

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号 : 32620

研究種目 : 若手研究 (S)

研究期間 : 平成 21 年度 ~ 平成 25 年度

課題番号 : 21679005

研究課題名 (和文) ヒト T 細胞共刺激分子 CD26-カベオリン系を標的とした移植免疫寛容誘導の基盤研究

研究課題名 (英文) Scientific research of transplantation tolerance targeting CD26/caveolin-1 costimulation pathway

研究代表者 大沼 圭 (OHNUMA KEI) 順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 10396872

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 49,500,000 円、(間接経費) 14,850,000 円

研究成果の概要 (和文) :

CD26 抗体或いは Cav-Ig (caveolin-1 とヒト IgG-Fc の融合蛋白) による CD26 共刺激阻害により、アロ抗原に対するアナジの誘導に成功し、CTLA4-Ig による CD28 共刺激阻害では完全には抑制できなかった GVHD 等 T 細胞活性化が主因となる免疫病への治療応用の可能性を示した。この成果を踏まえ、成人末梢血単核球を免疫不全 NOG マウスに移植した急性 GVHD モデルを用いて、CD26 抗体による急性 GVHD の予防、及び、治療の有効性を証明した。本研究において、ヒト T 細胞共刺激分子 CD26-カベオリン系を標的とした免疫制御は、従来の免疫抑制療法の欠点を大幅に改善し、免疫寛容を誘導し、尚且つ、GVL 効果を維持できるという、革新的な治療法であることが示された。

研究成果の概要 (英文) :

In our research, we demonstrated in *in vitro* experiments that blockade of CD26-mediated T cell costimulation by soluble Fc fusion proteins containing the N-terminal domain of caveolin-1 (Cav-Ig) diminished primary and secondary proliferative responses not only to recall antigen, but also to unrelated allogeneic antigen-presenting cell. To expand the *in vitro* findings to an *in vivo* system, we examined CD26-dependent organ injury in a xenogeneic GVHD (xGVHD) murine model. Administration of humanized anti-human CD26 monoclonal antibody (mAb) decreased xGVHD severity and prolonged survival in hu-PBL-NOG mice without loss of engraftment of human T cells, while increasing doses of CTLA4-Ig diminished engraftment of human lymphocytes. Importantly, anti-CD26 mAb treatment preserved the graft-versus-leukemia effects. Altogether, our findings indicate a role for CD26 in the regulation of GVHD and point to CD26 as a novel target for therapeutic intervention in this disease.

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・小児血液学

キーワード : 移植片対宿主病、造血幹細胞移植、T 細胞、共刺激、CD26/DPPIV、Caveolin-1

1. 研究開始当初の背景

CD26 分子は 110kDa の膜糖蛋白でヒトメモリー T 細胞に選択的に発現し、抗原提示細胞 (APC) 上の caveolin-1 (cav-1) を介したメモリー T 細胞の増殖や炎症性サイトカインの産生に深く関わっている T 細胞分子である。造

血幹細胞移植は難治性の白血病や再生不良性貧血などの血液疾患や代謝異常症を治癒に至らしめる治療法として確立しているが、同種免疫反応の GVHD (graft-versus-host disease, 移植片対宿主病) は依然重要な合併症であり、一方で、GVHD 予防・治療薬の免

疫抑制剤による日和見感染症は極めて重篤である。これら疾患の治療成績の向上は移植後免疫異常症の抑制とともに易感染性の排除であるが、いまだ最良のコントロールは得られていない。また、HLA 不一致臍帯血移植は移植ドナーの拡大をもたらしたが、GVHD はやはり重大な合併症となっている。

2. 研究の目的

本研究では、新たな T 細胞共刺激系 CD26-カベオリン系という新規分子基盤に基づき、免疫異常症、特に、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標とした。

3. 研究の方法

ヒト T 細胞がエフェクターとして働き異種 GVHD を発症するマウス (hu-PBL-SCID) を用いて、GVHD におけるヒト T 細胞 CD26 分子の機能解析と、抗原特異的免疫における CD26-カベオリン系のブロックによる免疫寛容誘導を実証するため、以下の研究を行った。

- (1) CD26 と caveolin-1 の相互作用をトリガーとする T 細胞の活性化機構の解明。
- (2) 臍帯血 T 細胞のアロ抗原応答性における CD26 と caveolin-1 の分子生物学的解析。
- (3) CD26 と caveolin-1 の相互作用を標的とした分子特異的 T 細胞抑制療法の開発、特に、急性 GVHD の予防と治療に対する新規薬剤の開発。
- (4) 移植免疫寛容誘導における CD26 と caveolin-1 の分子生物学的解析。

4. 研究成果

(1) CD26・caveolin-1 共刺激系を介した新たなメカニズムとして、従来報告されている Th1 への分化のみならず、CD26 共刺激による Th17 への分化と GVHD 病態形成の関連を発見した。

(2) 非致死量放射線照射した NOG マウスに臍帯血単核球を移入することで肺や皮膚、関節など多様な組織に臍帯血由来ヒト CD26T リンパ球がエフェクター細胞となって臓器に浸潤し、脱毛や皮膚の線維化、細気管支周囲の線維化など慢性 GVHD 様の症状を示モデルを樹立した。この慢性炎症マウスモデルにおいても CD26 抗体投与、あるいは、Cav-Ig 投与による慢性 GVHD 抑制効果が確認され、慢性 GVHD における CD26T 細胞の重要性が *in vivo* モデルで示唆された。この成果は、慢性 GVHD のみならず、関節リウマチや強皮症、全身性エリテマトーデス等の膠原病、新たな国民病となっている慢性閉塞性肺疾患等の慢性炎症全般の病態解明と治療の開発へと発展しうる。すなわち、従来の治療法では十分な効果が得られていない慢性炎症に起因する難

治性疾患に対する革新的な治療薬の開発が期待され、その結果、国民の健康寿命の延伸に大きく寄与することができる。

(3) hu-PBL-NOG マウスを用いて、急性 GVHD の病態への CD26 陽性 T 細胞の関与及びヒト化 CD26 抗体の発症予防効果の解析を行った。病理学的解析から、急性 GVHD の標的臓器とされる腸管、肝臓、皮膚への CD26 陽性 T 細胞の浸潤が認められ、マウス末梢血及び脾臓でもヒト T 細胞の CD26 の発現が移入後に顕著に増強していたことから、本モデルの病態への CD26 陽性 T 細胞の関与が強く示唆された。さらに、急性 GVHD を発症した同種移植後臨床検体 (消化管粘膜及び皮膚) を用いて、急性 GVHD の重症度と臓器に浸潤した CD26 陽性 T 細胞数の相関を、組織学的に検討したところ、急性 GVHD の重症度に相関して CD26 陽性 T 細胞の浸潤が多く認められた。そこで CD26 抗体と、比較対照として関節リウマチの治療薬として既に臨床応用されている CD28 共刺激阻害剤 CTLA4-Ig を hu-PBL-NOG マウスに投与し、生存延長効果及び薬剤の作用機序の解析を行った。CD26 抗体が高用量でもヒト T 細胞の生着を阻害することなく生存延長及び急性 GVHD 重症度の軽減に作用した一方で、CTLA4-Ig は高用量投与すると全ての個体が生存する反面、ヒト T 細胞の生着もほとんど阻害されることを示した。さらに、CD26 抗体投与群では肝臓へのヒトリンパ球の浸潤が顕著に抑制されることを明らかにした。また、コントロール IgG 抗体と比較して CD26 抗体によりマウス肝臓に浸潤したドナー T 細胞のエフェクター分子の mRNA 発現も低下していることが示された。これらの結果から、CD26 抗体はドナーリンパ球の生着阻害や白血病再発のリスクが少ない急性 GVHD の制御に有効な治療法であることが示された。

(4) さらに、臓器障害性リンパ球における CD26 分子の共刺激メカニズムを解析したところ、CD26 分子を介して活性化されたヒト CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害における主要なエフェクター分子である Granzyme B と FasL の両分子の発現が顕著に亢進され、非常に強い細胞傷害活性を示すことが明らかになった。このことから、CD26 共刺激による健常な CD8 陽性 T 細胞の活性化は、ウイルス感染や腫瘍からの生体防御において非常に重要な役割を担っていると考えられる。一方、自己免疫疾患や GVHD などのように何らかの要因で攻撃する矛先が正常な自己の細胞に向いてしまう場合では、CD26 共刺激によって強い細胞傷害活性を獲得した CD8 陽性 T 細胞は、重篤な組織破壊と炎症反応を引き起こす原因となることが示唆される。当研究室で作製に成功したヒト化抗 CD26 抗体は、CD26 共刺激シグナルを阻害することで、CD8 陽性 T 細

胞の炎症性因子の発現低下と細胞傷害活性の抑制に作用することが予想される。このヒト化抗 CD26 抗体が免疫システムを調整しながら十分な治療効果をあげる重要な例として、中東で猛威を奮っている致死性の高い新興ウイルスである新型コロナウイルス MERS (Middle East respiratory syndrome coronavirus) がある。MERS コロナウイルスは CD26 分子を受容体としてヒトに感染し、免疫不全や腎不全等 CD26 分子を発現する臓器を破壊する重篤な感染症状を引き起こすが、ヒト化抗 CD26 抗体は MERS コロナウイルスの感染阻止に有効であることを、オランダのエラスムス医学センターとの共同研究で発表した。以上のように、本研究によって明らかになったヒト CD8 陽性 T 細胞における CD26 分子の役割、生理的意義についての新たな知見は、ウイルス感染や腫瘍に対する CD8 陽性 T 細胞依存的な生体防御システムの理解や、CD8 陽性 T 細胞が発症や回復に重要な役割を持つと考えられる自己免疫疾患や GVHD などの免疫異常症の病態解明と過度の免疫抑制を回避した治療法の開発につながるものと期待できる。

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)

[雑誌論文] (計 22 件)

- (1) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer*. 2014;102:2232-2245. 査読有, DOI: 10.1038/bjc.2014.151.
- (2) Ohnuma K, Saito T, Hatano R, Hosono O, Iwata S, Dang NH, Ninomiya H, Morimoto C. Comparison of Two Commercial ELISAs against an in-house ELISA for measuring soluble CD26 in human serum. *J Clin Lab Anal*. 2014, [Epub ahead of print], 査読有, DOI: 10.1002/jcla.21736
- (3) Kwan J, Liu Y, Ratnayake R, Hatano R, Kuribara A, Morimoto C, Ohnuma K, Paul VJ, Ye T, Luesch H. Grassypeptolides as natural inhibitors of dipeptidyl peptidase 8 and T-cell activation. *Chembiochem*. 2014;15: 799-804. 査読有, DOI: 10.1002/cbic.201300762.
- (4) Htano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. *Diagn Pathol*. 2014;9:30 査読有, DOI: 10.1186/1746-1596-9-30.
- (5) Ohnuma K, Haagman BL, Hatano R, Raj VS, Mou H, Iwata S, Dang NH, Bosch BJ, Morimoto C. Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection by Anti-CD26 Monoclonal Antibody. *J Virology*. 2103;87:13892-13899. 査読有, DOI: 10.1128/JVI.02448-13.
- (6) Okamoto T, wata S, Yamazaki H, Hatano R, Komiya E, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells. *PLoS One*. 9;2013: e86671. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0086671.
- (7) Havre P, Ohnuma K, Iwata S, Morimoto C, Dang NH. CD26 Expression on T-anaplastic large cell lymphoma (ALCL) line Karpas 299 is associated with increased expression of versican and MT1-MMP and enhanced adhesion. *BMC Cancer*. 2013;3:517. 査読有, DOI: 10.1186/1471-2407-13-517.
- (8) Saito T, Ohnuma K, Dang NH, Hatano R, Ninomiya H, Morimoto C. Polyarthropathy in type 2 diabetes patients treated with DPP4 inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013;102:e8-e12. 査読有, DOI: 10.1016/j.diabres.2013.07.010.
- (9) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol*. 2013;162:263-77. 査読有, DOI: 10.1111/bjh.12378.
- (10) Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear localization of CD26 induced by a humanized monoclonal antibody inhibits tumor cell growth by modulating of

- POLR2A transcription. *PLoS One*. 2013;8:e62304. 査読有,
DOI: 10.1371/journal.pone.0062304.
- (11) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated co-stimulation in human CD8⁺ T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology*. 2013;138: 165-172. 査読有,
DOI: 10.1111/imm.12028.
- (12) Ohnuma K, Morimoto C. DPP4 (dipeptidyl-peptidase 4). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2013;17:301- 312. 査読有, DOI: 10.4267/2042/49697.
- (13) Ohnuma K (47人中22番目) *et al.* Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of memantine. *J Pharmacol Sci*. 2012;119: 324-9. 査読有, URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863669.
- (14) Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, Ohnuma K, Hosono O, Hiraki A, Fujii M, Yamada T, Dang NH, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T, Morimoto C. CD26 Overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1447-1456. 査読有,
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1990.
- (15) Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011;60:1246-1257. 査読有,
DOI: 10.2337/db10-1338.
- (16) Abe M, Havre PA, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang LH, Dang NH. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2011;11:51. 査読有,
DOI: 10.1186/1471-2407-11-51.
- (17) Takasawa W, Ohnuma K, Hatano R, Endo Y, Dang NH, Morimoto C. Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates micro-vascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;40:7-12. 査読有,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.112.
- (18) Ohnuma K, Hosono O, Katayose T, Yoshikawa N, Kawasaki H, Fujii T, Oyaizu N, Tanaka H, Morimoto C. Microscopic polyangiitis initiated with liver dysfunction, calf pain and fever of unknown origin. *Rheumatol Int*. 2010;30:1651-6. 査読有,
DOI: 10.1007/s00296-009-1121-2.
- (19) Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. CD26 expression on T cell lines increases SDF-1 α -mediated invasion. *Br J Cancer*. 2009;101:983-991. 査読有, DOI: 10.1038/sj.bjc.6605236.
- (20) Yamada K, Hayashi M, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Localization of CD26/DPPIV in nucleus and its nuclear translocation enhanced by anti-CD26 monoclonal antibody with anti-tumor effect. *Cancer Cell Int*. 2009;9:17. 査読有,
DOI: 10.1186/1475-2867-9-17.
- (21) Okamoto T, Iwata S, Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Histamine H1-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. *Clin Exp Immunol*. 2009;157:27-34. 査読有,
DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03958.x.
- (22) Ohnuma K, Uchiyama M, Hatano R, Takasawa W, Endo Y, Dang NH, Morimoto C. Blockade of CD26-mediated T cell costimulation with soluble caveolin-1-Ig fusion protein induces anergy in CD4⁺ T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386:327-332. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.027.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Hatano R, Ohnuma K, *et al.* Humanized anti-CD26 mAb Leads to Prophylaxis and Treatment of GVHD in hu-PBL-NOG Model Mice. 第 74 回日本血液学会総会.

2012年10月19日、京都市。

- (2) Hatano R, Ohnuma K, *et al.* CD26 blockade by humanized monoclonal antibody leads to prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease (GVHD) in hu-PBL NOG model mice. The 53th Annual Meeting, American Society of Hematology. December, 2011. San Diego, LA, USA.
- (3) Ohnuma K, Morimoto C. A novel immunoregulation therapy targeting CD26 molecule for intractable autoimmune diseases: a new aspect of T-cell costimulation blocking therapy. Tokyo-Shanghai Workshop on Rheumatology. November 2011, Urayasu, Japan.
- (4) Hatano R, Ohnuma K, *et al.* A Novel Function of CD26-Mediated Costimulation in the cytotoxic activity of human CD8⁺ T cells in xenogeneic graft-versus-host disease mice model. The 14th International Congress of Immunology. August 2010. Kobe, Japan.
- (5) 大沼圭、他。CD26分子を用いたGVHDなど難治性免疫疾患への新規治療法開発。第55回日本リウマチ学会総会。2011年7月17日。神戸市。
- (6) 高澤渉、大沼圭、他。CD26 expression of vascular endothelium and its role in inflammatory endothelial cell injury. 第71回日本血液学会総会。2009年10月24日。京都市。
- (7) Hatano R, Ohnuma K, *et al.* A Novel Function of CD26-Mediated Costimulation in the cytotoxic activity of human CD8⁺ T cells in xenogeneic chronic GVHD and GVL mice model. The 51th Annual Meeting, American Society of Hematology. December, 2009. New Orleans, LA, USA.

[図書] (計1件)

- (1) Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. In: Makowski GS, eds. Advances in Clinical Chemistry Vol 53. Burlington, MA, USA: Academic Press, 2011:51-84. ISBN: 978-0-12-385855-9.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

(1) 名称: 抗ヒト CD26 モノクローナル抗体
又はその抗原結合性断片
発明者: 大沼圭、波多野良、山田健人、森本幾夫
権利者: 順天堂大学、キッセイ薬品工業
種類: 特願
番号: 2013-158533
出願年月日: 2013年7月31日
国内外の別: 国内

(2) 名称: MERS コロナウイルス感染症予防治療剤
発明者: 大沼圭、森本幾夫
権利者: 順天堂大学
種類: 特願
番号: 2013-187124
出願年月日: 2013年9月17日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/laborary/contribution.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 圭 (OHNUMA KEI)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 10396872