

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591030

研究課題名（和文）CD28 スーパーアゴニストによる制御性 T 細胞増幅効果とその治療への応用

研究課題名（英文）Therapeutic effect of CD28 superagonist on renal disease via expansion of regulatory T cells

研究代表者

高島 義嗣（TAKABATAKE YOSHITSUGU）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30403075

研究成果の概要（和文）：

①CD28 スーパーアゴニスト（CD28-SA）のラットあるいはマウスへの投与により制御性 T 細胞（Treg）が優先的に増幅された。②CD28-SA はラット抗 GBM 抗体腎炎、マウスループス腎炎、ラット Thy-1 抗体腎炎の病態を改善し、投与により糸球体に Treg の浸潤を認めた。③CD28-SA によって増幅された制御性 T 細胞を別の疾患ラットに投与しても治療効果を認めることから前記②の効果の少なくとも一部は Treg を介したものであることが判明した。④（抗 GBM 抗体腎炎モデルの場合）CD28-SA 治療により糸球体への CD163+ マクロファージの浸潤増加と Th1 から Th2、Treg への bias を認め、これらが病態改善に関与している可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that a superagonistic monoclonal antibody for CD28, JJ316, which has been known to preferentially expand Treg cells in vivo, could prevent nephrotoxic serum (NTS)-induced nephritis in Wistar-Kyoto rats. Administration of JJ316 attenuated crescent formation, proteinuria, and glomerular accumulation of macrophages and Treg cells. Among glomerular macrophages, the CD163+ subset was significantly increased after treatment, suggesting that Treg cells may modulate the phenotype of macrophages leading to resolution of GN. Adoptive transfer experiment recapitulated the beneficial effects of in vivo administration of JJ316. Furthermore a single injection of JJ316 administered 3 days after disease induction completely protected nephritic rats from death for 2 months. In conclusion, we have demonstrated that treatment with JJ316 has a dramatic therapeutic effect on an experimental crescentic GN, probably due to an expansion of Treg cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：CD28、スーパーアゴニスト、制御性 T 細胞、FoxP3、抗 GBM 抗体腎炎

1. 研究開始当初の背景

(1)制御性 T 細胞(regulatory T cell、Treg)の存在と免疫自己寛容の維持
従来「自己」に対する免疫寛容は自己反応性クローンの除去によると考えられてきた。しかし近年、正常マウスにおいても自己免疫疾患の原因になる自己反応性 T 細胞が存在し、それを優性的、抑制的に制御している T 細胞分画、すなわち制御性 T 細胞 (Treg) が存在することが判明した。Treg は CD4+T 細胞中の 5-10% を占める。制御性 T 細胞の異常はヒトの自己免疫疾患にも関与している。IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) と呼ばれる遺伝性疾患では種々の自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギーが発症する。この疾患の原因遺伝子は FOXP3 と呼ばれる転写因子である。FOXP3 は Treg のマスター遺伝子であると考えられている。Treg は胸腺内で機能的に成熟した T 細胞として産生され、エフェクター T 細胞のサイトカイン産生と増殖応答を抑制する。このバランスの破たんは自己免疫疾患など生体に有害な反応を引き起こす。また、T 細胞の活性化抑制のみならず、抗原提示細胞の抗原提示能、マクロファージの活性化能、B 細胞の抗体産生能の抑制など多彩な免疫抑制効果有する。

(2)Treg の疾患治療への応用と CD28 スーパーアゴニスト

現在自己免疫疾患を中心に Treg の臨床応用を目指した取り組みが行われている。重要な課題のひとつは、如何にして Treg を効率的に増加させるかである。申請者はこの目的のために CD28 スーパーアゴニストに着目した。すべての T 細胞に発現する CD28 は、T 細胞が T 細胞受容体(TCR)を介して抗原提示細胞(APC)の MHC 複合体を認識する(シグナル 1)際に、APC 上の B7 分子と相互作用する(シグナル 2)。T 細胞活性化には両刺激が必須であり、従来の抗 CD28 抗体のみで T 細胞を刺激しても活性化は生じない。ところが CD28 スーパーアゴニストは従来とは異なったエピトープを認識することによって細胞膜上で CD28 の集積を誘導し、結果として単独で T 細胞を増殖させることができる。しかも Treg が優先的に増幅され、免疫抑制活性を失わない(Lin, C et al: Eur.J.Immunol., 33,626-638,2003)。CD28 スーパーアゴニストの開発者のひとりである Hunig らのグループはこれを用いて種々の疾患に対する治療効果を報告している。

2. 研究の目的

本研究では (1) ラット実験的半月体形成性腎炎 (抗 GBM 抗体腎炎) モデル (2) マウスループス腎炎モデル (3) ラット Thy-1 抗体腎炎モデルを用い、CD28 スーパーアゴニストの治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) ラット抗 GBM 抗体腎炎モデルに対する CD28 スーパーアゴニストの治療効果の検証

①Wistar-Kyoto ラット(以下 WKY ラット)に CD28 スーパーアゴニスト (JJ316) を 0.1mg、0.3mg、1mg 静脈内投与し、3 日後に脾臓、リンパ節、末梢血の T 細胞(Treg および非 Treg) 数を FACS にて評価する。

②WKY ラットを 5 群に分け、第 1 群 ; 正常コントロール群、第 2 群 ; 疾患群(抗 GBM 抗体のみを投与)、治療群(抗 GBM 抗体を投与し、3 日目にスーパーアゴニストを 0.1mg (第 3 群)、0.3mg (第 4 群)、1mg (第 5 群) 投与する。7 日目に採血、採尿後屠殺し、腎臓、リンパ節、脾臓を単離する。血液検査では腎機能、尿検査ではクレアチニン、タンパク量を測定し、各群で比較し治療効果を検証する。腎臓では通常病理像(PAS 染色、HE 染色)の他、免疫組織染色にて FoxP3 染色、各種リンパ球マーカー、マクロファージの染色を行う。また腎、リンパ節、脾臓から mRNA やタンパクを抽出し、主にサイトカインの発現量を比較する(real-time PCR)。

③ [Adoptive transfer]

JJ316 によって増幅した Treg が真に病態を改善しているのか否かを検証するために、正常ラットに JJ316 を投与し、3 日目に脾臓を取り出す。脾細胞から FACS にて CD4+CD25+分画を選別し、別の腎炎ラットに投与する。

④[長期実験]

WKY ラットを正常コントロール群、疾患群(抗 GBM 抗体のみを投与する)、治療群(抗 GBM 抗体を投与し、3 日目のみにスーパーアゴニストを 0.3mg 投与する群、7 日目のみに投与する群、14 日目のみに投与する群、3 日目に投与し 2 週間ごとに投与する群)に分ける。経時的に採血、採尿し、腎機能および尿タンパクを検査する。49 日目に採血、採尿後、一部を屠殺し、腎臓を評価する。のこりのラットについては生存率、腎機能を追跡する。

(2) マウスループス腎炎モデルへの CD28 スーパーアゴニスト (D665) の治療効果の検証

①NZBXNZWF1 マウスに D665 0.1mg を投与し、3 日後に脾臓およびリンパ節を FACS により解析する。

②NZBXNZWF1 マウスに生食 (group1) あるいは D665 0.1mg を 20 週令時に 1 回 (group2) あるいは 20 週令時より毎週 1 回 (group3) 投与し、37 週令時に屠殺し、免疫組織化学などにより解析する。

③NZBXNZWF1 マウスに D665 0.1mg を 20 週からあるいは 32 週から 1 週間ごとに投与し生存率を解析する。

(3) ラット Thy-1 抗体腎炎モデルにおける CD28 スーパーアゴニストの治療効果の検証

①ラット糸球体腎炎モデルである Thy-1 抗体腎炎を惹起後、3 日目に JJ316 を 1mg 投与し、腎組織 (HE、PAS)、免疫組織染色 (ED1、ED2、Foxp3) 血液 (Cr、BUN、TP)、尿タンパク量 (尿蛋白/尿 Cr)、腎糸球体 mRNA (各種サイトカイン) を疾患群と比較する。

② (1) ③と同様の adoptive transfer 実験を行う。

4. 研究成果

(1) ラット抗 GBM 抗体腎炎モデルに対する CD28 スーパーアゴニストの治療効果の検証

①JJ316 は正常ラットに投与すると、脾臓、リンパ節、末梢血において用量依存性に T 細胞数を増加させた。低用量では Treg のみが増加し、高用量では非 Treg も増加していた。

②JJ316 投与群すべてで半月体形成をはじめとする病理組織変化の軽減、尿タンパク量・の減少を認め、JJ316 高用量群で改善効果が顕著であった。治療群の糸球体内には Treg の浸潤が著明であった。治療群でも相当数のマクロファージが浸潤していたため、免疫を抑制する作用をもつ CD168 陽性マクロファージ数を調べたところ、治療群で増加していた。

③Adoptive transfer 実験では JJ316 を投与したラット由来の Treg 分画の移入により腎炎の活動性が抑制された。

④長期観察の結果では腎炎惹起後 7 日目の投与でも治療効果が認められた。また 3 日後に

1 回投与するだけで長期にわたり、疾患群に比較して病態の改善が認められた。

(2) マウスループス腎炎モデルへの CD28 スーパーアゴニストの治療効果の検討

①D665 は CD4+T 細胞を増加させ、特に Treg を優先的に増幅した

②治療群 (group2 および group3) では疾患群 (group1) に比し硬化や基質の沈着の程度に著明な改善を認め、腎機能の悪化が抑制された。また治療群 (group2 および group3) では疾患群 (group1) に比し尿タンパク量が抑制された。治療群 (group3 のみ) の糸球体には FoxP3 陽性 T 細胞 (Treg) が浸潤しており、IgG および補体 (C3) の沈着は減少していた。

③D665 投与により生存率の改善を認めた。32W に投与し始めた群においても部分的に生存率の改善を認めた。

(3) ラット Thy-1 抗体腎炎モデルにおける CD28 スーパーアゴニストの治療効果の検討

①JJ316 による治療群では腎機能の改善、尿タンパク量の減少、Treg および CD168 陽性マクロファージの浸潤増加、炎症性サイトカイン (IL-6 など) mRNA 量の減少、炎症抑制性サイトカイン (IL-10) の増加を認めた。

②Adoptive transfer 実験にても、JJ316 投与と同傾向の効果が認められたことから、JJ316 は Treg の増加を介して治療効果を発揮しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

①Takabatake Y, Li XK, Mizui M, Miyasato K, Matsui I, Kawada N, Imai E, Hünig T, Takahara S, Wada T, Furuichi K, Rakugi H, Isaka Y. A superagonistic monoclonal antibody for CD28 ameliorates crescentic glomerulonephritis in wistar-kyoto rats. Mol Med. 査読有 2011; 17 (7-8):686-96.

②Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, Kawachi H, Li XK, Hünig T, Takahara S, Rakugi H, Isaka Y. CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. Clin Exp Nephrol. 査読有 2011;

15(1):50-7.

③高島 義嗣、CD28 スーパーアゴニスト、
医学のあゆみ、査読無 2011;237: 260-261

〔学会発表〕(計2件)

①高島義嗣、木村友則、宮里研郎、高橋篤史、
植畑拓也、貝森淳哉、川田典孝、今井圓裕、
HunigThomas、李小康、楽木宏実、猪阪善隆、
ループス腎炎モデルマウスに対する CD28 ス
ーパーアゴニストの治療効果の検証、日本
腎臓学会 第 53 回日本腎臓学会学術総会
2010年6月16日、神戸

②高島義嗣、CD28 スーパーアゴニストのラッ
ト半月体形成性腎炎に対する治療効果の検
討、分子腎臓研究会、2009年9月5日、京都

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/in
dex.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 義嗣 (TAKABATAKE YOSHITSUGU)

大阪大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30403075

(2) 研究分担者

猪阪 善隆 (ISAKA YOSHITAKA)

大阪大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00379166

今井 圓裕 (IMAI ENYU)

名古屋大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：00223305