

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591240
 研究課題名（和文） CD26 とそのリガンドの相互作用を標的とする新規免疫療法開発の基礎研究
 研究課題名（英文） Scientific research for developing a novel immunotherapy targeting interaction of CD26 and its ligand
 研究代表者
 大沼 圭（OHNUMA KEI）
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号：10396872

研究成果の概要：造血幹細胞移植における拒絶反応や移植片対宿主病（GVHD）などの免疫異常症に対する治療の最終目標は、感染症に対する生体防御反応を妨げることなく異常炎症反応を特異的に抑制することである。そこで、われわれが発見した新規 T 細胞共刺激系 CD26-カベオリン経路の詳細な解明を行い、日和見感染症などをもたらす免疫不全状態を避けつつ同種メモリー応答依存性 T 細胞の異常活性化状態をコントロールしうる新規抗原特異的免疫寛容誘導療法につながる知見を得ることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：T 細胞、共刺激、CD26、caveolin-1、移植片対宿主病、臍帯血。

1. 研究開始当初の背景

CD26 分子は 110kDa の膜糖蛋白であり、細胞外領域に dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) というペプチダーゼ活性を有している。この CD26 はヒト CD4+メモリー T 細胞に選択的に発現し、T 細胞受容体 (TCR) からのシグナル伝達を補助的に増強する共刺激分子の一つで、T 細胞活性増殖や IL-2 産生の他、様々な T 細胞機能に関与している。例えば、CD26 陽性 T 細胞は非常に遊走能が強く、関節リウマチなどの患者末梢血や罹患関節等の局所炎症部位で増加している。組換え可溶性 CD26 分子 (sCD26) は、*in vitro* でメモリー抗原である

破傷風トキソイド (TT) に対する抗原特異的 T 細胞増殖反応を亢進させる。この反応には DPPIV 酵素活性を必要とすることが当研究室の森本らにより報告されているが、このメカニズムとして、sCD26 がメモリー抗原とともに抗原提示細胞 (APC) に取り込まれ、代表的な共刺激分子 CD28 のリガンドである CD86 の発現を亢進させることを研究代表者らは明らかにしてきた。さらに、CD26 が、抗原を取込んだ APC 上の caveolin-1 と結合して caveolin-1 をリン酸化し、APC の CD86 の発現上昇を誘導すること、このとき caveolin-1 の 82-101 番目のアミノ酸残基が CD26 の

DPPIV 酵素活性中心との結合に関与することを明らかにした。すなわち、T細胞のCD26とメモリー抗原に暴露されたAPCのcaveolin-1が互いに接触してimmunological synapseを形成してメモリー抗原に対するT細胞の増殖反応がもたらされることを示した。このようなCD26とcaveolin-1の相互作用によるT細胞活性化機構の免疫病態における意義を解析するため、関節リウマチ患者の罹患関節から得られた増殖滑膜の手術検体を組織学的に検討したところ、滑膜炎部位に集簇するリンパ球はCD26を強く発現しており、これらのリンパ球に隣接した胚中心を形成するAPCや増殖滑膜細胞、増成血管内皮細胞にはcaveolin-1が強く発現していることが、連続切片による解析で明らかとなった。

一方、臍帯血T細胞は、CD28共刺激は成人T細胞と同様に活性増殖が生じるにもかかわらず、CD26にはほとんど反応しないことから、CD26刺激による臍帯血T細胞活性不全のメカニズムを解析したところ、臍帯血T細胞上のCD26はラフトには動員されず、CD26とCD45RAがラフト外で会合することを報告した。

以上のことから、CD26とcaveolin-1の相互作用をターゲットとした抗原特異的な免疫反応の制御は、自己免疫疾患、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(GVHD; graft-versus-host disease)等の免疫異常症の新たな治療標的として大いに期待できると考えられた。

2. 研究の目的

上述したように、CD26分子は110kDaの膜糖蛋白でヒトCD4メモリーT細胞に選択的に発現され、その細胞外部分であるsCD26は、メモリー抗原特異的T細胞増殖反応を亢進させるが、このメカニズムとして、研究代表者らは、sCD26が抗原とともにマクロファージ(M₁)に取り込まれ、CD28共刺激分子のリガンドであるCD86の発現をM₁上に亢進させることを明らかにした。また、臍帯血T細胞は、CD28共刺激は成人T細胞と同様に活性増殖が生じるにもかかわらず、CD26にはほとんど反応しないことから、CD26刺激による臍帯血T細胞活性不全のメカニズムを解析したところ、臍帯血T細胞上のCD26はラフトには動員されず、CD26とCD45RAがラフト外で会合することを報告した。このCD26はT細胞受容体からのシグナル伝達を補助する共刺激分子の一つで、T細胞活性増殖に重要である。しかし、一方で、CD26の共刺激リガンドは同定されておらず、また、T細胞共刺激におけるCD26下流のシグナル伝達は明らかになっていない。

そこで、本研究では、炎症反応で重要な役割をもつ活性化T細胞上のCD26分子の機能

と構造との関係を明らかにして、免疫異常症、特に、急性GVHDなどの先端治療開発を目的とした分子標的療法の確立を目指した基礎研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

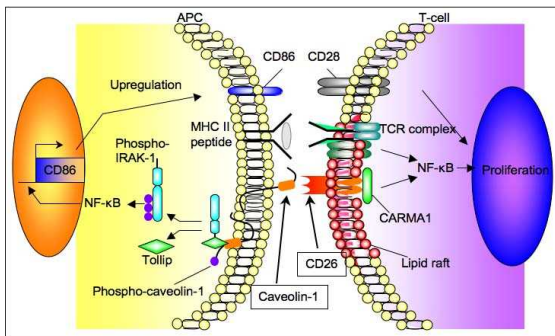
まず、caveolin-1がCD26の共刺激リガンドであるかどうか明らかにし、CD26とcaveolin-1の相互作用をトリガーとする詳しいT細胞の活性化機構を、分子生物学的に解明する。まず、CD26直下のシグナル分子を同定するために、網羅的解析を行い、2次元電気泳動によるプロテオーム解析を行う。このために、研究代表者がすでに確立したcaveolin-1の細胞外ドメインをIgG定常領域に融合した組替えタンパクcaveolin-1 Fcをコートしたpolystyrene microbeadsによって、T細胞を刺激する系を利用した。刺激はwild typeのcaveolin-1細胞外ドメインの他、CD26結合ドメイン(Scaffolding domain)を欠失した変異caveolin-1(Δ SCD)、CD26結合ドメインだけの変異caveolin-1(SCD)を、それぞれFcに融合した可溶性タンパクを遺伝子組換えによって作成し、プロテインAアフィニティーカラムを用いて精製する。これらを用いてcaveolin-1はCD26共刺激リガンドとしてT細胞の増殖やIL-2産生をもたらすかどうか、細胞生物学的な検討を行った。さらに、caveolin-1 Fc融合タンパクをコートしたpolystyrene microbeadsでT細胞を刺激し、刺激前後のT細胞溶解液を2次元電気泳動で展開し、スポット解析を行い、MS-TOF(Time of Flight Mass Spectrometry)によりタンパクを同定した。

次に、CD8陽性Tリンパ球におけるCD26共刺激シグナルについて解析するため、CD8陽性Tリンパ球におけるCD26陽性細胞のサブセット解析を行なった。さらに、このCD8陽性T細胞を共刺激してサイトカイン産生のプロファイリングを行い、CD28共刺激との異同を解析した。

一方、臍帯血T細胞はその機能が未熟なことが知られているが、臍帯血CD45RA陽性T細胞においては、成人CD45RA陽性T細胞と異なり、CD26のクロスリンクにてCD26はラフトに動員されず、さらにラフト外でCD45RAと会合した。CD26がCD45RAとラフト外で会合しラフトに移行しないことは、臍帯血T細胞がCD26共刺激に全く反応しないメカニズムの一つと考えられた。これは臍帯血のCD26陽性T細胞が制御性T細胞(Treg)である可能性を示唆している。そこで、臍帯血の制御性T細胞を純化し、そのCD26の発現やエフェクター機能解析を行なった。

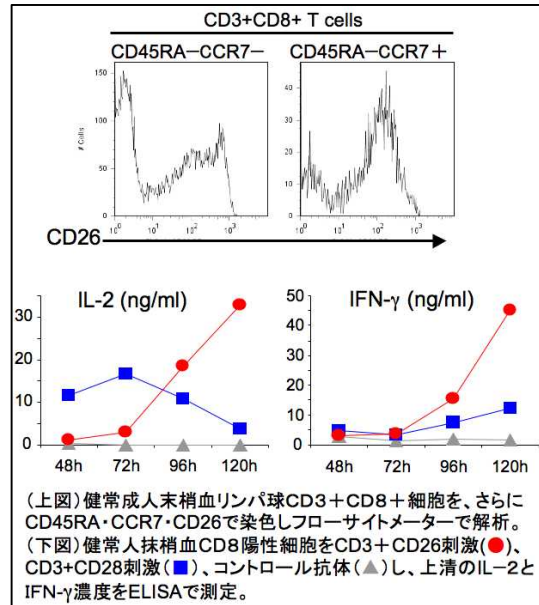
4. 研究成果

これまでの研究実績をもとに、CD26 によって誘導される caveolin-1 下流のシグナル伝達機構を明らかにする研究を行った。まず網羅的解析を行うため、CD26 刺激後の M 細胞溶解液を 2 次元電気泳動で展開し、スポット解析を行ったところ、CD26 刺激後に変化するタンパクとして Tollip と IRAK-1 が同定された。さらに、欠変異体組換えタンパクを用いた共沈実験により、caveolin-1 の scaffolding domain と Tollip の C2 domain が結合し、Tollip の CUE domain が結合し、caveolin-1/Tollip/IRAK-1 が複合体を形成することが判明した。すなわち、CD26 刺激によって、ACP の caveolin-1 がリン酸化し、Tollip と IRAK-1 を解離し、IRAK-1 のリン酸化から NF- κ B が活性化して CD86 の発現増強がもたらされることが明らかとなり、CD26/caveolin-1 という新たな免疫活性化機構を発見した（下図）。



次に、強力な共刺激分子である CD28 との関連や CD8+T 細胞における CD26 発現の意義については不明であり、CD26 を機軸とした新規免疫療法の解明のためには、これら未知の問題を明らかにする必要がある、細胞生物学的な実験の結果以下の新しい知見を得た；CD26 共刺激による T 細胞の活性化は、CD28 共刺激に比し遅れて生じ、さらに、CD26 と CD28 の刺激は協調的に作用し、相乗的な活性化をもたらすことが明らかとなった。次に、CD8+T 細胞において、活性化により CD26 の発現が増強すること、さらに、CD8+T 細胞のメモリーエフェクターサブセットにおける CD26 の発現について、メモリーエフェクター細胞の一部が CD26 高発現細胞であり、ナイーブ細胞では CD26 中等度発現であることが明らかとなった（右コラム上の図）。

次に臍帯血リンパ球における CD26 についてであるが、まず、臍帯血リンパ球の CD45RA と CD26 の発現を検討した。健康成人の CD4+リンパ球では CD45RA と CD45RO が同程度に発現しているが、臍帯血の CD4+リンパ球では CD45RA が 99.7%と優位であり、この結果はこれまでの報告と一致していた。さらに臍帯血の CD4+CD45RA+リンパ球の CD26 の発現を見ると、99.4%に CD26 が発現しており、臍帯



血の CD4+CD45RA+リンパ球はほとんどすべてが CD26 陽性細胞であることがわかった。

ところで、臍帯血の CD4+CD45RA+リンパ球には naive Treg が含まれているといわれているが、臍帯血リンパ球の CD26 共刺激が弱いのは、CD4+CD45RA+CD26+リンパ球が Treg の機能を発揮している可能性を考慮し、臍帯血リンパ球の Treg について検討を行なった。臍帯血リンパ球を CD4 と CD25 で展開すると、Treg を含むといわれている CD4+CD25^{hi}リンパ球が約 6%の割合で認められた。臍帯血 CD4+CD25^{hi}リンパ球の CD26 の発現を見てみると、80%以上の割合で CD26 が発現していることがわかった。すなわち、臍帯血 CD4+CD25^{hi}の Treg と思われる細胞は CD26 を高発現していることが分かった。次に、臍帯血 CD4+CD25^{hi}リンパ球の CD45RA と CD45RO の発現を検討したところ、臍帯血 CD4+CD25^{hi}リンパ球では CD45RA が優位に発現していることがわかった。さらに、臍帯血 CD4+CD25+リンパ球において、Treg のマスター遺伝子である *foxp3* 由来の蛋白質 FOXP3 の発現を解析したところ、臍帯血 CD4+CD25^{hi}CD45RA+リンパ球では FOXP が高発現しており、臍帯血 CD4+CD25^{hi}CD45RA+リンパ球のほとんどが Treg であることが示唆された。

このように、臍帯血 CD4+CD25^{hi}リンパ球は Treg を多く含む可能性が示唆されたが、この臍帯血 Treg が、健康成人末梢血に見いだされた Treg と同様に T 細胞抑制効果をもつかどうか検討した。まず、健康成人末梢血から CD4+CD25+リンパ球を分離して Treg とし、この Treg 分画が同じ供血者由来の CD4+CD25-リンパ球を CD3・CD28 で刺激したときの増殖能を抑制するかどうか検討した。その結果、健康成人由来の Treg は細胞数依存的に CD4+CD25-リンパ球増殖能を抑制した。一方、臍帯血由来の Treg 分画細胞は CD4+CD25-リン

パ球増殖能の抑制効果は弱く、しかも、Treg細胞も増殖能を示し、臍帯血のTregはanergy状態にはないことがわかった。同様に、Tregがサイトカイン産生抑制能をもつかどうか検討したところ、健康成人末梢血Tregはサイトカイン産生を抑制し得たが、臍帯血Tregはサイトカイン産生の有意な抑制効果を認めなかった。この時、IL-5、IL-4の産生も検討したが、ベースラインの産生量が少なく、評価は不能であった。ところで、Tregの機能はFOXP3とCD152(CTLA-4)の発現と密接に関連しているといわれているが、上に示した臍帯血のTregの機能について、FOXP3とCD152の発現と関連するかどうか、検討を行なった。そこで、健康成人末梢血、および、臍帯血からCD4+T細胞を分離し、CD25と細胞質内FOXP3、細胞質内CD152の発現をフローサイトメーターで解析した。FOXP3の発現については、健康成人由来Treg(APB)に比し、臍帯血由来Treg(CB)の方が発現が弱かった(平均蛍光強度MFI=99±33 (APB) v.s. 25±10 (CB))。同様に、CD152の発現も、健康成人由来Tregに比し、臍帯血由来Tregの方が発現が弱かった(MFI=46±13 (APB) v.s. 16±1 (CB))。さらに、FOXP3タンパク質の発現をウエスタンブロットで比較すると、健康成人由来Tregの方が、臍帯血由来Tregに比べ発現が弱かった。したがって、臍帯血Tregのregulatory functionの低さは、Tregのマスター遺伝子*foxp3*由来のタンパク質FOXP3の発現に由来しているものと推察された。

以上のように、臍帯血由来のTregは、静止期ではregulatory functionが低いことが示されたが、これは、臍帯血リンパ球のCD26共刺激機能が弱いことと、一見反するよう思われた。そこで、臍帯血Tregは増殖刺激を受けても、そのregulatory functionが弱いままであるか、検討を行なった。このために、健康成人、および、臍帯血からCD4+CD25+Tregを分離し、CD3+CD28 ビーズで刺激して増殖を行なった後、同じドナー由来のCD4+CD25-T細胞の増殖能を抑制しうるかどうか、実験を行なった。健康成人由来のTregは、静止期(fresh isolation)の時と同様に、Treg細胞数依存的にT細胞増殖を抑制した。一方、増殖刺激を加えた臍帯血由来のTregも、T細胞増殖を強力に抑制し、Treg自体もanergy状態であることが判明した。このとき、FOXP3タンパク質の発現をウエスタンブロットで解析すると、増殖刺激を行なった臍帯血由来Tregでは、健康成人由来Tregと同程度に、発現が増強していることが判明した。一方、臍帯血由来TregのCD26の発現を刺激前後で比較すると、CD25の発現は刺激によって若干発現が増しているが、CD26の発現は大きな変化はないことが示された。

以上より、臍帯血リンパ球のCD26共刺激の

弱さは、共刺激によってTregの機能増強を同時に見ていることに由来する可能性が示唆された。したがって、臍帯血リンパ球におけるCD26分子の機能として、Tregを活性化するシグナル伝達に關与する可能性が示唆され、臍帯血移植のGVHD治療におけるCD26標的になりうる成果と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Fujimaki W, Takahashi N, Ohnuma K, Nagatsu M, Kurosawa H, Yoshida S, Dang NH, Uchiyama T, Morimoto C. Comparative study of regulatory T cell function of human CD25+CD4+ T cells from thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood.

Clinical and Developmental Immunology 2008;2008:205859. 査読有り。

Ohnuma K, Hosono O, Kawasaki H, Yoshikawa N, Katayose T, Oyaizu N, Tanaka H, Morimoto C. An adult case of Henoch-Schönlein purpura complicating common peroneal nerve mononeuropathy. *Modern Rheumatology* 19:73-79:2009.

Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends in Immunology* 29:295-301:2008. 査読有り。

Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Frontiers in Biosciences* 13: 2299-2310:2008. 査読有り。

Harve PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Frontiers in Biosciences* 13: 1634-1645: 2008. 査読有り。

Yamochi T, Ohnuma K, Hosono O, Tanaka H, Kanai Y, Morimoto C. SSA/Ro52 autoantigen interacts with Dcp2 to enhance its decapping activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370(1):195-199. 査読有り。

Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, Kina S, Takahashi N, Yamochi T, Inamoto S, Katsuoka Y, Hosono O, Tanaka H, Dang NH, and Morimoto C. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clinical Cancer Research* 13:4191-4200:2007. 査読有り。

Ohnuma K, Uchiyama M, Yamochi T, Nishibashi K, Hosono O, Takahashi N, Kina S, Tanaka H, Lin X, Dang NH, Morimoto C. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. *J Biol Chem.* 2007;282(13):10117-31. 査読有り。

Ohnuma -Ishikawa K, Morio T, Yamada T, Sugawara Y, Ono M, Nagasawa M, Yasuda A, Morimoto C, Ohnuma K, Dang NH, Hosoi H, Verdin E, Mizutani S. Knockdown of XAB2 enhances *all-trans* retinoic acid-induced cellular differentiation in *all-trans* retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(3): 1019-29. 査読有り。

〔学会発表〕(計1件)

大沼圭、山田健人、高橋望、遠藤裕子、細野治、森本幾夫「ヒ型抗 CD26 E/α-β抗体による移植片対宿主病の治療法の開発」第70回日本血液学会総会(2008年10月12日)、京都市。

〔その他〕

ホームページ等

www.ims.u-tokyo.ac.jp/cimmuno/index.htm

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 圭 (OHNUMA KEI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10396872

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。