

氏 名	森本 貴子
(ふりがな)	(もりもと たかこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第59号
学位審査年月日	令和5年2月1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	High monocyte CD300e expression in patients with acute onset type 1 diabetes (急性発症1型糖尿病患者における単球CD300eの 高発現)
論文審査委員	(主) 教授 西川 浩樹 教授 武内 徹 教授 矢野 貴人

学位論文内容の要旨

《目的》

1型糖尿病(T1D)は免疫反応による膵β細胞の破壊と内因性インスリン分泌の枯渇を特徴とする。急性発症1型糖尿病(AT1D)は膵島関連自己抗体が陽性で、発症から3ヶ月以内に糖尿病性ケトアシドーシス(DKA)に至る。一方で、劇症1型糖尿病(FT1D)は膵島関連自己抗体が陰性で、発症から1週間以内で急激な膵β細胞破壊によりDKAに至る。我々は、FT1Dの急性期にCD300e抗体が高値であり、同抗体が早期診断マーカーになり得ることを報告した。

CD300ファミリーは、主に骨髄系細胞に発現する新たな免疫調整因子として注目されている。CD300ファミリーはCD300a-hまで8種同定されており、CD300b、c、d、e、hは免疫活性受容体、CD300a、fは免疫抑制受容体として作用する。CD300がアレルギー、感染症、自己免疫、炎症に関連すると報告されているが、それらの疾患におけるCD300

の詳細な役割は十分に明らかにされていない。そこで、本研究は T1D の発症における CD300e の関与を明らかにする目的で行った。

《対象》

当院通院中の FT1D 患者 20 名、AT1D 患者 25 名、2 型糖尿病(T2D)患者 14 名、健常者 (HC)17 名。T1D 以外の自己免疫疾患を有する患者、ステロイド/免疫抑制剤使用中の患者、研究に同意しない患者は除外した。

《方法》

FT1D、AT1D、T2D、HC 患者の末梢血より EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation Kit を用いたネガティブセレクションにより単球を採取した。また、FT1D 患者 8 名、AT1D 患者 12 名、T2D 患者 11 名、HC 9 名においては Ficoll®-Paque PREMIUM を用いて末梢血単核細胞(PBMC)を採取した。フローサイトメトリーを用いて、単球 (CD45⁺CD14⁺)と PBMC 中の骨髄系樹状細胞(mDC)(CD45⁺CD11c⁺HLA-DR⁺)における CD300e 発現を解析した。さらに、単球を CD300e のリガンドであるスフィンゴミエリン (SM)3.3 ng/μL で刺激培養後の細胞培養上清液中の TNF-α濃度を ELISA 法で測定した。

《結果》

年齢、性別、HbA1c、血糖値、糖尿病罹病期間、推定糸球体濾過量(eGFR)、body mass index に糖尿病 3 群(FT1D、AT1D、T2D)間の有意差はなかった。単球の CD300e 陽性率は、AT1D が HC よりも有意に高かった(p=0.006)。多変量解析では、単球の CD300e 陽性率は AT1D が HC より、女性が男性よりも高く、さらに、eGFR、年齢と負の相関を認めた(AT1D p=0.027、性別 p=0.023、eGFR p=0.028、年齢 p=0.023)。SM による単球刺激培養では TNF-α分泌の個人差が大きかったため、SM+TNF-α/SM-TNF-αを用いて群間差を評価した。FT1D、AT1D、T2D、HC の SM+TNF-α/SM-TNF-αはそれぞれ 2.2 (IQR;1.0,3.8)、1.9 (IQR;1.3,3.1)、2.4 (IQR;1.6,4.1)、2.4 (IQR;1.8, 3.7)で、群間差を認め

なかった。

《考察》

本研究では、単球の CD300e 陽性率は HC よりも AT1D が高いことを発見した。多変量解析では、単球の CD300e 陽性率と糖尿病型は他の背景因子と独立して関連することを示した。本研究は CD300e と自己免疫疾患との関連を示す初めての報告である。CD300e は免疫刺激受容体であることが示唆されており、AT1D 患者における高い単球 CD300e 陽性率は、自己免疫の促進因子としてその病因に関与する可能性がある。

近年、SARS-CoV-2 などのウイルス感染により骨髄球系細胞の CD300 ファミリーの発現が亢進していることが報告されている。AT1D の発症においてエンテロウイルス等のウイルス感染は重要な環境要因であるが、エンテロウイルスと CD300 ファミリーとの関連は報告されていない。今回の研究の結果から単球の CD300e 陽性率が増加していることは AT1D の潜在的なエンテロウイルス感染が関与している可能性も考えられる。

FT1D は CD300e 発現に関して AT1D と異なり HC との有意差を認めなかった。AT1D の膵島炎は発症後しばらく持続するのに対し、FT1D の膵島破壊は数週間のうちに消失する。FT1D では、ウイルス関連の膵島破壊と免疫応答が完了していたため、あるいは AT1D と異なる病態をもつために、その差を認めなかった可能性がある。

性別、年齢、腎機能の違いが免疫機能に影響を及ぼすことは以前より報告されているが、CD300e とこれらの要因との関係を調べた研究はない。本研究で示された単球の CD300e 発現と性別、年齢、eGFR の関連は、これらの要因に伴う免疫機能の違いを説明する一つの要素であると考えられる。

SM 刺激培養試験では糖尿病型間で単球からの TNF- α 産生量に差がなかった。SM は CD300e のみでなく、CD300b、CD300f のリガンドとしても作用するため、単球からの TNF- α 産生にバラツキが出た可能性がある。今後の研究で CD300e 抗体などの CD300e 特異的アゴニストを使用して明らかにする必要がある。

《結論》

本研究で、AT1D は HC よりも単球の CD300e 陽性率が高いことが示された。さらに、単球の CD300e 陽性率は、男性より女性の方が高く、eGFR、年齢と負の相関を認めた。すなわち、本研究は CD300e の新しい生理学的特徴を明らかにし、CD300e が AT1D の病因に関与する可能性があることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

1 型糖尿病(T1D)は免疫反応による膵β細胞の破壊を特徴とする。申請者のグループは、T1D の亜型である劇症 1 型糖尿病(FT1D)の急性期に CD300e 抗体が一過性に増加し、この抗体が早期診断マーカーになり得ることを報告した。今回、申請者は T1D の発症における CD300e の関与を明らかにする目的で本研究を行った。

FT1D 患者 20 名、急性発症 1 型糖尿病(AT1D)患者 25 名、2 型糖尿病(T2D)患者 14 名、健康者(HC)17 名の患者末梢血より単球を、FT1D 患者 9 名、AT1D 患者 12 名、T2D 患者 11 名、HC 9 名より末梢血単核細胞(PBMC)を採取した。フローサイトメトリーを用いて、単球と PBMC 中の骨髄系樹状細胞における CD300e 発現を分析した。次に、CD300e のリガンドであるスフィンゴリエリン(SM) 3.3 ng/μL で単球を刺激培養後の培養上清中 TNF-α 量を ELISA 法で測定した。

単球の CD300e 陽性率は AT1D が HC よりも有意に高かった。多変量解析では、CD300e 陽性率は AT1D が HC より、女性が男性よりも高く、eGFR、年齢と負の相関を示した。SM+TNF-α/SM-TNF-αには糖尿病型間の差を認めなかった。

本研究において、自己免疫疾患である AT1D と CD300e との関連を初めて報告した。AT1D 患者における高い単球 CD300e 陽性率は、自己免疫の促進因子として病因に関与する可能性や潜在的なエンテロウイルス感染が関与する可能性が考えられる。また、FT1D では AT1D と異なりウイルス関連の膵島破壊が完了しているため、CD300e 発現に HC との差を認めなかった可能性がある。本研究で示された CD300e と性別、年齢、eGFR の関連は、性、加齢、腎機能に伴う免疫機能の違いを説明する一つの要素であると考えられる。SM 刺激培養試験において糖尿病型間で TNF-α 産生量に差がなかったことは、SM が CD300e のみでなく、CD300b、CD300f のリガンドとしても作用したことが考えられ、今後の研究で検証する必要がある。

本研究で申請者は CD300e の新しい生理学的特徴を明らかにし、CD300e が AT1D の病因に関与する可能性があること明らかにした。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 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)

Bulletin of Osaka Medical and Pharmaceutical University

68(1): 2022, in press