

## 論文の内容の要旨

論文題目

### CD26 分子の T 細胞共刺激メカニズムの研究 ～CD26 分子の共刺激リガンドの探索～

指導教官 森本幾夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 内山 正彦

#### 【緒言】

活性化 T 細胞の表面抗原として確立された CD26 は、それ自身が細胞外に DPPIV (dipeptidyl peptidase IV) と呼ばれるペプチド分解酵素活性を有するユニークな細胞表面分子である。その発現は広範囲で腎、肝、腸管等の上皮細胞などに認められる。一方、末梢血リンパ球ではメモリー T 細胞上に発現されている。静止期 T 細胞上では CD26<sup>high</sup> の集団が重要な役割をはたしていることが知られている。この集団は CD45RO を発現するメモリー T 細胞に属し、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 細胞の抗体産性を誘導し、MHC クラス 1 特異的なキラー T 細胞の誘導活性も持つ。さらに CD26 陽性 T 細胞は IL-2、IFN- $\gamma$  などのサイトカインを分泌する T<sub>H</sub>1 型の細胞である。この細胞集団は血管内皮細胞間で最も強い遊走能を持ち、炎症部位への移動、集積を起こし炎症局所でも重要な役割を果たしている。ヒト CD26 遺伝子は 766 個のアミノ酸よりなる 110kDa の膜タンパク質で、細胞内領域のアミノ酸は 6 残基のみで、膜通過部分が 22 残基、細胞外部分が 738 アミノ酸と、そのほとんどが細胞外に存在する。CD26 分子は、TCR からの抗原特異的な 1 次シグナルと同時に CD26 特異抗体で刺激することによって抗原非特異的な 2 次シグナルを伝え、T 細胞活性化を誘導する、いわゆる共刺激分子である。しかしながら、CD26 は T 細胞の活性化シグナル伝達機構に直接関与し

ているが、従来、CD26 分子を介した T 細胞の活性化は CD26 特異抗体を用いて誘導され、いわゆるその対応する natural ligand は同定されていない。近年、これらの候補として当研究室は、破傷風トキソイド処理した単球上の caveolin-1 が CD26 と結合することを報告し、CD26 陽性 T 細胞が破傷風トキソイドなどのメモリー抗原に反応して活性化するメカニズムの一面が明らかになった。その一方で、APC 上の caveolin-1 を介した T 細胞と APC の相互作用が、CD26 による T 細胞共刺激活性をもたらすかどうかは明らかにされていない。そこで、本研究においては、caveolin-1 が T 細胞上の CD26 の共刺激リガンドとして機能しうるか検討した。

## 【方法と材料】

### 1. Caveolin-1-Fc 融合タンパクの作成

ヒト IgG<sub>1</sub>-Fc 融合タンパク発現プラスミドは、ヒト IgG<sub>1</sub>-Fc 領域 (hu Fc  $\gamma_1$ ) とヒト E-cadherin のシグナルペプチド領域 (hu ECDSP) を PCR で作成し、pEB6-CAG ベクターの *Sal* I と *Eco*R I サイトに組み込んだ (pEB6-CAG-hu ECDSP-Fc  $\gamma_1$ )。Caveolin-1-Fc 融合タンパク発現プラスミドは、ヒト caveolin-1 の細胞外領域 (N 端側の 1~101 アミノ酸残基まで) を PCR で作製し、pEB6-CAG-huECDSP-Fc  $\gamma_1$  ベクターの hu ECDSP と hu Fc  $\gamma_1$  の間の *Hind* III サイトに読み枠が合うようにクローニングした。

Caveolin-1-Fc 融合タンパクの大量精製は、 $1.0 \times 10^7$  の FreeStyle 293-F 細胞に  $20 \mu\text{g}$  のプラスミドコンストラクトを 293fectin™ 試薬にて導入、48 時間後に上清を回収した。以降、72 時間毎に上清を回収し、同時に、細胞濃度が  $1.0 \times 10^6$  /ml になるように継代し、プラスミド導入から 1 ヶ月にわたり、上清を回収し、凍結保存した。回収した上清からの Caveolin-1-Fc 融合タンパクの精製は、Protein A カラムを用いてアフィニティー精製を行った。精製した融合タンパクの確認は、SDS-PAGE と特異抗体によるウエスタンブロットにて行った。

### 2. Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる CD26 共刺激能の検討

ヒト CD26 全長遺伝子を導入した Jurkat 細胞安定株 (J.CD26wt) およびマウスプレ B 細胞安定株 (300-19-CD26wt)、破傷風トキソイドワクチン接種後 2 年以内の正常健康人 5 名の末梢血液から分離した T 細胞、及び、CD4+細胞、単球に対して、CD26 を介して Caveolin-1-Fc 融合タンパクが共刺激能をもたらすかど

うか、*in-vitro* costimulation 法により検討した。また、Caveolin-1-Fc 融合タンパクと CD26 の結合におけるアフィニティーの測定は Biacore 装置を用いた表面プラズモン共鳴による平衡化結合解析にて行った。

### 【結果】

まず、CD26 の共刺激リガンド候補であるタンパク caveolin-1 の細胞外領域を可溶化し、精製する試みを行った。pEB6-CAG ベクターをバックボーンベクターとして caveolin-1 の N 端側 1~101 残基を遺伝子組換え技術により、Caveolin-1-Fc 融合タンパクを発現するベクターを構築した。さらに、FreeStyle™ Expression System により、FreeStyle 293-F 浮遊細胞を振盪培養しながら継代し、継代ごとに回収した培養上清中に充分量の Caveolin-1-Fc 融合タンパクが分泌された。この培養上清から、プロテインAカラムによるアフィニティー精製により、native な caveolin-1 の N 端側タンパクと同等の機能を有する Caveolin-1-Fc 融合タンパクが、充分量精製できた。

次に、この Caveolin-1-Fc 融合タンパクを用いた共沈実験により、CD26 が共沈した。また、フローサイトメーターにより、Caveolin-1-Fc 融合タンパクは 300-19-CD26wt、及び、J.CD26wt と結合し、CD26 抗体によって結合がブロックされた。この結合には、caveolin-1 の N 末端ドメインのうち scaffolding domain (SCD) と呼ばれる 82-101 番目のアミノ酸残基が必要であることが、Caveolin-1-Fc の削除変異体 (SCD-Fc) を用いた実験によって判明した。さらに、Biacore 装置を用いて Caveolin-1-Fc と CD26 の結合アフィニティーを検討したところ、結合定数  $K_d$  は  $2 \times 10^{-5} M$  と計算され、caveolin-1 と CD26 の結合が、動的な環境下においても 1 対 1 で結合することが示された。

次に、Caveolin-1-Fc 融合タンパクが、T 細胞活性化能を有するかどうか検討したところ、CD3 抗体 (OKT3) +Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる固層化刺激により、CD3 抗体+CD28 抗体 (4B10) あるいは CD3 抗体+CD26 抗体 (1F7) 刺激と同等の T 細胞の増殖及び IL-2 産生が認められた。さらに、CD3 抗体 +Caveolin-1-Fc の刺激は、CD26 抗体によってブロックされたが、CD28 抗体ではブロックされなかった。

ところで、メモリー抗原に対する T 細胞の抗原認識は、TCR が抗原ペプチドを結合した MHC クラス II 分子によって提示されることでおこなわれるが、この

T細胞はCD4+T細胞であり、CD26がメモリー抗原に対してもっとも強く反応する分画もCD4+T細胞分画である。そこで、ヒト末梢血からCD4+細胞を純化し、破傷風トキソイドをパルスした同一ドナーの純化単球と再混合する再構成実験によって、CD26とcaveolin-1の相互作用を検討した。まず、破傷風トキソイドを添加したところ、CD4+T細胞は強く増殖反応を示したが、再混合直前のCD4+T細胞をFc融合タンパクで処理し再構成実験を行ったところ、Caveolin-1-Fc融合タンパクによってT細胞増殖反応は抑制され、CTLA4-IgあるいはCD86抗体(IT2.2)による抑制効果と同等のT細胞増殖抑制が認められた。

#### 【考察】

CD26特異抗体を用いた共刺激実験によって、CD26がCD3の共刺激シグナルを伝達しT細胞の増殖反応とIL-2産生を増加させることが報告され、CD28とともに、新たな共刺激分子であることが示唆されていた。しかしながら、CD26の共刺激リガンドの同定には至っておらず、抗体刺激という特異な状況での反応ではないかという批判もされていた。今回、私は、caveolin-1がCD26の共刺激リガンドである可能性を検討した結果、Caveolin-1-Fc融合タンパクを用いて、Caveolin-1-Fcが細胞表面上のCD26と結合し、CD3抗体とともに刺激するとT細胞増殖やIL-2産生を増強することを示した。さらに、Caveolin-1-Fcが、きわめて強力なメモリー抗原応答性T細胞増殖反応抑制効果を示すことから、抗原特異的免疫応答におけるCD26・caveolin-1の相互作用によるブロックが、Caveolin-1-Fc融合タンパクによってもたらされる可能性を示唆した。TNFR (tumor necrosis factor receptor) -Fc (エタネルセプト) やCTLA4-Ig (アバタセプト) などの生物学的製剤がすでに関節リウマチの治療薬として臨床応用されているが、今後はCaveolin-1-Fcの治療応用についても検討をしてゆきたい。また、本研究で精製したCaveolin-Fc融合タンパクは、CD26と結合するのみならず、DPPIV酵素活性を抑制する効果を有していることが判明した。CD26/DPPIVはインスリン分泌促進ホルモンGLP-1 (glucagon-like peptide 1) を分解するため、DPPIV阻害剤は、現在、糖尿病の治療薬として開発が進んでおり、一部の薬剤では第III相試験が進行している。そこで、SCD-Fcなどの融合タンパクも今後、糖尿病の治療薬として応用できるかどうかとも検討する予定である。