

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

【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 Ⅲ 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、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) 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、仏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%

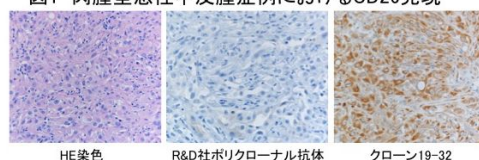
ーン 19-32 の方が、より広い範囲での陽性率を示すことが明らかとなった。一方、細胞膜に明らかな陽性像が認められる症例は、それぞれ 71 症例、19 症例であり、R&D 社ポリクローナル抗体の方が細胞膜染色性が強調される結果となった。また、細胞質に陽性所見が瀰漫生に認められる症例（細胞膜 + 細胞質）は、それぞれ 15 症例、67 症例であった。これらの結果は、新規モノクローナル抗体クローン 19-32 は中皮腫での CD26 発現評価において、より鋭敏であることが明らかとなったが、同時に細胞内局在の意味については今後、検討して行く必要があることを示唆している。なお、これらの症例を、細胞膜の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

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, MST0-211H 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