

201207015A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(創薬バイオマーカー探索研究事業)

悪性中皮腫のヒト化 CD26 抗体療法の確立及び化学療法剤の
有効性評価に有用な新規疾患関連バイオマーカーの開発

(H24-バイオ一般-003)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森本 幾夫

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

悪性中皮腫のヒト化 CD26 抗体療法の確立及び化学療法剤の有効性評価に 有用な新規疾患関連バイオマーカーの開発	1
-------------------------------------------------------------	---

研究代表者 森本 幾夫
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 客員教授

II. 分担研究報告

1. 悪性中皮腫組織の免疫染色に適した新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発	17
------------------------------------------	----

研究代表者 森本 幾夫
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 客員教授

研究分担者 山田 健人
慶應義塾大学医学部病理学教室 准教授

共同研究者 波多野 良
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 博士研究員

共同研究者 大沼 圭
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 准教授

2. CD26 陽性中皮腫の臨床像に関する研究	25
-------------------------	----

研究分担者 岸本 卓巳 岡山労災病院副院長
共同研究者 青江 啓介 山口宇部医療センター内科系診療部長
共同研究者 藤本 伸一 岡山労災病院第二呼吸器内科部長

3. 悪性中皮腫における CD26 発現の評価	33
-------------------------	----

研究分担者 山田 健人 慶應義塾大学医学部病理学教室 准教授

4. ヒト化 CD26 抗体投与患者検体の可溶性 CD26/DDP1V 酵素測定法の開発	37
----------------------------------------------	----

研究代表者 森本 幾夫
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 客員教授

共同研究者 大沼 圭
順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 准教授

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	49
-----------------	----

I. 総括研究報告

【悪性中皮腫のヒト化 CD26 抗体療法の確立及び化学療法剤の有効性評価に有用な新規疾患関連バイオマーカーの開発】

研究代表者 森本 幾夫 順天堂大学大学院医学研究科
免疫病・がん先端治療学講座 客員教授

研究要旨

本研究の目的は、CD26 陽性悪性中皮腫へのヒト化 CD26 抗体療法確立のため、腫瘍組織上の CD26 発現評価可能な抗体を開発し、コンパニオン診断薬及び血清中の可溶性 CD26/DPPIV 測定キットを確立し、更に CD26 発現評価が化学療法剤の治療効果予測因子のバイオマーカーになり得るかを決定することである。

免疫染色に適したコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発を行った。Urea buffer で変性処理を行った可溶性ヒト CD26 をマウスに免疫し、31 クローンが選出された。それらクローンの培養上清で免疫組織染色を検討した結果、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して明瞭に CD26 が検出される 2 クローンに絞り込むことができた。

悪性胸膜中皮腫の細胞膜における CD26 発現と臨床的要因との関連および生存解析を行った。CD26 発現群で化学療法の治療効果がより良好であった。また、CD26 陽性群で陰性群より予後が良好であった。しかしながら、今回の検討のみでは患者背景にかなりのばらつきがあるため、更に症例を追加してより条件の合致した 2 群の解析を行うことで CD26 発現の臨床像との関わりが明らかにできると考えられる。

中皮腫における CD26 発現の病理診断に有用な新規単クローン抗体が得られつつある。中皮腫における CD26 陽性率は、免疫染色において 73~100%であり、その細胞内局在の評価や陽性部位の面積により、陽性率に影響があることが判明した。

従来我々の開発した 2 つの異なった CD26 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法や市販の ELISA キットともに血清中の可溶性 CD26 はヒト化抗体存在下では測定不能であった。しかし 1F7、5F8、ヒト化 CD26 抗体と反応するエピトープとは異なる CD26 抗体 9C11 を同定し、これを用いることにより、ヒト化 CD26 抗体存在下でも可溶性 CD26 測定が可能なことが明らかになった。

研究分担者

岸本 卓巳：岡山労災病院・副院長

山田 健人：慶應義塾大学医学部
病理学教室・准教授

共同研究者

青江 啓介：山口宇部医療センター
内科系診療部長

藤本 伸一：岡山労災病院
第二呼吸器内科部長

大沼 圭：順天堂大学大学院医学研究科
免疫病・がん先端治療学講座
准教授

波多野 良：順天堂大学大学院医学研究科
免疫病・がん先端治療学講座
博士研究員

A. 研究目的

CD26分子はDPPVI酵素を含むT細胞活性化分子で、研究代表者は単クローンCD26抗体の開発、CD26 cDNAの単離を世界に先駆けて行い、当分野の研究では世界の最先端にいる。この研究過程で悪性中皮腫細胞株JMNがCD26を発現していることを発見し、高親和性、高生物学活性の高いヒト化CD26抗体を開発した。本抗体は*in vitro*で中皮腫細胞株の増殖及び浸潤を抑制し、中皮腫株移植マウスで腫瘍縮小、生存延長をきたし、正常中皮では発現のないCD26が悪性中皮腫、特に上皮型では8割以上に発現していることを見いだした。CD26は悪性中皮腫の増殖、浸潤に重要な役割を果たし、本抗体がその機能を抑制することから悪性中皮腫の新規治療法として有望な可能性が強く示唆された。

アスベストは潜伏期20~40年を経て悪性中皮腫を引き起こすため、今後益々患者数が増加し、2030年にピークを迎えるといわれ、

死亡者数も2010年には1215人にのぼり、今回の東日本大震災のがれきにもアスベストが混入しているといわれ、大きな社会問題となっている。平均生存期間は約1年と予後は極めて不良で、新規かつ有効な治療法開発は急務である。

ヒト化CD26抗体はフランスで悪性中皮腫を中心とした第1相臨床試験を実施中である。第4コホート(0.1mg/kg, 0.4mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg)まで有害事象もなく終了し、現在第5コホート(4mg/kg)がスタートし、第1相臨床試験も終了が近づいてきた。第4コホートまでの中間評価では約50%がSD(Stable Disease)(SD:9例, PD:10例)と期待される結果が得られつつある。第1相臨床試験が終了次第本邦でもできるだけ早期に臨床試験を実施する予定である。更にCD26の中皮腫組織発現は現存する化学療法剤の治療効果予測因子となり得るという結果も得ている。CD26は可溶性CD26(sCD26)として血清中に存在し、DPPIV酵素活性を含む。現在糖尿病治療薬としてDPPIV酵素阻害薬が広く用いられているが、ヒト化CD26抗体投与によりsCD26と反応し、その値及びDPPIV酵素値が減少することが予想され、このために様々な生理学的変化を生じるおそれもあるため、sCD26, DPPIV値を治療経過でモニターしていくことは安全に抗体療法が行われるために必須である。

そこで本研究では①ヒト化CD26抗体療法確立のためCD26組織発現を同定可能な単クローン抗体の開発に取り組む②CD26発現が治療効果予測因子となり得るかの評価をより症例数を増加して検討③ヒト化CD26抗体療法下でのsCD26/DPPIV測定

法の確立とその評価を行い実際のフランスの臨床試験患者血清の sCD26/DPPIV 酵素測定も開始していく。

本研究を通じて悪性中皮腫への CD26 抗体療法を有効かつ安全に行うためのコンパニオン診断薬やサリゲートマーカーの確立を行う。

B. 研究方法

1) 可溶性 CD26 の調製と Urea buffer 処理

研究代表者森本の研究室で作製した 3-9 アミノ酸を欠いたヒト可溶性 CD26 を安定して分泌する CHO 細胞株を用い、培養上清を adenosine deaminase-Sepharose カラムに通すことで可溶性 CD26 の精製を行った。Urea buffer 処理を行う際には、可溶性 CD26 を Urea buffer (8 M urea, 20 mM HEPES, 50 mM DTT) 中で室温 5-8 時間 rotate させた。

2) マウスへの免疫とハイブリドーマの作製

Urea buffer で変性処理を行った可溶性 CD26 を PBS で透析し、100 μ g/50 μ l になるよう調整した後、アジュバント TiterMax Gold(TiterMax USA Inc.) 50 μ l と混合し、1 匹あたり 100 μ l/dose で BALB/c マウスに皮下注射した。合計 7 回皮下免疫を行い、最後に尾静脈に上記を静脈注射を行い、3 日後に粗精製脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞をポリエチレングリコールで細胞融合した。細胞を 10% FCS, 5% BriClone, HAT 含有 RPMI1640 培地に懸濁して、96 well 平底プレートに播種した。生育した細胞の培養上清を回収し、随時フローサイトメトリーと ELISA によるスクリーニングと免疫組織染色の検討を行った。

3) フローサイトメトリー

研究代表者の研究室で作製したヒト CD26 を組み込んだ Jurkat 細胞株を用いて CD26 発現を検討した。一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を 50-100 μ l/sample で添加し、その後、細胞を洗浄し、二次抗体として PE 標識 Goat Anti-Mouse Ig 抗体 (BD Biosciences) を 20 ng/sample で添加し、4 $^{\circ}$ C で 25 分静置し、洗浄した後、FACSCalibur (BD Biosciences) で測定を行い、得られたデータを FLOWJO (Tree Star) で解析した。

4) ELISA

精製した可溶性 CD26 (非変性 CD26) または Urea buffer で処理した可溶性 CD26 (変性 CD26) を CBB buffer に希釈し、200 ng/well でイムノプレート(NUNC)に添加して一晩静置した。陰性コントロールとして CBB buffer のみを添加し、可溶性 CD26 をコートしない群を用意した。PBS-T で洗浄後、3% BSA in PBS-T を添加してプレートをブロッキングした。一次抗体としてハイブリドーマ培養上清または Goat Anti-Human CD26 ポリクローナル抗体(R&D Systems)、Mouse Anti-Human CD26 単クローン抗体(clone 5F8)を添加し、室温で静置し、二次抗体として HRP 結合 Goat Anti-Mouse Ig 抗体(BD Biosciences)または HRP 結合 Donkey Anti-Goat IgG 抗体(Santa Cruz)を添加し、室温で 1 時間静置した。TMB Peroxidase Substrate(KPL)を添加し、2N H₂SO₄ で反応を停止させた後、Microplate Reader (Bio-Rad)で 450 nm の吸収波長と 570 nm のレファレンス波長を測定した。

5) 免疫組織染色

CD26 の免疫組織染色は、慶應大学病理学教室で施行した。ホルマリン固定・パラフィン包埋切片から 3 μ m 厚の標本を準備し、パラフィンを溶かした後、様々な条件で抗原賦活化処理を行った。その後、H₂O₂ in MeOH に浸して内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、Horse 血清でブロッキングした。その後、一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を 100 μ l/sample または Goat Anti-Human CD26 ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を 1 μ g/sample で添加し、室温で 2 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP 結合 Horse Anti-Mouse IgG 抗体または HRP 結合 Horse Anti-Goat IgG 抗体を添加し、室温で 30 分反応させた。洗浄後、DAB と H₂O₂ で発色させ、顕微鏡で観察した。CD26 の染色結果に関する評価は、研究分担者の山田 (慶應大学病理学教室) が行い、悪性中皮腫・前立腺・肝臓・腎臓の 4 組織の CD26 の染色パターンを R&D 社の Goat Anti-Human CD26 ポリクローナル抗体で染色した場合と比較することで行った。

6) 患者検体の臨床的特徴及び解析方法

対象は 1998 年から 2011 年までに岡山労災病院および山口宇部医療センターにおいて、悪性胸膜中皮腫として診断・治療を受けた症例 108 例である。症例の内訳は男性 101 例、女性 7 例、年齢中央値は 65 歳 (5-90 歳)、組織型は上皮型 74 例、二相型 23 例、肉腫型 11 例、臨床病期は I 期 28 例、II 期 38 例、III 期 26 例、IV 期 20 例、Performance status (PS) は 0 が 28 例、1 が 61 例、2 が 10 例、3 が 9 例、PS4 の症例は含まれてい

ない。治療内容は胸膜外肺全摘術 (EPP) 42 例、化学療法 (CT) 73 例 (重複あり)、Best supportive care (BSC) 20 例である。

腫瘍細胞における CD26 の発現に関する検討は、慶應大学病理学教室にて CD26 免疫組織染色を行った。染色法としては、パラフィン包埋切片から 3 μ m 厚の標本を準備し、0.3% H₂O₂ の PBS 液で 30 分間、内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った後、4 $^{\circ}$ C の加湿室で 1 昼夜、抗 CD26/DPPIV 抗体 (NB100-59021, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) と反応させた。Histofine Simple Stain kit (Nichirei Bioscience、東京、日本) とジアミノベンチジン (Dojindo Laboratories、東京、日本) を用いて発色させ、核は Meyer' s hematoxylin で染色した。同様の染色を初期抗体のみで行い陰性対照とし、腫瘍周囲のリンパ球あるいは内皮細胞を CD26 反応の陽性対照とした。細胞膜での発現を半定量化して評価を行った。すなわち、発現の見られない場合スコア 0、25% 以下をスコア 1、26-50% はスコア 2、50% 以上をスコア 3 とした。

そして、この基準に基づいて、CD26 の発現と臨床的要因についての検討を行った。臨床的要因として、性別、年齢、組織型、臨床病期 (IMIG 分類)、PS、EPP、化学療法、pemetrexed の使用の有無を取り上げた。生存解析において、生存期間は診断確定日から月数で計算した。剖検で診断確定した症例は初診日から月数で計算した。

関連性についての検討は χ^2 乗検定を用い、生存解析には Kaplan-Meyer 法および Logrank 検定を使用した。

7) 病理組織の CD26 発現評価

開発中の新規単クローン抗体については、ホルマリン固定したパラフィン切片 (CD26 陽性である正常ヒト腎、肝、前立腺及び悪性中皮腫の組織) で CD26 が染色可能であるかを検討するために、抗原賦活化として、1) 前処置なし、2) 0.1%トリプシン 室温、30 分、3) 0.04% プロテイナーゼ K 室温、15 分、4) オートクレーブ処置 (120°C、20 分、0.01M Citrate Buffer pH6.0)、5) 煮沸 (10分、0.01M Citrate Buffer pH6.0)、の 5 つの条件を比較検討した。二次抗体は、Peroxidase 付加抗マウス IgG 抗体 (ImmPRESS 社製) を用い、発色は、DAB 液 (Simple Stain DAB, Histofine) を用いた。

岡山労災病院における中皮腫 59 症例の腫瘍の病理組織 (生検及び手術材料、10%ホルマリン固定、パラフィン切片) について、免疫染色を行った。抗原賦活化は、オートクレーブ処置 (120°C、20 分、0.01M Citrate Buffer pH6.0) を行い、一次抗体は、仏の臨床試験で用いている R&D 社製抗 CD26 ヤギ・ポリクローナル抗体 (Lot.No. JOQ107061) を用いた。二次抗体は、Peroxidase 付加抗ヤギ IgG 抗体 (ImmPRESS 社製) を用い、発色は、DAB 液 (Simple Stain DAB, Histofine) を用いた。いずれの染色においても、陽性対照には、正常ヒト腎、肝、前立腺及び悪性中皮腫を用い、陰性対照には、これらの正常組織切片内の各種組織 (平滑筋、脂肪組織、結合組織など) と CD26 陰性肺癌組織を用いた。

8) 可溶性 CD26/DDPIV 酵素測定 ELISA のための抗体

CD26 抗体である 1F7、5F8 及び 9C11 は森本研究室で確立された。ヒト化 CD26 抗体 (YS110) は Y's セラピューテイクス社から供与された。

9) 可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素 ELISA アッセイ

【可溶性 CD26 の測定 <サンドイッチ ELISA>】

1. 捕捉抗体プレートの作成

96 穴平坦底プレートに、5µg/ml の捕捉抗体 (CD26 モノクローナル抗体 5F8) を各穴 100µl ずつ分注し、4°C で一晚静置する。

2. 捕捉抗体プレートのブロッキング

上記 1 のプレートを PBS-Tween で 3 回洗浄後、ブロッキングバッファーを分注し、室温で 2 時間静置し、PBS-Tween で 3 回洗浄して 3 の検体分注に供する。

3. 血清及び標準曲線用組換え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween20 で 20 倍に希釈した対象血清を 100µl ずつ 2 穴に分注する。標準曲線を作成するため、段階希釈 (500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95, 0.98, 0.49, 0 ng/ml) した組換え可溶性 CD26 標準試薬を 100µl ずつ 2 穴に分注する。プレートを密封し、4°C で一晚静置する。

4. 可溶性 CD26 の測定

上記 3 のプレートを PBS-Tween で 3 回洗浄後、0.5µg/ml の検出抗体 (ビオチン化 CD26 モノクローナル抗体 9C11 あるいは 1F7) を各穴 100µl ずつ分注し、2 時間静置する。PBS-Tween で 3 回洗浄後、1 万倍希釈した ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase 液を 100µl ずつ分注する。プレートを遮光して、1 時間静置する。PBS-Tween で 3 回

洗浄後、PNPP を 100 μ l ずつ分注し、遮光して 10 分間静置した後、2N-NaOH 溶液を 100 μ l ずつ分注して、発色反応を停止させる。プレートリーダーで吸光度を測定する(吸光度 405nm、レファレンス 655nm)。

【DPPIV 活性の測定 <サンドイッチ ELISA>】

1. 捕捉抗体プレートの作成とブロッキング
上記 2) の 1 及び 2 と同様に捕捉抗体プレートを作成し、ブロッキングをする。

2. 血清及びポジティブコントロール用組換え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween20 で 10 倍に希釈した対象血清を 100 μ l ずつ 2 穴に分注する。ポジティブコントロールとして 500ng/ml に調整した組換え可溶性 CD26 標準試薬 (R&D systems, Inc.) を 100 μ l ずつ 2 穴に分注する。プレートを密封し、一晚静置する。

3. DPPIV 活性の測定

上記 2) のプレートを PBS-Tween で 3 回洗浄後、1mg/ml に調整した Gly-Pro-pNA を血清及びポジティブコントロールを添加したウェルに 150 μ l ずつ分注する。標準曲線を作成するため、段階希釈 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 0 μ M) した pNA 溶液を 150 μ l ずつに分注する。直ちにプレートリーダーで吸光度を測定する(吸光度 405nm、レファレンス 655nm)。その後 75 分後まで (15 分毎に) 吸光度を測定し、DPPIV 活性 (μ M/min) を計測する。

【比較対照とした既存の市販測定キット】

a) R & D Systems, Inc.

キット名 : Quantikine Human CD26/DPPIV Immunoassay

捕捉抗体 : 抗ヒト CD26 ラットモノクローナル抗体

検出抗体 : HRP 標識・抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体

b) Bender MedSystems GmbH (現 eBioscience)

キット名 : Human sCD26 Platinum ELISA

捕捉抗体 : 抗ヒト CD26 モノクローナル抗体

検出抗体 : ビオチン化抗ヒト CD26 モノクローナル抗体、Streptavidin-HRP

10) 健常人血清及び患者検体について

健常人血清は森本研究室で働く研究者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。

悪性中皮腫患者血清、胸水は 1998 年から 2011 年までに岡山労災病院及び山口宇部医療センターにおいて悪性中皮腫として診断・治療を受けた症例でインフォームドコンセントを得られた症例を用いている。

(倫理面への配慮)

CD26 単クローン抗体の開発におけるマウスを用いた動物実験については順天堂大学実験動物委員会で承認されている。

使用検体 (病理組織、血清、胸水) は岡山労災病院及び山口宇部医療センターの診断時、手術時に得られた標本を用い研究のために新たな侵襲が加えられたことはなかった。検体の使用は、患者の同意が得られているか、あるいは両施設の臨床研究審査委員会で承認を得て研究内容について院内掲示などで周知を図った。解析は匿名化したデータで行い個人のプライバシーが漏れることのないように配慮した。

患者検体などについては研究対象者に対する人権擁護上の配慮及び研究により研究対象者が受ける不利益、利益等の説明を患者及び遺族に対して行い、書面でのインフォームド・コンセントを得ている。また病理組織について免疫染色して CD26 発現を解析する研究については、慶應義塾大学医学部倫理委員会の審査にて承認されている(承認番号 20120100)。

フランスで実施されているヒト化 CD26 抗体投与の第 I 相臨床試験における対象症例血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 活性の測定及びコントロール症例の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性の測定については順天堂大学の倫理審査委員会の審査にて承認されている(順天医倫第 2012076 及び 2012081)。

C. 研究結果

1) 悪性中皮腫組織の免疫染色に適した新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発

我々は新規治療標的分子として悪性胸膜中皮腫細胞に発現する CD26 に着目し、ヒト化 CD26 抗体を開発しフランスにて第 I 相臨床試験を行なっている。治療適用患者選択のために CD26 の発現の診断が不可欠である。そこで、腫瘍病理組織の免疫染色に適したコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発を Urea 変性可溶性 CD26 をマウスに免疫してハイブリドーマを作製することで行っている。現在病理組織染色可能といわれている唯一の市販の単クローン CD26 抗体よりは組織染色のよい 2 クローンが得られつつある。さらにこれらの抗体を用いて適切な条件を検討中である。

2) CD26 陽性中皮腫の臨床像に関する研究

悪性胸膜中皮腫に対しては手術療法、化学療法、放射線療法などが行われるが、決して満足できる治療成績ではなく、新たな治療法の確立や治療法選択のための治療効果予測・予後予測マーカーの開発が望まれる。悪性胸膜中皮腫における CD26 発現と臨床的要因の関連および生存解析を行った。CD26 発現は上皮型細胞で発現頻度が高く、肉腫型細胞で発現頻度が低かった。CD26 発現群で化学療法の治療効果がより良好であった。また、CD26 陽性群で陰性群より予後が良好であった。より詳細な CD26 発現と臨床像の解明のためさらなる症例集積が必要である。

3) 悪性中皮腫における CD26 発現の評価

悪性中皮腫の新規治療法として期待されるヒト化 CD26 抗体療法において、腫瘍組織における CD26 発現評価は必須である。そこでこの CD26 発現評価を目的として開発されつつある新規単クローン抗体の病理組織における免疫染色への応用を目指した。初年度は、6 クローンの抗体について、抗原賦活化やシグナル増幅等の至適化を行った。また CD26 発現が化学療法剤の治療効果予測マーカーとなり得るかを評価するために、59 症例の中皮腫について CD26 発現の詳細な評価を行い、47 症例の陽性症例を細胞局在、陽性率で分類した。

4) ヒト化 CD26 抗体投与患者検体の可溶性 CD26/DDPIV 酵素測定法の開発

従来の可溶性 CD26 ELISA アッセイは 2 種類の異なる CD26 抗体を用いていたが一つの抗体の 1F7 はヒト化 CD26 抗体と同一

エピトープのために血清中にヒト化 CD26 抗体が存在すると競合してアッセイが阻害される可能性がある。そこでヒト化 CD26 抗体及びもう一つの抗体 5F8 と異なる新しいエピトープの CD26 抗体を用いた ELISA アッセイを開発する必要がある。従来の可溶性 CD26 測定 ELISA 系及び市販の ELISA キットともに血清中にヒト化抗体が存在するとブロックされ測定不能であった。9C11 という新しい CD26 エピトープと反応する CD26 抗体を同定し、これを用いることにより血清中にヒト化 CD26 抗体が存在していても競合することなく可溶性 CD26 は測定可能であった。DPPIV 酵素はヒト化抗体存在下でも 5F8 というヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープと反応する抗体をそのアッセイに用いるため測定可能であった。これらの ELISA アッセイを用いてフランスでのヒト化 CD26 抗体治療患者の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素値を今後測定していく予定である。

D. 考察

従来の CD26 単クローン抗体ではホルマリン固定・パラフィン包埋した病理組織の免疫染色を行うことができず、R&D 社及び Novus 社の CD26 ポリクローナル抗体のみ免疫組織染色に使用可能だが、これらの CD26 抗体はポリクローナル抗体であるためロット差が一番の問題となり、コンパニオン診断薬としては不適切である。そこで、悪性胸膜中皮腫およびその他 CD26 陽性腫瘍の免疫組織染色に適したコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発を行う必要がある。CD26 と同様に HLA class I に関しても、これまでホルマリ

ン固定・パラフィン包埋した腫瘍組織切片の染色に適した単クローン抗体はなく、ポリクローナル抗体でのみ免疫組織染色が可能であった。Torigoe らは Urea buffer で変性処理した HLA class I タンパクをマウスに免疫することで、免疫組織染色可能な抗 HLA class I 単クローン抗体を得た。そこで、我々も Urea buffer 処理したリコンビナント可溶性 CD26 をマウスに免疫してハイブリドーマの作製を行った。フローサイトメトリーと Urea 処理した可溶性 CD26 に対する ELISA でスクリーニングし、免疫組織染色を検討した結果、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して明瞭に CD26 が検出される 2 クローンに絞り込むことができた。しかしながら、R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体を用いて悪性中皮腫・前立腺・肝臓・腎臓の 4 組織の CD26 の染色を行った結果と比較すると、今回作製した CD26 単クローン抗体は悪性中皮種と前立腺の CD26 の染色パターンはよいが、肝臓や腎臓では非特異的な染色も認められている（データ未掲載）。コンパニオン診断薬としての使用を考えた際、多数の検体の免疫染色を検討し、明瞭に CD26 が染色される確率が最も高く、かつ非特異的な染色が少ない抗原賦活化条件の更なる検討が必要である。R&D 社の CD26 ポリクローナル抗体は affinity purify した抗体であるのに対し、現時点では我々はハイブリドーマ培養上清を用いているため、今後抗体精製を行ったうえで更に検討する予定である。

今回、悪性胸膜中皮腫における CD26 発現と臨床的要因の関連および生存解析を行った。中皮腫細胞膜における CD26 の発現と組織型にはきわめて強い関連があること

があらためて確認された。すなわち、上皮型あるいは二相型の上皮性部分では高率に CD26 発現が認められるのに対して肉腫型での発現頻度は低い。PS や EPP の有無との関連も示唆されたが生物学的に関連があるとは考えにくく、EPP を行い十分な組織量があれば CD26 発現を確認しやすいなど検体採取の状況と関連している可能性も考えられた。

CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、有意の関連が認められ、より高い発現のある症例でより良好な治療効果が得られた。悪性胸膜中皮腫の潜伏期間（石綿ばく露から中皮腫発症までの期間）は約 40 年とされ、高齢者の悪性胸膜中皮腫症例も多数存在する。一方、悪性胸膜中皮腫に対する化学療法の効果は十分とはいえず、副作用の多い治療法を行うべきか判断に苦慮する場合もある。治療効果が予測できるマーカーが存在すれば治療効果の期待できる症例を適切に選択できる可能性があり、今回の結果は、CD26 発現がそのようなマーカーとなり得る可能性を示唆している。

生存解析においても、CD26 発現は良好な予後を示している。CD26 発現が比較的早期の臨床病期や PS 良好例に発現が多いなど、一般に予後因子として予後良好と考えられる群と CD26 発現群が重複しているため、CD26 発現そのものの意義がどれくらいかは現時点では明確にできない。しかしながら、化学療法の有無が生存に大きな影響を及ぼすことが今回の検討でも明らかになったため、化学療法の治療効果と CD26 の発現が関連することが予想されるため、化学療法を行った集団のみで解析すると CD26 発現の予後への影響は更に大きくなっていった。先行

研究で行った検討では予後への影響を統計学的に確認できなかったがそれは症例数が少なかったためと考えられる。

CD26 の中皮腫組織での発現を正確に検出し、標的対象症例を選別できる診断薬として開発中の単クローン抗体は、ホルマリン固定、パラフィン切片においても、陽性シグナルが得られており、有用な抗体である可能性が高いと考えられる。また岡山労災病院における中皮腫 59 症例の CD26 発現解析から、スコア評価では中皮腫の陽性率が 82%であり、これまでの検討と同様の結果であった。一方、仏での臨床試験の陽性基準では、陽性率が 73%となり、現在の臨床試験の陽性基準が厳しいものであると考えられた。また中皮腫細胞における CD26 陽性所見は、細胞質から細胞膜、核まで、症例により多彩な局在を示しており、これらの客観的な評価が、バイオマーカーとしての CD26 の検討には重要と推測された。

悪性中皮腫への新規治療法候補としてヒト化 CD26 抗体を開発し、現在フランスで悪性中皮腫その他 CD26 陽性腫瘍をターゲットとして第 1 相臨床試験を施行中で現在第 5 コホート (4mg/kg) に入っているが、第 4 コホートまでの中間評価では安全に進行し、期待される効果も得られつつあり、本邦でもフランスの第 1 相試験が終了次第、臨床試験を計画中である。現在、糖尿病治療薬として DPPIV 酵素阻害薬が登場し、幅広く用いられつつある。CD26 分子は可溶性 CD26 (sCD26) として血清、胸水中にも存在し、DPPIV 酵素活性を含み、GLP-1 をはじめとしてその他サイトカイン、ケモカイン、Neuropeptide 等が基質とされており、これらが切断されることで血糖値を含めて生体

の様々な生理学的機能を調節している。ヒト化 CD26 抗体投与により、血清中に存在する sCD26 と反応し、投与患者では sCD26 値及び DPPIV 酵素値が減少することが予想されることから sCD26 及び DPPIV 酵素活性値を治療経過でモニターにしていくことは抗体療法が安全に施行されるためにも必須である。

今までに可溶性 CD26 測定系として異なるエピトープと反応する CD26 抗体、5F8 及び 1F7 を用いたサンドイッチ ELISA 法及び DPPIV 酵素測定 ELISA 法としては固相化した 5F8 が可溶性 CD26 を捕捉し、Gly-Pro-pNA を加えて、DPPIV 活性を測定する方法を確立した。しかしヒト化 CD26 抗体と 1F7 は同一エピトープを認識する CD26 抗体であるため (5F8 は異なるエピトープ) ヒト化 CD26 抗体治療患者では血清中にヒト化抗体が存在するため従来の ELISA 系では同一エピトープの 1F7 と競合するために sCD26 測定不能の可能性があったが、予想通りに血清中に 1 μ g/ml 以上存在する点で測定不能であった。市販の可溶性 CD26 測定 ELISA キットにおいてもヒト化 CD26 抗体 1 μ g/ml 以上の存在で測定不能であった。すでに開発した CD26 抗体の中で、1F7、ヒト化 CD26 抗体及び 5F8 と異なるエピトープと反応する CD26 単クローン抗体をスクリーニングした結果 9C11 抗体が今までの CD26 抗体とは異なるエピトープと反応する抗体であることを同定した。更に可溶性 CD26 測定 ELISA 系においても 1F7 biotin の代わりに 9C11 biotin に置き換えて、正常人血清にヒト化 CD26 抗体を加えてアッセイを行ったところ競合することなく可溶性 CD26 の測定が可能であった。精製可

溶性 CD26 を 1F7 biotin、9C11 biotin を用いて測定した結果両者は同等の感度で測定できることが明らかとなった。また実際の患者血清及び胸水においても sCD26 値をほぼ同等に測定していた。

今後は 9C11 を用いた新しい ELISA 系でフランスの第 1 相臨床試験検体を測定予定である。血清中のヒト化 CD26 抗体値の動態を解析すると同様に sCD26 測定値の変動を検討することは重要であり、また sCD26 値、DPPIV 酵素活性値とヒト化 CD26 抗体治療患者の臨床病態や治療効果などを検討することも今後重要と思われる。

E. 結論

悪性胸膜中皮腫の免疫染色に適したコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発を行った。Urea buffer で変性処理を行った可溶性ヒト CD26 をマウスに免疫し、フローサイトメトリ陽性かつ Urea 処理可溶性 CD26 に対する ELISA 陽性の 31 クローンが選出された。それらクローンの培養上清で免疫組織染色を検討した結果、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して明瞭に CD26 が検出される 2 クローンに絞り込むことができた。

悪性胸膜中皮腫の細胞膜における CD26 発現と臨床的要因との関連および生存解析を行った。CD26 発現は上皮型腫瘍細胞で発現頻度が高く、肉腫型細胞で発現頻度が低かった。CD26 発現群で化学療法の治療効果がより良好であった。また、CD26 陽性群で陰性群より予後が良好であった。しかしながら、今回の検討のみでは患者背景にかなりのばらつきがあるため、更に症例を追加してより

条件の合致した 2 群の解析を行うことで CD26 発現の臨床像との関わりが明らかにできると考えられる。

中皮腫における CD26 発現の病理診断に有用な新規単クローン抗体が得られつつある。中皮腫における CD26 陽性率は、免疫染色において 73～100%であり、その細胞内局在の評価や陽性部位の面積により、陽性率に影響があることが判明した。

従来我々の開発した 2 つの異なった CD26 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法や市販の 2 種の sCD26 測定 ELISA キットともにヒト化抗体存在下では測定不能であることが明らかとなった。しかし 1F7、5F8、ヒト化 CD26 抗体と反応するエピトープとは異なる CD26 抗体 9C11 を同定し、これを用いることにより、ヒト化 CD26 抗体存在下でも可溶性 CD26 測定が可能になった。

F. 健康危険情報

現時点では、特記すべき健康危険情報は無い。

G. 次年度以降の計画

悪性中皮腫組織の免疫染色に適したヒト CD26 単クローン抗体の開発について、現時点で最も期待される 2 クローン及び 3 通りの抗原賦活化条件の中で、多数の検体の免疫組織染色を検討した際に陽性率が最も高いものを絞り込み、そのハイブリドーマを限界希釈して単クローン抗体を得る。単クローンを得た後、抗体可変領域の塩基配列解析やエピトープの同定、単クローン抗体の精製を進め、更に、悪性胸膜中皮腫のみならずその他の CD26 陽性腫瘍病理組織についても検討を加える予定である。

組織上の CD26 の発現評価が悪性中皮腫の予後や、化学療法剤の治療反応性予測評価になるかどうかについて、更に症例を追加して、より患者背景の合致した 2 群の条件を整理して解析を行い CD26 発現の臨床像との関わりを解明する。

悪性中皮腫組織における CD26 発現評価について、CD26 の中皮腫組織での発現を正確に検出し、標的対象症例を選別できる診断薬として、研究代表者・森本が開発している新規単クローン抗体について、特異性を確認後、病理組織における有用性を検討し、さらに染色条件の至適化を進め、診断薬としての確立とキット化を目指す。具体的には、抗原賦活化と染色の条件、ブロッキング、増幅方法の選別などについて、至適化を図る。また特異性については、精製抗原による抗体の吸収試験や各種のエピトープを認識する抗体との競合試験により確認する。これらの条件が決定した場合には、キット化を目的として全自動染色装置での工程確立を行う。更に中皮腫における化学療法剤の治療効果予測マーカーのみならず、CD26 がバイオマーカーとなりうるかどうか検討する。今後 CD26 発現を細胞局在、陽性率、陽性強度などの各種パラメーターで詳細に評価していく予定である。

ヒト化 CD26 抗体投与患者検体の可溶性 CD26/DDP/IV 酵素測定法の開発について、フランスでのヒト化 CD26 抗体を用いた第 1 相臨床試験患者血清の可溶性 CD26 値、DDP/IV 酵素値を新しい ELISA 系で同定し、患者病態、ヒト化 CD26 抗体濃度などの動きについても検討していく予定である。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnuma K, Morimoto C. DPP4 (dipeptidyl-peptidase 4). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. in press
- 2) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Komoriya K, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated costimulation in human CD8+T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immuno*. 2013; 138: 165-72.
- 3) Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K. CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma. *Oncol Rep*. 2013; 29: 21-8.
- 4) Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Sano M, Matsushashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of HEXIM1 Prevents Right Ventricular Hypertrophy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *PLoS One*. 2012; 7: e2522.
- 5) Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C. Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 6326-6338.
- 6) Gemba K, Fujimoto N, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. *Acta Oncol*. in press
- 7) Noguchi K, Fujimoto N, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Hotta K, Kato K, Toda H, Taguchi K, Kishimoto T. Extrapulmonary small cell carcinoma mimicking malignant pleural mesothelioma. *J Clin Pathol*. in press
- 8) Shinjo K, Okamoto Y, An B, Toshihiko Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 1277-85.
- 9) Morimoto D, Fujimoto N, Nishi H, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Taguchi K, Kishimoto T. Malignant pleural mesothelioma localized in the thoracic wall. *J Thorac Oncol*. 2012; 7: e21-2.
- 10) Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, Kanazawa S,

- Miyoshi S. MicroRNA miR-34b/c Enhances Cellular Radiosensitivity of Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Anticancer research*. 2012; 32: 4871-5.
- 11) 福岡和也、関戸好孝、樋田豊明、河原邦光、太田三徳、松村晃秀、岡田守人、岸本卓巳、中野喜久雄、中野孝司：悪性中皮腫の血清診断における可溶性メソテリン関連ペプチド(SMRP：Soluble Mesothelin-related Peptides)の有用性に関する多施設共同試験. *医学と薬学*. 2012; 68: 177-183.
 - 12) Shiheido H, Naito Y, Kimura H, Genma H, Takashima H, Ono T, Hirano T, Du W, Yamada T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H. An Anilinoquinazoline Derivative Induces Apoptosis of Multiple Myeloma Cells through Interaction with hCAP-G2, a Subunit of Condensin II. *PLoS ONE*. 2012; 7: e44889.
 - 13) Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H; Ogawa Y, Du W; Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H. A Phthalimide Derivative that Inhibits Centrosomal Clustering is Effective on Multiple Myeloma. *PLoS ONE*. 2012; 7: e38878.
 - 14) Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Sasaki H, Amagai M. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1538-46.
- ## 2. 学会発表
- 1) Angevin E, Trillet - Lenoir V, Alexandre J, Isambert N, Viehl P, Farace F, Valleix F, Podoll T, Shimasaki M, Miyashita I, Hosono O, Dang NH, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C. First - in - Human Phase I administration of YS110, a humanized monoclonal antibody directed against the CD26 molecule in cancer patients. 37th The European Society for Medical Oncology (ESMO) Congress, 28 September-2 October 2012, Vienna, Austria
 - 2) Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, Ohnuma K, Hosono O, Hiraki A, Fujii M, Yamada T, Dang NH, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T, Morimoto C. CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
 - 3) Fujimoto N. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. Asian asbestos Initiative 5th Inter National Seminar (AAI), November 6-8 2012,

- Busan, Korea
- 4) Gemba K, Fujimoto N, Kato K, Aoe K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
 - 5) Okabe K, Matsuda E, Tao H, Hayashi T, Tanaka T, Sano H, Takahagi A, Aoe K, Taguchi K. Trimodality therapy with extrapleural pneumonectomy, radiation therapy, and chemotherapy for malignant pleural mesothelioma. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
 - 6) Fujimoto N, Gemba K, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
 - 7) Fujimoto N, Gemba K, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. National survey of malignant mesothelioma in Japan. The 103th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 31 March-5 April 2012, Chicago, USA
 - 8) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Yamada T, Morimoto C. Humanized anti-CD26 mAb Leads to Prophylaxis and Treatment of GVHD in Hu-PBL-NOG Model Mice. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21 日, 京都
 - 9) 岸本卓巳. 臨床からみたアスベスト関連疾患 アスベストによる健康障害 - 過去・現在・未来 -. 第 60 回日本職業・災害医学会学術大会, 2012 年 12 月 2-3 日, 大阪
 - 10) 岸本卓巳. 石綿肺によるびまん性胸膜肥厚、良性石綿胸水について. 第 60 回日本職業・災害医学会学術大会, 2012 年 12 月 2-3 日、大阪
 - 11) 藤本伸一、浅野美智子、淵本康子、小野勝一郎、小崎晋司、西英行、岸本卓巳. 胸膜中皮腫を中心とした胸水中の分子マーカーの検討. 第 53 回日本肺癌学会総会ワークショップ 4「悪性胸膜中皮腫の診断における最近の進歩」. 2012 年 11 月 8-9 日, 岡山
 - 12) 山本寛斎、多田龍平、枝園和彦、古川公之、宗淳一、三村雄輔、片山英樹、青江啓介、岡部和倫、松本常男、豊岡伸一、三好新一郎. 新規に樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株の分子生物学的解析. 第 53 回日本肺癌学会総会, 2012 年 11 月, 岡山
 - 13) 岡部和倫、松田英祐、田尾裕之、林達朗、田中俊樹、佐野史歩、高萩亮宏、青江啓介、前田忠士、上岡博、田口耕太郎、橋本かおり、松本常男. 悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療. 第 53 回日本肺癌学会総会, 2012 年 11 月, 岡山
 - 14) 青江啓介、VJ Amatya、藤本伸一、大沼圭、細野治、平木章夫、藤井昌学、山

- 田健人、NH Dang、武島幸男、井内康輝、岸本卓巳、森本幾夫. 悪性胸膜中皮腫における CD26 発現と化学療法効果・予後の検討. 第 53 回日本肺癌学会総会, 2012 年 11 月, 岡山
- 15) 藤本伸一、玄馬頭一、加藤勝也、青江啓介、武島幸男、井内康輝、岸本卓巳. 我が国の悪性中皮腫における石綿ばく露および臨床像に関する全国調査. 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 2012 年 10 月 25-27 日, 横浜
- 16) 宇都宮利彰、村上知之、青江啓介、岸野大蔵、近森研一、片山英樹、前田忠士、村田順之、坂本健次、大藤貴、大石景士、関千尋、神徳濟、尾形佳子、佐野史歩、林達朗、田中俊樹、田尾裕之、松田英祐、岡部和倫、上岡博. 骨および軟骨形成を認めた悪性胸膜中皮腫の 1 例. 第 47 回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2012 年 7 月, 下関
- 17) 松嶋敦、高木努、島袋郁子、小畑秀登、青江啓介、田尾裕之、岡部和倫、村上知之. 難治性の縦隔炎を合併し診断に苦慮した悪性胸膜中皮腫の一例. 第 47 回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2012 年 7 月, 下関
- 18) Yamada T. Impairment of cell growth by down regulation of NCAP2 gene transcription mediated with nuclear transported CD26 using humanized anti-CD26 monoclonal antibody. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 28-31 日, 神戸

1. 特許取得

開発した組織染色可能な単クローン CD26 抗体の特性の検討が終了次第特許・出願予定である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

Ⅱ. 分担研究報告

【悪性中皮腫組織の免疫染色に適した新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発】

研究代表者	森本 幾夫	順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 客員教授
研究分担者	山田 健人	慶應義塾大学医学部病理学教室 准教授
共同研究者	波多野 良	順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 博士研究員
共同研究者	大沼 圭	順天堂大学大学院医学研究科 免疫病・がん先端治療学講座 准教授

研究要旨

悪性胸膜中皮腫はアスベストばく露によって起こる胸膜中皮由来の難治性悪性腫瘍である。悪性胸膜中皮腫に対して現時点で満足できる治療法はなく、新たな治療法の確立が望まれる。われわれは、新規治療標的分子として悪性胸膜中皮腫細胞に発現する CD26 に着目し、ヒト化 CD26 抗体を開発しフランスにて第 I 相臨床試験を行なっているが、治療適用患者選択のために悪性胸膜中皮腫における CD26 の発現の診断が不可欠である。そこで、腫瘍病理組織の免疫染色に適したコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発を行っている。現在病理組織染色可能といわれている唯一の市販の単クローン CD26 抗体よりは組織染色のよいものが得られつつある。さらにこれらの抗体を用いて適切な組織染色の条件を検討中である。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫はアスベストばく露によって起こる胸膜中皮由来の難治性悪性腫瘍である。アスベストばく露から発症までの潜伏期間は 30-50 年とされ、日本を含めアジアやヨーロッパなど世界規模で胸膜中皮腫患者数は今後ますます増加すると考えられている。悪性胸膜中皮腫に対しては手術療法、化学療法、放射線療法などが行われるが、いずれも満足できる治療成績ではなく、新たな

治療法の確立が望まれる。われわれは、新規治療標的分子として悪性胸膜中皮腫細胞に発現する CD26 に着目し、ヒト化 CD26 抗体を開発しフランスにて第 I 相臨床試験を行なっている。近年、治療薬の有効性や副作用を予測するために治療薬とセットで使われる診断薬(コンパニオン診断薬)を治療薬とともに早期から開発する動きが活発化している。ヒト化 CD26 抗体に関しても、治療適用患者選択のために悪性胸膜中皮腫に