

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

【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 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 $\mu$ m 厚の標本を準備し、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 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- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) を測定した。

関連性についての検討は 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。

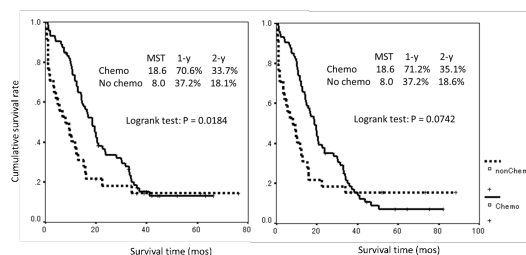
また、CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、有意の関連が認められた。すなわち、より高い発現のある症例で良好な治療効果が得られた。

## 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

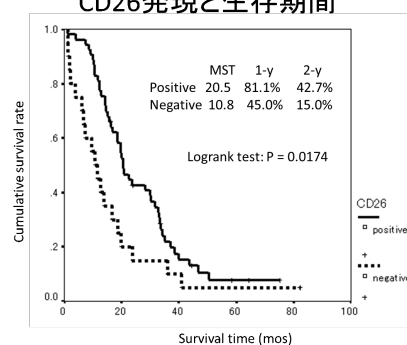


CD26 陽性群では生存期間中央値 16.8 ヶ月、1 年生存率 67.2%であるのに対し、CD26 陰性群では、生存期間中央値 9.7 ヶ月、1 年生存率 40.7%であった (P = 0.0280)。

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

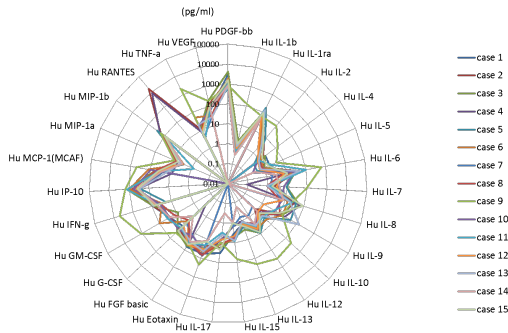
### 化学療法症例における CD26 発現と生存期間



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

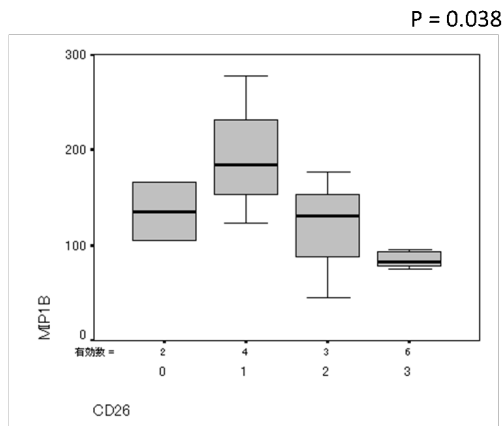
中皮腫15例の血清サイトカイン濃度



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-1 のみが有意差を示した (図 4)。

図 4

CD26発現と血清MIP-1β濃度



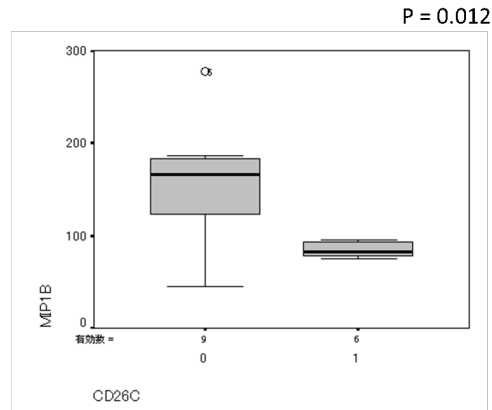
CD26 発現スコア 0 - 1 とスコア 2 - 3 の 2 群で比較数と血清 IL-8, IL-9, MIP-1 で有意差が認められ、いずれも CD26 高発現群で低濃度を示した。

また、血清 MIP-1 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-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。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 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