

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670486

研究課題名(和文)CD26分子の新型コロナウイルス感染症(MERS)への役割及び新規治療法開発

研究課題名(英文)Role of CD26 molecule in the infection of MERS(Middle East respiratory syndrome) virus and development of new therapy

研究代表者

森本 幾夫(MORIMOTO, CHIKAO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：30119028

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): MERSコロナウイルスの受容体はCD26であるが、さまざまなCD26単クローン抗体を用いてMERSの感染に關与するCD26ドメインを同定した。Adenosine Deaminaseの結合ドメインと反応する2F9抗体は完全にウイルスの侵入を抑制し、ヒト化CD26抗体も有意に感染を抑制した。このことから2F9及びヒト化CD26抗体はMERS感染症への治療候補である。MERSウイルスはヒトCD26陽性Jurkat T細胞株に感染しアポトーシスを生じるが、このことからMERS感染によりCD26陽性T細胞がアポトーシスを生じ減少し免疫不全を生じる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文): We identified the domains of CD26 involved in the binding of Middle East respiratory syndrome coronavirus using distinct clones of anti-CD26 monoclonal antibodies (MABs). One clone, named 2F9, almost completely inhibited viral entry. The humanized anti-CD26 MAb also significantly inhibited infection. These findings indicate that both 2F9 and humanized MAb are potential therapeutic agents for MERS infection.

MERS infects human bronchial epithelial Calu-3 cells as well as CD26 Jurkat T lymphocyte cells. Unlike severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV, which exclusively infects and releases through the apical route, this virus can do so through either side of polarized Calu-3 cells. Infection results in profound apoptosis irrespective of its production of titers that are lower than those of SARS-CoV. Together, our results provide new insights into the dissemination and pathogenesis of MERS-CoV and may cause in immune defects since it infected in human CD26 T cells.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：MERS感染症 コロナウイルス CD26/DPP 重症呼吸器感染症 ヒト化CD26抗体 CD26単クローン抗体
 アポトーシス エピトープ

1. 研究開始当初の背景

MERS 感染症(Middle East respiratory syndrome)(MERS-CoV)はSARS-CoV同様に重症急性呼吸器感染症を引き起こし、2012年に報告され、致死率は40%と非常に高い。中東地域を中心に感染が蔓延している。現時点ではワクチンや有効な治療方法は全く存在せず、MERS-CoV感染症の生物学及び病態を深く理解することは非常に重要で、新規かつ有効な治療法開発は急務である。MERS-CoVのスパイク蛋白S1は標的細胞へのウイルス侵入に必須とされ、最近CD26分子がそのウイルス受容体と報告された(Nature. 495:251, 2013)。CD26はdipeptidyl peptidase IV (DPPiV)酵素を含むT細胞活性化分子で、我々は単クローン抗体の開発、CD26 cDNAの単離を世界に先駆けて行いCD26の様々な機能を確立してきた(Trends Immunol. 29: 295,2008)。CD26はT細胞など免疫系のみならず気管支、腎臓、腸管などの上皮に幅広く分布しており、MERS-CoVの全身播種に重要な役割を果たしている可能性がある。更にMERSの病態における免疫系の役割などは全く不明である。MERS-CoVのCD26発現臓器への侵入阻止やMERS-CoVを消滅させる有効な治療法開発が重要とされ、CD26発現レベルの操作やMERS-CoV-S1ドメインとその受容体との相互作用を標的とする阻害薬の開発はMERSの有効な治療手段となる。我々はCD26を6つのエピトープに分ける多数のCD26単クローン抗体を既に開発しており(Mol Immunol. 35:13,1998)、臨床応用可能なヒト化CD26抗体も開発している。CD26のMERS-CoV感染症における役割を検討することはCD26を基盤としたMERS-CoV感染症への新規治療法を開発するためにも重要である。

2. 研究の目的

MERS コロナウイルス感染症(MERS-CoV)はSARS感染症同様に重症急性呼吸器感染症を引き起こし、中東地域を中心に感染が拡大しているが、死亡率は約40%と非常に高くワクチンや有効な治療法は現時点で全く存在せず、新規治療法開発は急務とされている。オランダのHaagmansらはMERS-CoVのウイルス受容体はCD26分子であると報告している(Nature. 495:251,2013)。

我々は種々のCD26エピトープと反応するCD26抗体を開発していることからCD26のMERS-CoVの結合及び感染に関与する詳しいドメインの解析及びMERS感染後に免疫系にいかなる生物学的eventを生じさせるかあるいは、CD26抗体がMERSコロナウイルス感染症の治療法になり得るかどうかなどを検討することを目的とするこれらの研究を通してMERS感染症の病態解明及び新規治療法開発につなげる予定である。

3. 研究の方法

(1)MERS-CoV感染に関与するCD26分子上の特異的ドメインを決定するうえで、MERS-CoVのスパイク蛋白(MERS-S1)が必須のためDr.Haagmansから入手する。既にエピトープを決定している6種のCD26単クローン抗体(4G8, 1F7, 2F9, 16D4B, 9C11, 14D10; Mol Immunol. 35:13,1998)、ヒト化CD26抗体、及びAlexa-Fluor488をラベルしたMERS-S1及びCD26を強制発現させたCD26+ Jurkat T細胞株を用いて、10⁶g/mlの各種CD26抗体及びコントロールIgGと細胞を4, 30分培養して洗浄した後、MERS-S1 Alexa-Fluor488(5⁶g/ml)を加えてその結合抑制をフローサイトメトリーで解析する。

ヒトCD26はAdenosine deaminase(ADA)の結合蛋白であるが、ADAをAlexa-Fluor488で標識し、それぞれのCD26

抗体を用いてその結合抑制について検討する。ヒト CD26 の 340 番目から 344 番目のアミノ酸をマウス CD26 のアミノ酸に置換した CD26 を Jurkat T 細胞株に発現させた JKT-hCD26-ADA^{negative} Jurkat T 細胞は作製済みである(J Immunol. 159:6070,1997)。

MERS-S1 の結合に関与する詳しい CD26 エピトープを検討するため全長の CD26 cDNA 及び 1-739th, 1-577th, 1-358th, 1-247th, の CD26 欠損変異体と GFP 発現ベクターを Cos-1 細胞に発現させ、Alexa-Fluor647 でラベルした MERS-S1 とヒト化 CD26 抗体及び種々の CD26 単クローン抗体を用いてトランスフェクタントを染色してその発現を評価して、MERS-S1 及び各 CD26 抗体の詳しい結合ドメインを解析する。

CD26 の欠損変異体は CD26 の立体構造を変化させ C 末端部分の欠損変異体は MERS-S1 の変異 CD26 の結合を阻害する可能性があるため、ADA に結合しないラット CD26 とヒト CD26 との Swap 変異体を作製し、立体構造が維持された CD26 を発現するトランスフェクタントを用いて MERS-S1 及び CD26 抗体の詳しい CD26 結合ドメインを解析する。

(2)Dr.Haagmans らの研究室で MERS-CoV の感染実験を依頼して感染に関与する CD26 のドメイン及び CD26 抗体の感染抑制を検討してもらう。

(3)MERS-CoV 感染によるアポトーシス誘導はテキサス大学 Dr.Tseng 博士との共同研究を行いアポトーシス評価は核形態、Caspase-3 発現、AnnexinV 及び PI 染色にて行った。

4 . 研究成果

(1)MERS-CoV-S1 の CD26 Jurkat T 細胞株への結合及び種々の CD26 抗体の結合抑制について
まず MERS-CoV-S1 蛋白に Alexa-Fluor488

をラベルした蛋白は CD26 を発現させた CD26 Jurkat T 細胞に結合し、CD26 陰性の Jurkat T 細胞には結合しないことを確認した。

CD26 陽性 JurkatT 細胞株を 10µg/ml の 6 種類の CD26 抗体(4G8,1F7, 2F9,16D4, 9C11,14D10) 及びヒト化 CD26 抗体及びコントロール IgG と 4 30 分培養して、MERS-S1 Alexa Flour488 を加えてその結合抑制を FACS で検討した。その結果 2F9 は MERS-CoV-S1 の CD26Jurkat T 細胞への結合をほとんど抑制したが、1F7 及びヒト化 CD26 抗体は約 50%ほど抑制した。しかしその他の抗体は結合を抑制しなかった。更に 2F9、1F7 及びヒト化 CD26 抗体について容量を 1µg/ml ~ 50µg/ml まで増加して、その抑制の容量依存性について検討したところ、おのこの抗体について 5µg/ml ~ 50µg/ml までほぼ同程度の抑制が認められ、特に 2F9 については 5µg/ml の濃度からほとんどすべて MERS-S1 の結合を抑制した。

(2)CD26 の Adenosine deaminase(ADA)結合ドメインの MERS-CoV 結合への関与
CD26 は ADA の結合蛋白で我々の今までの報告から 2F9 は ADA の結合ドメインの近傍を認識し(248-449 アミノ酸残基)1F7,ヒト化 CD26 抗体は ADA 結合ドメインは認識しないことを報告している(248-340 アミノ酸残基)。更に ADA の CD26 への結合は 340-344 アミノ酸残基が関与している。(J Immunol. 159:6070,1997)

Alexa-Fluor488 をラベルした ADA は CD26 Jurkat T 細胞に結合するが、この系を用いて CD26 抗体の ADA 結合抑制を FACS にて解析した。2F9 は完全に ADA の CD26 Jurkat への結合を抑制するが 1F7,ヒト化 CD26 抗体は全く抑制しなかった。次に MERS-S1 の CD26 Jurkat T 細胞への結合が ADA を加えることで抑制されるかどうか検討した。
MERS-CoV-S1 の CD26 への結合は ADA を

加えることで抑制されたが、100 μ g/ml の ADA を加えても完全には抑制されなかった。次にヒト CD26 分子の 340 番目から 344 番目のアミノ酸をマウスアミノ酸に置換した変異 CD26 を Jurkat T 細胞株に発現させた。JKT-hCD26⁺ADA⁻ Jurkat T 細胞株を用いて (J.Immunol 159 : 6070 , 1997)

MERS-CoV-S1 の結合を検討したところ ADA はこの細胞株には結合しなかったが MERS-CoV-S1 は容量依存性にこの細胞株に結合した。このことから MERS-CoV-S1 の CD26 への結合は CD26 の ADA 結合ドメイン以外に CD26 分子の他のドメインも関与していることが示唆された。

(3)MERS-S1 の結合に関与する詳しい CD26 エピトープの検討

詳しい CD26 エピトープを解析するため全長の CD26cDNA 及び 1-739th、1-577th、1-449th、1-358th、1-247th の欠除変異体と GFP 発現ベクターを Cos-1 細胞に発現させ Alexa Flour ラベルした MERS-S1、2F9、ヒト化 CD26 抗体(この抗体は 1F7 と同じエピトープを認識)を用いて Cos-1 細胞トランスフェクタントを染色してその発現を評価して MERS-S1 及び各 CD26 抗体の詳しい結合ドメインを解析した。この結果 MERS-CoVS1 は 1-739th、1-577th、1-449th、1-358th を含むコンストラクトには結合能を有していたが、MERS-CoV-S1 の 1-247th を含むコンストラクトへの結合は全く同定できなかった。更に 2F9 あるいはヒト化 CD26 抗体で同定されるエピトープは 248 から 449 番目のアミノ酸あるいは 248 から 358 番アミノ酸残基に存在するという結果を得た。この結果から MERS-CoV-S1 の結合に関与する CD26 エピトープは 358 アミノ酸近傍にありこれは 2F9 の反応する CD26 エピトープとほぼ近いことが示唆された。また MERS-CoV-S1 の CD26 結合には主なる ADA 結合ドメインに加えてそれ以外のドメインも関与していることが

明らかになった。

図 1 に MERS-CoV 及び 2F9、YS110 (ヒト化 CD26 抗体のことで 1F7 と同じエピトープ) の MERS-CoV に関与する結合ドメインのスキームを示した。

CD26 と MERS-CoVS1 ドメインとのコンピュータ予測による結晶構造解析が明らかにされたが (Nature500 : 227、2013) 我々の CD26 抗体による CD26 への MERS-CoV 結合解析とほぼ同様の結果であることが示された。

(4)CD26 抗体の 2F9 及びヒト化 CD26 抗体による MERS-CoV 感染への抑制についてオランダ Dr.Haagmans の研究室において 2F9 をはじめとする CD26 抗体の MERS-CoV 感染への抑制について解析してもらった。

図 2 に示すように 2F9 抗体はほとんど MERS 感染を抑制し、更に 1F7 及び同様のエピトープと反応するヒト化 CD26 抗体も有意に MERS 感染を抑制することが明らかとなった。この実験から 2F9 及び 1F7、ヒト化 CD26 抗体は MERS-CoV 感染症の有効な治療法となる可能性が示唆された。

(5)MERS-CoV 感染によるアポトーシス誘導 テキサス大学 Dr.Tseng 博士の研究室と MERS-CoV 感染による生物学的現象について共同研究を行った。ヒト気管支上皮細胞株 Calu-3 細胞 (CD26 陽性) 及び CD26 陽性 Jurkat ヒト T 細胞株を用いて in vitro で MERS-CoV 感染実験を行ったところ、Calu-3 細胞及び CD26 陽性 JurkatT 細胞ともに強いアポトーシス誘導が認められた。しかし CD26 陰性 Jurkat T 細胞ではアポトーシス誘導は認められなかった。このことから MERS 感染症ではヒト免疫系とくに CD26 陽性リンパ球にも感染して生体で免疫不全状態も起こす可能性が強く示唆された。

図 1. Binding region of CD26 to MERS-CoV S1 Fc

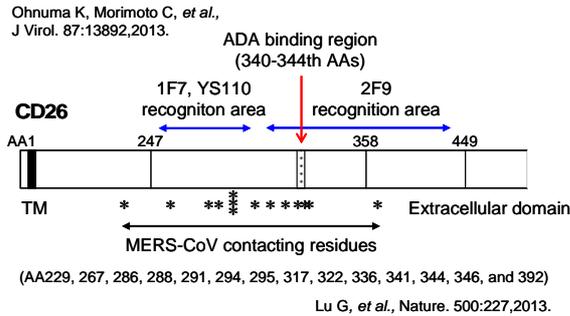
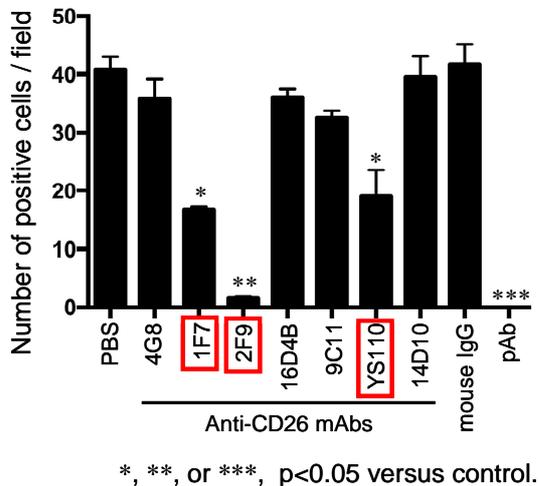


図 2. *In vitro* infection experiments



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 15 件)

- Hatano R, Ohnuma K, Otsuka H, Komiya E, Taki I, Iwata S, Dang NH, Okumura K, Morimoto C. , CD26-mediated induction of EGR2 and IL-10 as potential regulatory mechanism for CD26 costimulatory pathway, J Immunol. 、査読有、Vol.194、2015、pp. 960-972.
- Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada

T, Morimoto C. 、 Regulation of pulmonary GVHD by IL-26+CD4 T lymphocytes through CD26/caveolin-1 interaction、 J Immunol. 、 査読有、 Vol.194、 2015、 pp.3697-3712

- Ohnuma K, Hatano R, Morimoto C.、 DPP4 in anti-tumor immunity:going beyond the enzyme.、 Nat Immunol. 、 査読有、 Vol.16、 2015、 pp.91-92.
- 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、 査読有、 Vol.110、 2014、 pp.2232-2245
- Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C.、 Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma、 PLoS One. 、 査読有、 Vol.9、 2014、 pp.e115647

[学会発表](計 9 件)

- 森本幾夫,CD26 抗体を基盤とするトランスレーショナルリサーチ.,第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2015 年 11 月 27 日,甲府富士屋ホテル,山梨県甲府市.
- Ryo Hatano, Taketo Yamada, Haruna Otsuka, Eriko Komiya, Noriaki Iwao, Ko Okumura, Chikao Morimoto, Kei Ohnuma. Anti-interleukin-26 therapy for lung fibrosis of GVHD. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月 16 - 18 日, ANA クラウンプラザホテル金沢,石川県金沢市
- 古宮栄利子、山崎裕人、山田健人、森本幾夫 CD26 promotes invasiveness of

malignant pleural mesothelioma cell via upregulation of periostin. 第 74 回 日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

- 4) 波多野良, 大沼圭, 石井智徳, 岩田哲史, 奥村康, 関川巖, 森本幾夫. T 細胞共刺激分子 CD26 に基づく全身性エリテマトーデスの病態および疾患活動性の新規バイオマーカーの探索. 第 59 回日本リウマチ学会学術集会, 2015 年 4 月 23 - 25 日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
- 5) 大沼圭, 斉藤辰彦, 波多野良, 岩田哲史, 鈴木博史, 森本幾夫. DPP4 阻害剤の服用によって誘発される多関節症とそのバイオマーカー. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014 年 4 月 24 - 26 日, グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1. 名称: CD26 抗体と他のがん剤とを組み合わせた癌治療用組成

発明者: 山田健人、林睦、山田幸司、森本幾夫、岡本俊博、金子有太郎

権利者: Ys AC 株式会社

種類: 特許

番号: 2015 - 179672

出願年月日: 2015 年 9 月 11 日

国内外の別: 国内

2. 名称: 免疫抑制剤

発明者: 森本幾夫、大沼圭、波多野良

権利者: 順天堂大学

種類: 特許

番号: 2014 - 199260

出願年月日: 2014 年 9 月 29 日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幾夫 (MORIMOTO, Chikao)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号: 30119028

(2) 研究分担者

岩田 哲史 (IWATA, Satoshi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 00396871

大沼 圭 (OHNUMA, Kei)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10396872