様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790600
研究課題名（和文）CD26 による難治性糸球体腎炎の治療応用に向けた基礎的研究

研究課題名（英文） A basic study for Application to treatment of the refractory glomerulonephritis using CD26

研究代表者
小林 政司（KOBAYASHI SEIJI）
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：80408400

研究成果の概要（和文）：CD26 は T 細胞共刺激分子の一つで T 細胞増殖活性に重要である。T 細胞における CD3 及び CD26 の共刺激に対する T 細胞表面への lipid rafts の発現量は経時的にその発現量が増加することが判明した。一方、免疫抑制剤存在下での共刺激後では、細胞増殖抑制に伴い T 細胞上の lipid rafts の薬剤濃度依存的かつ経時的な発現量の低下が判明した。このことは糸球体腎炎患者 T 細胞における免疫抑制剤の効果を評価するにあたり lipid rafts がバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：CD26 has an important role in T-cell activation and is costimulatory molecule. We demonstrated that the expression level of lipid rafts to the peripheral blood T cell surface increased over time by costimulation of CD3 and CD26. Moreover, anti CD26 antibody treatment of peripheral blood T cells led to increased surface expression of Lipid rafts. On the other hand, after costimulation under the immunosuppressive drugs treatment, the expression of lipid rafts on T cells decreases drugs concentration-dependently and over time with T-cell proliferation being inhibited. Our results suggest that lipid rafts may become the biomarker when we evaluate the effect of the immunosuppressive drug in patients with glomerulonephritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２００８年度	1,600,000	480,000	2,080,000
２００９年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学・腎臓学
キーワード：CD26、難治性糸球体腎炎、lipid rafts

１．研究開始当初の背景

CD26 分子は dipeptidyl peptidase Ⅳ（DPP Ⅳ）酵素を含む 110kDa の膜蛋白である。CD26 はリンパ球、腎臓、血管内皮細胞を含む様々な細胞表面に発現している。CD26 は T 細胞において CD45 と ADA と、また、腎臓において

Na^+/H^+ exchanger との結合蛋白質として機能している。CD26 は CD28 のような T 細胞共刺激分子の一つとして T 細胞活性化に重要な役割を担っている。CD3 と CD26 の共刺激により T cell receptor(TCR)/CD3 複合体からのシグナル伝達が増強され、T 細胞活性化および Interleukin-2 産生が誘導される。CD26 により切断されたペプチドホルモン及びケモカインは、糖尿病、腫瘍、移植後拒絶反応等に関与している。近年、CD26（DPPⅣ）阻害剤による glucagon-like peptide-1 を介した２型糖尿病の治療が注目されている。細胞膜は脂質二重層で形成されるが、一部スフィンゴ脂質とコレステロールからなる特殊なマイクロドメインが存在する。この構造は lipid rafts と呼ばれる。lipid rafts には T 細胞受容体/CD3 シグナル伝達蛋白質が多数存存し、T 細胞活性化シグナル伝達の重要な場として機能していることが判明してきた。研究者が所属していた東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野森本研究室では、ヒト CD26 単クローン抗体の開発、CD26cDNA の単離を世界に先駆けて行い、CD26 の構造と T 細胞における様々な機能を確立してきた。特に CD26 および DPPⅣ酵素の T 細胞活性化への役割を解明してきた。最近では、研究者らは、CD26 は lipid rafts に存在し、抗 CD26 抗体でのクロスリンクにより末梢血 T 細胞上の CD26 が lipid rafts に動員され、CD26 と CD45RO とが lipid rafts 上で会合することにより TCR シグナル伝達が誘導されることを明らかにした。さらに研究者は、臍帯血 T 細胞では CD26 が lipid rafts には動員されず、CD26 と CD45RA とが lipid rafts 外で会合することを明らかにし、このことが臍帯血 T 細胞の機能不全に関与していることを示唆した。一方、糸球体腎炎では種々の免疫異常の関与が指摘されているが、CD26 に関する詳細な検討はなされていない。本研究による知見は CD26 及び lipid rafts の生体防御機構の解明のみならず、腎疾患における病態への関わり及び先端治療法開発に新たな概念を提示する可能性が考えられる。

２．研究の目的

（１）腎疾患における CD26 共刺激による TCR シグナル伝達機構と CD45 との相互作用の解析

糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞における CD26 共刺激による TCR シグナル伝達及び蛍光顕微鏡による CD26 と CD45 との相互作用の解析を行なう。CD26 は T 細胞共刺激分子であり、その活性化には CD45 分子との相互作用の関与が明らかにされている。CD26 陽性 T 細胞は破傷風トキソイドのようなメモリー抗原に反応するほか、B 細胞の抗体産生を誘導し、主要組織適合抗原 class Ⅰ特異的なキラーT 細胞の誘導活性も持ち、IL-2、IFN-γなどのサイトカインを分泌する Th１型の細胞集団であると報告されている。さらに血管内皮細胞間の遊走能をもち、炎症部位への移動や集積を起こし、炎症局所で重要な役割を果たしていると考えられている。T 細胞活性化の初期反応として TCR シグナル伝達の中心をなす src 型キナーゼ Lck の活性化の調節機構が重要である。Lck は C 末端に存在するチロシン残基が脱リン酸化されると活性化される。Lck の活性化調節を担っているのが膜結合型チロシン脱リン酸化酵素 CD45 である。CD45 によって脱リン酸化された Lck はキナーゼドメインにあるチロシンを自己リン酸化し活性化型 Lck となる。糸球体腎炎では種々の免疫異常の関与が指摘されているが、CD26 に関する詳細な検討はなされていない。今回、健常人に対する糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞における CD26 を介した TCR シグナル伝達を検討する。また、T 細胞上の CD26 のクロスリンクにより CD26 分子と CD45 分子の細胞膜上の分子動態を検討する。

（２）腎疾患における免疫抑制剤に対する T 細胞上の lipid rafts の分子動態及びシグナル伝達機構の解析

T 細胞表面への lipid rafts の発現は T 細胞活性化に伴いその発現量が増加し、さらに lipid rafts の発現量増加が細胞内信号伝達を効率化している可能性が考えられている。CD28 分子は TCR や LAT の lipid rafts での集合を増強するのに対し、CTLA-4 分子はそれを阻害することが報告されている。また、SLE 患者 T 細胞では lipid rafts の異常が指摘されている。一方、膜性腎症や巣状糸球体硬化症は難治性ネフローゼ症候群を引き起こす代表的疾患である。現在、難治性ネフローゼ症候群に対し副腎皮質ステロイド薬とシクロスポリン併用による治療が検討されているが、疾患に対するシクロスポリンの適応の選択性、及び、シクロスポリンの患者個々人に対する T 細胞への免疫抑制効果における明確な指標は明らかにされていない。難治性ネフローゼ症候群の患者末梢血 T 細胞では lipid rafts の発現量の異常が生じている可能性が高い。今回の研究では健常人とネフローゼ症候群の患者末梢血 T 細胞における lipid rafts の発現量を検討する。

３．研究の方法

（１）健常人と糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞を用いた CD26 共刺激能の解析

magnetic beads を用いて患者末梢血より T 細胞を分離する。分離した各々の細胞集団を 96 穴プレートに固層化した抗 CD3 単抗体及び抗 CD26 単抗体と共に培養し、3 日後に 3H-thymidine をパルスしてその増殖能を検討する。また各々の細胞集団における共刺激

に対するサイトカイン産生能に関しても検討する。
（２）腎疾患における免疫抑制剤に対する T 細胞上の lipid rafts の分子動態及びシグナル伝達機構の解析
健常人と難治性糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞を分離し、T 細胞表面における lipid rafts の発現量の解析及び（ｉ）CD3 と CD26 、または（ii）CD3 と CD28 の共刺激に対する T 細胞表面への lipid rafts の発現量への影響を FITC 標識 cholera toxin B を用いてフローサイトメータで検討する。また、シクロスポリンに対する難治性ネフローゼ症候群の患者 T 細胞における lipid rafts の発現量の変化を検討する。

４．研究成果
１）健常人と糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞を用いた CD26 共刺激能の解析
negative selection 法により magnetic beads を用いて患者末梢血より分離された健常人末梢血 T 細胞を、96 穴プレートに固層化した抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD26 単抗体（5.0μg/ml）と共に培養し、3 日後に 3H-thymidine をパルスした後、細胞増殖能を検討した結果を図１に示す。また免疫抑制剤：サイクロスポリンを添加した際の増殖活性も同時に示す。

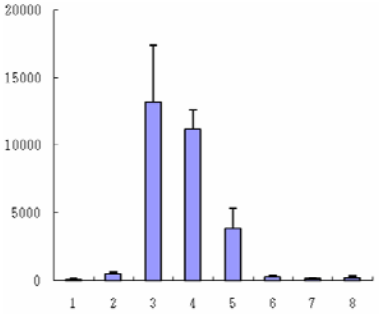

図１：CD26 共刺激シグナルに対するサイクロスポリンの濃度依存的 T 細胞増殖活性抑制効果
縦軸：cpm
横軸：培地のみ（カラム１）、抗 CD3 単抗体のみ（カラム２）、抗 CD3 単抗体＋抗 CD26 単抗体（カラム３）、4-8：サイクロスポリン添加（カラム４－８）、10ng/ml（カラム 4）、100ng/ml（カラム 5）、500ng/ml（カラム 6）、1000ng/ml（カラム 7）2000ng/ml（カラム 8）

末梢血 T 細胞において CD3 及び CD26 共刺激は、既知の報告通り、CD3 単独からの第１シグナルによる増殖活性（カラム 2）より著名な細胞増殖活性を認めた（カラム 3）。一方、サイクロスポリンを添加した場合、濃度依存性に T 細胞増殖活性が抑制された。このことは、抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD28 単抗体（1.0μg/ml）による共刺激の際にも同様に認められ、CD26 共刺激と同様にサイクロスポリンの添加濃度が 500ng/ml-1000ng/ml の時、T 細胞増殖活性が抑制された。
同様に、副腎皮質ステロイド：デキサメサゾンによる細胞増殖活性抑制効果を検討した結果を図 2 に示す。

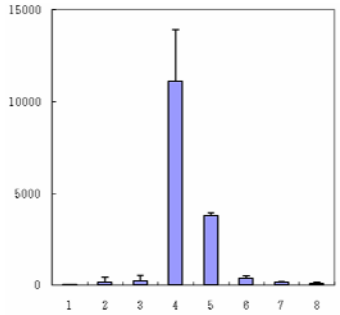

図 2： CD26 共刺激シグナルに対するデキサメサゾンの濃度依存的 T 細胞増殖活性抑制効果
縦軸：cpm
横軸：培地のみ（カラム１）、抗 CD3 単抗体のみ（カラム２）、抗 CD3 単抗体＋抗 CD26 単抗体（カラム３）、デキサメサゾン添加（カラム４－８）、10μg/ml（カラム 4）、50μg/ml（カラム 5）、100μg/ml（カラム 6）、500μg/ml（カラム 7）1000μg/ml（カラム 8）

デキサメサゾンを添加した場合でも、サイクロスポリンを添加した場合に認められたように、濃度依存性に CD26 共刺激による T 細胞増殖活性が抑制された。このことは、抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD28 単抗体（1.0μg/ml）による共刺激の際にも同様に認められ、CD26 共刺激と同様にデキサメサゾンの添加濃度が 100μg/ml-1000μg/ml の時、T 細胞増殖活性が抑制された。
以上のことから、CD3 及び CD26 または CD3 及び CD28 による T 細胞増殖活性のシグナル伝達は免疫抑制剤サイクロスポリン及び副腎皮質ステロイドにより濃度依存性に抑制され、その至適濃度はサイクロスポリンの場合、500ng/ml ないし 1000ng/ml であることが判明した。またデキサメサゾンの場合、500μg/ml ないし 1000μg/ml であることが同様に判明した。このことは、末梢血 T 細胞活性化において、CD26 による CD3 からの T 細胞増殖活性を増強する第１シグナル及び CD28 からの T 細胞増殖活性を増強する第 2 シグナルのいずれのシグナル伝達系においても、免疫抑制剤の至適濃度は同程度であることが判明した。

（２）免疫抑制剤に対するＴ細胞上の lipid rafts の分子動態及びシグナル伝達機構の解析

negative selection 法により magnetic beads を用いて健常人末梢血より分離された末梢血 T 細胞を、抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD26 単抗体（5.0μg/ml）にて経時的に共刺激した後、T 細胞表面への lipid rafts の発現量を FITC 標識 cholera toxin B を用いてフローサイトメータで検討した結果を図 3 に示す。

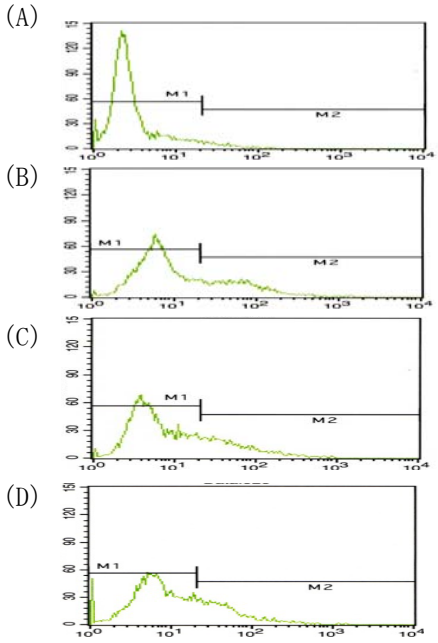

図 3: CD26 共刺激による末梢血Ｔ細胞表面における lipid rafts の発現量の変化

（A）培地のみ（B）抗 CD3 単抗体及び抗 CD26 単抗体刺激 24 時間後（C）同刺激 48 時間後（D）同刺激 72 時間後
M2：lipid rafts 発現末梢血 T 細胞
縦軸：細胞数
横軸：螢光強度

CD3 及び CD26 共刺激による末梢血 T 細胞における T 細胞表面への lipid rafts の発現量は図（B)、(C)、(D）が示す通り経時的な蛍光強度の増強を認めていることから、lipid rafts の発現量の経時的な増加が示唆された。このことは、抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD28 単抗体（1.0μg/ml）による共刺激の際にも同様に認められた。すなわち T 細胞増殖活性において、CD3 による第１シグナル系によっても CD28 による第２シグナル系によっても、T 細胞活性化において lipid rafts の発現量の増加が生じることが判明された。次に、免疫抑制剤シクロスポリン及び副腎皮質ステロイド：デキサメサゾンに対する末梢血 T 細胞における lipid rafts の発現量の変化を検討した。その結果を図４に示す。

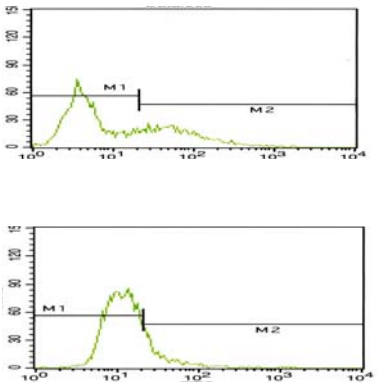

図 4: CD26 共刺激 72 時間後におけるサイクロスポリン及びデキサメサゾンによる末梢血Ｔ細胞表面における lipid rafts の発現量の変化
上段：サイクロスポリン 1000ng/ml 添加
下段：デキサメサゾン 1000μg/ml 添加

サイクロスポリン及びデキサメサゾンの各免疫抑制剤存在下における CD3 及び CD26 共刺激 72 時間後の lipid rafts の発現量は減弱していることが判明した。このことは、サイクロスポリン及びデキサメサゾンの各免疫抑制剤存在下における抗 CD3 単抗体（0.5μg/ml）及び抗 CD28 単抗体（1.0μg/ml）による共刺激 72 時間後の lipid rafts の発現量の観察の際にも同様に認められた。以上のことから、lipid rafts の発現量は T 細胞活性化によりその T 細胞表面への発現量が増強される一方、免疫抑制剤により T 細胞活性化が抑制された際にはその発現量が減弱することが判明した。このことは Lipid rafts が T 細胞の活性化のバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

本研究期間中、難治性糸球体腎炎患者おける患者末梢血 T 細胞において CD26 のシグナル伝達系を検討する予定であったが、本研究期間中に研究参加への受諾者が極めて少なかったため難治性糸球体腎炎患者の末梢血 T 細胞における CD26 の分子動態を詳細に検討することが難しかったことを付記する。

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）

〔学会発表〕（計１件）
1. 小林政司、小池健太郎、鈴木孝秀、宮崎陽一、宇都宮保典、細谷龍男、経過中に急性溶連菌感染後糸球体腎炎（APSGN)を合併しﾈﾌﾛｰｾﾞ症候群を呈したIgA腎症の一例、日本腎臓学会東部学術大会、2009 年 10 月 2 日、東京

６．研究組織
(1)研究代表者
小林　政司（KOBAYASHI　SEIJI）
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：80408400