

【課程-2】

審査の結果の要旨

氏名 波多野 良

本研究は、T細胞の制御破綻が原因で発症する難治性の免疫異常症に対する、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を目的とし、マウスにヒトリンパ球を移入する異種移植片対宿主病（GVHD）の病態モデルを用いて、当研究室で作製に成功したヒト化抗CD26抗体のGVHD発症予防効果およびその詳細な作用機序の解明を試みた。また、これまで未解明であったヒトCD8陽性T細胞におけるCD26の役割に関しても解析を行い、下記の結果を得ている。

- 1-1. 重度の免疫不全のフェノタイプを示すNOGマウスにヒト末梢血単核球（PBMC）・Pan T細胞（CD4 T細胞、CD8 T細胞の両者）・CD4 T細胞・CD8 T細胞をそれぞれ移入して、異種GVHDを発症するドナー細胞サブセットの解析を行った。その結果、Pan T細胞を移入した群でもPBMC移入群と同様に急激な体重減少を起し、同時期に死に至ったことから、本病態モデルはドナー（ヒト）T細胞が原因となって発症することが確認された。また、CD4 T細胞、CD8 T細胞単独で移入した群ではどちらも重度のGVHD様の症状が認められなかったことから、重度のGVHDの発症にはCD4・CD8両T細胞が関与していることが示された。
- 1-2. NOGマウスにヒトPBMCを移入した翌日からヒト化抗CD26抗体を投与し、生存日数とマウス血中ドナー（ヒト）T細胞の割合を経時的に測定した。その結果、抗CD26抗体を低容量（マウス1個体あたり合計20 µg）投与した場合でも、生存日数の著明な延長が認められ、その効果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）を同量投与した場合と比べても遜色がないことが示された。また、抗CD26抗体は高容量（1個体あたり合計2 mg）投与した場合でも低容量投与した場合と変わらないドナーT細胞の生着が認められたのに対し、CTLA4-Igは高容量投与すると生着阻害に作用することが示された。
- 1-3. GVHD標的臓器の組織切片を作製し病理組織学的解析を行った結果、ヒトIgGコントロール抗体投与群では肝臓にドナー（ヒト）リンパ球が多数浸潤し、重度の組織障害が認められたのに対し、抗CD26抗体投与群ではリンパ球浸潤が顕著に抑制されていることが示された。肝臓へのリンパ球浸潤に関しては、CTLA4-Igには抗CD26抗体ほどの抑制作用はないことが示唆された。
- 1-4. マウス体内でのドナー（ヒト）T細胞のCD26の発現を経時的に解析した結果、マウス血中のドナーCD4 T細胞、CD8 T細胞ともにIgGコントロール抗体投与群では移入

1-2 週後の初期に CD26 の発現が移植前よりも顕著に増強することが示された。一方、抗 CD26 抗体投与群では、ドナー T 細胞膜上での CD26 の発現が消失していることが示され、抗体が結合することで膜上から細胞内へ移行したと考えられた。

1-5. NOG マウスに蛍光色素 (CFSE) でラベルしたヒト PBMC を移入し、抗 CD26 抗体および CTLA4-Ig を 1 週間投与した後、ドナー (ヒト) T 細胞の細胞分裂回数を解析した。その結果、抗 CD26 抗体はドナー CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の移植初期の細胞分裂をどちらも抑制したが、その作用は CD8 T 細胞に対して特に強いことが示された。一方、CTLA4-Ig はドナー CD8 T 細胞の細胞分裂を抗 CD26 抗体と同程度抑制するとともに、CD4 T 細胞に対しても非常に強い抑制作用を示すことが明らかになった。

2-1. 細胞表面マーカー (CD28・CD45RA・CCR7) および Perforin (PRF)・Granzyme (Gzm) の発現パターンからヒト末梢血 CD26 陽性 CD8 T 細胞の分化段階の解析を行った結果、CD26 強陽性は主に CD28⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻ かつ PRF^{int} GzmA⁺ GzmB^{low} であり早期エフェクターメモリーであること、CD26 弱陽性は主に CD28⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺ かつ PRF⁻ GzmA⁻ GzmB^{low} でありナイーブであることが示された。

2-2. 抗 CD3 抗体と抗 CD26 抗体または抗 CD28 抗体を用いてヒト末梢血 CD8 T 細胞を共刺激した後、Granzyme B の発現を解析した結果、CD28 共刺激と比較して CD26 共刺激により、いずれの刺激強度、刺激時間でも発現が顕著に増強することが示された。

2-3. 抗 CD3 抗体と抗 CD26 抗体または抗 CD28 抗体を用いてヒト末梢血 CD8 T 細胞を共刺激した後、ELISA によって培養上清中のサイトカインの定量を行った。CD28 共刺激と比較して CD26 共刺激により、TNF- α 、IFN- γ 、soluble Fas Ligand の産生が強く誘導された一方で、IL-2、IL-5 の産生誘導は弱いことが示された。

2-4. 抗 CD3 抗体と抗 CD26 抗体または抗 CD28 抗体を用いて共刺激したヒト末梢血 CD8 T 細胞の U937 細胞に対する細胞傷害活性を解析した結果、CD26 共刺激によって活性化されたヒト CD8 T 細胞は CD28 共刺激と比較して非常に強い細胞傷害活性を獲得していることが示された。

以上、本論文は異種 GVHD モデルにおいて、ヒト化抗 CD26 抗体は CD28 共刺激阻害剤 CTLA4-Ig とは異なる作用機序で GVHD の発症予防に働くことを明らかにした。また、ヒト CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能獲得における CD26 共刺激の役割についても新たな基礎的知見が得られた。本研究は、ヒト T 細胞が炎症のエフェクター細胞として働く病態モデルにおいてヒト化抗 CD26 抗体の有用性を初めて評価したものであり、CD26 に基づく免疫異常症の病態解明や新規免疫制御療法の開発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。