

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

**【悪性中皮腫組織の CD26 発現評価のための
新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の開発とその性状の解析】**

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

分担研究者 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 Ⅲ 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 抗体よりも遙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。

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 2009 年よりフランスにて第 Ⅲ 相臨床試験を開始、昨年(2014 年)9 月に無事終了した。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おける CD26 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) 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組換え可溶性 CD26 をアジュバント TiterMax Gold (TiterMax USA Inc.) と混合し、BALB/c マウスに 2 週間ごとに合計 7 回皮下免疫を行い、最後に尾静脈に静脈注射を行った。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。得られたハイブリドーマの中で特に優れた染色性を示した 19-32 と 18-110 の 2 クローンを 96 well 平底プレ-

ートに 1 cell/well で限界希釈し、それぞれの単クローンを得た。

2) 培養上清から IgG 抗体の精製

限界希釈して得た単クローンの培養に用いる培地を無血清の GIT 培地 (Wako Pure Chemicals) に置換し、Protein A カラム (Pierce) にて IgG の精製を行った。クローン 19-32、18-110 とともに限界希釈後、最初にハイブリドーマの凍結保存ストックを作製する時点で回収した培養上清と、その後約 2 週間培養した際に回収した培養上清、さらにもう約 2 週間培養した際に回収した培養上清をそれぞれ別々に IgG 精製することで、異なる 3 ロットの精製抗体を得た。いずれの抗体も大量の PBS 中で透析処理を行い、抗体濃度を 1mg/mL に調整した。それらの抗体を分注し、一部は 4℃ 冷蔵保存での安定性の検討に、一部は -80℃ 冷凍保存での安定性の検討に用いた。

3) 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 4-6 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、0.3% 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、一次抗体としてクローン 19-32、18-110 の精製抗体を 10-100 μg/sample または Goat Anti-Human CD26 ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を 1-2 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、ジアミノベンジンと 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、分担研究者の山田健人(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 単クローン抗体を開発するためのマウスを用いた動物実験は順天堂大学医学部実験動物委員会で承認を得た後、順天堂大学動物実験等管理規則を遵守して行った。

患者検体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、山口宇部医療センター倫理委員会、岡山労災病院倫理委員会、慶應義塾大学医学部倫理委員会および順天堂大学医学部倫理委員会の審査にて承認されている。

C. 研究結果

1) 新規抗ヒト CD26 単クローン抗体のロット間の免疫組織染色性の比較

これまでに我々が検討した結果、市販の CD26 単クローン抗体 23 種、及び過去に当研究室で作製した 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なかったが、市販の CD26 ポリクローナル抗体ではいくつか染色可能なものがあり、中でも R&D 社の抗体は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、ポリクローナル抗体では異なるロットの抗体で染色すると染色強度や染色パターンに違いが出るおそれがあることから、安定した結果が求められる診断薬としては不適切である。一昨年度からの取り組みにより、我々は免疫組織染色可能な新規抗ヒト CD26 抗体産生ハイブリドーマの作製に成功し、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して遥かに明瞭に CD26 を検出できる 2 クローン(19-32 と 18-110)に絞り込んだ。

そこで、今年度は得られたクローン 19-32 と 18-110 のロット間での免疫組織染色性の比較を行うため、研究方法に記載したようにそれぞれ精製抗体を 3 ロットずつ調製した。ホルマリン固定・パラフィン包埋された悪性中皮腫・前立腺・肝臓・腎臓の病理組織を様々な条件で抗原賦活化処理し、新規単クローン抗体及び R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体 0.1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL で免疫組織染色を行った。クローン 19-32 及び 18-110 で染色した組織標本をスライドガラスごとマクロに写した結果を図 1 に、クローン 19-32 で染色した悪性中皮腫と前立腺の結果を図 2 に示した。

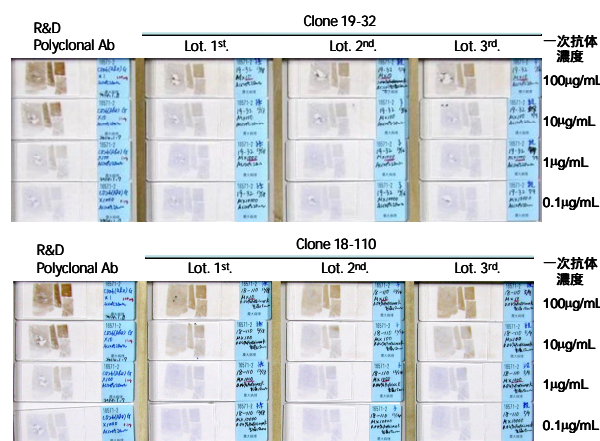


図1 新規抗ヒトCD26単クローン抗体のロット間の免疫組織染色性の比較

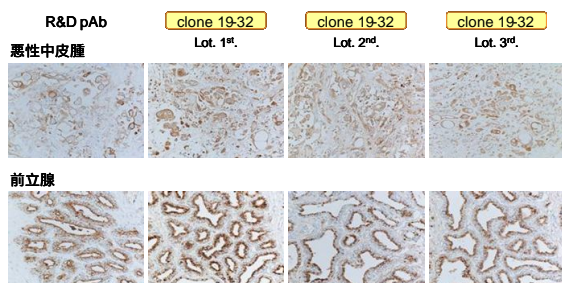


図2 新規抗ヒトCD26単クローン抗体3ロットによる悪性中皮腫と前立腺の免疫組織染色の結果

この結果から新規抗ヒト CD26 単クローン抗体 19-32 と 18-110 はどちらもハイブリドーマの継代回数及び精製回が異なる 3 ロットとも同等の明瞭な染色性を示すことが明らかになった。

2) 新規抗ヒト CD26 単クローン抗体の 4 及び-80 での安定性の解析

本プロジェクトで開発に成功した免疫組織染色可能な新規抗ヒト CD26 単クローン抗体を、治療用ヒト化 CD26 抗体の適用患者選択のためのコンパニオン診断薬として使用するには、抗体の染色性や安定性などより詳細な性状の解析が必要となる。そのため、開発した新規単クローン抗体の 4 及び-80 での安定性について解析を行った。抗体を安定に保存するためには、その使用用途に合わせて 4 冷蔵保存の場合はアジ化ナトリウムやチメロサルなどの防腐剤、EDTA などのキレート剤、メルカプトエタノールやジチオスレイトールなどの還元剤、ウシ血清アルブミン(BSA)などの保護剤を、-20 での冷凍保存の場合はグリセロールを抗体保存溶液中に添加することが多いが、今回はあらゆる実験に悪影響を及ぼすリスクが低い PBS を保存液とし、その他の成分を含まない状態で単クローン抗体を 1mg/mL の濃度に調整して 4 及び-80 での安定性

評価を行った。クローン 19-32、18-110 とともに培養上清からプロテイン A カラムで IgG へ精製した直後に免疫組織染色を行った結果と、4 で 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月保存後の抗体を用いて染色した結果、-80 で 6 ヶ月、12 ヶ月保存後の抗体を用いて染色した結果の比較を行った。悪性中皮腫・前立腺・肝臓・腎臓の標準検体に加え、悪性中皮腫の臨床検体 9 例の CD26 の免疫組織染色を試みた結果、クローン 19-32 は 4 で 12 ヶ月保存した場合でも、-80 で 12 ヶ月保存した場合でも培養上清から精製した直後と同等の安定した染色性を示すことが明らかになった(図 3)。また、クローン 18-110 においても同様に安定性が確認された(データ未掲載)。

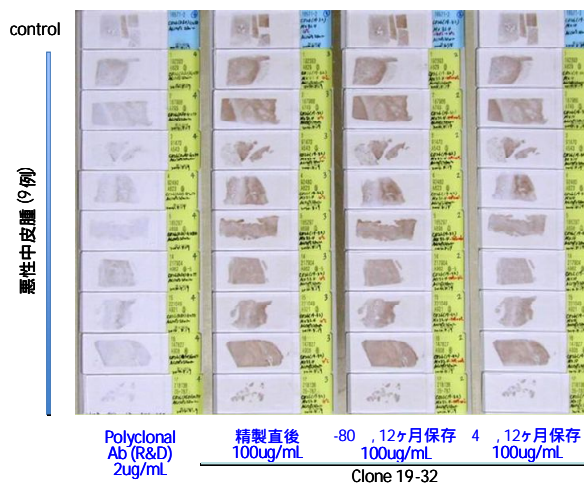


図3 新規抗ヒトCD26単クローン抗体の 4 及び-80 での安定性の解析

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。Urea buffer 処理した組換え可溶性 CD26 をマウスに免疫してハイブリドーマを作製し、その培養上清でスクリーニングした結果、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して遥かに明瞭に CD26 を検出できる 2 クローン (19-32 と 18-110) を得た。それらの抗体は悪性中皮腫のみならず、肝がん、腎がん、前立腺がん、大腸がん、肺がんなどその他の CD26 陽性腫瘍に対しても R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体と遜色のない明瞭性と染色強度を示した。さらに、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。R&D 社のポリクローナル抗体と新規単クローン抗体で異なる染色結果となっている部分に関しては、腫瘍検体からその部分を採取してウエスタンブロットティングやフローサイトメトリーといった免疫組織染色以外の手法を用いて CD26 の発現の有無を評価する必要があると考えられる。

また、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。しかしながら、ホルマリン固定された病理組織の免疫染色では、抗原と抗体との反応性を上げるための抗原賦活化前処理を行うため、タンパク質本来の立体構造とは異なる構造に変性しており、19-32 が結合する CD26 上のアミノ酸配列と相同性の高い配列が CD26

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⁺・80 とともに 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: 2439-2452
- 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, 齊藤辰彦, 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