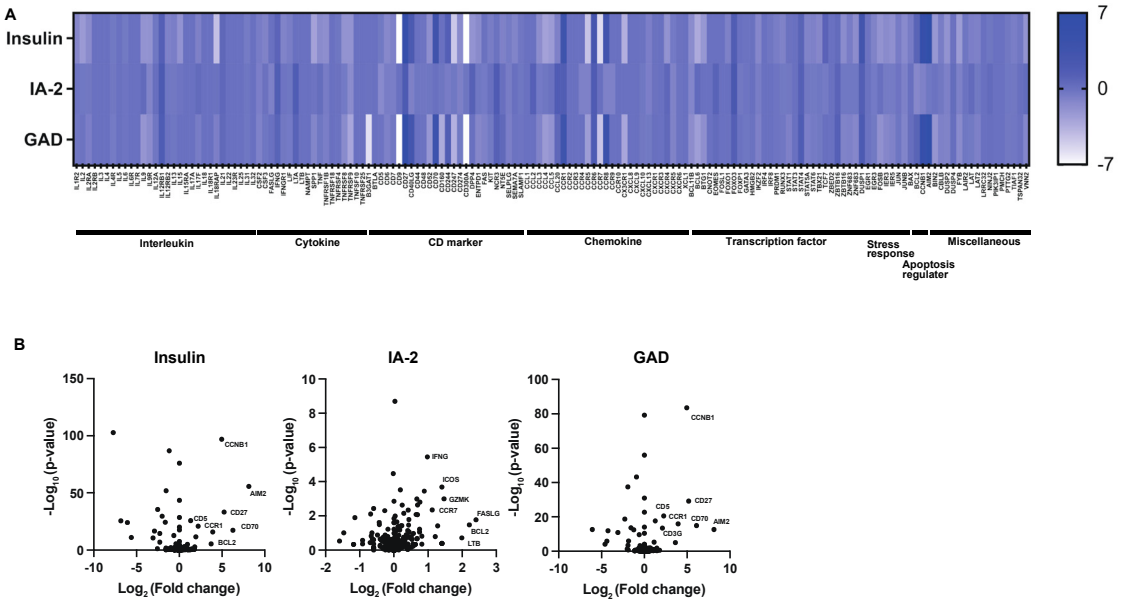


図 2. CD8^{+}T 細胞の遺伝子発現

A） NC 群との遺伝子発現の比較を示すヒートマップ。

B） ボルケーノプロットは、NC 群との遺伝子発現の比較を、x 軸に $\log_2$(Fold change)、y 軸に$-\log_{10}$（p-value）で示した。

NC 群の遺伝子発現と比較して、Insulin 群と GAD 群は同様の遺伝子発現の変化を示したが、IA-2 は他の 2 群と異なる遺伝子発現の変化を示した（表 1）。

表 1. エフェクターメモリーCD8^{+}T 細胞において NC 群と比較して発現量が増加した上位 20 遺伝子

	Insulin	IA-2	GAD		Insulin	IA-2	GAD
1	*AIM2*	*FASLG*	*AIM2*	11	*TNFRSF18*	*CCR5*	*GLG1*
2	*CD70*	*BCL2*	*CD70*	12	*CTLA4*	*CCR7*	*IL12RB2*
3	*CD27*	*LTB*	*CD27*	13	*NINJ2*	*IFNG*	*CD7*
4	*CCNB1*	*GZMK*	*CCNB1*	14	*FASLG*	*CD5*	*DUSP4*
5	*CCR1*	*ICOS*	*CCR1*	15	*LTB*	*OAS1*	*CD244*
6	*BCL2*	*IL12RB2*	*BCL2*	16	*PECAM1*	*SEMA7A*	*ZNF683*
7	*CD5*	*CD70*	*CD5*	17	*CD7*	*CD3D*	*MYC*
8	*CD3G*	*IL6*	*CD3G*	18	*ZBTB16*	*BAX*	*IL1R2*
9	*CD4*	*CTLA4*	*LTA*	19	*IL2RA*	*BCL11B*	*STAT1*
10	*IL12RB2*	*MYC*	*CD4*	20	*GLG1*	*IL7R*	*PECAM1*

実際、*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。

次に、全てのエフェクターメモリ CD8^{+}T 細胞において、NC 群と比較して insulin 群および GAD 群で発現が上昇した上位 8 遺伝子の陽性細胞の頻度を図 3A に示す。

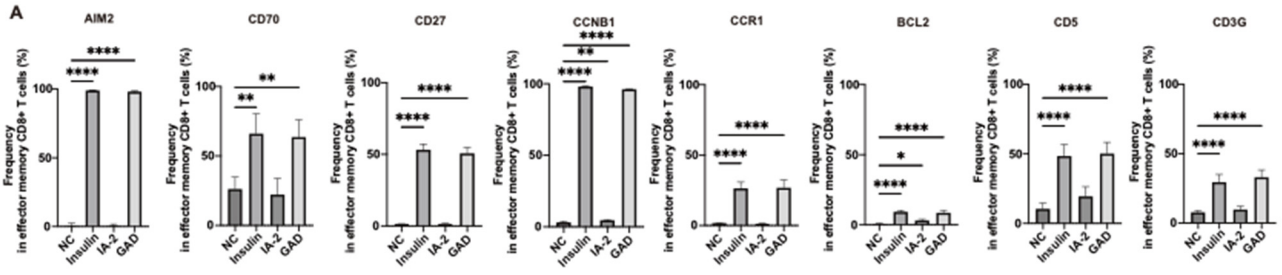


図 3. Insulin 群、GAD 群で NC 群と比較して発現量が増加した上位 8 遺伝子

AIM2、*CD70*、*CD27*、*CCNB1*、*CCR1*、*BCL2*、*CD5*、*CD3G* を持つエフェクターメモリー$CD8^+$T 細胞における頻度。データは、平均値±SD 値で示し、Holm-Šídák の多重比較検定による 1-way ANOVA で分析した。*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001。

考　察

バイアスのない PCR 技術である adapter ligation-mediated PCR を使用した TCR レパートリー解析により本実験は行われた。本研究では、4 人の 1 型糖尿病患者の TRA と TRB のレパートリーをクローンレベルで包括的に調査した。BD Rapsody を用いて 1 型糖尿病患者の TRA と TRB のレパートリーを明らかにしたのは、本研究が初めてである。さらに、この統合的な解析により、特定の TRV や TRJ の優先的な利用を容易に検出することができ、今後実施予定である抗原特異的 T 細胞による免疫応答の研究に有用であると考えられる。

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。細胞傷害性 $CD8^+$T 細胞は、膵島浸潤における $CD8^+$T 細胞の優位性［1，2］、および $CD8^+$T 細胞による β 細胞傷害に起因する 1 型糖尿病の動物モデルを用いた多くの研究［3，4］に基づいて、β 細胞傷害の主要メディエイターと考えられている。我々の知る限り、本研究は、1 型糖尿病患者の PBMC をオーバーラップペプチドで刺激し、細胞系譜、TCR、遺伝子活性化に着目した単一細胞解析により膵島自己抗原反応性 T 細胞の質的異常を明らかにした最初の研究である。

さらに、insulin、IA-2、GAD65 といった代表的な 1 型糖尿病抗原の TCR に認識されうるペプチド断片を包含するオーバーラッピングペプチドを作製した。本研究で使用したペプチドは、各抗原の配列をカバーする 11 アミノ酸のオーバーラップした 15 mer の配列を中心とした凍結乾燥ペプチドのプールである。PepTivator®オーバーラップペプチドは、主に SARS-CoV2 関連の研究に使用されてきた［5，6］。本研究では、これらのオーバーラップペプチドで刺激した免疫細胞において、TCR レパートリーや遺伝子発現に明らかな変化が観察された。Insulin、IA-2、GAD 抗原がエフェクター$CD8^+$T 細胞における遺伝子発現を変化させることを明らかにした。興味深いことに、インスリン抗原と GAD 抗原の刺激による $CD8^+$エフェクターT 細胞の遺伝子発現の変化は同様であり、多くの既報が本研究の結果を支持している。本研究は、1 型糖尿病の病態をさらに解明するための手がかりになるとともに、1 型糖尿病治療のターゲットとなりうる可能性を示している。

共同研究者・謝辞

技術協力いただきましたバイオストリーム株式会社の細野直哉様に感謝申し上げます。

文　献

1) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. (1985) *In Situ* Characterization of Autoimmune Phenomena and Expression of HLA Molecules in the Pancreas in Diabetic Insulitis. New England Journal of Medicine 313:353–360. doi: 10.1056/NEJM198508083130604.PMID: 3159965

2) Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. (2009) Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. Clin Exp Immunol 155:173–181. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x.PMID: 19128359

3) Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Podolin PL, Zijlstra M, Jaenisch R, Peterson LB. (1994) β2-Microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulitis or diabetes. Diabetes 43:500–504. doi: 10.2337/diab.43.3.500

4) Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P (2002) Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: Emerging targets for therapeutic intervention. Immunity 17:1–6. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00338-2

5) Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR (2020) Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. Viruses 12:. doi: 10.3390/v12030254.PMID: 32106567

6) Chu Y, Milner J, Lamb M, Maryamchik E, Rigot O, Ayello J, Harrison L, Shaw R, Behbehani GK, Mardis ER, Miller K, Prakruthi Rao Venkata L, Chang H, Lee D, Rosenthal E, Kadauke S, Bunin N, Talano JA, Johnson B, Wang Y, Cairo MS. (2022) Manufacture and Characterization of GMP-Compliant SARS-COV-2 Cytotoxic T Lymphocytes. J Infect Dis. doi: 10.1093/infdis/jiac500. PMID: 36583990