

論文の内容の要旨

論文題目

ヒト T 細胞共刺激分子 CD26 を分子標的とした新規免疫制御療法の開発に関する基盤研究

波多野 良

CD26 は多様な細胞に発現し様々な機能を持つ分子であり、ヒト T 細胞においては共刺激分子として機能して、その活性化に重要な役割を果たすことが明らかになっている。また、CD26 陽性 T 細胞は、関節リウマチや多発性硬化症、移植片対宿主病 (Graft-Versus-Host Disease; GVHD) など多くの免疫系疾患で炎症部位への集積が認められるとの報告があり、病態への関与が示唆されている。

これまでに当研究室では、CD26 はヒト CD4⁺ T 細胞の活性化マーカーであり、CD26 強陽性の CD4⁺ T 細胞はメモリー抗原に対して非常に強く応答するサブセットであること、CD26 は T 細胞受容体からのシグナルと協調的に T 細胞活性化を促す共刺激分子であり、そのシグナル伝達機構として CD26 の細胞内ドメインに CARMA1 が動員され CARMA1/Bcl10/MALT1 の複合体を形成、IKK 複合体との相互作用により NF- κ B の活性化が誘導されることを明らかにしてきた。また、CD26 のリガンドとして Caveolin-1 を同定し、CD26 と Caveolin-1 との相互作用は、T 細胞に活性化シグナルを伝達すると同時に、抗原提示細胞上の CD86 (CD28 のリガンド) の発現を増強させることも明らかにした。このようにヒト免疫系における CD26 の研究が進められてきた一方で、マウス CD26 では共刺激分子としての機能は報告されておらず、また、ヒトとマウスとでは CD26 の免疫系での役割が異なることも示唆されている。

以上の理由により、ヒト免疫異常症の治療を目指した CD26 の研究に CD26 ノックアウトマウスを用いることはできず、ヒト T 細胞を用いた研究システムの構築が必須であった。そこで、ヒト T 細胞が炎症のエフェクター細胞として働く簡便な病態モデルとして、異種 GVHD モデルマウス (HuPBL-NOG マウス) の系を用い、ヒト T 細胞共刺激分子 CD26 を分子標的とした新規免疫制御療法の可能性について検討を行った。

1. 免疫疾患モデルにおけるヒト化抗 CD26 抗体の有用性の評価

重度の免疫不全のフェノタイプを示す NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic) マウスにヒト末梢血単核球を移入すると、毛並みの悪化、背骨の歪曲、運動性の低下とともに急激な体重減少を起こし死に至る GVHD 様の症状が認められた。本モデルの原因細胞を同定するため、ヒト CD4⁺ T 細胞または CD8⁺ T 細胞に精製してから NOG マウスへの移入を試みた。CD4⁺ T 細胞・CD8⁺ T 細胞の両方を移入した群はすぐに急激な体重減少を起こして死

に至ったのに対し、CD4⁺T細胞単独では緩やかな体重減少と脱毛は見られたが観察期間中ほとんどのマウスが生存し、CD8⁺T細胞単独ではほとんどの個体で体重減少やGVHD様の症状も認められなかった。これらの結果から、本モデルにおいてCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の両者が共存することで重度の異種GVHDが誘発されることが示された。このHuPBL-NOGマウスにヒト化抗CD26抗体または関節リウマチの治療薬として既に実用化されているCD28共刺激阻害剤CTLA4-Ig (Abatacept)の投与を行った結果、抗CD26抗体の投与によりヒトT細胞がマウス体内に生着しているながらCTLA4-Igを投与した場合と同程度の生存期間の延長と体重減少の軽減が認められた。CTLA4-Igを投与した場合には、投与量依存的な異種GVHDの発症予防効果が認められた反面、高用量(2 mg/body)投与したマウスでは移植ヒトT細胞の生着もほとんど阻害されることが示された。GVHD標的臓器の病理組織学的解析から、本モデルにおける主な死因としてドナーT細胞による肝機能障害が予測され、抗CD26抗体投与群では肝臓へのリンパ球浸潤が明らかに軽減されていることが示された。CD26分子の病態への関与を明らかにするため、マウス血中ヒトT細胞のCD26の発現を経時的に解析した結果、薬剤非投与群およびコントロール抗体投与群ではヒトCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ともに移植初期にCD26の発現が移植前よりも顕著に増強していることが示された。一方、抗CD26抗体投与群では、移植初期にマウス血中および脾臓に生着したヒトT細胞は細胞膜上でのCD26の発現が検出できないことが示され、抗体が結合することで膜上から細胞質へCD26が移行したと考えられた。さらに、CFSEで蛍光標識したヒト末梢血単核球をマウスに移入して脾臓に生着したヒトT細胞の細胞分裂を解析した結果、抗CD26抗体はCD4⁺T細胞以上に移植初期におけるCD8⁺T細胞の分裂を強く抑制した一方で、CTLA4-IgはCD8⁺T細胞と同様にCD4⁺T細胞に対しても非常に強い細胞分裂抑制作用を示すことが明らかになった。

本節の結果から、ヒトT細胞をNOGマウスに移入する異種GVHDモデルにおいて、ヒトCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ともに移植初期にCD26の発現が顕著に増強しており、細胞分裂の解析結果から、抗CD26抗体はCD4⁺T細胞だけでなくCD8⁺T細胞の活性化抑制にも強く作用すると考えられた。

2. CD26共刺激によって獲得するヒトCD8⁺T細胞のエフェクター機能の解析

これまでにCD4⁺T細胞におけるCD26分子の機能解析が進められてきた一方で、CD8⁺T細胞におけるCD26分子の役割については未だ解明されていない部分が多い。そこで、ヒトCD8⁺T細胞におけるCD26共刺激の役割、中でもエフェクター機能との関係について重点的に解析を行った。

ヒトCD8⁺T細胞は、CD4⁺T細胞と同様にCD26強陽性、弱陽性、陰性の三相性の発現パターンを示す。そこで、まずヒト末梢血CD8⁺T細胞の中でCD26陽性細胞はナイーブ・メモリー・エフェクターのいかなる分化段階に属するのかをフローサイトメトリーにて解析した。細胞表面マーカー(CD28/CD45RA/CCR7)および細胞傷害における主要なエフェ

クター分子である Perforin (PRF) /Granzyme (Gzm) の発現パターンを解析した結果、CD26 強陽性はほとんどが CD28⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻、PRF^{int} GzmA⁺ GzmB^{low} でありエフェクターメモリーに属すること、CD26 弱陽性はほとんどが CD28⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺、PRF⁻ GzmA⁻ GzmB^{low} でありナイーブに属することが示され、CD26 強陽性と CD26 弱陽性は明確に異なる分化段階の細胞集団であることが示された。また、CD26 陰性にはナイーブ・メモリー・エフェクターのいずれもが混在していた。

次に、抗 CD3 抗体と抗 CD26 抗体による固相化刺激で活性化されたヒト CD8⁺ T 細胞の増殖性およびエフェクター分子の発現を解析した。³H-チミジン取込み量の測定および CFSE ラベルによる細胞分裂の解析から増殖性の評価を行なった結果、代表的な共刺激である CD28 共刺激と比較すると、CD26 共刺激による CD8⁺ T 細胞の増殖誘導は培養 3 日の時点では弱かったが、5 日の時点では同程度であることが示された。次に、刺激後の PRF、GzmA および GzmB の発現をフローサイトメトリーにて解析した結果、CD26 共刺激、CD28 共刺激どちらの場合でも GzmB の発現亢進が認められたが、CD26 共刺激は CD28 共刺激と比較していずれの刺激強度、いずれの刺激時間でも GzmB の発現を顕著に増強させることが示された。また、培養上清中のサイトカインを定量した結果、CD26 共刺激により TNF- α 、IFN- γ および可溶性 Fas Ligand を非常に強く産生した一方で、IL-2 や IL-5 の産生量は CD28 共刺激と比較して明らかに低かった。さらに、CD26 共刺激による GzmB や TNF- α 、Fas Ligand といった細胞傷害性因子の顕著な発現の誘導が、機能的に意義のあるものかを確かめるため、細胞傷害活性の評価を行った。CD26 共刺激または CD28 共刺激によって活性化したヒト CD8⁺ T 細胞とヒト組織球性リンパ腫患者由来単球系細胞株 U937 細胞との混合リンパ球反応を行なった結果、CD26 共刺激によって活性化された CD8⁺ T 細胞は CD28 共刺激と比較しても非常に強い細胞傷害活性を獲得していることが明らかになった。

以上の結果から、ヒト末梢血 CD8⁺ T 細胞において、CD26 はエフェクターメモリーに高発現、ナイーブに低発現しており、CD26 共刺激による活性化シグナルが伝達することで GzmB の発現が顕著に亢進し、炎症性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ および可溶性 Fas Ligand の産生が選択的に増強し、非常に強い細胞傷害活性を獲得することが明らかになった。

本研究の結果から、GVHD や自己免疫疾患などの難治性免疫系疾患において抗 CD26 抗体は CD28 共刺激阻害剤とは異なる機序で免疫制御に機能する可能性が示された。また、これまで未解明であったヒト CD8⁺ T 細胞のエフェクター機能獲得における CD26 共刺激の役割の一端が明らかになった。これらの結果から、CD8⁺ T 細胞による組織障害が発症に強く関与すると考えられる疾患に対して、CD26 に基づいた病態の解明と新規治療法開発を目指したトランスレーショナルリサーチが期待される。