

以外のタンパク質中にも発生していることが予想される。ヒト化 CD26 抗体適用患者を選択するための CD26 の発現診断にはどこで誰が診断しても CD26 陽性率を正確に評価できる明瞭さと特異性が求められる。そのために、R&D 社のポリクローナル抗体との比較を行い、非特異的な結合を可能な限り抑え、より明瞭に CD26 を染色することができる新規抗ヒト CD26 単クローン抗体に適した抗原賦活化処理方法やブロッキング方法を選択する必要がある。

E. 結論

Urea buffer で変性処理した組換え可溶性ヒト CD26 をマウスに免疫することで、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体よりも遥かに染色性に優れた 2 クローンを得た。これらの新規単クローン抗体は異なるロットでも安定した染色性を示し、4°C・-80°C ともに 12 ヶ月保存しても精製直後と同等の明瞭な染色強度を示すことが確認された。今後、開発した新規単クローン抗体を用いた免疫染色キット化を目標に、免疫組織染色プロトコルの更なる改良を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Regulation of pulmonary GVHD by IL-26+CD4 T lymphocytes through CD26/caveolin-1 interaction. *J Immunol.* 2015; in press.
- 2) Otsuki N, Iwata S, Yamada T, Hosono O, Dang NH, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C. Modulation of immunological responses and amelioration of collagen-induced arthritis by the novel roxithromycin derivative 5-I. *Mod Rheumatol.* 2015; in press.
- 3) Ohnuma K, Saito T, Hatano R, Hosono O, Iwata S, Dang NH, Ninomiya H, Morimoto C. Comparison of two commercial ELISAs against an in-house ELISA for measuring soluble CD26 in human serum. *J Clin Lab Anal.* 2015; in press
- 4) Hatano R, Ohnuma K, Otsuka H, Komiya E, Taki I, Iwata S, Dang NH, Okumura K, Morimoto C. CD26-mediated induction of EGR2 and IL-10 as potential regulatory mechanism for CD26 costimulatory pathway. *J Immunol.* 2015; 194:960-972
- 5) Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2014; 9:e115647
- 6) Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Blockade of CD26 Signaling Inhibits Human Osteoclast Development. *J Bone Miner Res.* 2014; 29: 2439-2455
- 7) Komiya E, Ohnuma K, Yamazaki H, Hatano R, Iwata S, Okamoto T, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 4: 609-615
- 8) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata

S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma. Br J Cancer. 2014; 110: 2232-2245

- 9) Kwan JC, Liu Y, Ratnayake R, Hatano R, Kuribara A, Morimoto C, Ohnuma K, Paul VJ, Ye T, Luesch H. Grassypeptolides as Natural Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 8 and T-Cell Activation. Chembiochem. 2014; 15:799-804.

発明者 : 森本幾夫、大沼圭、波多野良
出願者 : 順天堂大学
種類 : 特許権
番号 : 特願2014-199260
出願日 : 2014年9月29日
出願国 : PCT加盟国
概略 : CD26分子のリガントCav-Ig蛋白が慢性GVHD治療に有効であるという特許である。

2. 学会発表

- 1) 大沼圭, 斉藤辰彦, 波多野良, 岩田哲史, 鈴木博史, 森本幾夫. DPP4 阻害剤の服用によって誘発される多関節症とそのバイオマーカー. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014 年 4 月 24-26 日, 東京
- 2) 波多野良, 大沼圭, 岩田哲史, 石井智徳, 関川巖, 森本幾夫. IL-10 産生誘導による CD26 共刺激経路の negative feedback 機構の解析. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014 年 4 月 24-26 日, 東京

G. 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

【本研究の進捗による特許出願】

発明の名称 : 免疫抑制剤

【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・非常勤講師

研究要旨

悪性中皮腫の新規治療法として期待されるヒト化 CD26 抗体療法においては、腫瘍組織における CD26 発現の適確な評価が重要である。本研究では CD26 発現評価を目的として開発された新規単クローン抗体の臨床検体における免疫染色の評価法の確立を行い、適合性を検討した。最終年度は、クローン 19-32 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 86 症例の悪性中皮腫症例について CD26 発現の詳細な検討を行い、77 症例が陽性（陽性率 90%）となること、肉腫型でより高感度に発現を検出できることを見出した。またポリクローナル抗体との発現局在の差異を明らかにした。

A. 研究目的

仏にて施行されたヒト化 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、また中皮腫では 19 症例中 10 症例で「安定」(Stable Disease;SD)への導入が可能であり、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た。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きた。

本研究においては、これまでに研究代表者・森本幾夫とともに本分担研究者は、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、新規単クローン抗体の開発に成功した。そこで、ここでは、これらの新規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した。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報告 (Clin Cancer Res 18:1447, 2012)してきたが、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ための新規抗体での基礎的検討を行った。

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

ープ処置（120℃、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。

岡山労災病院および山口宇部医療センターにおける中皮腫 86 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℃、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・ポリクローナル抗体 (Lot. No. JOQ107061) および新規モノクローナル抗体クローン 19-32 を用いた。二次抗体は、Peroxidase 付加抗ヤギ IgG 抗体(ImmPRESS 社製)あるいは 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。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

昨年度までに新規開発した単クローン抗体 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、さらに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た。その結果、クローン 19-32 およびクローン 18-110 について、正常ヒト腎、肝、前立腺及び悪性中皮腫のいずれの組織においても、R&D 社ポリクローナル抗体と同等の結果が得られることに成功した。

そこで、中でもバックグラウンドが低く良好なシグナルが得られたクローン 19-32 について、岡山労災病院および山口宇部医療センターにおける中皮腫 86 症例の腫瘍の病理組織を対象として、免疫染色に検討した（表 1）。なお組織型は、上皮型 53 症例、肉腫型 15 症例、二相型 18 症例である。これらの症例について、私の臨床試験で行っている R&D 社ポリクローナル抗体を用いた CD26 染色法および新規モノクローナル抗体クローン 19-32 を用いて解析した。陽性率 20%以上の症例はそれぞれ 73 症例、77 症例であった。また陽性率を 50%以上とするとそれぞれ 55 症例、70 症例となった。このように新規モノクローナル抗体クロ

表1 悪性中皮腫症例におけるCD26発現

| | 陽性率 | | 膜>細胞質 | 膜+細胞質 | 上皮型 | 肉腫型 |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 20%≤ | 50%≤ | | | | |
| Clone 19-32 | 77/86 90% | 70/86 81% | 19/86 22% | 67/86 78% | 65/71 92% | 12/15 80% |
| Poly Ab R&D | 73/86 85% | 55/86 64% | 71/86 83% | 15/86 17% | 67/71 94% | 6/15 40% |

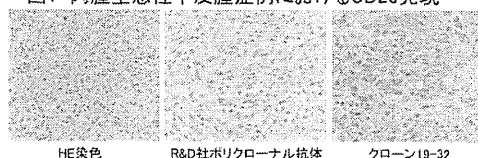
ーン 19-32 の方が、より広い範囲での陽性率を示すことが明らかとなった。一方、細胞膜に明らかな陽性像が認められる症例は、それぞれ 71 症例、19 症例であり、R&D 社ポリクローナル抗体の方が細胞膜染色性が強調される結果となった。また、細胞質に陽性所見が瀰漫生に認められる症例（細胞膜+細胞質）は、それぞれ 15 症例、67 症例であった。これらの結果は、新規モノクローナル抗体クローン 19-32 は中皮腫での CD26 発現評価において、より鋭敏であることが明らかとなったが、同時に細胞内局在の意味については今後、検討して行く必要があることを示唆している。なお、これらの症例を、細胞膜の陽性率で、1) 陰性、2) 0-25%、3) 26-50%、4) 50%以上、の 4 段階にスコア評価し、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、共同研究者・岸本卓巳が解析する予定である。

また新規モノクローナル抗体クローン 19-32 について、正常ヒト全身の各組織を用いて、様々な固定条件で検討を行っているが、過固定の場合には平滑筋、心筋などの CD26 陰性組織において非特異的陽性所見が出るということが明らかとなってきた。

悪性中皮腫の中で肉腫型あるいは二相型の肉腫成分において、CD26 陽性率が低いことが、これまでのポリクローナル抗体を用いた検討から明らかになっている。ところが、悪性中皮腫の肉腫型から樹立され

た細胞株 (JMN, MSTO-211H 細胞など) では、未固定細胞のフローサイトメーター解析やウエスタンブロット法による蛋白質発現解析さらに蛍光抗体法解析により、CD26 発現があることが示されている。そこで、肉腫型中皮腫症例について、新規モノクローナル抗体クローン 19-32 を用いて免疫染色により、CD26 発現を検討した。その結果、R&D 社ポリクローナル抗体では 6 症例 (40%) に対して新規モノクローナル抗体クローン 19-32 では、12 症例 (80%) の症例で陽性となった (表 1 および図 1)。

図1 肉腫型悪性中皮腫症例におけるCD26発現



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ナル抗体は、ホルマリン固定、パラフィン切片においても、良好で広範囲に陽性シグナルが得られており、有用な抗体であると考えられる。さらに今後は、本抗体は抗体療法の適否を評価するバイオマーカーとするために、様々な医療機関でのいろいろな固定状況、包埋条件での検体で免疫染色の至適を進める必要がある。さらに今後、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キット化を行い、全自動染色装置での工程を確立するために、染色条件の至適化を進めることが必要である。また CD26 発現について細胞局在、陽性率、陽性強度などの各種パラメーターで詳細に定量評価することで、抗

体療法の効果や予後などとの関連性を検証する基礎を構築していくことも重要と考える。

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た。本クローンは、これまでのポリクローナル抗体と同等以上の染色性と特異性を有しており、さらに肉腫型中皮腫においては、ポリクローナル抗体よりも感度が高い傾向が明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. PLoS One. 9(12):e115647, 2014
- 2) Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Blockade of CD26 Signaling Inhibits Human Osteoclast Development. J. Bone Miner. Res. 29(11):2439-2455, 2014
- 3) Komiya E, Yamazaki H, Ryou Hatano R, Iwata S, Okamoto T, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 447(4):609-615, 2014
- 4) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C.

Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma. Br. J. Cancer. 110(9):2232-2245, 2014

5) Hatano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. Diagn. Pathol. 9:30, 2014

2. 学会発表

- 1) Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Targeting CD26 on both osteoclasts and carcinoma cells in osteolytic bone metastasis with humanized anti-CD26 monoclonal antibody. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-27 日 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

出願番号：特願 2013-158533
発明の名称：抗ヒト CD26 モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片
出願日：2013年7月31日

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起因する胸膜由来の難治性悪性腫瘍である。集学的治療が行われるが、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い、CD26 発現と血清サイトカインの関連について検討を行った。CD26 発現は上皮型細胞で発現頻度が高く、CD26 発現群で化学療法の治療効果がより良好、CD26 陽性群で予後が良好であった。CD26 発現と血清サイトカインの関連では CD26 発現と血清 MIP-1 β の関連が示唆された。今後、種々の治療法を検討する上で免疫学的側面の検討も重要と思われた。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫は石綿ばく露に起因する胸膜中皮由来の難治性悪性腫瘍である。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。近年、種々の悪性腫瘍に対す

る新たな治療法として免疫学的側面からのアプローチが試みられている。今回、悪性胸膜中皮腫と CD26 の発現、免疫学的側面を把握する一つの方法として診断時の血清サイトカインについて検討した。

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°C の加湿室で 1 昼夜、抗 CD26/DPPIV 抗体 (NB100-59021, Novus Biologicals, Litterton, 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。最終確認日は平成 25 年 12 月 1 日で集計した。

CD26 発現を確認した悪性胸膜中皮腫症例のうち 15 例について診断時の血清から Bio-plex 法を用いて 27 種類のサイトカイン (PDGF, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGFb, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α , VEGF) を測定した。

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。2 群間の比較には Mann-Whitney 検定、多群間の比較には Kruskal-Wallis 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。

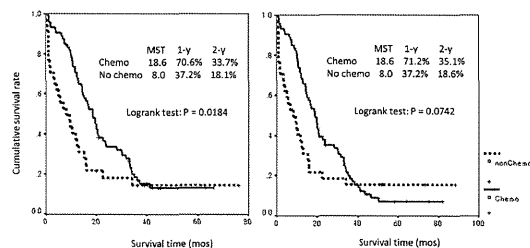
また、CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、有意の関連が認められた。すなわち、より高い発現のある症例で良好な治療効果が得られた。

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 15.2 ヶ月、1 年生存率 60.5%、2 年生存率 29.9%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、BSC で有意差が認められた。短期間での解析では化学療法でも差が認められたが今回の長期解析では化学療法の有無では有意差は検出されなかった (図 1)。

図 1

化学療法の有無と生存期間

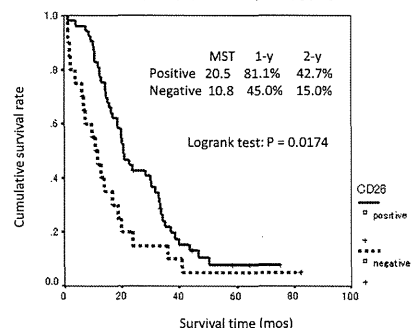


CD26 陽性群では生存期間中央値 16.8 ヶ月、1 年生存率 67.2%であるのに対し、CD26 陰性群では、生存期間中央値 9.7 ヶ月、1 年生存率 40.7%であった (P = 0.0280)。

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 で有意差が認められた (図 2)。また、Pemetrexed の使用の有無でも有意差が認められた。

図 2

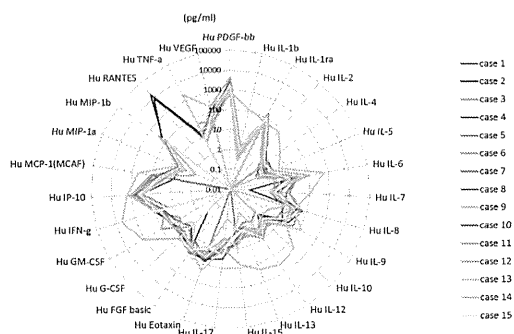
化学療法症例における CD26 発現と生存期間



続いて中皮腫の CD26 発現と血清サイトカイン濃度の関連を検討した。CD26 発現スコアで 0, 1, 2, 3 がそれぞれ 2 例、4 例、3 例、6 例の計 15 例で検討した。15 例の血清サイトカイン濃度をレーダー図で示す (図 3)。

図 3

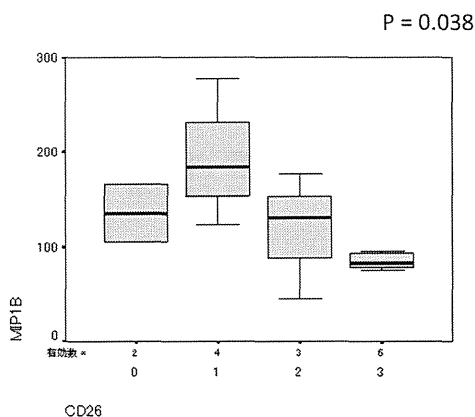
中皮腫15例の血清サイトカイン濃度



CD26 の発現により 4 群に分けて血清サイトカイン濃度を比較すると、他のサイトカインでは CD26 発現スコアにより有意差は認められなかったが、血清 MIP-1β のみが有意差を示した (図 4)。

図 4

CD26発現と血清MIP-1β濃度



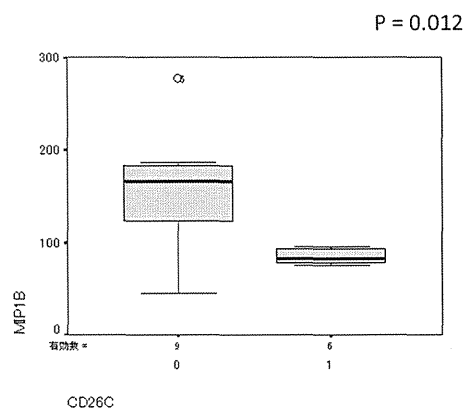
CD26 発現スコア 0 - 1 とスコア 2 - 3 の 2 群で比較数と血清 IL-8, IL-9, MIP-1β で有意差が認められ、いずれも CD26 高発現群で低濃度を示した。

また、血清 MIP-1β では、CD26 発現ス

コア 0 - 2 とスコア 3 の 2 群でも有意差が認められた (図 5)。

図 5

CD26発現と血清MIP-1β濃度



D. 考察

これまでに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い、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、CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、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ていることが確認されている。

また、CD26 発現と 27 種類の血清サイトカイン濃度との関連を検討したところ、多くのサイトカインでは血清濃度と CD26 発現には統計学的な関連は見いだされなかった。しかし、IL-8, IL-9, MIP-1β で CD26 発現と濃度に偏りがみられ高発現群で濃度が低かった。その中で MIP-1β のみが 4 群の比較でも CD26 発現が高いほど血清濃度が低い傾向を示した。

MIP-1β の生理活性として、T 細胞、未熟

樹状細胞、好酸球、NK 細胞などに対して遊走活性を示し、これらの細胞の局所への浸潤の制御し、T 細胞に対して F-アクチンとの重合化や再構成を引き起こしインテグリンの inside out signaling により、血管内皮細胞の ICAM-1 や VCAM-1 への接着を誘導することが知られている。また、抗 CCR3 抗体によるヒト T 細胞の *in vitro* での細胞増殖反応において、T 細胞受容体の副刺激として増殖を促進させることが報告されている。悪性胸膜中皮腫における MIP-1 β についての報告は管見の限りでは認められずその役割については不明である。しかしながら、悪性胸膜中皮腫の発症にはアスベストによる胸膜の慢性炎症が関与すると考えられており、中皮腫の発症あるいは増殖に何らかの関与をしている可能性は十分に考えられる。

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。

CD26 発現と血清サイトカイン濃度との検討では、いくつかのサイトカインで CD26 発現との関連を示唆する結果が示された。サイトカインは相互に関連して生理活性を示すため今回の結果だけで結論を出すことはできないがなんらかの免疫学的側面を有していることを示唆するものと考えられる。難治性悪性疾患のひとつである悪性胸膜中皮腫の治療開発においてはこのような免疫学的側面も把握しながら検討していくことが

今後重要になっていくと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 110:2232-45, 2014.
- 2) Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*. 9:e115647, 2014.

2. 学会発表

- 1) 青江啓介、岡部和倫、村上知之、村田順之、宇都宮利彰、大石景士、坂本健次、尾形佳子、片山英樹、近森研一、前田忠士、上岡博. 気胸を契機に発見された悪性胸膜中皮腫の検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術集会 2014 年 4 月 27 日, 大阪
- 2) 青江啓介、三村雄輔、三村由香、村田順之、大石景士、岸野大蔵、近森研一、前田忠士、岸本卓巳、上岡博. Fibulin-3, ERC/mesothelin, and Osteopontin in Pleural Effusion for Diagnosing Malignant Pleural Mesothelioma in Japan. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2014 年 7 月 17 日, 福岡
- 3) 青江啓介、三村由香、三村雄輔、岡部和

倫、村上知之、上岡博. 中皮腫診療におけるバイオマーカー. 第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会 2014 年 11 月 9 日, 下関

- 4) 宮武和代、片山英樹、関千尋、坂本健次、大石景士、岸野大蔵、近森研一、青江啓介、前田忠士、上岡博. 緩和ケア病棟における胸部腫瘍患者に対する鎮静の評価. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014 年 11 月 16 日, 京都
- 5) 青江啓介、村田順之、宇都宮利彰、大石景士、坂本健次、関千尋、大藤貴、尾形佳子、岸野大蔵、片山英樹、近森研一、前田忠士、村上知之、岡部和倫、上岡博. 悪性胸膜中皮腫非手術例における長期生存例の検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014 年 11 月 16 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【胸膜中皮腫における血清および胸水中の可溶性 CD26 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に加え早期診断、スクリーニングのためのバイオマーカーの開発が望まれる。本研究では悪性胸膜中皮腫における血清および胸水中の可溶性 CD26 を測定し早期診断における有用性について検討した。血清可溶性 CD26 は、胸膜中皮腫を発症していない職業性石綿ばく露者に比べ、胸膜中皮腫患者では有意に低下していた。また胸膜中皮腫の進行に伴いさらに低下していた。血清可溶性 CD26 は胸膜中皮腫のスクリーニング、早期診断マーカーとして有用である可能性がある。また血清 DPPIV 活性、胸水中の比活性値(DPPIV/CD26)については、高値群と低値群の間で中皮腫の生存期間に有意差が認められた。

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に加え、早期診断、スクリーニングのためのバイオマーカーの開発が望まれる。われわれは、胸膜中皮腫患者における血清および胸水中の可溶性 CD26 に着目し測定した。他疾患の罹患者や、中皮腫を発症していない石綿ばく露者との比較検討を行い、胸膜中皮腫の早期診断、スクリーニングにおける有用性につ

いて検討した。

特に本年度の研究では、血清及び胸水中の可溶性 CD26 と中皮腫患者の生存との関連について検討を加えたほか、中皮腫早期診断における有用性について、可溶性メソセリン関連蛋白 (SMRP) との比較検討を行った。

B. 研究方法

対象は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 84 例と、職業性の石綿ばく露歴があり画像上石綿ばく露の指標となる胸膜プラークを認めるものの、胸膜中皮腫を発症していない症例 79 例、および比較の対象として良性石綿胸水や感染性胸膜炎の胸水貯留症例 135 例である。胸膜中皮腫 84 例のうち、45 例(上皮型 28 例、二相型 4 例、肉腫型 8 例、組織型不明なもの 5 例)において血清、66 例(上皮型 42 例、二相型 15 例、肉腫型 7 例、組織型不明なもの 2 例)において胸水を採取した。職業性の石綿ばく露歴があり胸膜プラークを認める 79 例からは血清を、良性石綿胸水や感染性胸膜炎の胸水貯留症例 135 例からは胸水を採取した。

血清および胸水中の可溶性 CD26 の測定は、順天堂大学免疫病・がん先端治療学講座において樹立した測定系を用いて DPPIV 活性とともに測定した。血清中の可溶性 CD26、DPPIV 活性について胸膜中皮腫群と胸膜プラーク群において比較検討を行い、さらに胸膜中皮腫群を組織型および臨床病期別に分けて比較検討した。胸水中の可溶性 CD26 については胸膜中皮腫群と他の良性胸水疾患群において比較検討を行ったほか、血清と同様胸膜中皮腫群において組織型や臨床病期別に分けて比較検討した。

SMRP については、富士レビオ社による化

学発光免疫測定法を用いて測定した。

異なる 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用い、カプラン・マイヤー法を用いて生存曲線を作成した。p<0.05 をもって統計学的に有意と判断した。

(倫理面への配慮)

検体は診断時に患者の同意を得てで採取した。本研究については上述の 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) 胸膜中皮腫の診断における血清可溶性 CD26 の有用性について

まず、血清中の可溶性 CD26 について検討した。胸膜中皮腫における血清可溶性 CD26 を胸膜プラーク群と比較したところ、胸膜プラーク群に比べ有意に低値であった(図 1)。ROC 曲線を作成し両群の鑑別における有用性を検討したところ、AUC は 0.787(95%信頼区間 0.699-0.876)であり、1.00 g/ml をカットオフ値としたところ、感度は 60.0%、特異度は 77.2%であった。次に、血清中の DPPIV 活性について検討した。胸膜中皮腫における DPPIV 活性を胸膜プラーク群と比較したところ、やはり胸膜プラーク群に比べ有意に低値であった。ROC 曲線を用いて両群の鑑別における有用性を検討したところ、AUC は 0.787(95%信頼区間 0.704-0.871)であり、17.0 μ M/min をカットオフ値としたところ、感度は 60.0%、特異度は 84.8%であった。

続いて、胸膜中皮腫群における血清可溶性 CD26 を組織型、臨床病期別に検討した。血清中の可溶性 CD26 は組織型に関しては差が

見られなかったが、臨床病期別の検討では、比較的早期である I 期と II 期群に比べ、進行期である III 期および IV 期群においてより低値を示した(図 2)。

さらに、血清可溶性 CD26 と DPPIV 活性について、胸膜中皮腫患者の生存との関連について検討した。血清可溶性 CD26 値が高値の群と低値の群に分けて生存期間を比較したが両群の間に有意差は見られなかった。しかし DPPIV 活性について高値($\geq 17.0\mu\text{M}/\text{min}$)と低値($< 17.0\mu\text{M}/\text{min}$)の 2 群に分けて生存期間を比較したところ、高値群では生存期間の中央値は 15.0 ヶ月(95%信頼区間 8.1-21.9 ヶ月)であり、低値群(生存期間の中央値 11.4 ヶ月、95%信頼区間 7.8-15.0 ヶ月)に比べ有意に延長していた($P=0.032$) (図 3)。

図 1

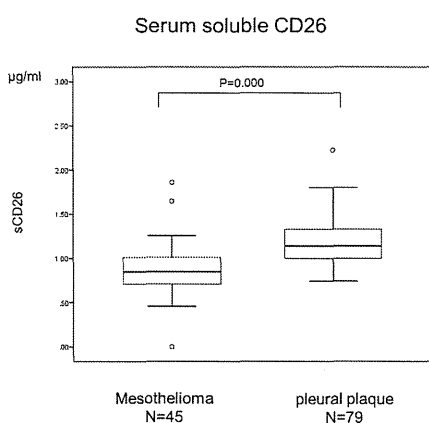


図 2

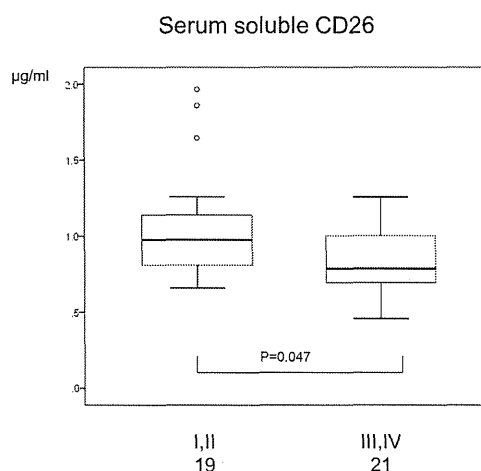
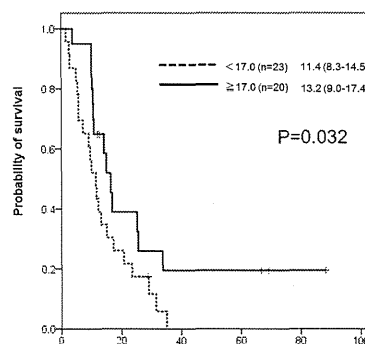


図 3

中皮腫における血清DPPIV活性と予後



2) 胸水中の可溶性 CD26 の検討

悪性胸膜中皮腫における胸水中の可溶性 CD26 と DPPIV 活性を組織亜型ごとに比較したところ、上皮型において肉腫型にくらべ高値であり、特に CD26 に関しては統計学的に有意であった($P=0.027$)(図 4)。次に上皮型中皮腫における可溶性 CD26 と DPPIV 活性を他の良性胸水疾患群と比較したところ高値である傾向を示し、特に DPPIV 活性においては統計学的に有意差が認められた($P=0.006$)。

次に胸水中の可溶性 CD26、DPPIV 活性と、胸膜中皮腫患者の生存との関連について検討した。胸水中の可溶性 CD26、DPPIV 活性をそれぞれ高値群と低値群に分けて生存期間を比較したところ、いずれも有意差は認められなかった。けれども DPPIV/CD26 であらわした比活性値について、高値群(≥ 17.0 nmol/min/mg sCD26)と低値群(< 17.0 nmol/min/mg sCD26)の 2 群で生存を比較したところ、高値群では生存期間の中央値は 18.5 ヶ月(95%信頼区間 12.1-25.0 ヶ月)であり、低値群(生存期間の中央値 12.2 ヶ月、95%信頼区間 9.7-14.7 ヶ月)に比べ有意に延長していた($P=0.028$)(図 5)。

図 4

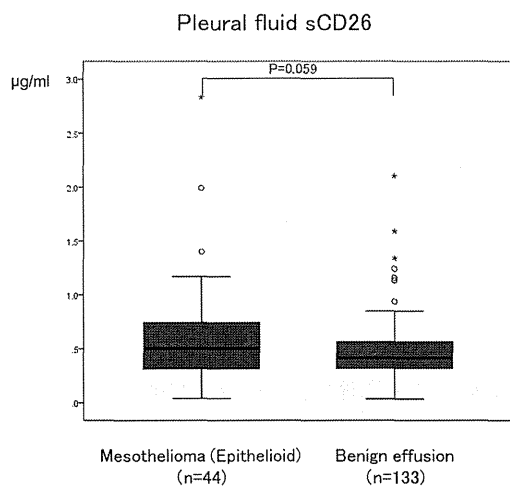
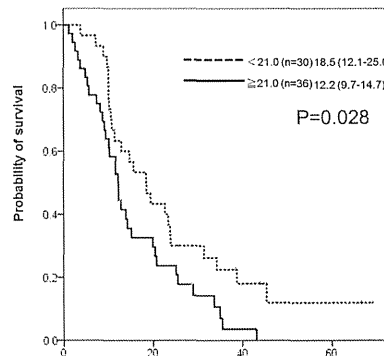


図 5

中皮腫における胸水比活性DPPIV/CD26と予後



3) 胸膜中皮腫における血清及び胸水中の SMRP

胸膜中皮腫の診断における可溶性 CD26 の有用性を既存の分子マーカーと比較する目的で、SMRP の測定を行った。胸膜中皮腫患者における血清及び胸水中の SMRP の中央値はそれぞれ 0.43 nmol/l, 15.37 nmol/l であった。胸膜プラークを認めるものの胸膜中皮腫を発症していない症例 79 例における血清 SMRP の中央値は 0.90 nmol/l、良性石綿胸水や感染性胸膜炎の胸水貯留症例 135 例における胸水中の SMRP の中央値は 0.43 nmol/l であった。胸膜中皮腫における血清 SMRP 値は胸膜プラークを認めるものの胸膜中皮腫を発症していない症例に比べ有意に高く ($P=0.000$)、胸膜中皮腫における胸水 SMRP は良性石綿胸水や感染性胸膜炎の胸水貯留症例に比べ有意に高値であった ($P=0.000$)。胸膜中皮腫例と、胸膜プラークを認めるものの胸膜中皮腫を発症していない症例の鑑別における SMRP の有用性を検討するため ROC 曲線を作成したところ、AUC 値は 0.738(95% 信頼区間 0.638-0.838)であった。

D. 考察

悪性胸膜中皮腫における血清および胸水中の可溶性 CD26 を測定しバイオマーカーとしての有用性について検討した。その結果、胸膜中皮腫における血清可溶性 CD26 および DPPIV 活性は胸膜プラークを有する石綿ばく露者に比べ有意に低値を示していた。これらの結果は、胸膜中皮腫のスクリーニングあるいは早期診断においてこれらの測定が有用である可能性を示している。同様に SMRP を測定したところ、胸膜中皮腫において有意に高値であった。ROC 解析に基づいた比較では、血清可溶性 CD26 は胸膜中皮腫の鑑別において SMRP に劣らない有用性を示すことが示唆された。また胸水中の可溶性 CD26 および DPPIV 活性は、特に上皮型の中皮腫において高値を呈する傾向があり、他の良性胸水疾患に比べ高値を呈しており、上皮型中皮腫の診断マーカーとして有用である可能性があると思われた。

また血清 DPPIV 活性、胸水中の比活性値 (DPPIV/CD26) については、高値群と低値群の間で中皮腫の生存期間に有意差が認められた。これらの結果は、可溶性 CD26 が中皮腫の予後を反映する可能性があることを示唆している。

悪性疾患における CD26 の関わりに関してはこれまでにいくつかの報告があるが、そのうち、大腸癌患者における過去の報告では、我々の結果と同様に、健常人に比べ CD26 が低値であったと報告されている。CD26 は本来リンパ球に発現するマーカーの 1 つであり、リンパ球の活性を反映するマーカーであると考えられている。今回の検討で示された胸膜中皮腫における血清可溶性 CD26 の低下

は、胸膜中皮腫発症に伴う免疫能の低下を反映している可能性がある。このことは、胸膜中皮腫の進行期においてこれらのマーカーがさらに低値となっていたことから裏付けられる。あるいは近年の研究において、DPPIV は脂肪組織から分泌されるアディポカインの 1 つであることが示されており、肥満や体重減少と関連がありメタボリックシンドロームのマーカーとなり得ることが報告されている。今回の胸膜中皮腫における CD26 の低値は中皮腫の発症、進行に伴う体重減少を反映している可能性もあるが、これは今後明らかにすべき課題であるといえる。

一方で特に上皮型の中皮腫において胸水中の可溶性 CD26 が高値となる傾向が示された。我々はこれまでの研究において、上皮型の胸膜中皮腫では腫瘍細胞の表面に CD26 が高発現することを報告しており、胸水中の可溶性 CD26 は、腫瘍細胞に由来し胸水中に分泌され遊離しているものと思われた。

このように、血清および胸水中の可溶性 CD26 は、それぞれ異なった機序により遊離している可能性があり、これらはバイオマーカーとしての有用性を示唆しているほか、胸膜中皮腫における CD26 の関わりを考える上でもきわめて興味深い知見であると考えられる。

E. 結論

悪性胸膜中皮腫における血清および胸水中の可溶性 CD26 について検討した。血清中の可溶性 CD26 は石綿ばく露者における胸膜中皮腫発症のスクリーニングあるいは早期診断マーカーとして有用な可能性がある。また胸水中の可溶性 CD26 は上皮型中皮腫の診断マーカーとして有用な可能性がある。血清および胸水中の可溶性 CD26 に関する検討は、胸

膜中皮腫における CD26 の関わりを考える上できわめて重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimoto N, Kato K, Usami I, Sakai F, Tokuyama T, Hayashi S, Miyamoto K, Kishimoto T. Asbestos-related diffuse pleural thickening. *Respiration* 2014; 88: 277-84.
- 2) Makimoto G, Fujiwara K, Fujimoto N, Yamadori I, Sato T, Kishimoto T. Phrenic nerve paralysis as the initial presentation in pleural sarcomatoid mesothelioma. *Case Rep Oncol* 2014; 7: 389-392.
- 3) Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2014; 9: e115647.
- 4) 藤本伸一、青江啓介、大泉聡史、上月稔幸、亀井敏昭、三浦溥太郎、井内康輝、岸本卓巳。胸膜中皮腫を中心とした胸水ヒアルロン酸に関する症例調査。肺癌 54 (6) : 767—771, 2014.
- 5) 五十嵐毅、宇佐美郁治、岸本卓巳、水橋啓一、大西一男、大塚義紀、横山多佳子、藤本伸一、坂本浩一、中野郁夫、木村清延。じん肺健康診断判定基準の変更における妥当性についての検討。日職災医誌, 62 : 233-237, 2014.
- 6) 中野郁夫、岸本卓巳、宇佐美郁治、大西一男、水橋啓一、大塚義紀、五十嵐毅、藤本伸一、木村清延。じん肺における非結核性抗酸菌症の発生状況に関する研究。

日職災医誌, 62 : 117-22, 2014.

2. 学会発表

- 1) 藤本伸一。石綿曝露による悪性中皮腫。第 87 回日本産業衛生学会。職業性呼吸器疾患研究会「職業性呼吸器疾患の臨床的特徴」2014 年 5 月 22 日, 岡山
- 2) 藤本伸一、青江啓介、細野治、山田健人、岸本卓巳、森本幾夫。胸膜中皮腫における可溶性 CD26 の臨床有用性に関する検討。第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25-27 日, 横浜
- 3) Fujimoto N, Kato K, Usami I, Sakai F, Tokuyama T, Hayashi S, Miyamoto K, Kishimoto T. Asbestos-Related Diffuse Pleural Thickening in Japan: A Retrospective Analysis. CHEST 2014 , Oct 25 -30, 2014, Austin, USA
- 4) 藤本伸一、岸本卓巳。石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の臨床と問題点。第 62 回日本職業災害医学会学術大会。シンポジウム 8「アスベストによる健康障害の現状と今後の課題」2014 年 11 月 16 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

【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

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

研究要旨

可溶性 CD26 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可溶性 CD26 値及び DPPIV 酵素値を治療経過でモニターしていくことは抗体療法が安全に行われるために必須である。

従来の可溶性 CD26 測定 ELISA 法及び市販の ELISA キットともに正常人血清中にヒト化 CD26 抗体が存在するとブロックされ測定不能であったが、9C11 という新しい CD26 抗体を従来用いていたヒト化 CD26 抗体と同一エピトープの 1F7 に置き換えて ELISA を行うと、ヒト化抗体存在下でも可溶性 CD26 は測定可能であり、新しい ELISA 系を確立した。この ELISA 系は従来の ELISA 系と比しても同等の測定感度を持ち、市販の ELISA キットよりも格段に感度は高かった。フランスの第 I 相臨床試験が終了したのでヒト化 CD26 抗体投与の全検体について患者血清中の可溶性 CD26/DDPIV 酵素値を測定したところ、新しい ELISA 系はヒト化抗体存在下でも測定が可能であり、さらにヒト化 CD26 抗体の投与量が増加するにつれて可溶性 CD26/DDPIV 値は低下する傾向にあった。可溶性 CD26ELISA キットの性能試験は良好であるが DPPIV 酵素活性測定キットの性能については血清中の干渉因子がその測定に一部影響する可能性が示唆された。

A. 研究目的

CD26 分子は DPPIV 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て行った。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。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 2013 年には 1425 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、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 相臨床試験を施行していたが、平成 26 年 9 月に終了し、安全性が確認され、更に期待される効果を示唆する結果も得られ、本邦でもできるだけ早期に臨床試験が施行できるように現在計画中有る。

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 抗体を投与すると血清中の sCD26 と反応し、sCD26 値及び DPPIV 酵素値が減少することが予想されるため、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の sCD26 にヒト化 CD26 抗体が結合するため、ヒト

化抗体と同じエピトープを認識する 1F7 を用いる従来の ELISA 系では(5F8は異なる)競合し、sCD26 は測定は不可能であった。さらに市販の sCD26 測定キットにおいてもヒト化 CD26 抗体存在下では測定はできなかった。昨年度に従来の CD26 単クローン抗体 1F7 と異なるエピトープを持つ CD26 抗体 9C11 を見出し、本抗体を用いることで、ヒト化 CD26 抗体存在下でも sCD26 が測定できる ELISA 系を開発した。昨年度はフランスの第 I 相臨床試験患者サンプルも測定可能なことを明らかにしたが本年度は第 I 相臨床試験も終了したので、全てのサンプルの測定及び可溶性 CD26 ELISA 法及び DPPIV 酵素活性値測定法の性能試験データ及び手順簡便化の検討を行った。

B. 研究方法

1) 抗体

CD26 抗体である 1F7、5F8 及び 9C11 は当研究室で開発された。ヒト化 CD26 抗体(YS110)は Y's セラピューティクス社から供与された。

2) 可溶性 CD26 ELISA 及び DPPIV 酵素活性測定アッセイ

【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 穴平底プレートに、5µg/ml の捕捉抗体 (CD26 単クローン抗体 5F8) を各穴 100µl ずつ分注し、4℃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 300µl の PBS-Tween で 3 回洗浄後、200µl のブロッキングバッファーを分注し、室温で 2 時間