

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

【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

悪性中皮腫における CD26 発現の病理診断に有用な新規 CD26 単クローン抗体 2 クロオンを得た。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 ヶ月・80 ℃ 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。本クローン抗体は、これまでの R&D 社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。

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、特に MIP-1 と CD26 発現との関連を示唆する結果が示された。

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、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り、さらに血清及び胸水中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性値は、胸膜中皮腫における予後評価の判定に用い得る可能性も示唆された。

新しい CD26 エピトープと反応する CD26 抗体 9C11 を用いることにより血清中にヒト化 CD26 抗体存在下でも可溶性 CD26/DPPIV を測定できる新 ELISA 系を確立した。フランスのヒト化 CD26 抗体投与の第 Ⅲ 相臨床試験患者血清においてもブロックされることなく可溶性 CD26/DPPIV 値は適切に測定することができた。可溶性 CD26 ELISA アッセイシステムの性能はとても良好で反応時間も短縮できることが明らかとなった。しかし DPPIV 酵素活性測定アッセイでは血清中に存在する干渉因子などの影響で希釈検体などで測定値に影響を与える可能性が示唆され、また反応時間の簡便化はそれらの干渉因子の存在などで現時点では難しいことが示唆された。

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・非常勤講師

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 2012 年には 1400 人にのぼり、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。

フランスで行われていたヒト化 CD26 抗体の悪性中皮腫を中心とした治療抵抗性 CD26 陽性悪性腫瘍への第 Ⅰ 相臨床試験は平成 26 年 9 月 15 日に終了し、安全性を確認でき更に 33 例中 13 例が Stable Disease(SD)、13 例が Progress Disease(PD)、7 例が評価できずという結果を得て、特に治療抵抗性悪性中皮腫 19 例中 10 例が SD となり、しかもその内 6 例が 3 ヶ月以上(5 例は 6 ヶ月以上)SD が継続して有効性を示唆するデータも得られ悪性中皮腫の治療薬として有望と考えている。Lung Cancer という雑誌(Lung Cancer 85 (2014) 251-257)に悪性中皮腫治療に有望な 3 つの Drug の 1 つに選ばれている。国内では PMDA と昨年 12 月に第 1 回の事前相談を行い平成 28 年 8 月頃を目処に第 Ⅰ 相臨床試験をスタートする予定である。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 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 CD26 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 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 酵素測定も行う予定である。

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

各分担研究報告書に詳述

(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 2012087)。

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

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、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、一昨年度から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に取り組み、市販の単クローン CD26 抗体よりも遥かに染色性に優れた単クローン抗体を得た。今年度はそれらの抗体を用いて、異なるロット間の染色性の比較、及び冷蔵・冷凍での安定性の検討を行った結果、異なる 3 ロットとも安定した染色性を示し、4 保存・-80 保存ともに 12 ヶ月間安定であることが示された。

2) 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。

3) CD26 陽性中皮腫の臨床像に関する研究

悪性胸膜中皮腫については、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 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る。

4) 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

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。

5) 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

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。

新しい CD26 エピトープと反応する 9C11 という CD26 抗体を見出し、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 の測定可能な新しい ELISA 系を確立した。フランスの第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/DPPIV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。

D. 考察

悪性中皮腫はアスベストばく露により引き起こされ、20年～40年の潜伏期間を経て発生するといわれ、日本では1990年前半にアスベスト使用が禁止されたが今後益々増加すると予想されている。東日本大震災での大量のがれき中にもアスベストが含まれており、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が急務となっている。

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その他CD26陽性腫瘍をターゲットとして第1相臨床試験は昨年（平成26年）9月中旬に終了し安全性の確認及び、期待される効果を示唆する結果も得られ、本邦においても平成28年8月頃を目処に臨床試験を計画中である。

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は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。昨年度に報告したように、病理組織上に発現するCD26を検出できるCD26単クローン抗体2クローン（19-32と18-110）を得た。今年度の検討の結果、新規抗ヒトCD26単クローン抗体19-32と18-110は異なるロットでもいずれも同等の安定した染色強度を示し、また4℃で12ヶ月冷蔵保存した場合でも、-80℃で12ヶ月冷凍保存した場合でも精製直後と同程度の明瞭な染色性を示すことが明らかになった。今後、これらの単クローン抗体を用いた免疫染色キット化を目標に、ホルマリン固定された腫瘍病理組織のCD26発現をどこでも誰でも安定して評価できる免疫組織染色プロトコルの更なる改善が期待される。

R&D社の抗ヒトCD26ポリクローナル抗体と新規単クローン抗体19-32を用いて多数の悪性中皮腫検体の染色を行った結果、R&D社のポリクローナル抗体でCD26陰性だった検体に関しては19-32でもほぼ同様の結果を示し、現時点での免疫組織染色条件でも19-32はCD26の陽性/陰性の判断には有用であることが示唆される。しかしながら、R&D社のポリクローナル抗体では細胞質よりも細胞膜上のCD26が強く染まるのに対し、19-32では細胞質も細胞膜と同等に強く染まる性質があり、そのことが影響してかR&D社のポリクローナル抗体ではあまり染色されない悪性中皮腫の肉腫型でも19-32では細胞質が染まる例が見られる。

現時点での免疫組織染色条件では、R&D社の抗ヒトCD26ポリクローナル抗体では染まらないCD26陰性の心筋組織で、新規

単クローン抗体 19-32 では非特異的な染色が見られることがわかっている。新規抗ヒト CD26 単クローン抗体は、CD26 陰性の Jurkat 細胞株にヒト CD26 全長を強制発現させた細胞株を用いたフローサイトメトリーと、組換え可溶性 CD26 及び urea buffer で変性処理した可溶性 CD26 に対する ELISA、さらに CD26 の発現パターンがよくわかっている悪性中皮腫・前立腺・肝臓・腎臓の免疫組織染色によりスクリーニングを行い、過剰量の可溶性 CD26 と前処理することで免疫染色が吸収されることから CD26 に対する特異性は証明されている。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。

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、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必要がある。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。

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 発現と血清サイトカイン濃度との関連を検討した。この結果、IL-8, IL-9, MIP-1 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-1 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-1 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。悪性胸膜中皮腫における MIP-1 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。

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 活性は胸膜ブラン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 が中皮腫の予後マーカーとなり得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、健常人にくらべ 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る。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。

ヒト化 CD26 抗体を投与すると、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 酵素測定法としては固相化した 5F8 に可溶性 CD26 を捕捉させ、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

ーブ) ヒト化 CD26 抗体治療患者では血清中の sCD26 にヒト化抗体が結合するため従来の CD26 検出 ELISA 系の 1F7 では sCD26 への結合が競合するために sCD26 は測定できなかった。

更に市販の可溶性 CD26 測定 ELISA キットにおいてもヒト化 CD26 抗体が存在すると測定不能であった。今まで我々の開発した CD26 抗体の中で 9C11 抗体が従来の ELISA に用いていた 1F7, 5F8 及びヒト化 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可溶性 CD26 検出 ELISA 系において本抗体を用いることで可溶性 CD26 の測定が可能であった。しかも 9C11 を用いた新規 ELISA は市販の ELISA キットよりも感度が高いことが明らかとなった。フランスでのヒト化 CD26 抗体の第 Ⅲ 相臨床試験は平成 26 年 9 月に終了して、安全性の確認及び期待される効果を示唆するデータも得られた。その全ての抗体投与患者において血清中の可溶性 CD26 は測定可能であり、更に抗体投与量が増加するにつれて、可溶性 CD26 濃度は低下し、可溶性 CD26 値と DPPIV 酵素活性値は相関して動くことから DPPIV 酵素値も低下して DPPIV 阻害剤が投与されている病態を呈する可能性があり、ヒト化 CD26 抗体投与例において特に糖尿病薬服用者については低血糖発作などに注意する必要性が示唆された。

可溶性 CD26 定量 ELISA アッセイシステムの性能試験の結果はとても良好であった。更に可溶性 CD26 測定は検体反応時間も従来の一晩から二時間に短縮できた。一方で DPPIV 酵素活性アッセイシステムでは血清中の可溶性 CD26/DPPIV 分子のキャプチャ

ー性能は良好であったが、極低濃度ではその測定にばらつきがあったり、添加ありの試料の直線性はやや不良であることが観察された。また DPPIV 酵素活性測定法については可溶性 CD26 測定 ELISA とは異なり検体反応時間を短縮すると DPPIV 酵素活性は低く測定された。これは DPPIV 酵素活性測定の際に血清中に干渉因子が存在し、その為に測定結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。また DPPIV 酵素活性アッセイシステムの手順簡便化のためには測定干渉因子を最小化する条件検討が必要なことが明らかになった。

E. 結論

昨年度に病理組織染色可能な優れた抗ヒト CD26 単クローン抗体 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⁺・80⁺ 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。更に本クローン抗体は、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。

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、特に MIP-1 と CD26 発現との関連を示唆する結果が示された。

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、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。さらに血清及び胸水中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性値は、胸膜中皮腫における予後評価の判定に用い得る可能性も示唆された。

新たなエピトープと反応する CD26 抗体 9C11 を用いることにより血清中にヒト化 CD26 抗体存在下でも可溶性 CD26/DPPIV を測定できる新 ELISA 系を確立した。フランスのヒト化 CD26 抗体投与の第 Ⅲ 相臨床試験患者血清においてもブロックされることなく可溶性 CD26/DPPIV 値は適切に測定できた。更に可溶性 CD26 ELISA アッセイシステムの性能はとても良好で反応時間も短縮できることが明らかとなった。しかし DPPIV 酵素活性測定アッセイでは血清中に存在する干渉因子などの影響で測定値や反応時間に影響を与える可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

現時点では、特記すべき健康危険情報はない。

G . 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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

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

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。