

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05345

研究課題名(和文) CD26分子を介した免疫制御機構の解明と自己免疫疾患への臨床応用の基盤研究

研究課題名(英文) Molecular understanding of CD26-mediated immune regulatory mechanism and development of novel molecular targeted therapy for the treatment of refractory autoimmune diseases

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：CD26は共刺激分子としてヒトT細胞の活性化に重要な役割を果たしている。申請者らは近年、CD26分子が免疫応答の活性化と抑制の両方に関与している可能性を見出した。CD26シグナルによって特徴的に発現が増強される免疫抑制性因子の同定を試みた結果、CD4 T細胞はIL-10、LAG3、BTLAの、CD8 T細胞はBTLAの発現が顕著に増強されることを見出した。このCD26陽性LAG3陽性T細胞もしくはBTLA陽性T細胞は、健康者や全身性エリテマトーデス(SLE)患者の末梢血中にはほとんど存在しなかったが、悪性胸膜中皮腫患者の胸水中T細胞には存在することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD26分子はマウスT細胞では共刺激分子として機能せず、ヒト免疫において重要な分子である。免疫応答の負の制御メカニズムの解明は、自己免疫疾患の発症・悪化の根幹をなす問題であり、また、近年腫瘍免疫の分野においても、免疫応答を負に制御する免疫チェックポイント分子を阻害する免疫チェックポイント阻害薬は新たな治療薬として非常に注目されている。さらに申請者らが開発したヒト化CD26抗体は、悪性胸膜中皮腫に対する第I/II相臨床試験を実施しているところであり、CD26抗体の新たな抗腫瘍作用メカニズムの解明にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CD26 is a T cell costimulatory molecule, and plays an important role in the human immune system. We have recently shown that CD26 not only functions in T cell activation, but also may serve as an immune regulator. From our extensive examination, we found that the expression levels of IL-10, LAG3 and BTLA in human CD4 T cells, and those of BTLA in CD8 T cells were markedly enhanced following CD26 costimulation, as compared with CD28 costimulation. However, CD26+LAG3+ or BTLA+ CD4 T cells or CD26+BTLA+ CD8 T cells were hardly found in the peripheral blood of SLE patients or healthy adult volunteers. In contrast, the percentage of immune checkpoint molecules-expressing T cells was prominently increased in the pleural fluid of malignant pleural mesothelioma patients, and we could find CD26+LAG3+ or CD26+BTLA+ T cell subsets in the pleural fluid. The molecular mechanisms how the expression of LAG3 or BTLA is induced following CD26 costimulation are needed to be investigated in the future.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：CD26/DPP1V T細胞 共刺激分子 IL-10 ヒト免疫 免疫チェックポイント分子 全身性エリテマトーデス 悪性胸膜中皮腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CD26 分子は dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 酵素活性を有するヒト T 細胞共刺激分子であると同時に、様々なタンパクとも相互作用し、T 細胞の活性化や細胞遊走に関わる多機能分子である。一方、マウスでは末梢に出た T 細胞は CD4、CD8 両 T 細胞ともに CD26 の発現レベルが低く、そのうえ CD26 分子が共刺激分子としても機能しない。このことから、免疫制御に関わる重要な分子である CD26 を標的とした自己免疫疾患の解明のためには、マウスではなくヒト T 細胞を用いることが不可欠である。

代表的な T 細胞活性化分子である CD28 を介して活性化された T 細胞は、CTLA-4 や PD-1 といった免疫応答を負に制御する分子の発現が誘導され、慢性的に T 細胞の活性化が持続することを制御する免疫チェックポイント機構が知られている。この免疫応答を負に制御する分子を阻害する抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体は癌免疫療法として着目されているが、自己免疫疾患様の重篤な副作用も報告されている。一方、CD26 分子を介した T 細胞活性化の negative feedback 機構に関しては不明であったが、健常者の末梢血 T 細胞に強い CD26 シグナルが入ることで、代表的な免疫抑制性サイトカインである IL-10 の高産生と免疫チェックポイント分子の一つである LAG3 の高発現が誘導されることを申請者らは近年見出した。このことから、CD26 陽性 T 細胞は炎症のエフェクター細胞として生体防御に働く以外に、免疫抑制機能を持った細胞としても働く可能性があり、二面性を有していることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒト T 細胞に CD26 シグナルが入ることで IL-10 の高産生と LAG3 の高発現が誘導されることに着目し、CD26 シグナルによって免疫抑制機能を獲得する新たな抑制性 T 細胞サブセットの同定と、その分化誘導制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(2) 全身性エリテマトーデス (SLE: systemic lupus erythematosus) に代表される自己免疫疾患では、その特徴の一つとして自己反応性リンパ球の制御の破綻が考えられている。一方、様々ながんでは、がん細胞自身やその周囲に存在する細胞に免疫応答を抑制する種々の分子が高発現しているために、免疫細胞の機能が抑制され、免疫細胞によるがん細胞の除去から逃れていることが示唆されている。これまでに申請者らは、主に健常者の末梢血 T 細胞を用いて CD26 分子の機能解析を行ってきたが、自己免疫疾患やがんの病態に、CD26 分子を介した免疫活性化と免疫抑制がいかに関与しているかを明らかにし、病態のより詳細な解明、診断への応用、新たな分子標的療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト T 細胞の調製

順天堂大学医学部研究等倫理委員会、順天堂大学医学部附属浦安病院倫理委員会、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会、岡山労災病院臨床倫理小委員会および山口宇部医療センター受託研究審査委員会治験及び臨床研究審査部会での承認を得て、インフォームド・コンセントを written で得られた成人健常者、SLE 患者および悪性胸膜中皮腫患者の末梢血から、Ficoll 密度分離法により末梢血単核球 (PBMC) を調製した。悪性胸膜中皮腫患者および良性石綿胸水患者の胸水を遠心分離し、胸水と胸水細胞を分取した。PBMC および胸水細胞から T 細胞への精製には MACS (磁気細胞分離) システム (Miltenyi Biotec) を用いた。ヒト CD4 T 細胞、CD8 T 細胞への精製には、それぞれ human CD4⁺ T cell isolation kit, human CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) を使用し、それぞれ CD3⁺CD4⁺ が 97% 以上、CD3⁺CD8⁺CD56^{neg} が 95% 以上であることを FACSCalibur (BD Biosciences) にて確認した。

(2) 抗体と試薬

Flow cytometry には下記のヒト抗原特異抗体を用いた。CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD57, CCR6, CXCR3, CXCR5, KLRG1, PD-1, TIM3, BTLA, CD160, 2B4 (CD244), CD39, CD73 に対する蛍光標識抗体は BioLegend より購入した。CD26, CTLA-4, CCR7, Foxp3, Perforin, Granzyme A, Granzyme B に対する蛍光標識抗体は BD Biosciences より購入した。LAG3, TIGIT に対する蛍光標識抗体は eBioscience より購入した。

(3) フローサイトメトリー

成人健常者、SLE 患者の PBMC 及び悪性胸膜中皮腫患者、良性石綿胸水患者の PBMC 及び胸水細胞から精製した CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の、細胞膜上の CD26 の発現、T 細胞サブセットマーカー、細胞傷害性エフェクター T 細胞マーカー、免疫抑制性分子の発現を解析した。Foxp3, Perforin, Granzyme A, Granzyme B の細胞内の発現に関しては、BD Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences) を用いて、付属のプロトコルに従い細胞内染色を行った。FACSCalibur で測定を行い、得られたデータを FlowJo (Tree Star) で解析した。

4. 研究成果

(1) CD26 共刺激による免疫抑制性分子の発現誘導

申請者らは以前、CD26 共刺激によって特徴的に産生が誘導されるサイトカインを明らかに

するために、T 細胞が産生する代表的なサイトカイン産生を解析し、CD28 共刺激と比較して末梢血 CD4 T 細胞の IL-10 産生と IL-21 産生を顕著に誘導することを見出した(J Immunol. 2015)。また、IL-10 産生 T 細胞との関連が報告されている LAG3 分子の発現も顕著に増強されることを明らかにした。CD26 共刺激シグナルによる免疫抑制性分子の発現誘導機構を明らかにするために、IL-10・LAG 以外のよく知られている免疫抑制性分子の発現に関して、CD26 共刺激の刺激強度・刺激時間をふって解析を行った。

CD26 共刺激または CD28 共刺激によって活性化された末梢血 CD4 T 細胞の、IL-10 と同様に代表的な免疫抑制性サイトカインである TGF- β 1 及び IL-35 (EBV-induced 3 と p35 のヘテロダイマー)の発現を ELISA 及びリアルタイム RT-PCR によって解析したが、顕著な発現レベルの上昇は見られなかった。

次に、CD4 陽性 CD25 強陽性制御性 T 細胞の発生・分化・機能を制御するマスター転写因子である Foxp3 の細胞内発現、潜在型 TGF- β 複合体の N 末側構成成分である LAP の細胞膜上の発現をフローサイトメトリーにて解析した。CD26 共刺激及び CD28 共刺激にともない末梢血 CD4 T 細胞の Foxp3 の発現は上昇したが、両刺激の間で有意な差は認められなかった。一方、LAP に関しては CD28 共刺激では発現上昇が明白に見られたのに対し、CD26 共刺激では発現レベルの上昇がほとんど見られなかった。

近年、腫瘍免疫の分野において免疫応答の抑制に働く分子(免疫チェックポイント分子)を阻害することで腫瘍免疫を増強させ、免疫細胞によるがん細胞の傷害を促進する免疫療法が話題になっている。抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体は既にがんの治療薬として認可され、臨床応用されており、抗 LAG3 抗体もがんに対する臨床試験が行われている。その他に近年、免疫チェックポイント分子の総説で取り上げられる主な分子として、TIM3、TIGIT、BTLA、CD160、2B4(CD244)、CD39、CD73 があり、図 1 にそれらのリガンドとの関係をまとめたものを示す。腫瘍免疫の分野では CD8 T 細胞の解析が主に行われているが、本研究では CD4、CD8 両 T 細胞におけるこれらの主要な免疫チェックポイント分子 10 種の細胞膜上の発現レベルを解析した。

その結果、活性化刺激にともない発現が減少した CD73 以外の 9 種の分子では、CD28 共刺激または CD26 共刺激による発現レベルの増強が見られた。LAG3 に関しては、CD26 共刺激は CD28 共刺激よりも CD4 T 細胞の LAG3 の発現を顕著に増強させたのに対し、CD8 T 細胞の LAG3 の発現は CD28 共刺激の方がより強く発現レベルが増強されることが示された。CD28 共刺激と比較して最も CD26 共刺激による発現増強が顕著な分子として BTLA を見出した。BTLA は CD4、CD8 両 T 細胞において、著明な発現増強が認められた。

以上より、代表的な免疫抑制性のサイトカイン及び細胞膜上分子の発現を解析した結果、CD26 共刺激によって CD4 T 細胞は IL-10、LAG3、BTLA の、CD8 T 細胞は BTLA の発現が顕著に増強されることが示され、このことは代表的な活性化刺激である CD28 共刺激とは免疫系における役割が異なることを強く示唆している。

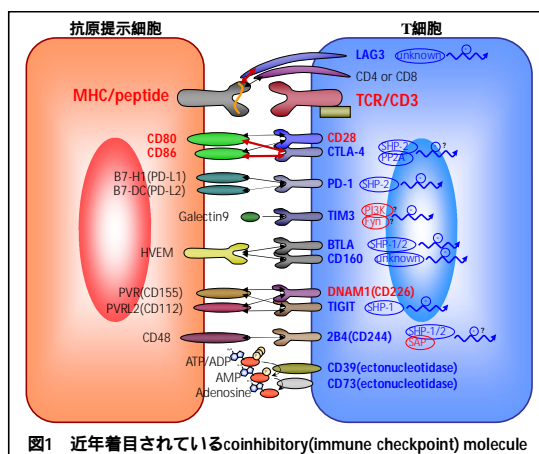


図1 近年着目されているcoinhibitory(immune checkpoint) molecule

(2) SLE における CD26 陽性・CD26 陰性 T 細胞サブセットの解析

SLE は皮膚や腎臓、中枢神経、肺、血管など全身の臓器で炎症反応が惹起される代表的な自己免疫疾患の一つであり、多彩な臓器症状を統一的に説明できる分子メカニズムは解明されていない。そこでまず、SLE 患者 40 例の末梢血 T 細胞の CD26 発現、CD26 陽性・CD26 陰性 T 細胞のサブセット解析、CD26 陽性 LAG3 陽性 T 細胞サブセット・CD26 陽性 BTLA 陽性 T 細胞サブセットの割合及び機能の解析を行った。

申請者はこれまでにヒト末梢血 CD8 T 細胞の CD26 と CD28 の発現パターンから naive・central memory・early effector memory・late effector memory・terminally differentiated effector といった分化段階の判別ができることを明らかにしている(Immunology. 2013)。SLE 患者の末梢血 CD8 T 細胞の CD26 と CD28 の発現パターンは、健常者と比較して患者によって非常に多様な発現パターンを示し、共通した傾向として CD26 陰性 CD28 陰性の terminally differentiated effector CD8 T 細胞の割合が増加していることが示された。

同様に SLE 患者と健常者の末梢血 CD4 T 細胞における CD26 と CD28 の発現パターンを解析した結果、約 4 割の SLE 患者で CD4 T 細胞中に健常者では見られないレベルの CD26 陰性の割合の増加が見られた。この SLE 患者の末梢血中で増加していた CD26 陰性 CD4 T 細胞の詳細なサブセット解析を行った結果、この細胞集団は健常者の末梢血 CD4 T 細胞中にはほとんど存在しない細胞傷害活性を有する細胞であることが示唆された。

次に、健常者及び SLE 患者の末梢血中の CD26 陽性 LAG3 陽性 T 細胞・CD26 陽性 BTLA 陽性 T 細胞の解析を試みたが、健常者・SLE 患者ともに少なくとも末梢血中では CD4、CD8 両 T 細胞において、LAG3 陽性 T 細胞の割合は 1%未満であり、BTLA はもともと T 細胞には弱陽性で発現しているが、*in vitro* の実験で CD26 共刺激を与えた際に認められるレベルで

BTLA を発現しているドナーは見られなかった。

以上の結果から、成人健常者と比較して SLE 患者では、CD8 T 細胞のみ CD26 陰性の割合が顕著に増加している患者と、CD8 T 細胞と CD4 T 細胞の両方で CD26 陰性の割合が増加している患者、少数派ながら健常者と近い CD26 陽性率を示す患者に分けられることが示された。現在、これらの T 細胞の CD26 の発現パターンと SLE の多様な病態との関係性について解析を行っている。一方で、当初解析を予定していた CD26 陽性の免疫抑制性 T 細胞サブセットに関しては、健常者及び SLE 患者で少なくとも末梢血中の T 細胞ではほとんど見られないことが示され、提供していただける血液量と細胞数の関係から解析は困難であることが明らかになった。

(3) 悪性胸膜中皮腫における CD26 陽性免疫抑制性 T 細胞サブセットの解析

固形がんの免疫チェックポイント分子の研究では、がん細胞の周囲に浸潤してきた T 細胞 (TIL: tumor infiltrating lymphocyte) の解析が主に行われ、がん細胞自身や間質に存在するがん細胞の影響を受けた樹状細胞や骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid derived suppressor cells) などが産生する免疫抑制性因子や免疫チェックポイント分子の刺激により、末梢血中の T 細胞と比較して TIL はがん細胞を傷害する機能が低下していることが示されている。

申請者は自らが開発した CD26 分子に対するヒト化抗体の悪性胸膜中皮腫に対する国内第 I/II 相臨床試験を行っており、CD26 分子を標的としたがんに対する新規治療法開発に取り組んでいる。悪性胸膜中皮腫は主にアスベスト曝露が原因で発症する難治性の希少がんで、共同研究施設から研究に足りるだけの量の手術直後の検体を得ることは難しく、そのため悪性胸膜中皮腫の TIL の解析は困難であった。そこで、悪性胸膜中皮腫は胸膜の内側に胸水が溜まるのが特徴であり、末梢血中の T 細胞と比較して、がん細胞の近位に存在し、がん細胞からの影響を強く受けている可能性が考えられる胸水中 T 細胞の解析を試みた。

成人健常者の末梢血 T 細胞と比較して、悪性胸膜中皮腫患者の末梢血 T 細胞では、BTLA, TIGIT, 2B4(CD244) の陽性率が増加している傾向が見られた。悪性胸膜中皮腫患者の胸水中 T 細胞は末梢血 T 細胞と比較して、CD4, CD8 両 T 細胞ともに PD-1, LAG3, TIM3, BTLA, TIGIT, CD39 の陽性率の増加が見られた。このことから、胸水中 T 細胞は末梢血 T 細胞と比較して、様々な免疫チェックポイント分子の陽性率が明白に増加しており、TIL に近い性質を有している可能性が考えられた。

胸水 T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現パターンは患者によって個人差があり、これらの免疫チェックポイント分子の発現パターンが悪性胸膜中皮腫の病態 (組織型や stage、予後など) といかに関係しているかについて現在、より検体数を増やして解析を継続している。また、一部の患者の胸水中 T 細胞には CD26 陽性 LAG3 陽性 T 細胞・CD26 陽性 BTLA 陽性 T 細胞が認められることから、これらの T 細胞の LAG3 及び BTLA の発現誘導に CD26 共刺激シグナルが関与しているか、また、CD26 分子を介した LAG3 及び BTLA の発現誘導メカニズムの詳細についても今後、解析を継続していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件) 全て査読有

Itoh T, Hatano R, Komiya E, Otsuka H, Narita Y, Aune TM, Dang NH, Matsuoka S, Naito H, Tominaga M, Takamori K, Morimoto C, Ohnuma K. Biological effects of IL-26 on T cell-mediated skin inflammation, including psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2019;139(4):878-889. doi: 10.1016/j.jid.2018.09.037.

Ohnuma K, Hatano R, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Iwao N, Kaneko Y, Yamada T, Dang NH, Morimoto C. A novel role for CD26/dipeptidyl peptidase IV as a therapeutic target. *Front Biosci*. 2018;23:1754-1779. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29772527>

Angevin E, Isambert N, Trillet-Lenoir V, You B, Alexandre J, Zalcmann G, Vielh P, Farace F, Valleix F, Podoll T, Kuramochi Y, Miyashita I, Hosono O, Dang NH, Ohnuma K, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C. First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *Br J Cancer*. 2017;116(9):1126-1134. doi: 10.1038/bjc.2017.62.

[学会発表] (計 23 件)

波多野良、大沼圭、石井智徳、伊藤匠、岩田哲史、奥村康、関川巖、森本幾夫. 全身性エリテマトーデスのステロイド減量困難例における CD26 陰性 T 細胞サブセットの増加について. 第 62 回日本リウマチ学会、東京、2018 年 4 月 26-28 日

波多野良、大沼圭、石井智徳、岩田哲史、奥村康、関川巖、森本幾夫. 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、福岡、2017 年 4 月 20-22 日

波多野良、大沼圭、石井智徳、岩田哲史、奥村康、関川巖、森本幾夫. CD26 陽性 T 細胞サブセットに基づく全身性エリテマトーデスの病態解析. 第 60 回日本リウマチ学会、横浜、2016 年 4 月 22-24 日

〔図書〕(計2件)

Hatano R, Ohnuma K, Yamada T, Okamoto T, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Iwao N, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. 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, Inc., Hauppauge, NY, Editor: Leon V. Berhardt, Volume 129: Chapter 1: 1-44, 2018

Ohnuma K, Hatano R, Yamazaki H, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. CD26-targeted therapy: A new horizon in malignant pleural mesothelioma management. In: Horizons in Cancer Research, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, Editor: Hiroto S. Watanabe, Volume 64: Chapter 6: 129-162, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：免疫チェックポイント阻害剤

発明者：大沼圭、森本幾夫、波多野良

権利者：学校法人順天堂

種類：特許

出願番号：特願 2019-004480

出願年：2019年

国内外の別：国内(PCT出願予定)

名称：抗ヒト CD26 モノクローナル抗体

発明者：森本幾夫、波多野良、山田健人、大沼圭

権利者：学校法人順天堂、学校法人埼玉医科大学

種類：特許

出願番号：特願 2018-049308

出願年：2018年

国内外の別：国内(PCT出願予定)

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

出願番号：特願 2017-231439

出願年：2017年

国内外の別：国内(PCT出願予定)

取得状況(計1件)

名称：抗 CD26 抗体と他の抗癌剤とを組み合わせた癌治療用組成物

発明者：山田健人、林睦、山田幸司、森本幾夫、岡本俊博、金子有太郎

権利者：Ys AC 株式会社

種類：特許

国際公開番号：WO/2017/043613

国際公開年：2017年

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/immunity_cancer/

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大沼 圭

ローマ字氏名：OHNUMA, kei

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学研究科(研究院)

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10396872

研究分担者氏名：波多野 良

ローマ字氏名：HATANO, ryo

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学研究科(研究院)

職名：申請時 博士研究員 研究期間中変更 特任助教

研究者番号(8桁): 30638789

研究分担者氏名：岩田 哲史

ローマ字氏名：IWATA, satoshi

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学研究科(研究院)

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁): 00396871

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。