

論文の内容の要旨

論文題目

ヒト T 細胞における CD26 分子の機能解析

指導教員 森本幾夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

高橋 希

【背景と目的】

CD26 分子は CD4 陽性 T 細胞がエフェクター機能を発揮するために重要な分子であり、T 細胞の活性化に伴いその発現が上昇し、TCR・CD3 複合体 (T cell receptor complex) からの活性化刺激を増強する共刺激分子である。さらに、CD26^{high}CD4 陽性 T 細胞は Th1 タイプの細胞で、強力な血管内皮間遊走能を有し、炎症部位に最も遊走しやすいサブセットであり、関節リウマチなどの自己免疫疾患や移植後拒絶反応、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) などの免疫異常症に関与し、病変部位に集積することが知られている。現在までのところ、上述した炎症のエフェクター機構を制御する治療法として、副腎皮質ステロイド剤、サイクロスポリン、タクロリムス、抗胸腺細胞抗体、OKT3 モノクロナール抗体などが使用されている。しかしながら、これらの免疫抑制剤はいずれも免疫系全体を抑制するため、CMV 感染症や EBV 関連リンパ球増殖症、真菌症などの重篤な日和見感染症を惹起し、治療成績の低下につながっている。そのため、同種移植免疫異常の特異的、選択的な治療法の開発が急務となっており、CD26 陽性 T 細胞や CD26 分子の機能の理解をさらに深めることは、これら免疫異常症の病態特異的な治療法の確立につながると考えられる。

当研究室はこれまで、エフェクター T 細胞における CD26 の機能について研究してきた。CD26 は、DPPIV (dipeptidyl peptidase IV) というペプチダーゼ活性

をもつ 110 kDa の膜糖タンパク質で、特に CD4 陽性 T 細胞における CD45RO 陽性メモリー細胞に高発現している。また、CD26 分子は、TCR からのシグナルを補助的に増強する共刺激分子のひとつであり、T 細胞の活性化に伴う増殖や IL-2 産生の他、様々な T 細胞機能に関与している。この分子メカニズムとして、CD4 陽性 T 細胞上の CD26 に、抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) 上の caveolin-1 が結合することで、CARMA1 (caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1) を介したシグナルが惹起されることが当研究室から報告されている。

しかし、健常成人末梢血液中の T 細胞が CD26 共刺激によってどのように活性化するかについては、未だに詳細な知見が得られておらず、さらに、CD8 陽性 T 細胞における CD26 の機能についても解明されていない。また、当研究室はこれまでに、臍帯血 T 細胞における CD26 共刺激の応答性が成人末梢血 T 細胞に比べて低く、その原因が CD45RA と関連している可能性を報告したが、臍帯血 T 細胞での CD26 の細胞生物学的な機能については、未だに不明である。そこで、本研究ではこれらの点に着目し、CD26 共刺激による成人末梢血 T 細胞の活性化と、臍帯血 T 細胞における CD26 共刺激の低応答性について検討した。

【方法】

1. 単核球および T 細胞の調製

成人末梢血、臍帯血から、Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS) を用いた密度勾配遠心法により、単核球を分離した。さらに、単核球から MACS (magnetic cell sorting) により T 細胞を分離した。

2. フローサイトメトリー

成人末梢血、臍帯血由来の単核球、T 細胞を目的分子に対する抗体で染色した。その後、FACSCalibur、FACSAria (BD Biosciences) にて目的分子の発現強度を測定し、得られたデータを FlowJo (Tree Star Inc.) により解析した。

3. 成人末梢血 T 細胞の培養と抗体刺激による活性化誘導

MACS により分離した成人末梢血 T 細胞を、抗 CD3 抗体 (OKT3)、抗 CD28 抗体 (4B10)、抗 CD26 抗体 (1F7) で底面をコートした 96 穴平底プレート中で

培養した。培養後の T 細胞について、CFSE の蛍光強度を測定することにより、細胞の分裂様式を解析した。また、培養後の上清を回収し、ELISA によりサイトカイン産生量を測定した。

4. 制御性 T 細胞 (Treg) による抑制効果の検討

MACS により分離した CD25⁺CD4 陽性 T 細胞を Treg とし、Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander (Invitrogen Corp.)、APC (γ 線 30 gray を照射し、さらに 50 μg/ml mitomycin C を処理した単核球) 存在下、96 穴丸底プレート中で CD25⁻CD4 陽性 T 細胞と共培養した。培養終了の 16 時間前に ³H-thymidine を 37 kBq/well 加えた。培養終了後、細胞を回収し、取り込まれた ³H の放射線量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【結果】

健常成人末梢血由来の CD3 陽性 T 細胞について、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体、または抗 CD3 抗体 + 抗 CD26 抗体で刺激した場合における T 細胞分裂、および IL-2 産生について検討した。その結果、CD28 共刺激の場合は、刺激後 1 日で IL-2 の産生が顕著に確認され、さらに刺激後 3 日目から細胞分裂が確認された。一方、CD26 共刺激の場合は、刺激後 2~3 日目から徐々に IL-2 産生が増加し始め、さらに刺激後 3~4 日目から細胞分裂が確認された。このとき、刺激後 1 日目における CD69 の発現パターンを解析すると、CD28 共刺激と CD26 共刺激それぞれにおいて発現が増加していた。次に、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、抗 CD26 抗体を同時に処理した場合における CD3 陽性 T 細胞の活性化様式について解析した。その結果、CD28 共刺激の場合と比較して、CD28・CD26 同時共刺激では IL-2 産生、細胞分裂ともに増加することが示された。

次に、CD26 共刺激による CD8 陽性 T 細胞の活性化について、サイトカイン産生を指標に検討した。その結果、既知であった CD4 陽性 T 細胞のみならず、CD8 陽性 T 細胞も CD26 共刺激により活性化し、IL-2、IFN-γ、TNF を産生することが示された。また、CD8 陽性 T 細胞における CD26 の発現パターンについて解析した結果、CD26 の発現パターンは、CD26^{high}、CD26^{intermediate} (CD26^{int})、CD26^{nega} の三相性を示した。さらに、CCR7、CD45RA の発現量により、CD8 陽性 T 細胞をナイーブ、エフェクター、エフェクターメモリー、セントラルメモリーの 4 種のサブセットに分類し、それぞれにおける CD26 の発現パターンにつ

いて解析した結果、エフェクターメモリー細胞の一部が CD26^{high} 細胞であること、および、ナイーブ細胞が CD26^{int} 細胞であることが示された。

一方、臍帯血 T 細胞について、フローサイトメトリーによりサブセット解析した結果、CD25^{high}CD45RA⁺CD4 陽性 T 細胞は CD26 陽性であることが明らかになり、さらに FOXP3 を発現していたことから、この細胞は制御性 T 細胞 (Treg) であることが示唆された。また、この臍帯血 Treg が成人末梢血 Treg と同様に、CD25⁻CD4 陽性 T 細胞の活性化を抑制するかについて検討した結果、静止期の臍帯血 Treg は成人末梢血 Treg と比べて抑制機能が弱く、FOXP3 の発現も低いことが示された。しかし、増殖培養した後の臍帯血 Treg では、成人末梢血 Treg と同様に CD25⁻CD4 陽性 T 細胞の活性化を抑制し、FOXP3 の発現も増強していることが示された。

【考察】

本研究により、CD26 共刺激による成人末梢血 T 細胞の活性化様式は、CD28 共刺激の場合と比べて大きく異なることが明らかになり、特に IL-2 産生と細胞分裂が誘導されるまでに、数日間の遅れが生じることが示された。さらに、CD28 共刺激時に CD26 からのシグナルを加えると、IL-2 産生と細胞分裂が促進されることも明らかになった。これらの結果から、生体内における CD26 共刺激の意義は、CD28 共刺激との相互作用により、メモリー抗原に対する免疫応答を増強することにあると考えられる。また、CD26 は CD4 陽性 T 細胞のみならず、CD8 陽性 T 細胞においても共刺激分子として機能することが示唆された。CD8 陽性 T 細胞は、GVHD 等の免疫異常症において炎症のエフェクターとして機能していることから、今後は免疫不全マウスにヒトの PBL (peripheral blood lymphocyte) を移植することで異種 GVHD を発症させるモデルを作製し、CD26 陽性 T 細胞が炎症のエフェクターとしてどのように機能しているかという点について、*in vivo* の実験系で検討する予定である。

一方、本研究により、静止期の臍帯血 Treg は抑制機能が弱い、増殖刺激を受けることで強力な抑制機能を獲得することが示された。このことから、臍帯血 T 細胞における CD26 共刺激の低応答性は、共刺激によって Treg の抑制機能が増強されることに由来する可能性が示唆された。今後はさらに研究を重ね、CD26 が免疫制御に関与する可能性についても検討したいと考えている。