

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390257  
 研究課題名（和文）DNAM-1 を分子標的とした移植片対宿主病に対する免疫療法の基盤開発  
 研究課題名（英文）Development of immunotherapy for DNAM-1 as a molecular target in graft-versus-host disease  
 研究代表者  
 渋谷 彰（SHIBUYA AKIRA）  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
 研究者番号：80216027

## 研究成果の概要：

本研究では申請者らが同定したDNAM-1 (CD226) を分子標的としたGVHDに対する新しい診断と免疫療法の基盤開発を行なうことを目的とした。

DNAM-1 遺伝子欠損マウスでは野生型に比較し、有意に GVHD の重症度が低く、生存期間が延長した。さらに野生型マウスをドナー細胞とした GVHD モデルマウスにあらかじめ DNAM-1 に対する中和抗体 (TX 4 2) を投与することによって、急性 GVHD の発症が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、DNAM-1 を用いた分子標的療法の可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：移植片対宿主病、同種造血幹細胞移植、DNAM-1、分子標的療法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 移植片対宿主病 (GVHD) における臨床的課題

同種造血幹細胞移植において最も大き

な合併症は移植片対宿主病 (GVHD) である。急性 GVHD の本質はアロ抗原特異的な免疫反応であるが、その病態は様々な炎症反応により修飾されており、必ずしも詳細は明

らかになっていない。その診断においては客観的な特異マーカーがなく、移植後早期の合併症との鑑別診断も必ずしも容易でない。また予防や治療においても副腎皮質ホルモン剤などの非特異的な免疫抑制剤が主体であり、GVHDに対する特異的な治療法の開発が望まれている。本研究では申請者らが同定したDNAM-1 (CD226) を分子標的としたGVHDに対する新しい診断と免疫療法の基盤開発を行なう。

## (2) 研究の着想の経緯

### ① DNAM-1 (CD226) の同定

申請者は25年間にわたり血液免疫学を中心とした研究に従事してきた。その前半(1981-1993)は白血病などの造血器疾患に対する化学療法や造血幹細胞移植療法などの臨床研究を中心に行い、後半(1993-)は血液免疫学の基礎研究に従事してきた。中でも造血器腫瘍や造血幹細胞移植療法に重要な役割を担うと考えられるNK細胞の分化機構の研究を行い(Shibuya, et al, *Blood*, 1991, Taguchi K, Shibuya A, et al, *Blood*, 1992, Shibuya, et al, *Blood*, 1993, Shibuya, et al, *Blood*, 1995)、さらに1996年、新しいヒトのNK細胞レセプターであるDNAM-1(第7回HLDA ワークショップでCD226に認定, 2000)を世界に先駆けて同定した(Shibuya A, et al, *Immunity*, 1996, Shibuya A, et al, *J Immunol* 1998)。DNAM-1は分子量が65 kDaの免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型の膜蛋白であり、ヒトのNK細胞や細胞傷害性キラーリンパ球(CTL)に発現し、腫瘍細胞(白血病、肺癌、乳癌、脳腫瘍、子宮癌、悪性黒色腫など)に対する細胞傷害機構に重要な分子であることをin vitro の系で明らかにした。また申請者らはDNAM-1がT細胞やNK細胞で白血球接着分子LFA-1と物理的、機能的

に会合し(Shibuya, et al., *Immunity* 1999)、LFA-1のコレセプターとしてこれらの細胞に活性化シグナルを伝えることを明らかにした(Shibuya, et al., *J Exp Med* 2003)。また、DNAM-1とLFA-1との会合にはDNAM-1のセリンのリン酸化が必須であること(Shirakawa, et al., *Int Immunol* 2005)、またLFA-1とともにリポドラフト会合することなど(Shirakawa, et al., *Int Immunol* 2006)、リンパ球の活性化におけるDNAM-1のシグナル伝達機構を明らかにしてきた。さらにDNAM-1は巨核球・血小板にも発現し、血小板の凝集などの活性化や血管内皮細胞への接着にも重要な役割を担っていることを明らかにした。(Kojima, et al. *J Biol Chem* 2003)

### ② DNAM-1 (CD226) リガンドの同定

さらに申請者らはDNAM-1が認識するリガンドの同定を試み、これがポリオウイルスレセプターファミリーであるCD155 (poliovirus receptor/PVR) とCD112 (Nectin-2/PRR-2)の2つの分子であることを明らかにした(Tahara-Hanaoka et al., *Int Immunol* 2004)。CD155はポリウイルスレセプターとして知られてきたが、我々の研究によってその生理的機能が初めて明らかになった。

### ③ DNAM-1 とそのリガンドのマウス相同遺伝子の同定とマウスモデルを用いた生体内機能の解析

CD226の生体内機能を明らかにするために、申請者らはDNAM-1とそのリガンドであるCD155のマウス相同遺伝子をそれぞれ世界に先駆けてクローニングした(Tahara-Hanaoka, et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005)。これらを用いてDNAM-1リガンドの発現していない白血病細胞株RMAとDNAM-1リガン

ドである CD155 または CD112 を遺伝子導入し安定的に発現させた RMA 細胞株をそれぞれマウスに接種すると、RMA 腫瘍は増大しマウスは死亡するのに対し、DNAM-1 リガンドを発現した RMA 腫瘍は完全に拒絶された。この腫瘍拒絶は抗体投与により CD8+T 細胞を除去すると完全に阻害され、この CD8+T 細胞は RMA に発現する Raucher マウス白血病ウイルスの gag 蛋白のリーダー配列由来のペプチド(gagL)を抗原として認識していることを明らかにした。さらに DNAM-1 リガンドを発現した RMA 細胞株を完全に拒絶したマウスに、拒絶から 10 週間を経て親株である RMA を接種すると、今度は完全にこれを拒絶し、DNAM-1 リガンドの発現により腫瘍抗原特異的メモリーCD8+キラーT リンパ球(CTL)が誘導されることを示した (Tahara-Hanaoka, et al., *Blood* 2006)。

#### ④ GVHD 病態における DNAM-1 の関与

申請者らはヒトの血清中に分子量が 45 kDa の遊離型 DNAM-1 が存在する事を見だし、ELISA による定量法を開発した (検出領域 0.008nM<sup>-1</sup>)。健常人を対照として種々の血液疾患患者で遊離型 DNAM-1 を定量したところ、同種造血幹細胞移植後の患者で急性 GVHD を発症した患者では、発症直前から高値を取り、症状の推移と併行して変動することを見いだした (右図)。しかし、急性 GVHD を発症しなかった同種造血幹細胞移植後の患者やその他の血液疾患患者では健常人とまったく有意差を認めなかったことから、遊離型 DNAM-1 が急性 GVHD の特異的予知マーカーとなりうる事を示した (特許出願 2006-106951、「移植片宿主

病予知マーカー」)。

さらに亜致死量 (400rad) の放射線を照射した BALB/C と C57BL/6 の F1 マウスに、BALB/C マウスの脾臓細胞を移植し誘導した急性 GVHD を発症するマウスモデルの系において、申請者らが樹立した DNAM-1 遺伝子欠損マウス (BALB/C) の脾臓細胞を移植細胞として用いると急性 GVHD の発症が著明に抑制された。これらの結果より、急性 GVHD ではアロ抗原特異的免疫応答やこれに伴う炎症反応に関与する免疫細胞が活性化し、遊離型 DNAM-1 が分泌されていること、遊離型あるいは膜型の DNAM-1 が急性 GVHD の病態に何らかの関与をしている可能性が強く示唆された。本研究は、これらの知見に基づき、計画するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、致死量の放射線照射したマウスに骨髄移植を行ないGVHDを誘導したモデルマウスを作製し、遊離型DNAM-1が分泌される分子メカニズムを明らかにし、急性GVHDの予知、診断への応用における分子基盤を確立する。さらにDNAM-1が急性GVHDの発症や病態に関与するか否かを、申請者らが樹立したDNAM-1遺伝子欠損マウスを用いて明らかにする。DNAM-1遺伝子欠損マウスで急性GVHDの発症が抑制される事が確認されれば、申請者らが作製したマウスDNAM-1に対する中和抗体 (TX 4 2) の投与によって、急性GVHDの発症が抑制されるか否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 急性 GVHD の診断における遊離型 DNAM-1 の意義に関する基盤的研究

① マウスにおける遊離型 DNAM-1 の測定系の確立

申請者らは認識エピトープの異なるヒトの DNAM-1 に対するモノクローナル抗体を複数クローン樹立した。これらを組み合わせて用いて、もっとも感度の良いヒト遊離型 DNAM-1 の ELISA によるアッセイ系を確立した（検出領域 0.008nM<sup>-1</sup>）。同様に、申請者らは認識エピトープの異なるマウスの DNAM-1 に対するモノクローナル抗体もすでに複数クローン樹立している。マウス DNAM-1 分子の細胞外領域部分の遊離型 DNAM-1 を作製し、これを標準蛋白として、樹立したモノクローナル抗体を組み合わせるマウス遊離型 DNAM-1 の ELISA によるアッセイ系を確立する。

② マウス GVHD モデルの作製

BALB/C マウスの骨髄細胞を致死量の放射線を照射した C57BL/6 マウスに移植し骨髄再建を行ない、急性 GVHD の発症を誘導する。移植後、定期的に体重測定、血清中インターフェロンの定量、生存期間を観察し、急性 GVHD の発症、重症度のマーカーとする。

③ マウス GVHD モデルにおける遊離型 DNAM-1 の定量

上記で作製した GVHD モデルマウスにおいて、移植後より定期的に遊離型 DNAM-1 の定量をおこない、GVHD の発症時期、重症度との関連を解析する。

(2) 急性 GVHD の病態における DNAM-1 の役割とその応用に関する基盤的研究

① 急性 GVHD の病態における DNAM-1 の役割

急性 GVHD マウスモデルにおいて、移

植骨髄細胞を野生型から DNAM-1 遺伝子欠損マウスに代え、GVHD の発症とその重症度とを体重、血清中インターフェロン $\gamma$ 、生存期間を指標に解析する。すでに述べたように、申請者らは、亜致死量の放射線を照射した BALB/C と C57BL/6 の F1 マウスに、BALB/C マウスの脾臓細胞を移植し誘導した急性 GVHD を発症するマウスモデルの系において、DNAM-1 遺伝子欠損マウス (BALB/C) の脾臓細胞を移植細胞として用いると急性 GVHD の発症が著明に抑制されることを明らかにしており、これが骨髄移植により骨髄再建をした GVHD マウスモデルでも同様である事を確認して DNAM-1 が急性 GVHD の病態に関与していることを立証する。

② 急性 GVHD の発症や病態に関する DNAM-1 発現細胞の同定

2-①で DNAM-1 が急性 GVHD の発症や病態に関与している事が明らかになれば、どの DNAM-1 発現細胞がこれらに直接関与しているかを (1-5) における In vivo での解析と同様の移植実験で明らかにする。すなわち、移植する骨髄細胞から T 細胞、NK 細胞、またはマクロファージなどの細胞を MACS で除去し、代わりに DNAM-1 遺伝子欠損マウスのそれぞれの細胞と入れ替え移植する。移植後、経時的に GVHD の発症、重症度等を体重、血清インターフェロン $\gamma$ 、生存期間を指標に解析する。

③ DNAM-1 を標的分子とした急性 GVHD に対する抗体療法の開発

申請者らはすでに in vivo 投与により DNAM-1 発現細胞を除去せず、DNAM-1 と DNAM-1 リガンドとの結合をブロックする中和抗体 (TX42) を作製した (Tahara-Hanaoka S, et al. *Blood*, 2006)。

これを上記1-2)で述べた急性GVHDマウスモデルに投与し、GVHDの発症、重症度の変化を体重、血清中インターフェロン $\gamma$ 、生存期間を指標に解析する。この際、中和抗体の量、投与時期、期間などについて検討し、最も有効な投与方法を決定する。

#### 4. 研究成果

(1) 急性GVHDの診断における遊離型DNAM-1の意義に関する基盤的研究  
マウスにおける遊離型DNAM-1の測定系を確立した。また、マウスGVHDモデルの作製系も確立できた。これらを用いてGVHDの際の血清中の遊離型DNAM-1を定量を試みたが、有意な値を検出できなかった。マウスとヒトとの種の差によるものか、その他の原因によるものかを検討しているところである。

(2) 急性GVHDの病態におけるDNAM-1の役割とその応用に関する基盤的研究

放射線照射したマウスに脾細胞移植を行ないGVHDを誘導したモデルマウスを作製し、DNAM-1が急性GVHDの発症や病態に関与するか否かを検討した。申請者らが樹立したDNAM-1遺伝子欠損マウスまたは野生型マウスをドナー細胞としてGVHDモデルを作製すると、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは野生型に比較し、有意にGVHDの重症度が低く、生存期間が延長した。

さらに野生型マウスをドナー細胞としたGVHDモデルマウスにあらかじめDNAM-1に対する中和抗体(TX42)を投与することによって、急性GVHDの発症が抑制されることを明らかにした。また、これにはCD8<sup>+</sup>T細胞上のDNAM-1が主として関与していることを明らかにした。これらの結果から、

DNAM-1を用いた分子標的療法の可能性が示唆された。

#### 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10件)

1. Lakshmikanth T, Kärre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. et al (25人中23番目) NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 119:1251-63, 2009. 査読有
2. Iguchi-Manaka A, Kai H, Shibuya A. et al (10人中最終著者) Brief Definitive Report. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med*, 205:2959-2964, 2008. 査読有
3. Kurita N, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. et al (8人中最終著者) Identification of the Fc $\alpha$ / $\mu$ R isoform specifically expressed in the kidney tubule. *Mol Immunol*, 46:749-753, 2008. 査読有
4. Nakano T, Honda S-I, Shibuya K, Shibuya A. et al (8人中最終著者) Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV. *Mol Immunol*, 45:289-294, 2008. 査読有
5. Can I, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. et al (9人中最終著者) Caspase-independent cell death by CD300LF (MAIR-V), an inhibitory immunoglobulin-like receptor on myeloid cells. *J Immunol*. 180: 207-213, 2008. 査読有
6. Wang Y, Shibuya A. et al (11人中最終

- 著者) LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation in vivo. Int Immunol. 20:1119-1127, 2008. 査読有
7. Nakahashi C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. et al (9 人中最終著者) Dual assemblies of an activating immune receptor, MAIR-II, with ITAM-bearing adapters DAP12 and FcR $\gamma$  chain on peritoneal macrophages. J Immunol, 178:765-70, 2007. 査読有
  8. Ishizaki K, Shibuya A, Takahashi S. et al (10 人中 9 番目) Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominant responses in T-bet overexpression transgenic mice develops allergic contact dermatitis. J Immunol, 178:605-12, 2007. 査読有
  9. Hara H, Ishihara C, Shibuya A, Saito T. et al (16 人中 9 番目) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors, Nature Immunol, 8:619-29, 2007. 査読有
  10. Kikuno K, Shibuya A, Kubagawa H. et al (10 人中 9 番目) Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc $\alpha$ / $\mu$  receptor. Eur J Immunol. 37:3540-3550, 2007. 査読有

<http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/97904/browse-title>

[学会発表] (計 4 件)

1. Shibuya A. Enhanced humoral Immune responses against T-independent antigens in Fca/mR-deficient mice. International Symposium of 38<sup>th</sup> meeting of the Japanese Society for Immunology. Kyoto, Dec. 1, 2008

2. Shibuya A. Immune responses by the family of activating and inhibitory myeloid associated-immunoglobulin-like receptors (MAIR). 57<sup>th</sup> fall Conference of Korean Association of Immunologists. Seoul, Nov. 13, 2008
3. Shibuya A. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. 11<sup>th</sup> meeting of the Society for Natural Immunity. Perth, Australia, Oct. 27, 2008
4. Shibuya A. Enhanced humoral Immune responses against T-independent antigens in Fca/mR-deficient mice. FASEB Summer Research Conference, New Heaven, USA. Aug. 7, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Fc $\alpha$ / $\mu$ レセプターを介する生体機能調節物質のスクリーニング方法

発明者: 渋谷 彰、本多 伸一郎

権利者: 渋谷 彰、本田 伸一郎

種類: 工業所有権

番号: 2008-263584

出願年月日: 2008 年 10 月 10 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 彰 (SHIBUYA AKIRA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 80216027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし