

審査の結果の要旨

氏名 内山 正彦

本研究は、ヒト・メモリー/エフェクターT 細胞において重要な役割を演じていると考えられる CD26/dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) の T細胞活性化機構における共刺激リガンドを明らかにするため、CD26 の結合分子である caveolin-1-Fc 融合タンパクの作成・精製、および、それらの T細胞における CD26 を介した共刺激の分子機構の解明、機能解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 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、精製するため、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 浮遊細胞に Caveolin-1-Fc 発現プラスミドを遺伝子導入し、培養上清中に充分量の Caveolin-1-Fc 融合タンパクが分泌され、プロテイン A カラムによるアフィニティー精製により精製した Caveolin-1-Fc 融合タンパクが内在性の caveolin-1 と結合するが、clathrin とは結合しないなど、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 融合タンパクの精製に成功した。
2. Caveolin-1-Fc 融合タンパクを用いた共沈実験により、Caveolin-1-Fc と CD26 が共沈することが示された。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 (ヒト CD26 の全長を安定に発現したマウスプレ B 細胞トランスフェクタント)、及び、J.CD26wt (ヒト CD26 の全長を安定に発現した Jurkat 細胞トランスフェクタント) と結合し、CD26 抗体によって Caveolin-1-Fc 融合タンパクの結合がブロックされることが示された。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 の削除変異体を用いた実験によって示された。さらに、Biacore 装置を用いた Caveolin-1-Fc と CD26 の結合アフィニティー解析により、結合定数 K_d は $2 \times 10^{-5} M$ と計測され、caveolin-1 と CD26 の結合が、動的な環境下においても直接結合することが示された。
3. Caveolin-1-Fc 融合タンパクが CD26 と結合するだけでなく、CD26 の DPPIV 酵素活性を抑制するかどうか検討した結果が示された。まず、遺伝子組換えにより作製し

た可溶性 CD26 タンパクに対し、DPPIV 阻害剤 Valine-pyrrolidide (Val-Pyr) を添加し DPPIV 酵素活性を計測したところ、Val-Pyr の濃度依存性に DPPIV 酵素活性が阻害され、50%抑制濃度 IC₅₀ が 3 μM と示され、従来の報告である 2.4 μM とほぼ同程度であることが示された。次に、可溶性 CD26 に NT-Fc を添加して DPPIV 酵素活性を検討したところ、Val-Pyr と同様に、NT-Fc の濃度依存的に DPPIV 酵素活性が抑制され IC₅₀ は、15 μM という結果が示された。以上の結果より、Caveolin-1-Fc 融合タンパクは CD26 と結合するのみならず、CD26 の DPPIV 酵素活性を抑制することが示された。

4. Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる T 細胞増殖能を正常健人末梢血 T 細胞と J.CD26wt 細胞を用いて検討した結果、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 細胞増殖及び IL-2 産生をもたらすことが示された。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ず、Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる T 細胞共刺激は CD26 特異的な刺激の結果もたらされる可能性が示された。
5. 正常健人末梢血から 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から純化した CD14+単球と再混合する再構成実験を行って、CD26 と caveolin-1 の相互作用を検討した。その結果、破傷風トキソイドを添加した場合、正常に 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 細胞増殖抑制がもたらされることが示された。

以上、本論文は、CD26 の新たな結合分子 caveolin-1 を同定し、それらの結合ドメインを介した、CD26 と caveolin-1 の結合によってもたらされる CD26 陽性メモリー T 細胞において、CD26 が共刺激分子として機能することが、Caveolin-1-Fc 融合タンパクを用いて明らかにした。本研究は、これまで未知に等しかった、CD26 の共刺激リガンド候補を同定し、CD26 陽性メモリー T 細胞の細胞生物学的な活性化機構を解明し、メモリー抗原に対する T 細胞の免疫応答およびその後には生じる炎症反応の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。