

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860760

研究課題名(和文) CD26陽性CD8 T細胞を標的とした自己免疫疾患の病態解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of CD8+CD26-positive/negative T cell subsets for the development of an innovative therapy and elucidating the pathophysiology of refractory autoimmune diseases

研究代表者

波多野 良 (Hatano, Ryo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30638789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD26はDPPiV酵素活性を有する多機能タンパクで、ヒトT細胞共刺激分子としても機能し、様々な免疫疾患への関与が示唆されている。全身エリテマトーデス(SLE)ではT細胞上のCD26の発現が低下していることを見出し、この発現低下の意味を明らかにすることを目的とした。SLEにおけるT細胞のCD26の発現低下は、CD4 T細胞、CD8T細胞のどちらもPerforin・Granzyme B強陽性の細胞傷害性T細胞の増加を反映していることが示唆され、CD26陰性T細胞の割合が増加した患者は初期治療時にステロイドやその他免疫抑制剤による効果が出にくいステロイド減量困難例である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：CD26 is a T cell costimulatory molecule, and CD26+ T cells have been suggested to be involved in the pathophysiology of diverse autoimmune diseases. Since the role of CD26 in the pathophysiology of SLE still remains to be elucidated, our objective is to characterize the CD26-positive or negative T cell subsets in SLE patients. Human CD4+ or CD8+ T cells were purified from PBMCs of SLE patients or healthy adult volunteers, and we examined the phenotypes of CD26-positive or negative subsets. In addition to CD8+CD26nega T cells, CD4+CD26nega T cells were also markedly increased in SLE patients, and these cells exhibited CD28negaCD57+PerforinhiGranzyme Bhi cytotoxic potential. It takes more than 24 months for the patients with a large number of these subsets to reduce the daily dose of prednisolone to less than 10 mg after the initial treatment, strongly suggesting that CD26nega cytotoxic T cells are involved in the pathophysiology of steroid-resistant SLE.

研究分野：免疫学

キーワード：CD26/DPPiV T細胞 SLE 自己免疫疾患 細胞傷害性T細胞 共刺激分子 ヒト免疫

1. 研究開始当初の背景

CD26 は DPPIV 酵素活性を有する多機能タンパクで、ヒト T 細胞の活性化を誘導する共刺激分子としても機能する。CD26 陽性 T 細胞は様々な免疫異常症の病態に関与していることが示唆され、多発性硬化症やバセドウ病、関節リウマチ、移植片対宿主病などでその炎症部位に CD26 陽性 T 細胞が多数浸潤していること、疾患重症度と相関することなどが報告されている。CD26 はヒト T 細胞の活性化マーカーでもあるが、申請者の研究グループは以前、全身性の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)では、末梢血中の CD26 陽性 T 細胞が予想に反して減少していることを見出している(J Rheumatol. 2002)。しかしながら、この T 細胞上の CD26 の発現低下が SLE の多様な病態といかに関係しているかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

SLE は発熱や全身倦怠感、皮膚の発疹や関節炎等の症状を伴う全身性の自己免疫疾患で、重症例ではさらに腎臓や中枢神経、血管などに障害が起こり症状は多岐にわたるが、その発症原因や発症機構の詳細は不明である。SLE の特徴として自己抗原の発生、抗核抗体の出現、Type I IFN 産生などによる自己免疫寛容の破綻があげられ、T 細胞の異常として、CD4 T 細胞では B 細胞の抗体産生を促進する濾胞性ヘルパー T 細胞や、炎症性細胞である Th17 細胞が増加している一方で、制御性 T 細胞が減少していること、CD8 T 細胞では Perforin/Granzyme 陽性の細胞傷害性エフェクター T 細胞が増加していることがこれまでに報告されている。

本研究では、多様な機能を有するヒト T 細胞共刺激分子 CD26 に着目し、これまでに SLE ではヒト T 細胞膜上の CD26 の発現が低下していることを見出したが、SLE においてこの CD26 の発現低下は何を意味するのか、T 細胞の CD26 の発現パターンが SLE の多様な病態や活動性を判断する新たな診断バイオマーカーとなりうるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト T 細胞の調製

順天堂大学医学部研究等倫理委員会、順天堂大学医学部附属浦安病院倫理委員会および東北大学大学院医学系研究科倫理委員会での承認を得て、インフォームド・コンセントを以て得られた成人健常者および SLE 患者の末梢血から、Ficoll 密度分離法により末梢血単核球(PBMC)を調製した。PBMC から T 細胞への精製には MACS(磁気細胞分離)システム(Miltenyi Biotec)を用いた。ヒト CD4 T 細胞、CD8 T 細胞への精製には、それぞれ human CD4⁺ T cell isolation kit, human CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi

Biotec)を使用し、それぞれ CD3⁺CD4⁺ が 97%以上、CD3⁺CD8⁺CD56^{neg}が 95%以上であることを FACSCalibur (BD Biosciences)にて確認した。

(2) 抗体と試薬

Flow cytometry には下記のヒト抗原特異抗体を用いた。CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD57, CCR6, CXCR3, CXCR5, KLRG1 に対する蛍光標識抗体は BioLegend より購入した。CD26, CCR7, Perforin, Granzyme A, Granzyme B に対する蛍光標識抗体は BD Biosciences より購入した。

(3) フローサイトメトリー

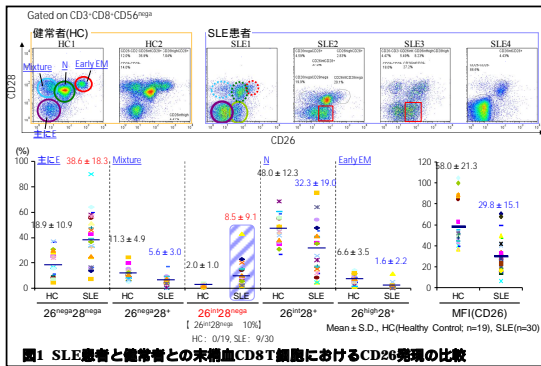
健常者及び SLE 患者の末梢血単核球から精製した CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の、細胞膜上の CD26 の発現、T 細胞サブセットマーカー、細胞傷害性エフェクター T 細胞マーカーの発現を解析した。Perforin, Granzyme A, Granzyme B の細胞内の発現に関しては、BD Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences)を用いて、付属のプロトコルに従い細胞内染色を行った。FACSCalibur で測定を行い、得られたデータを FlowJo (Tree Star)で解析した。

4. 研究成果

(1) 末梢血 CD8 T 細胞における CD26 発現

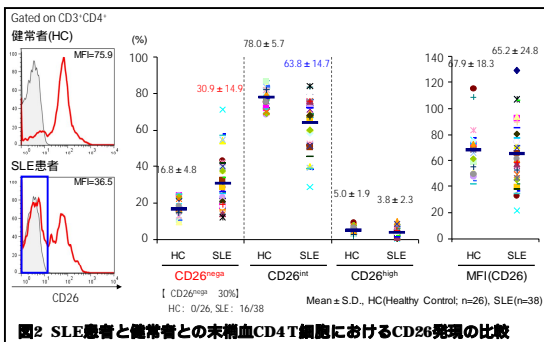
CD26 は健常者の末梢血 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞のどちらも高発現している CD26^{high}、中程度発現している CD26^{int}、発現していない CD26^{neg}の三相性の特徴的な発現パターンを示す。申請者の研究グループは以前、活動期の SLE 患者では末梢血中の CD26 陽性 T 細胞が減少していることを報告しているが(J Rheumatol. 2002)、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞それぞれの CD26 発現の詳細や、CD26 陽性/陰性 T 細胞の性質については解析がされていない。そこでまず、SLE 患者の末梢血 CD8 T 細胞における CD26 陽性率・陰性率、発現強度と、CD26 陽性/陰性細胞の機能・フェノタイプについて詳細な解析を行った。

図 1 上部(HC1・2)に示すように、健常者の末梢血 CD8 T 細胞における CD26 と代表的な T 細胞共刺激分子である CD28 の発現パターンを解析すると、CD26^{high}CD28⁺・CD26^{int}CD28⁺・CD26^{neg}CD28⁺・CD26^{neg}CD28^{neg}の 4 つの細胞集団に大別される。一方、SLE 患者の末梢血 CD8 T 細胞の CD26 と CD28 の発現パターンは図 1 上部(SLE1-4)に示すように、患者によって非常に多様な発現パターンを示すことが明らかになったが、共通した傾向として CD26^{high}CD28⁺と CD26^{int}CD28⁺の割合が減少し、CD26^{neg}CD28^{neg}が増加していることが示された(図 1)。また、健常者の末梢血 CD8 T 細胞中にはほとんど見られない CD26^{int}CD28^{neg}の細胞集団が SLE 患者 30 例中 9 例で CD8 T 細胞中 10%以上存在



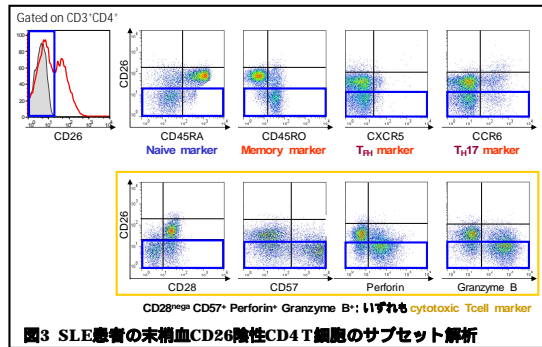
することが示された(図 1)。CD8 T 細胞の役割は細菌やウイルスに感染した細胞やがん細胞を体内から除去することであり、その細胞傷害活性に中心的な役割を果たす Perforin, Granzyme A・B の発現を解析した結果、SLE 患者の末梢血中で増加していた CD26^{neg} CD28^{neg} と、一部の SLE 患者で発生していた CD26^{int}CD28^{neg} はどちらも Perforin 強陽性 Granzyme A 陽性 Granzyme B 陽性のエフェクター細胞であることが示された(データ未掲載)。以上のように、SLE 患者の末梢血 CD8 T 細胞における CD26 の発現変化は、Perforin と Granzyme B をどちらも発現した Late effector memory・Terminal effector の割合の増加と、Naive・Early effector memory の割合の減少を反映しており、それにもとない CD26 強陽性、CD26 弱陽性が減少し、CD26 陰性が増加していると考えられた。

(2) 末梢血 CD4 T 細胞における CD26 発現
同様に SLE 患者と健常者の末梢血 CD4 T 細胞における CD26 の発現解析を行った。CD26 強陽性の割合と CD4 T 細胞全体の CD26 の発現強度に関しては SLE 患者と健常者との間に有意差はなかったが、38 例中 16 例の SLE 患者で CD4 T 細胞中に健常者では見られないレベルの CD26 陰性の増加と CD26 弱陽性の減少が見られた(図 2)。



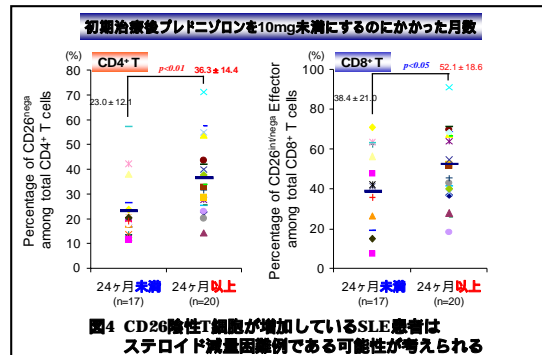
そこで、この SLE 患者の末梢血中で増加していた CD26 陰性 CD4 T 細胞のサブセット解析を行った結果、ほとんどが CD45RA 陰性 CD45RO 陽性の抗原感作された細胞であることが示されたが、Th17 細胞や濾胞性ヘルパー T(T_H)細胞のマーカーである CCR6, CXCR5 はあまり発現しておらず、一方で

CD8 T 細胞において Terminal effector のマーカーとされる CD28 陰性 CD57 陽性を多く含み、さらに Perforin と Granzyme B も強陽性であることを明らかにした(図 3)。このことから、SLE 患者の末梢血中で増加している CD26 陰性 CD4 T 細胞は、健常者の末梢血 CD4 T 細胞中にはほとんど存在しない細胞傷害活性を有する細胞であることが示唆された。



(3) CD26 陰性 T 細胞の増加と SLE 病態との関係性について

これまでの結果から、SLE 患者の末梢血 T 細胞中の CD26 陰性の割合の増加は、CD8 T 細胞、CD4 T 細胞ともに細胞傷害性のエフェクター T 細胞の増加を示唆していることが示された。そこで CD26 陰性 T 細胞の増加が SLE の病態といかに関係しているか、腎炎・関節炎・中枢神経炎などの病型や活動性、血清中の抗二本鎖 DNA 抗体価、補体価、IFN- α 濃度などの相関を解析した結果、それらの臨床情報との明白な相関は認められなかった(データ未掲載)。一方で、初期治療後にプレドニゾロン(ステロイド)を 10mg 未満にするのに 24 カ月以上かかりステロイドを減量することが困難であった SLE 患者では、CD4 T 細胞中の CD26 陰性の割合が有意に高いことが示された(図 4)。また、CD8 T 細胞においてもプレドニゾロンを 10mg 未満にするのに 24 カ月以上かかった SLE 患者では、Perforin 陽性 Granzyme B 陽性の細胞傷害性エフェクター細胞の割合が高いことが示された(図 4)。



初発または再発で来院した寛解導入療法を行う前の、末梢血中の CD26 陰性 T 細胞の割合が顕著に高かった活動期の SLE 患者が、ステロイドと免疫抑制剤による治療を受け

て症状や抗核抗体などの血清学上の異常が見られなくなった後、末梢血中 T 細胞の CD26 発現を解析すると、血清学上の各項目が健常者と同等の正常値まで改善している非活動期の SLE 患者では、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに健常者と同程度の CD26 陽性率、発現パターンに変わっていることが示された(データ未掲載)。

以上の結果から、SLE 患者の末梢血 T 細胞における CD26 陽性率の低下は、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞のどちらも Perforin 強陽性 Granzyme B 陽性の細胞傷害性 T 細胞の増加を反映していると考えられ、また、それらは初期治療時にステロイドやその他免疫抑制剤による効果が出にくいステロイド減量困難例に多く見られることが示唆された。このことは、末梢血 T 細胞の CD26 発現パターン解析が SLE の病態診断に応用しうることを示唆している。今後、これらの細胞が何故特定の SLE 患者で増加しているのか、ステロイドや免疫抑制剤、T 細胞活性化刺激に対する応答性を解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件) 全て査読有

Ohnuma K, Hatano R, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Iwao N, Kaneko Y, Yamada T, Dang NH, Morimoto C. A novel role for CD26/dipeptidyl peptidase IV as a therapeutic target. *Front Biosci*, 23: 1754-1779, 2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29772527>

Ohnuma K, Hatano R, Itoh T, Iwao N, Dang NH, Morimoto C. Role of IL-26+CD26+CD4 T cells in pulmonary chronic graft-versus-host disease and treatment with caveolin-1-Ig Fc conjugate. *Crit Rev Immunol*, 36: 239-267, 2016.

doi:10.1615/CritRevImmunol.2016018772.

Ohnuma K, Hatano R, Morimoto C. DPPIV in anti-tumor immunity: going beyond the enzyme. *Nat Immunol*, 16: 791-2, 2015.

doi: 10.1038/ni.3210.

Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Regulation of Pulmonary Graft-versus-Host Disease by IL-26+CD26+CD4 T Lymphocytes. *J Immunol*, 194: 3697-712, 2015.

doi: 10.4049/jimmunol.1402785.

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*, 194: 960-72, 2015.

doi: 10.4049/jimmunol.1402143.

[学会発表] (計 5 件)

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. 全身性エリテマトーデスのステロイド治療抵抗性と CD26 陰性 T 細胞サブセットとの関係性について. 第 61 回日本リウマチ学会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2017 年 4 月 20-22 日

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. CD26 陽性 T 細胞サブセットに基づく全身性エリテマトーデスの病態解析. 第 60 回日本リウマチ学会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016 年 4 月 22-24 日

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、ホテル日航金沢(石川県金沢市)、2015 年 10 月 16-18 日

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、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015 年 4 月 23-25 日

波多野良, 大沼圭, 岩田哲史, 石井智徳, 関川巖, 森本幾夫. IL-10 産生誘導による CD26 共刺激経路の negative feedback 機構の解析. 第 58 回日本リウマチ学会、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)、2014 年 4 月 24-26 日

[図書] (計 2 件)

Hatano R, Ohnuma K, Yamada T, Okamoto T, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Iwao N, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. The use of the humanized anti-CD26 monoclonal antibody YS110 as a novel targeted therapy for refractory cancers and immune disorders. In: *Advances in Medicine and Biology*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, Editor: Leon V. Berhardt, Volume 129: Chapter 1: 1-44, 2018

Ohnuma K, Hatano R, Yamazaki H, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. CD26-targeted therapy: A new horizon in malignant pleural mesothelioma management. In: *Horizons in Cancer Research*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, Editor: Hiroto S. Watanabe, Volume 64: Chapter 6:

129-162, 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：抗ヒト CD26 モノクローナル抗体。
発明者：森本幾夫、波多野良、山田健人、大沼圭。

権利者：学校法人順天堂、学校法人埼玉医科大学。

種類：特許

番号：特願 2018-049308

出願年月日：2018 年 3 月 16 日

国内外の別：国内

名称：抗ヒト IL-26 抗体。

発明者：森本幾夫、波多野良、大沼圭、伊藤匠。

権利者：学校法人順天堂

種類：特許

番号：特願 2017-231439

出願年月日：2017 年 12 月 1 日

国内外の別：国内

名称：抗 CD10 抗体。

発明者：水谷奈津子、阿部雅明、松岡周二、樋野興夫、大辻奈穂美、波多野良。

権利者：学校法人順天堂、日本抗体医薬株式会社。

種類：特許

番号：特願 PCT/JP2017/023104

出願年月日：2017 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 2 件)

名称：免疫抑制剤。

発明者：森本幾夫、大沼圭、波多野良。

権利者：学校法人順天堂

種類：特許

番号：特開 2016-069314

取得年月日：2016 年 5 月 9 日

国内外の別：国外

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：森本幾夫、波多野良、山田健人、大沼圭。

権利者：学校法人順天堂

種類：特許

番号：特開 2015-030666

取得年月日：2015 年 2 月 16 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/immunity_cancer/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

波多野 良 (HATANO, Ryo)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任研究員

研究者番号：30638789

(2)研究協力者

石井 智徳 (ISHII, Tomonori)

関川 巖 (SEKIGAWA, Iwao)