

における CD26 の発現の診断が不可欠であるが、これまでに我々が検討した結果、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信頼できる染色結果が得られることが明らかになった。しかしながら、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、異なるロットの抗体で染色すると染色強度やパターンに違いが出るおそれがあることから診断薬としては不適切である。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うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 可溶性 CD26 の調製と Urea buffer 処理

当研究室で作製した 3-9 アミノ酸を欠いたヒト 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 µg/50 µl になるよう調整した後、アジュバント TiterMax Gold (TiterMax USA Inc.) 50 µl と混合し、1 匹あたり 100 µl/dose で BALB/c マウスに皮下注射した。2 週間ごとに合計 7 回皮下免疫を行い、最後に尾静脈に上記の半量静脈注

射を行った。3 日後に解剖し、粗精製脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞を 1:1 で混合し、ポリエチレングリコールで細胞融合した。細胞を洗浄した後、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

当研究室で作製したヒト CD26 を組み込んだ Jurkat 細胞株を用いた。一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を 50-100 µl/sample で添加し、4°C で 25 分静置した。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°C で 25 分静置した。細胞を洗浄した後、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 4°C で一晩静置した。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 を添加して室温で 1 時間静置することでプレートをブロッキングした。洗浄後、一次抗体として PBS-T で 3 倍に希釈した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 50 ng/well で添加し、室温で1時間静置した。洗浄後、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。洗浄後、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 μm 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 μl/sample または Goat Anti-Human CD26 ポリクローナル抗体 (R&D Systems)を 1 μg/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、研究分担者の山田健人 (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。

(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。

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)。

C. 研究結果

1) Urea buffer による可溶性 CD26 の変性処理条件の検討

免疫組織染色に適した抗ヒト CD26 単クローン抗体を作製するため、Urea buffer を用いて免疫原である可溶性 CD26 の変性処理を行った。ELISA により非変性の可溶性 CD26 に対する吸光値と Urea buffer 処理した可溶性 CD26 に対する吸光値を比較した結果、免疫組織染色に使用可能な R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体でも Urea 処理を 3 時間以上施した可溶性 CD26 に対する吸光値は非変性 CD26 に対する吸光値の約 40%に低下するが、免疫組織染色に使用できない抗ヒト CD26 単クローン抗体 (clone 5F8)では約 10%にまで低下することが示された (図 1)。これらの結果から、Urea 処理により可溶性 CD26 のほとんどが変性したと考えられた。また、Urea 処理 3 時間以上では吸光値の低下はほとんど認められなかったため、5-8 時間 Urea 処理を施した

可溶性 CD26 をマウスに免疫することにした。

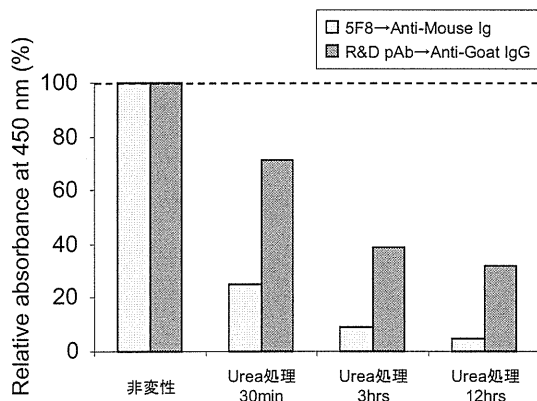


図1 Urea bufferによる可溶性CD26の変性処理

2) マウスへの免疫プロトコールの検討

BALB/c マウスに Urea 処理を施した可溶性 CD26 を 100 µg/dose で 2 週間ごとに 7 回皮下免疫を行い、最後に 50 µg/dose で尾静脈注射した。アジュバントには合成コポリマー系アジュバントである TiterMax Gold を用いた。3 回皮下免疫して最後に尾静脈からブーストするプロトコールでも一度検討を行ったが、1st スクリーニングの時点で抗ヒト CD26 抗体産生ハイブリドーマの数が非常に少なく目的の抗体は得られなかった (データ未掲載)。

3) 抗ヒト CD26 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング結果

上述した方法のプロトコールでハイブリドーマを作製し、生育した細胞の培養上清を回収して、フローサイトメトリーによる 1st スクリーニングと ELISA による 2nd スクリーニングを行った。免疫したマウスの粗精製脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞を細胞融合させ、6000 well に播種したうち、生育したハイブリドーマ 2100 sample の 1st スクリ

ーニングをフローサイトメトリーで行った結果、非常に bright に染まるものから dull に染まるものまで多様な 347 クローンが得られた (図 2)。

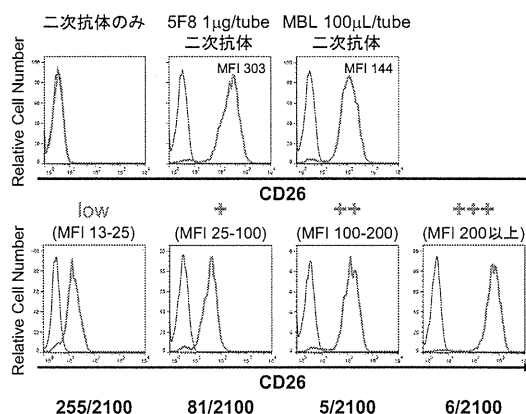


図2 フローサイトメトリーによる1stスクリーニングの結果

1st スクリーニングで陽性だったクローンをスケールアップさせていく過程で、フローサイトメトリーと ELISA によるスクリーニングを 2 回ずつ行い、いずれも陽性のクローンとして 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、様々な条件で抗原賦活化処理を検討した結果、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、免疫組織染色に使用可能な R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体を用いた場合での CD26 の染色パターンと比較すると、肝臓の毛細胆管や腎臓の近位尿管の brush border など強く染まるべき箇所の色が弱いなど現時点ではまだ完全な染色パターンの一致は認められていない。現時点での免疫組織染色の最適抗原賦活化条件と結果をまとめたものを表 1 に示した。

表1 現時点での最適抗原賦活化条件と免疫組織染色の結果

CD26抗体	抗原賦活化条件	肝	前立腺	腎	中皮腫
R&D pAb	AC120°C 20min クエン酸Buffer	⊙	⊙	⊙	⊙
clone A	AC120°C 20min クエン酸Buffer	○	○	△	○
clone A	0.1%Trypsin 室温30min	△	○	△~○	○
clone B	煮沸10min クエン酸Buffer	×	○	○	△~○
MBL mAb	未処置	×	×~△	△	△

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ことを目的とした。CD26 と同様に HLA class I に関しても、これまでにホルマリン固定・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腫と前立腺の 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。また、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検討する予定である。

今回の検討では、ハイブリドーマのスクリーニングにフローサイトメトリーと ELISA を用いた。興味深いことに、Urea buffer で変性処理した可溶性 CD26 に対する ELISA での吸光値と、免疫組織染色での CD26 の染色パターンのよさや染色感度との相関は全く認められなかった（データ未掲載）。このことは、Urea buffer による抗原の変性処理が、免疫組織染色に適した単クローン抗体を得るうえで最適の処理であるわけではないことを示しているが、非変性の抗原で免疫するよりは何かしらの方法で変性処理を施した抗原を免疫した方がバリエーションに富んだ単クローン抗体が得られる可能性は十分に考えられる。今回免疫組織染色を検討した 31 クローンの中で免疫組織染色での CD26 の染色パターンがよかった抗体は、いずれもフローサイトメトリーで bright には染まらない抗体であった（データ未掲載）。このことから、免疫組織染色に適した抗体の

スクリーニング方法としてフローサイトメトリーで bright に染まらないクローンを選択することが有効である可能性が考えられ、今後更に多くのクローンを用いて再現性を検討する予定である。目的の抗体の用途に適した免疫原の変性処理方法やハイブリドーマのスクリーニング方法の情報が今後更に蓄積することを期待したい。

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、脾細胞からハイブリドーマを作製した結果、フローサイトメトリー陽性かつ 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。今後、多数の検体の免疫組織染色を検討し、最も陽性率が高く非特異的な染色が認められない抗原賦活化条件を決定することが重要である。

F. 次年度以降の計画

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。

G. 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.

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) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

【CD26 陽性中皮腫の臨床像に関する研究】

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

研究要旨

悪性胸膜中皮腫は石綿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。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫は石綿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。石綿ばく露から発症までの期間、すなわち潜伏期間は約 40 年とされ、日本国内でも高度経済成長時代の石綿消費を反映して胸膜中皮腫患者数は増加傾向にあり、このような状態は少なくとも 20 年間は続くと考えられている。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、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。われわれは、胸膜中皮腫細胞に発現する CD26 に着目し細胞膜に発現する CD26 が

治療標的となる可能性について報告した。しかしながら、臨床的意義を確認するには十分な症例数とは言えないためさらに症例数を増やして CD26 発現と臨床像との関連について検討することとした。

B. 研究方法

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、慶応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。

(倫理面への配慮)

検体は診断時、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、あるいは上述の 2 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。

C. 研究結果

1) 胸膜中皮腫における CD26 発現と臨床的要因の関連

まず、細胞膜における CD26 発現の有無と臨床的要因の関連について検討した。性別、年齢 (65 才以下と 65 才以上)、臨床病期 (I/II 期と III/IV 期)、化学療法の有無、BSC かどうかでは特に関連は認められなかったが、組織型、PS、EPP の有無では有意な関連が認められた。すなわち、組織型については上皮型、二相型、肉腫型の陽性比率はそれぞれ 85%、70%、18%であった。また、PS 0/1 が陽性 80%であるのに対し PS 2/3 は 53%にとどまった。化学療法が行われた群だけでの解析では、組織型、EPP で関連が認められた。

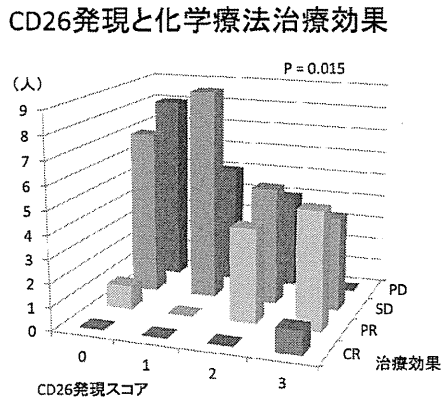
続いて、細胞膜における CD26 の発現程度と臨床的要因の関連を検討すると、性別、組織型と有意な関連が認められた。細胞膜における CD26 発現は有無、程度、いずれの評価においても組織型と強い関連があることが確認された。

また、CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、有意な関連が認められた。すなわち、より高い発現のある症例で良好な

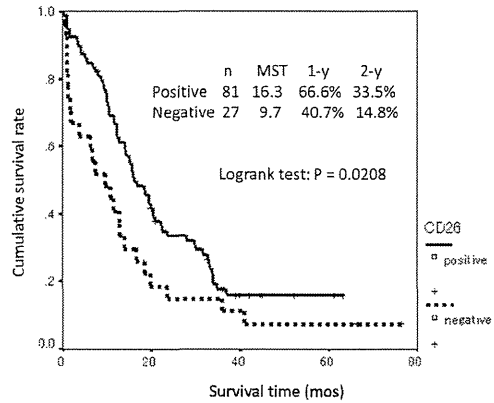
治療効果が得られた (図 1)。

図 2

図 1



CD26発現と生存期間



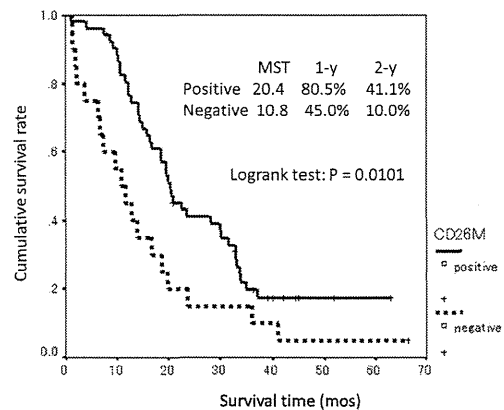
2) 胸膜中皮腫における CD26 発現と生存解析

悪性胸膜中皮腫における CD26 発現と生存との関連を臨床的要因とともに解析した。解析対象 108 例全例での生存期間中央値は 15 ヶ月、1 年生存率 60%、2 年生存率 28.7% であった。CD26 発現の有無、性別、年齢 (65 才以下と 65 才以上)、組織型、臨床病期 (I/II 期と III/IV 期)、PS (PS 0/1 と PS 2/3)、EPP の有無、化学療法の有無、BSC かどうかにおいてそれぞれ生存曲線を作成し解析すると、CD26 発現の有無、臨床病期、PS、EPP、化学療法、BSC で有意差が認められた。CD26 陽性群では生存期間中央値 16.3 ヶ月、1 年生存率 65.8% であるのに対し、CD26 陰性群では、生存期間中央値 9.7 ヶ月、1 年生存率 42.3% であった (P = 0.0414、図 2)。

また、化学療法を受けた群だけを抽出して同様の検討を行うと CD26 発現の有無、組織型、PS、EPP、化学療法、BSC で有意差が認められた (図 3)。また、Pemetrexed の使用の有無でも有意差が認められた。

図 3

化学療法例における CD26発現と生存期間



D. 考察

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。

また、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る。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。先行研究で行った同様の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。悪性胸膜中皮腫が比較的まれな疾患であるため、このような解析のための症例集積に 10 年以上を要している。10 年間で支持療法などは大きく変貌しており、今後更に短期間での症例集積を行い解析することで CD26 発現と予後への影響について検討することができると思われる。

E. 結論

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なると考えられる。

F. 次年度以降の計画

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Clin Cancer Res* ; 18(5): 1447-1456, 2012.
- 2) Fujii M, Fujimoto N, Hiraki A, Gemba K, Aoe K, Umemura S, Katayama H, Takigawa N, Kiura K, Tanimoto M, Kishimoto T. Aberrant DNA methylation profile in pleural fluid for differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* 103 (3): 510-514, 2012.
 - 3) Gemba K, Fujimoto N, Kato K, Aoe K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto K. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. *Cancer Sci.* 103 (3): 483-490, 2012.
 - 4) 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.* 68(1):177-183, 2012.
 - 5) 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* 32(11):4871-5, 2012.
 - 6) 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* 7:e21-2, 2012.
 - 7) 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.* 33(7):1277-85, 2012 .
 - 8) 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).
 - 9) 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(1): 21-28(in press).
 - 10) 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).

2. 学会発表

- 1) 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.. [March 31-April 5, 2012, Chicago, USA]
- 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 Mesothelioma Interest Group Meeting, September 11-14, 2012, Boston
- 3) Fujimoto N, Gemba K, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. The 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. [Sep 11-14, 2012, Boston, USA]
- 4) 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 Mesothelioma Interest Group Meeting, September 11-14, 2012, Boston
- 5) 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 Mesothelioma Interest Group Meeting, September 11-14, 2012, Boston
- 6) Fujimoto N. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. Asian asbestos Initiative 5th Inter National Seminar(AAI) [Nov 6-8, 2012, Busan, Korea]
- 7) 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、平成24年7月、下関。
- 8) 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、神徳済、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、平成24年7月、下関。
- 9) 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【平成 24 年 10 月 25-27 日、横浜】

- 10) 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、平成 24 年 11 月、岡山
- 11) 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、平成 24 年 11 月、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、平成 24 年 11 月、岡山
- 13) 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」【平成 24 年 11 月 8-9 日、岡山】
- 14) 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【平成 24 年 12 月 2 日、3 日、大阪】
- 15) 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【平成 24 年 12 月 2 日、3 日、大阪】

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【悪性中皮腫におけるCD26発現の評価】

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

研究要旨

難治性腫瘍である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。そこで本研究では、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。

A. 研究目的

現在、仏にて施行中のヒト化 CD26 抗体療法の第 I 相臨床試験では、特記すべき有害事象なく、また CD26 発現領域が 50%以上の症例では、すべて「安定」(Stable Disease:SD)な状態に入っており、安全性のみならず、その腫瘍効果も期待される成果が得られつつある。このヒト化 CD26 抗体療法では、あらかじめ生検あるいは手術より得られている腫瘍の病理組織について、抗 CD26 ポリクローナル抗体を用いて免疫染色することで、その発現の評価を行い、陽性率 20%以上の症例を臨床試験対象症例としている。

本研究では、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・森本幾夫が新規単クローン抗体を開発しつつあり、その抗体の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ものである。また CD26 発現は現在用いられているアリムタ、シスプラチンなど化学療法剤の治療効果予測マーカーとしても有望な結果を得ているが、さらに 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することで、バイオマーカーとなりうるかどうか検討するものである。

B. 研究方法

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、私の臨床試験で用いている R&D 社製抗 CD26 ヤギ・ポリクロナール抗体 (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。

(倫理面への配慮)

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)。

C. 研究結果

開発中の新規単クローン抗体については、31 クローンについて、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を用いて染色を試みた。その中で有意な陽性所見を呈した 6 クローンを選別した。その中で、背景の非特異的反応が強い 4 クローンについては、抗原賦活化の条件 (温度、時間、各種酵素の濃度) を厳しくし、反応の弱い 2 クローンについては、条件を緩和して、現在、さらに至適な染色条件について検討している。

岡山労災病院における中皮腫 59 症例の腫瘍の病理組織について、病理組織学的に検討したところ、その組織型は、上皮型 41 症例、肉腫型 7 症例、二相型 11 症例であった。これらの症例について、私の臨床試験で行っている CD26 染色法を用いて解析したところ、59 症例全てにおいて、陽性像は認められたが、陽性率 20%以上の症例は 43 症例であり、20%未満の症例が 16 症例であった。また陽性率を問わず、細胞膜に陽性像が認められる症例は、47 症例であり、細胞質のみと推測される症例が 12 症例であった。また、細胞膜に陽性像が見られるこれらの症例を、1) 陰性、2) 0-25%、3) 26-50%、4) 50%以上、の 4 段階にスコア評価したところ、それぞれ、1) 11 症例、2) 21 症例、3) 8 症例、4) 19 症例、であった。なお、これらの染色結果と本症例群の化学療法の有無や予後などの臨床的な各種パラメーターとの関連については、共同研究者・岸本卓巳が報告する予定である。現在、これらの CD26 染色の細胞内局在、陽性率、陽性強度について、詳細に分類しており、これらの分類結果についても同様に臨床的な各種パラメーターとの関連を探る予定である。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 次年度以降の計画

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・森本幾夫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。また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さらに、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, Hosono O, Ohnuma K, Hiraki A, Fujii M, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. Clin. Cancer Res. 18:1447-1456, 2012

2) 山田 健人 免疫組織化学での TSA (Tyramide Signal Amplification) 増感法検査と技術 第 40 巻 第 2 号 155-157, 2012

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. The European Society for Medical Oncology (ESMO) Vienna, Austria
28 September - 2 October 2012

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. The 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group September 11-14, 2012, Boston, USA

3) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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))
分担研究報告書

【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】

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

研究要旨

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 方法及び市販の ELISA キットともに正常人血清中にヒト化抗体を加えてアッセイ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 CD26 抗体存在下でも 5F8 という異なるエピトープの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 抗体治療患者の血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素値を今後測定していく予定である。

A. 研究目的

CD26 分子は DDPIV 酵素を含む T 細胞活性化分子で、我々は単クローン CD26 抗体の開発、CD26 cDNA の単離を世界に先駆けで行った。この研究過程で悪性中皮腫細胞株が CD26 を発現していることを偶然発見した。更に高親和性で生物学的活性の強い良質なヒト化 CD26 抗体(YS110)を開発した。本抗体は *in vitro* で中皮種細胞株の増殖を抑制し、中皮腫株移植免疫不全マウスに投与したところ腫瘍縮小と生存延長をきたした。ま

た実際の悪性中皮腫患者病理組織では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出し、本抗体が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。

悪性中皮腫はアスベストばく露により引き起こされ、今後益々増加すると予想され、死亡者数も 2010 年には 1215 名にのぼり、大きな社会問題となっている。予後はきわめて不良で平均生存期間は約 1 年で、新規かつ有効な治療法開発は急務である。

我々は悪性中皮腫への新規治療法候補としてヒト化 CD26 抗体を開発したが、現在フランスで悪性中皮腫及びその他 CD26 陽性悪性腫瘍患者を中心として第 1 相臨床試験を施行中で、第 4 コホートまでの中間評価では安全に進行し、更に評価可能な 19 症例について約 50%の症例が stable disease (SD)と期待される結果を得ており、フランスの第 1 相試験が終了次第、本邦でも臨床試験を計画している。

可溶性 CD26(sCD26)は DPPIV 酵素活性を含み、血清及び胸水中に存在する。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 抗体投与では血清中の sCD26 と反応し、投与患者においては sCD26 値及び DPPIV 酵素値が減少することが予想され、sCD26、DPPIV 酵素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。

sCD26 レベル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 系を確立した (J.Rheumatol.29:1855,2002)。しかしヒト化 CD26 抗体治療患者では血清中にヒト化 CD26 抗体が存在するため、この ELISA 系ではヒト化抗体と同じエピトープを認識する 1F7 を用いるため (5F8 は異なる)、競合し、sCD26 は測定不可の可能性がある。そこで本研究はヒト化 CD26 抗体存在下でもこれらを測定可能な ELISA 系を開発し、さらに市販の sCD26 測定キットにおいてもヒト化 CD26 抗体存在下で測定可能なものはないかも検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 抗体

CD26 抗体である 1F7、5F8 及び 9C11 は当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。

2) 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、5 μ g/ml の捕捉抗体 (CD26 モノクローナル抗体 5F8) を各穴 100 μ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する。

2. 捕捉抗体プレートのブロッキング

上記 1 のプレートを各穴 300 μ l の PBS-Tween で 3 回洗浄後、200 μ l のブロッキングバッファーを分注し、室温で 2 時間静置し、各穴 300 μ l の 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 100 μ l 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 100 μ l ずつ 2 穴に分注する。プレートを密封し、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する。

4. 可溶性 CD26 の測定

上記 3 のプレートを各穴 300 μ l の PBS-Tween で 3 回洗浄後、0.5 μ g/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 100 μ l ずつ分注し、室温で 2 時間静置する。300 μ l の

PBS-Tween で 3 回洗浄後、1 万倍希釈した ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase 液を 100 μ l ずつ分注する。プレートに遮光して、室温で 1 時間静置する。300 μ l の PBS-Tween で 3 回洗浄後、PNPP を 100 μ l ずつ分注し、遮光して室温で 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、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する。

3. DPPIV 活性の測定

上記 2 のプレートを各穴 300 μ l の 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

発色 : 化学発光 (吸光度 450nm)

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

発色 : 化学発光 (吸光度 450nm)

3) 健常人、血清及び患者検体について

健常人血清は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)

本研究の、特に臨床研究においては、文書により被験患者本人の同意を得た上で行うものとする。本研究にまつわる個人の情報は厳重な管理のもと守秘義務を遵守する。また解析検討結果を公表する際には個人名の漏