

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04879

研究課題名(和文)GVHDにおける炎症の慢性化と多臓器線維化の制御及び新規治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文)Mechanism of lung fibrosis in chronic GVHD

研究代表者

大沼 圭(OHNUMA, Kei)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10396872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患は、慢性GVHDに特徴的なはな病変である。本研究において、慢性GVHDを発症するヒト免疫化マウスモデルを利用して、慢性GVHDマウスにおいて有意にコラーゲン含有量が増加していること、浸潤したヒトリンパ球はCD26発現量が著明に増加すると共に、CD4T細胞が優位であること、IL-26が高発現していることを発見し、IL-26は特異抗体およびナチュラルリガンドのcav-1によるCD26共刺激で高発現し、CD28共刺激では分泌されないことを示した。さらに、Cav-Ig投与により慢性GVHDの予防および治療が、GVL効果を阻害することな可能であることをin vivoモデルで示した。

研究成果の概要(英文)：Obliterative bronchiolitis (OB) is the only manifestation of pulmonary chronic GVHD (cGVHD). We identified a novel effect of IL-26 on cGVHD. Humanized cGVHD mice exhibited OB with increased collagen deposition and predominant infiltration with human IL-26CD26CD4T cells. IL-26 increased collagen synthesis in fibroblasts and that collagen contents were increased in a murine GVHD model using IL26 Tg mice. IA significant increase in IL-26 production by CD4T cells following CD26 costimulation, while immunoglobulin Fc domain fused with the N-terminal of caveolin-1, the ligand for CD26, (Cav-Ig) effectively inhibited production of IL-26. Administration of Cav-Ig before or after onset of GVHD impeded the development of cGVHD without interrupting engraftment of donor-derived human cells, with preservation of the GVL effect. We concluded that cGVHD of the lungs is caused in part by IL-26CD26CD4T cells, and that treatment with Cav-Ig could be beneficial for cGVHD prevention and therapy.

研究分野：医学

キーワード：慢性GVHD CD26 Caveolin-1 IL-26 造血幹細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞移植 (HSCT) は、毎年約2万人が発症している血液がんや先天性免疫不全・代謝異常症の有力な治療方法であるが、約60%の患者は血縁者にHLA適合ドナーが存在しないため、非血縁者間骨髄や臍帯血移植、さらにはHLAミスマッチ移植治療を行ってHSCTの拡大がはかられている。しかし、非血縁者間HSCTやHLAミスマッチ臍帯血移植による移植適応の拡大と移植成績の向上は長期生存者の増加をもたらしたが、これら長期生存者は必ずしも良質な生活の質(QOL)を保持しているとは言いがたい。特に、慢性GVHDに伴う晩期合併症により日常生活動作(ADL)が妨げられ、QOLが低下している。ADL障害の原因は、炎症の慢性化に伴う肺の線維化による呼吸障害や皮膚硬化・関節障害による身体活動の重篤な制限である。慢性GVHDの標準治療はステロイド剤であるが、発症後2年以上の長期間の免疫抑制療法が必要で、長期投与に伴う副作用も多く、肺や皮膚の線維化の阻止効果も不十分で臓器障害が進行するため、HSCT患者のQOLの向上のためには、慢性GVHDの本質的な病態形成理論に基づいた根本的な治療法の開発が喫緊の課題である。

(2) われわれは、T細胞のCD26分子が抗原提示細胞(APC)のCaveolin-1(cav-1)と相互作用することにより、T細胞のメモリアン答が増強することを発見し、CD26依存性メモリアン答におけるT細胞-APC活性化の分子メカニズムを解明した。これら一連の研究結果から、今まで不明であったCD26の共刺激リガンドcav-1を世界で初めて明らかにし、CD28とは別経路のT細胞共刺激分子の活性化メカニズムをヒト免疫系において発見した。その結果、CD26抗体或いは、Cav-Ig(cav-1とヒトIgG-Fcの融合蛋白)によるCD26共刺激阻害により、アロ抗原に対するアナジの誘導に成功し、アバタセプト(CTLA4-Ig)によるCD28共刺激阻害では完全には抑制できなかったGVHD等T細胞活性化が主因となる免疫病への治療応用の可能性を示した。

(3) この成果を踏まえ、申請者は、成人末梢血単核球を免疫不全NOGマウスに移植した急性GVHDモデルを用いて、CD26抗体による急性GVHDの予防および治療の有効性を証明した。このモデルでは、CD26抗体療法は、CTLA4-Igを上回る急性GVHD予防および治療効果があり、一方、CTLA4-Igでは強い免疫抑制作用によって生着不全が有意に高率に認められたが、CD26抗体療法はドナー細胞の生着率も優れ、さらに、移植片対白血病(GVL)効果にもCD26抗体療法は優れていた。しかし、このモデルでは急性GVHDの発症は探索できたが、炎症の慢性化による多臓器障害の解析は不可能であった。そこで、申請者が以前報告したCD26共刺激シグナルが減弱している臍帯血T細胞に着目して、慢性炎症を再現するヒト免疫化マウスモデルを作成した。このモデルは、ヒトCD26+CD4T細胞がエフェ

クターとなって炎症の慢性化と多臓器の線維化を惹起するモデルである。浸潤したCD4T細胞を純化して炎症性サイトカインのプロファイルをDNAマイクロアレイで解析したところ、共刺激分子CD26とともに、IL-10ファミリーに属するIL-26が高発現していることを発見し、IL-26は特異抗体およびナチュラルリガンドのcav-1によるCD26共刺激で高発現し、CD28共刺激では分泌されないことを示した。重要なことに、IL-26はマウスに存在しないため、疾患モデルによるIL-26と病態の関係が明らかにされていないが、申請者は、組換えヒトIL-26はマウス線維芽細胞にもヒト細胞と同様に作用してシグナルの活性化とコラーゲンの発現を増強することを*in vitro*実験で示した。

(4) したがって、このモデルマウスを用いることにより、慢性GVHDの病因および慢性GVHDによる慢性閉塞性肺疾患様の肺障害や皮膚硬化等を引き起こす慢性炎症及び組織線維化の分子メカニズムを解明し、慢性炎症性疾患に対する新たな分子標的療法を確立する基盤研究を行うため、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

(1) 上述の背景を踏まえ、新規炎症性サイトカインIL-26の慢性GVHDの病態における役割解明およびCD26とそのリガンドcav-1をターゲットとした新規分子標的療法による慢性炎症と線維化の制御メカニズムを、疾患モデルを用いて明らかにすることにより、慢性GVHDのみならず、自己免疫疾患等の自己抗原応答性T細胞活性化が原因と考えられる慢性炎症性疾患に対する新たな分子標的療法の確立が大いに期待できる。

(2) 慢性GVHDは克服すべき最も重要なHSCT合併症であるが、従来の免疫抑制薬では肺や皮膚の線維化の阻止効果は不十分で、徐々に臓器障害が進行するため、革新的な新規治療法の開発が必須とされている。そこで、本研究では、申請者が新たに樹立したヒト免疫化慢性炎症マウスを用いて、慢性GVHD等の慢性炎症性疾患の病態解明と分子標的療法の確立を目指した基盤研究を行うため、以下の①～③の研究を実施する。

① ヒト免疫化慢性GVHDマウス及びヒトIL26トランスジェニック(Tg)マウスにおけるIL-26とCD26共刺激の役割を解明する。これにより、炎症の慢性化に関わる分子メカニズムが解明でき、治療標的分子を明らかにする。

② CD26共刺激リガンドのcav-1を標的とした慢性GVHDに対する新規分子標的療法の開発を行う。これにより、トランスレーショナルリサーチを進めるための基礎的データを獲得する。

③ 慢性GVHD症例の臨床検体を分子生物学的に解析する。これにより、慢性GVHDの病態解明や新たな疾患活動性のバイオマーカーを同定する。

以上により、慢性GVHDの病態解明のみな

らず、慢性炎症の分子機構の解明、及び、安全で有効性の高い革新的な免疫制御療法の開発に寄与することを目的とする。

(3) これにより、従来の免疫抑制療法では日和見感染や成長障害等の副作用で十分な治療が受けられなかった小児慢性 GVHD 患者のみならず、造血幹細胞移植を受けた成人の慢性 GVHD 患者、さらには、心血管疾患や腎障害等の副作用で十分な免疫制御治療が難しかった高齢者にとっても、安全で有効性の高い新規分子標的療法を開発する。さらに、肺の生活習慣病といわれる慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や血管の慢性炎症である動脈硬化性疾患等の慢性炎症全般の病態解明と治療の開発へと発展させ、国民の健康寿命の延伸を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) まず、慢性 GVHD を発症するヒト免疫化マウスモデルを利用して、さらに詳しい慢性炎症の分子病態を解明する。このモデルは、皮膚や肝、肺など多臓器にヒト T 細胞が浸潤し、臓器の線維化を示す。われわれは、予備実験で、このマウスの肺のコラーゲン含有量について、GVHD を発症しないコントロールマウス (ヒト臍帯血由来 T 細胞除去 CD34 陽性を移植した NOG マウス) の肺と比較したところ、慢性 GVHD マウスにおいて有意にコラーゲン含有量が増加していること、また、炎症組織に浸潤したヒトリンパ球は CD26 発現量が CD28 に比して著明に増加すると共に、CD4T 細胞が優位であることを見出した。そこで、浸潤した CD4 陽性 T 細胞を純化して炎症性サイトカインのプロファイルをマイクロアレイで解析したところ、共刺激分子 CD26 とともに、IL-10 ファミリーに属する IL-26 が高発現していることを発見し、*in vitro* 実験では、IL-26 は特異抗体およびナチュラルリガンドの cav-1 による CD26 共刺激で高発現し、CD28 共刺激では分泌されないことを示した。しかし、IL-26 はマウスに存在しないため、疾患モデルによる詳細な病態解析はなされていない。一方、組換えヒト IL-26 がヒト細胞と同様にマウス線維芽細胞にも作用してシグナルの活性化とコラーゲンの発現を増強することを確認した。これらの結果を踏まえ、CD4 陽性 T 細胞を活性化する CD26 共刺激シグナルの分子メカニズムと新規炎症性サイトカイン IL-26 の細胞生物学的な意義を *in vivo* で解明し、CD26・CD4 陽性 T 細胞の浸潤によって引き起こされる慢性炎症・臓器線維化とその臓器障害の病因病態を明らかにする。このために、慢性炎症マウスの脾臓、末梢血および肺・肝臓・皮膚・腎臓の CD26・CD4 陽性 T 細胞を分取し、フローサイトメトリーによる多重染色法によりエフェクター分子の発現解析やヒト炎症性サイトカインプロファイルの同定を行い、慢性炎症にかかわる IL-26 発現細胞のサブセットを同定する。

(2) 次に、慢性炎症における IL-26 の役割

を解明するため、ヒト IL-26 遺伝子を導入した Tg マウスを用いる。放射線照射とシクロフォスファミド投与した HLA ハプロタイプの異なるレシピエントマウスに *IL26*Tg マウスの脾臓細胞と骨髄細胞を移植する adoptive transfer の系により、皮膚、腎臓、肺の炎症、線維化を病理学的に解析する。これにより、CD26・IL-26・CD4 陽性 T 細胞の機能と慢性 GVHD 病態との関係および慢性 GVHD 病態の CD4 陽性 T 細胞における CD26 共刺激独自のシグナル伝達経路を明らかにする。

(3) 上記慢性 GVHD モデルマウスにおいて、CD26 抗体が生存率を延長させるが、さらに、CD26 の共刺激リガンドをブロックする Cav-Ig はより生存期間を延長させるという予備データを得ている。この予備データを踏まえ、まず、慢性 GVHD マウスを用いて Cav-Ig 或いは CD26 抗体の投与量と投与時期、投与期間を変えて、最適の予防及び治療投与方法を明らかにする。慢性 GVHD に対する効果判定は、Cooke の臨床スコアの改善、及び、生存期間延長を指標とする。これにより、慢性 GVHD の予防的投与のプロトコールの確立とともに、発症後の投与でも慢性炎症の抑制が充分可能かどうか明らかにし、CD26 抗体と Cav-Ig のどちらがより適切な治療分子であるかも明らかにする。また、ヒト *IL26*Tg マウスを利用した adoptive transfer の系で、同様に慢性 GVHD を惹起し、病理組織解析、炎症浸潤リンパ球のサブセットやサイトカイン発現解析を行う。これにより、慢性 GVHD における IL-26 の重要性を実証する。

(4) 上記の adoptive transfer の系において、慢性 GVHD マウスの肺や皮膚の炎症・線維化が十分に予防および治療できているか病理組織学的に解析する。同時に、マウス血清中のヒト IL-26 の経時変化を ELISA で測定して、慢性 GVHD の重症度と IL-26 の相関を証明する。また、肺、皮膚、肝臓に浸潤したヒト T 細胞のサブセットをフローサイトメトリーで解析し、発症時と抑制時の CD26 の発現や浸潤した標的臓器間で CD26 の発現やサブセットに違いが認められるかを明らかにする。

(5) 一方、免疫抑制療法が白血病などの原疾患の再発をもたらすようならば臨床応用が難しくなる。そこで、Cav-Ig 投与による GVL 効果への影響を検討するため、NOG マウスと同系マウス由来の B 細胞リンパ腫株 A20 にルシフェラーゼ発現遺伝子を安定的に導入した細胞を慢性 GVHD マウスに移入して GVL 効果の評価を行う (In Vivo Imaging 法にて)。これにより、Cav-Ig 療法は、GVL 効果を維持して免疫寛容誘導が可能であるかどうかを実証する。

(6) 申請者は、同種 HSCT 後の急性 GVHD 患者の末梢血リンパ球を解析したところ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞とも CD26 強陽性細胞が著増しており、さらに、急性 GVHD の胃粘膜生検組織ではグレードに比例して

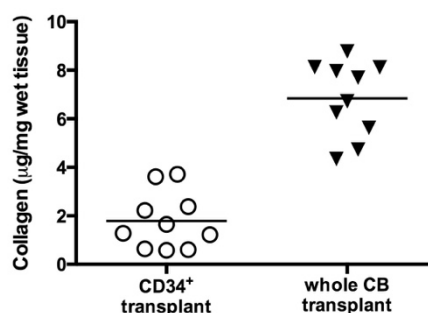
CD26T リンパ球が強く浸潤しているという知見を得ている。一方、慢性 GVHD の臨床検体のデータは皆無である。そこで、慢性 GVHD 患者の検体を用いて CD26 やそのリガンド cav-1、及び IL-26 の発現をフローサイトメトリーと ELISA で解析する。これにより、慢性 GVHD の病因や新たな疾患活動性の臨床指標となるバイオマーカーを同定する。

#### 4. 研究成果

(1) われわれは、以前、臍帯血 T 細胞においては CD45RA 陽性のナイーブサブセットが優勢で CD26 共刺激シグナルが減弱していることを見出しているが、この点に着目して、ヒト臍帯血 (CB) をドナーソースとした慢性炎症を再現するヒト免疫化マウスモデルを作成した (whole CB transplant)。すなわち、非致死量の放射線照射をした NOG マウスに CB から分離した単核球 (MNC) を移植することにより、移植したヒト臍帯血由来 CD26 強陽性リンパ球 (CD26+ HuCB) が標的臓器に浸潤し、全身の皮膚萎縮と硬化、閉塞性細気管支炎 (BO) 及び肺線維症、肝臓の線維化を発症した。whole CB transplant マウスは移植後 4 週目に GVHD 症状が発現し、8 週から 16 週までに死亡する。比較コントロールとして、T 細胞除去 CD34 陽性細胞純化臍帯血を移植した NOG マウス (CD34+ transplant) は、GVHD を発症することなく、前例生存した。末梢血液の解析では、どちらの群もヒトリンパ球が生着し T 細胞、B 細胞のサブセットの比率に差異は認めなかった。

次に、GVHD 肺病変のヒトリンパ球をフローサイトメトリーおよび免疫組織化学検査で解析した。whole CB transplant マウスでは、肺に浸潤したドナー由来リンパ球の 99% が CD3 陽性 T 細胞であり、しかも、CD4 陽性 T 細胞が優位であった。whole CB transplant マウスの肺組織からヒト CD4 陽性 T 細胞を分取し定量的 RT-PCR で mRNA の発現解析を行ったところ、*CD26/DPP4*、*IFNG*、*IL17A*、*IL21*、*IL26* の発現が有意に上昇していることを見出した。一方、*IL2*、*TNF*、*IL4*、*IL6*、*IL10* の発現は低下していた。また、whole CB transplant マウスの血清を ELISA で解析したところ、可溶性 CD26、IL-26 は CD34+ transplant マウスに比べて、有意に上昇していた。さらに、肺に浸潤したドナー由来リンパ球を多重染色によるフローサイトメトリーで解析したところ、GVHD 肺病変に浸潤しているドナー由来ヒト T 細胞は、IL26+CD26+CD4+ T 細胞であることを見出した。

(2) whole CB transplant マウスの肺のコラーゲン含有量について、GVHD を発症しない CD34+ transplant マウスの肺と比較したところ、慢性 GVHD マウスにおいて有意にコラーゲン含有量が増加していることが明らかとなった (図)。また、炎症組織に浸潤したヒトリンパ球は CD26 発現量が CD28 に比して著明に増加すると共に、CD4T 細胞が優位であるこ



図：肺コラーゲン含有量の比較

NOG マウスに T 細胞除去 CD34+細胞 (○, n=10)、又は、臍帯血単核球 (▼, n=10) を移植し、移植後 10 週目に肺を摘出。肺重量測定後 Sircol コラーゲンアッセイキットでコラーゲン量を定量した。

とを明らかにした。そこで、IL-26 が慢性 GVHD の肺病変の形成や線維化に関与していることを証明するため、まず、IL-26 によるコラーゲン産生能を *in vitro* で解析した。マウス線維芽細胞 NIH3T3 および正常ヒト肺線維芽細胞 NHLF の IL-26 受容体 (IL-20RA/IL-10RB) の発現をフローサイトメトリーおよびウエスタン解析で確認した。NIH3T3 および NHLF にヒト IL-26 を添加したところコラーゲン産生が増加し、一方、IL-26 によるコラーゲン産生刺激は IL-20RA の中和抗体で阻害された。したがって、IL-26 は臓器線維化のエフェクターサイトカインであり、また、IL-26 の受容体 IL-20RA/IL-10RB はヒトとマウスで共有されており、マウス細胞でも IL-26 が作用することが示された。

(3) ところで、IL-26 はマウスに存在しないため、疾患モデルの開発が皆無で IL-26 と病態の関係が全く不明であった。そこでわれわれは、ヒト *IL26* トランスジェニック (hIL26Tg) マウスを樹立して慢性 GVHD の臓器線維症の病態解明を行った。このために、hIL26Tg をドナー、NOG マウスをレシピエントとする骨髄移植モデルで解析を行った。hIL26Tg 骨髄移植 NOG マウスでは肺 GVHD 病変、特に細気管支周囲において著名なコラーゲン蓄積を認めた。一方、IL-26 を産生しない litter mate コントロールマウスあるいは B6 マウスの骨髄移植 NOG マウスの肺病変では、細胞浸潤は認めるがコラーゲンの蓄積は認められなかった。このことは、IL-26 が慢性 GVHD の肺病変の線維化に関与していることを示している。

(4) 次に、IL-26 産生刺激に関わる分子メカニズムを解析した。上述したように肺 GVHD 病変の IL-26 産生リンパ球は CD26+CD4+ T 細胞であるが、CD26 は T 細胞の共刺激分子であるため、慢性 GVHD の肺病変にけるエフェクター細胞として CD26+CD4+ T 細胞の解析を行った。まず、*in vitro* 培養系で HuCB T 細胞を用いて CD26 抗体、CD26 の共刺激リガンドである Cav-Ig、CD28 抗体および CD3 抗体で共刺激実験を行ったところ、CD26 抗体、Cav-Ig により IL-26 の産生が有意に認められ

た。さらに、この IL-26 産生刺激は、可溶性 Cav-Ig によって阻害された。これにより、HuCB CD4 陽性 T 細胞は、CD26・cav-1 の共刺激によって IL-26 を産生することが示された。

(5) Cav-Ig が慢性 GVHD の予防に有効であることを実証するため、whole CB transplant マウスを用いて解析を行った。非致死量の放射線照射を行った NOG マウスに HuCB を移植し、移植後 1 日目から Cav-Ig (100  $\mu$ g) の投与を行った (移植後 28 日目まで隔日に投与した)。コントロール群としてヒト IgG を投与した。ヒト IgG コントロール投与群は移植後 8 週から 15 週までに GVHD 症状を発症し全例死亡した。一方、Cav-Ig 投与群は、GVHD 症状を発症することなく生存した。末梢血の解析では、Cav-Ig 投与群、コントロール群ともドナー由来ヒトリンパ球の生着を認めており、T 細胞、B 細胞のサブセット比率も差異は認めなかった。GVHD 標的臓器である肺、皮膚、肝臓の病理組織検査では、コントロール IgG 投与群では慢性 GVHD の組織所見を認めたが、Cav-Ig 投与群では細胞浸潤は認めなかった。さらに、肺病変のコラーゲン量を測定したところ、コントロール IgG 投与群ではコラーゲン含有量の増加がみられたが、Cav-Ig 投与群では、非移植マウスや CD34+ transplant マウスと同等の低いコラーゲン含有量であった。これらの結果は、Cav-Ig 投与により、慢性 GVHD の予防が可能であることが示唆された。

(6) 次に、Cav-Ig が慢性 GVHD の治療に有効であることを実証するため、whole CB transplant マウスを用いて解析を行った。非致死量の放射線照射を行った NOG マウスに HuCB を移植し、慢性 GVHD 症状が出現しはじめる移植後 28 日目から Cav-Ig (100  $\mu$ g) の投与を行った (移植後 56 日目まで隔日に投与した)。コントロール群としてヒト IgG を投与した。ヒト IgG コントロール投与群は移植後 8 週から 15 週までに GVHD 症状を発症し全例死亡した。一方、Cav-Ig 投与群は、GVHD 症状を発症することなく生存した。末梢血の解析では、Cav-Ig 投与群、コントロール群ともドナー由来ヒトリンパ球の生着を認めており、T 細胞、B 細胞のサブセット比率も差異は認めなかった。移植後 5 週目の解析では、GVHD 標的臓器である肺、皮膚、肝臓の病理組織検査では、コントロール IgG 投与群では慢性 GVHD の組織所見を著名に認めたが、Cav-Ig 投与群では細胞浸潤はわずかであった。移植後 10 週目の解析では、コントロール IgG 投与群ではコラーゲンの沈着を著名に認めたが、Cav-Ig 投与群では細胞浸潤や線維化の病理変化は認めなかった。さらに、肺病変のコラーゲン量を測定したところ、移植後 5 週目、10 週目ともに、コントロール IgG 投与群ではコラーゲン含有量の増加がみられたが、Cav-Ig 投与群では、非移植マウスや CD34+ transplant マウスと同等の低いコラーゲン含有量であった。これらの結果は、Cav-Ig 投

与により、慢性 GVHD の治療が可能であることが示唆された。

(7) Cav-Ig 投与による GVL 効果への影響を検討するため、NOG マウスと同系マウス由来の B 細胞リンパ腫株 A20 にルシフェラーゼ発現遺伝子を安定的に導入した細胞 (A20-luc) を慢性 GVHD マウスに移入して GVL 効果の評価を行った。まず、上記 (5) の予防投与群において、移植後 1 日目に A20-luc を腹腔内に投与し、以降、Cav-Ig を 28 日目まで隔日投与した。A20-luc のみ移入したマウスは 4 週から 6 週までに腫瘍増殖のため全例死亡した。コントロール IgG 投与群は A20-luc の増殖は抑制されたが GVHD のため移植後 8 週から 15 週までに全例死亡した。一方、Cav-Ig 投与群は A20-luc の増殖および GVHD のいずれも抑制され全例が生存した。末梢血の解析では、Cav-Ig 投与群、コントロール群ともドナー由来ヒトリンパ球の生着を認めており、T 細胞、B 細胞のサブセット比率も差異は認めなかった。これらの結果は、Cav-Ig 投与により、GVL 効果を維持しながら慢性 GVHD の予防が可能であることが示唆された。

次に、上記 (6) の治療投与群において、移植後 28 日目に A20-luc を腹腔内に投与し、以降、Cav-Ig を 28 日から 56 日目まで隔日投与した。A20-luc のみ移入したマウスは 6 週までに腫瘍増殖のため全例死亡した。コントロール IgG 投与群は A20-luc の増殖は抑制されたが GVHD のため移植後 13 週までに全例死亡した。一方、Cav-Ig 投与群は A20-luc の増殖および GVHD のいずれも抑制され全例が生存した。末梢血の解析では、Cav-Ig 投与群、コントロール群ともドナー由来ヒトリンパ球の生着を認めており、T 細胞、B 細胞のサブセット比率も差異は認めなかった。これらの結果は、Cav-Ig 投与により、GVL 効果を維持しながら慢性 GVHD の治療が可能であることが示唆された。

(8) 慢性 GVHD 患者の B0 様の肺病変の病理組織解析では、CD26 陽性 T 細胞が細気管支周囲に浸潤しており、一方、cav-1 は血管内皮細胞およびマクロファージ様細胞に高発言していることが明らかとなった。このことは、ヒト慢性 GVHD の肺病変においても CD26・cav-1 の刺激経路により、慢性炎症病態が形成されていることを示唆している。

以上のように、ヒト免疫化マウス及びヒト IL26Tg マウスを利用した本研究成果は、慢性炎症の病態と治療標的を解明する突破口になると思われる。さらに、CD28 や ICOS 等の共刺激分子と異なり、様々なタンパク質と相互作用し T 細胞の活性化のみならず、細胞遊走や浸潤にも関与する CD26・cav-1 を標的とした免疫制御療法は、慢性 GVHD のみならず、関節リウマチや強皮症、全身性エリテマトーデス等の膠原病、新たな国民病となっている慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や動脈硬化等の慢性炎症全般の病態解明と治療の開発へと発展しうると思われる。すなわち、本研究成果

により、従来の治療法では十分な効果が得られていない慢性炎症に起因する難治性疾患に対する革新的な治療薬の開発が期待され、その結果、国民の健康寿命の延伸に大きく寄与することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Ohnuma K, Morimoto C, et al. CD26 in anti-tumor immunity: going beyond the enzyme. *Nat Immunol.* 2015;16(8):791-2. 査読あり
- ② Ohnuma K, Morimoto C, et al. Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes. *J Immunol.* 2015;194(8):3697-712. 査読あり
- ③ Ohnuma K, Morimoto C, et al. CD26-mediated induction of EGR2 and IL-10 as potential regulatory mechanism for CD26 costimulatory pathway. *J Immunol.* 2015;94(3):960-72. 査読あり
- ④ Ohnuma K, Morimoto C, et al. Role of IL-26+CD26+CD4 T cells in pulmonary chronic graft-versus-host disease and treatment with caveolin-1-Ig Fc conjugate. *Crit Rev Immunol.* 2016; 36: 239-267. 査読あり
- ⑤ Ohnuma K, Morimoto C, et al. First-in-Human phase I of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *Br J Cancer.* 2017;62:1-9. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大沼圭, 岩田哲史, 森本幾夫 他, 「T細胞共刺激分子 CD26 に基づく全身性エリテマトーデスの病態および疾患活動性の新規バイオマーカー探索」第 59 回日本リウマチ学会総会、2015 年 4 月、名古屋市。
- ② 大沼圭, 森本幾夫 他, 「Anti-interleukin 26 therapy for lung fibrosis of GVHD」第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月、金沢市。
- ③ 大沼圭, 森本幾夫 他, 「CD26/DPPIV-mediated regulation of pruritus in psoriasis」第 41 回研究皮膚科学会 年次学術大会・総会、2016 年 12 月、仙台市。
- ④ 大沼圭, 岩田哲史, 森本幾夫 他, 「全身性エリテマトーデスのステロイド治療抵抗性と CD26 陰性 T 細胞サブセットとの関係性について」第 61 回日本リウマチ学会総会、2017 年 4 月、福岡市。
- ⑤ 岩尾憲明, 大沼圭, 森本幾夫 他, 「急性 GVHD マウスモデルにおける HMGB1 の動態に関する検討」日本造血幹細胞移植学会総会、2018 年 2 月、札幌市。

[図書] (計 2 件)

- ① Ohnuma K, Morimoto C, et al. CD26 targeted therapy: A New Horizon in Malignant Pleural Mesothelioma Management, *Horizons in Cancer Research*, Nova Science Publishers, 2017, Editor: Hiroto S Watanabe, Vol 64: Chapter 6: Page 129-162. ISBN: 978-1-53610-512-4
- ② Ohnuma K, Morimoto C, et al., The use of the humanized anti-CD26 monoclonal antibody YS110 as a novel targeted therapy for refractory cancers and immune disorders. In: *Advances in Medicine and Biology*, Nova Science Publishers, 2018, Editor: Leon V. Berhardt, Vol 129: Chapter 1: 1-44. ISBN: 978-1-53613-347-8.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗ヒト IL-26 抗体  
発明者: 森本幾夫、波多野良、大沼圭、伊藤匠  
権利者: 学校法人 順天堂  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-231439  
出願年月日: 平成 29 年 12 月 1 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
[https://www.juntendo.ac.jp/graduate/lab-oratory/lab/immunity\\_cancer/](https://www.juntendo.ac.jp/graduate/lab-oratory/lab/immunity_cancer/)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 圭 (OHNUMA, Kei)  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号: 10396872

(2) 研究分担者

森本 幾夫 (MORIMOTO, Chikao)  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授  
研究者番号: 30119028  
岩尾 憲明 (IWAO, Noriaki)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00309139

岩田 哲史 (IWATA, Satoshi)  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師  
研究者番号: 00396871