

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

**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**

(H24-ハ^イオ-一般-003)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森本 幾夫

平成 26(2015)年 3 月

目 次

・ 総括研究報告

- 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…………… 1
- 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

・ 分担研究報告

1. 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… 13
- 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
- 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
2. 悪性中皮腫における CD26 発現の評価…………… 21
- 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
3. CD26 陽性中皮腫の臨床像に関する研究…………… 25
- 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
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…………… 31
- 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
5. ヒト化 CD26 抗体投与患者検体の可溶性 CD26/DDP1V 酵素測定法の開発…………… 37
- 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

・ 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 47

・ 研究成果の刊行物・別刷…………… 49

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 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。

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。

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 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 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。

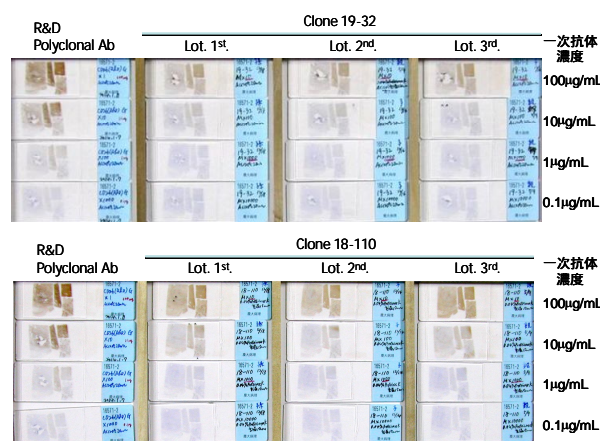


図1 新規抗ヒトCD26単クローン抗体のロット間の免疫組織染色性の比較

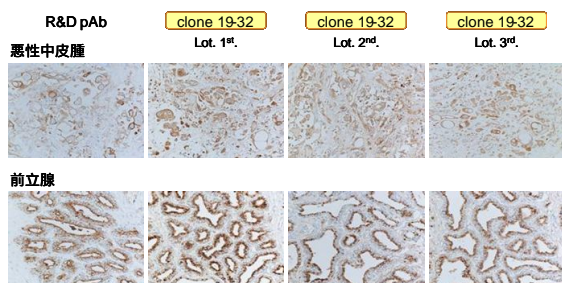


図2 新規抗ヒトCD26単クローン抗体3ロットによる悪性中皮腫と前立腺の免疫組織染色の結果

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)。

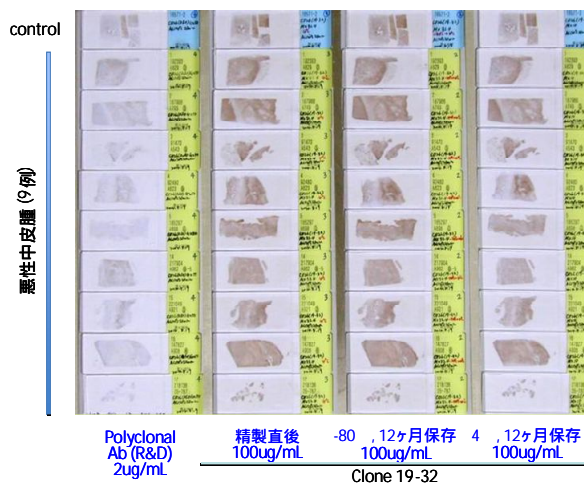


図3 新規抗ヒトCD26単クローン抗体の 4 及び-80 での安定性の解析

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ツ

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: 2439-2455
- 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, 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

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

ーブ処置 (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	70/86	19/86	67/86	65/71	12/15
	90%	81%	22%	78%	92%	80%
Poly Ab R&D	73/86	55/86	71/86	15/86	67/71	6/15
	85%	64%	83%	17%	94%	40%

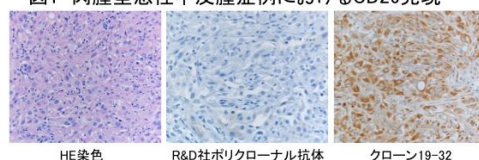
ーン 19-32 の方が、より広い範囲での陽性率を示すことが明らかとなった。一方、細胞膜に明らかな陽性像が認められる症例は、それぞれ 71 症例、19 症例であり、R&D 社ポリクローナル抗体の方が細胞膜染色性が強調される結果となった。また、細胞質に陽性所見が瀰漫的に認められる症例（細胞膜 + 細胞質）は、それぞれ 15 症例、67 症例であった。これらの結果は、新規モノクローナル抗体クローン 19-32 は中皮腫での CD26 発現評価において、より鋭敏であることが明らかとなったが、同時に細胞内局在の意味については今後、検討して行く必要があることを示唆している。なお、これらの症例を、細胞膜の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

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 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 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 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。

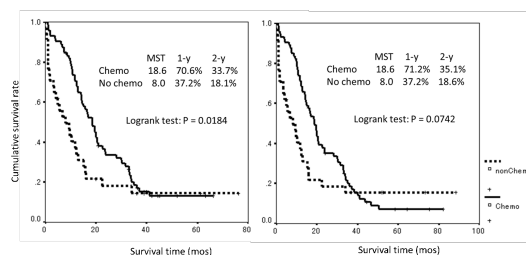
また、CD26 の発現程度と化学療法の効果の関連をみると、有意の関連が認められた。すなわち、より高い発現のある症例で良好な治療効果が得られた。

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

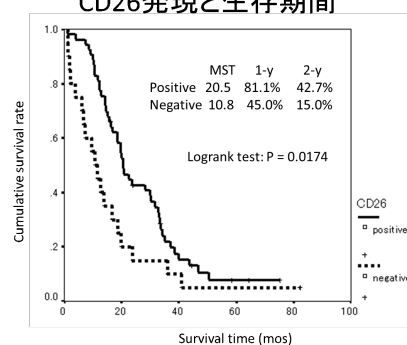


CD26 陽性群では生存期間中央値 16.8 ヶ月、1 年生存率 67.2%であるのに対し、CD26 陰性群では、生存期間中央値 9.7 ヶ月、1 年生存率 40.7%であった (P = 0.0280)。

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

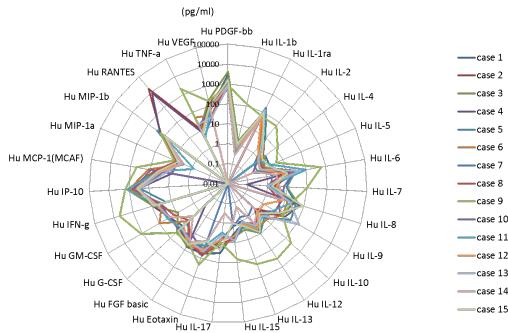
化学療法症例における CD26 発現と生存期間



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

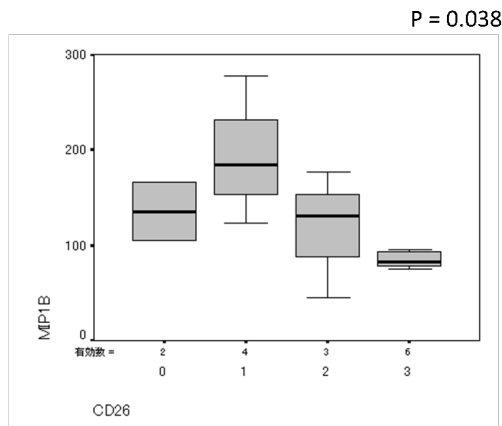
中皮腫15例の血清サイトカイン濃度



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



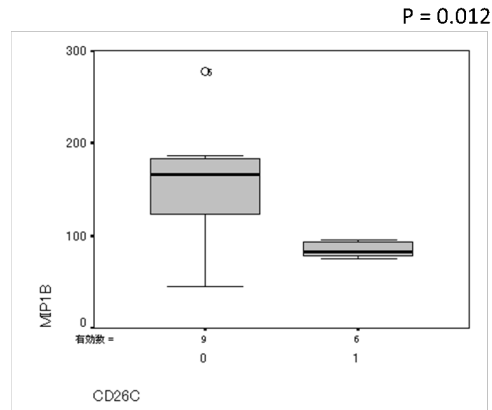
CD26 発現スコア 0 - 1 とスコア 2 - 3 の 2 群で比較数と血清 IL-8, IL-9, MIP-1 で有意差が認められ、いずれも CD26 高発現群で低濃度を示した。

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

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

【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(17.0 μ M/min)と低値(<17.0 μ M/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 2

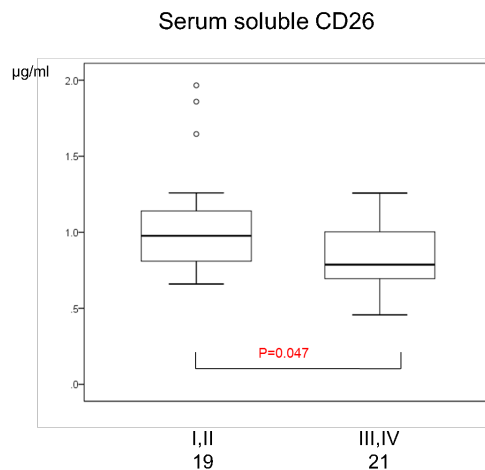


図 3

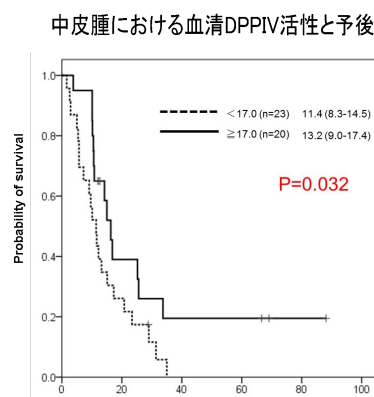
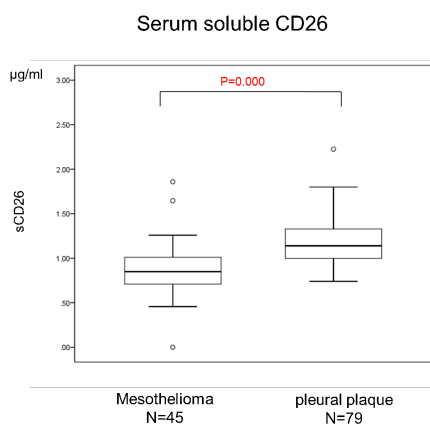


図 1



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

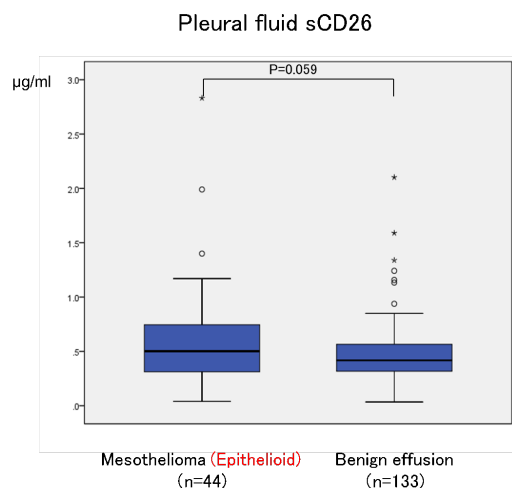
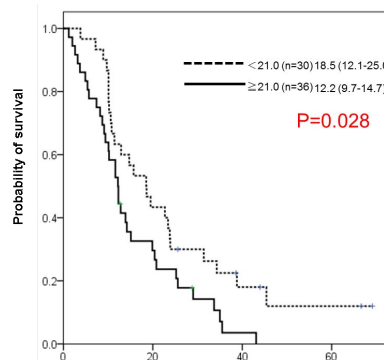


図 5

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

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

【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 を行くと、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 Ⅲ 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 CD26 ELISA 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である。

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 1 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 2 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

静置し、各穴 300 μ l の PBS-Tween で 3 回洗
浄して 3 の検体分注に供する。

3. 血清及び標準曲線用組換え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween20 で 20 倍に希釈した対象血
清を 100 μ l ずつ 2 穴に分注する。標準曲線
を作成するため、段階希釈 (500, 250, 125,
62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95, 0.98, 0.49, 0
ng/ml) した組換え可溶性 CD26 標準試薬
(R&D systems, Inc.) を 100 μ l ずつ 2 穴に
分注する。プレートを密封し、4 で一晩静
置する。

4. 可溶性 CD26 の測定

上記 3 のプレートを各穴 300 μ l の
PBS-Tween で 3 回洗浄後、0.5 μ g/ml の検出
抗体 (ビオチン化 CD26 単クローン抗体
9C11 あるいは 1F7) を各穴 100 μ l ずつ分注
し、室温で 2 時間静置する。300 μ l の
PBS-Tween で 3 回洗浄後、1 万倍希釈した
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase 液を
100 μ l ずつ分注する。プレートを遮光して、
室温で 1 時間静置する。300 μ l の PBS-Tween
で 3 回洗浄後、PNPP を 100 μ l ずつ分注し、
遮光して室温で 10 分間静置した後、
2N-NaOH 溶液を 100 μ l ずつ分注して、発
行反応を停止させる。プレートリーダーで吸
光度を測定する (吸光度 405nm、レファレン
ス 655nm)。

【DPPIV 酵素活性の測定】

1. 捕捉抗体プレートの作成とブロッキング
上記 2) の 1 及び 2 と同様に捕捉抗体プレ
ートを作成し、ブロッキングをする。
2. 血清及びポジティブコントロール用組換
え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween で 10 倍に希釈した対象血清

を 100 μ l ずつ 2 穴に分注する。ポジティブ
コントロールとして 500ng/ml に調整した
組換え可溶性 CD26 標準試薬 (R&D
systems, Inc.) を 100 μ l ずつ 2 穴に分注す
る。プレートを密封し、4 で一晩静置する。

3. DPPIV 酵素活性の測定

上記 2 のプレートを各穴 300 μ l の
PBS-Tween で 3 回洗浄後、1mg/ml に調整
した Gly-Pro-pNA を血清及びポジティブコ
ントロールを添加したウェルに 150 μ l ずつ
分注する。標準曲線を作成するため、段階希
釈 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6,
7.8, 3.9, 0 μ M) した pNA 溶液を 150 μ l ずつ
分注する。直ちにプレートリーダーで吸光度
を測定する (吸光度 405nm、レファレンス
655nm)。その後 75 分後まで (15 分毎に)
吸光度を測定し、DPPIV 活性 (μ M/min)
を計測する。

【比較対照とした既存の市販測定キット】

a) R & D Systems, Inc.

キ ャ ッ ト 名 : Quantikine Human
CD26/DPPIV Immunoassay

捕捉抗体: 抗ヒト CD26 単クローン抗体

検出抗体: HRP 標識・抗ヒト CD26 ポリク
ローナル抗体

発色: 化学発光 (吸光度 450nm)

b) Bender MedSystems GmbH (現
eBioscience)

キ ャ ッ ト 名 : Human sCD26 Platinum
ELISA

捕捉抗体: 抗ヒト CD26 単クローン抗体

検出抗体: ビオチン化抗ヒト CD26 単ク
ローン抗体、Streptavidin-HRP

発色: 化学発光 (吸光度 450nm)

3) 健常人血清、本邦患者検体及びフランス
の第 相臨床試験の患者血清について

健常人血清は研究室で働く研究者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。

悪性中皮腫患者血清、胸水は1998年から2011年までに岡山労災病院及び山口宇部医療センターにおいて悪性中皮腫として診断・治療を受けた症例でインフォームドコンセントを得られた症例を用いている。

フランスでの第 相臨床試験は平成 21 年 1 月からスタートして、第 6 コホートからなり、第 1 コホート 0.1mg/kg、第 2 コホート 0.4mg/kg、第 3 コホート 1mg/kg、第 4 コホート 2mg/kg、第 5 コホート 4mg/kg、第 6 コホート 6mg/kg で各コホートは 3 症例からなっている。第 4 コホートの途中までは 2 週間ごとの 1 ヶ月間月 3 回投与であった。その後第 4 コホートの途中から 1 ヶ月間毎週投与で月 5 回投与とプロトコールの変更を行っている。平成 26 年 9 月に第 相臨床試験は終了した。合計 34 例の標準治療に抵抗性の悪性中皮腫患者(23 例)腎癌(10 例)、膀胱移行上皮癌(1 例) であった。

(倫理面への配慮)

本研究の、特に臨床研究においては、文書により被験患者本人の同意を得た上で行うものとする。本研究にまつわる個人情報には厳重な管理のもと守秘義務を遵守する。また解析検討結果を公表する際には個人名の漏えい防止を徹底し、プライバシーの保護に努める。さらに個人に帰属する結果を個人に求められた場合には、その個人本人のもののみ伝達する旨である。

なお、フランスで実施されているヒト化 CD26 抗体投与の第 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)。検体の使用は患者の同意が得られているかあるいは岡山労災病院、山口宇部医療センター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。

試料を匿名化することで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) フランスの第 相臨床試験の患者血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性値

フランスの第 相臨床試験患者検体は第 4 コホート途中までの 1 ヶ月隔週投与例ではヒト化 CD26 抗体投与前、投与直後、2 日後、15 日後投与前、投与直後の血清、第 4 コホート途中以後はヒト化 CD26 抗体は 1 ヶ月毎週投与となったため、ヒト化 CD26 抗体投与前、投与直後、2 日後、15 日後投与前、投与直後、29 日後投与前、投与直後の血清からなり、新しい ELISA 法にて可溶性 CD26 及び DPPIV 値を測定した。図 1 にヒト化 CD26 抗体の血清中濃度、図 2 に可溶性 CD26 の血清中濃度を示した。ヒト化 CD26 抗体はコホートが上がり、投与濃度が増加するにつれ、血中濃度も上昇していた。それに対応して可溶性 CD26 濃度は低下していることが観察された。DPPIV 酵素活性についても可溶性 CD26 濃度に並行して動き低下していくことが明らかとなった(図 3)。

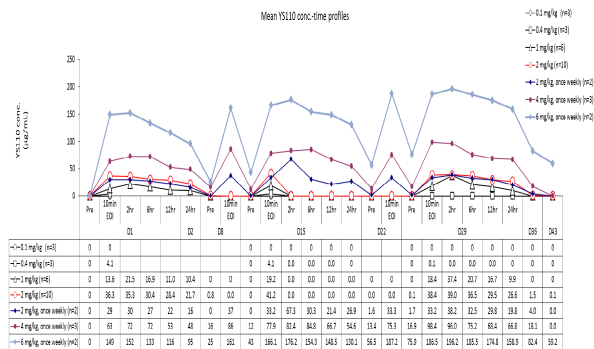


図1 ヒト化CD26抗体の血清中濃度平均値の推移

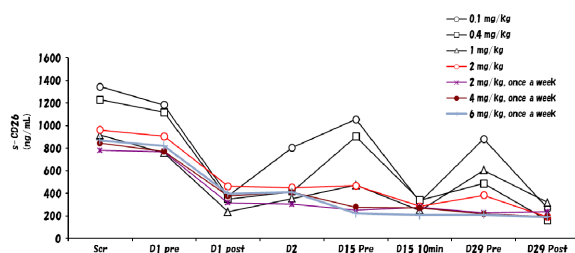


図2 可溶性CD26の血清中平均濃度の推移

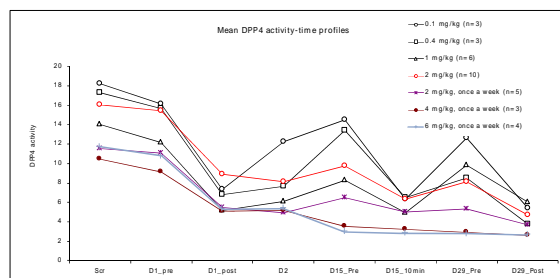


図3 DPPIV酵素活性の血清中平均値の推移

2) 可溶性 CD26 ELISA アッセイの性能試験と測定時間の簡便化

4 種類の濃度の標準試料 (5, 50, 150, 400ng/ml) を同時に 8 回測定することで同時再現性試験とした。表 1 に示したように変動係数 (CV: Coefficient of variation) は

10%以下と良好な結果を示した。次に 4 種類の濃度の標準試料 (5, 50, 150, 400ng/ml) を 5 回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。表 2 に示したように変動係数 (CV) が 10%以下と良好な結果を示した。添加回収試験 (Recovery) と直線性試験 (Linearity) について添加回収試験 (Recovery) は R&D system 社の Spike and Recovery Test protocol に従って実地した (図 4-1)。「試料」は健康成人血清を 20 倍希釈したものを使用。「添加あり」は recombinant CD26 (R&D#1180-SE) を最終濃度 (50ng/ml) になるようにサンプルに添加した。図 4-2 に結果を示したが Recovery は回収率 80~120%範囲内と良好な結果を示した。更に Linearity についても図 4-2 に結果を示したが直線性 80~120%範囲内と良好な結果を示した。健康成人の血清検体の 2 週間までの 4 保存及び血清検体を 10 回まで凍結融解をくり回したが共に測定値の変化は認められなかった(データは未表示)。可溶性 CD26 定量 ELISA アッセイの性能試験のまとめであるが性能試験の結果は良好であった。すなわち検量線、血清検体、捕捉抗体、検出抗体、希釈液等いずれも適切であると言える。最後に可溶性 CD26 濃度測定 ELISA アッセイの短縮化の検討を行った。検体反応について従来法は一晩・静置・4 で施行したが改訂版として 2 時間穏やかに振盪・室温で行い、健康成人血清 11 例について検討した。図 5 に示すように可溶性 CD26 測定は室温 2 時間の検体反応時間で従来法と同等の測定結果が得られた。以上より可溶性 CD26 測定に関して検体反応時間は一晩から 2 時間まで短縮可能である。

表1 同時再現性試験(Intra-assay):可溶性CD26定量アッセイ

標準試料	テスト1	テスト2	テスト3	テスト4	テスト5	テスト6	テスト7	テスト8	Mean	SD	CV (%)
5 ng/ml	5.33	4.96	4.62	4.85	5.06	5.04	4.89	5.06	4.98	0.20	4.09
50 ng/ml	48.50	50.98	49.30	51.20	51.47	51.60	51.68	53.58	51.04	1.55	3.04
150 ng/ml	142.47	155.10	153.40	152.34	159.13	156.74	155.68	162.53	154.67	5.89	3.81
400 ng/ml	388.49	399.37	398.86	417.97	392.53	406.96	390.13	418.48	401.60	11.83	2.95

4種類の濃度の標準試料(5, 50, 150, 400ng/ml)を同時に8回測定することで同時再現性試験とした。
変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。

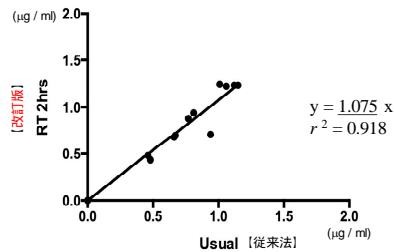


図5 可溶性CD26測定値の比較(従来法 v.s. 改訂版)

可溶性CD26測定は、室温2時間の検体反応時間で従来法と同等の測定結果が得られた。

可溶性CD26測定に関して、検体反応時間は一晩から2時間まで短縮可能である。

表2 測定間再現性試験(Inter-assay):可溶性CD26定量アッセイ

標準試料	プレート1	プレート2	プレート3	プレート4	プレート5	Mean	SD	CV (%)
5 ng/ml	4.89	5.02	5.33	5.06	4.89	5.04	0.18	3.55
50 ng/ml	50.27	49.62	48.50	49.60	49.79	49.56	0.65	1.31
150 ng/ml	150.54	154.83	142.47	149.57	148.05	149.09	4.48	3.00
400 ng/ml	396.01	394.05	388.49	395.09	411.59	397.05	8.64	2.18

4種類の濃度の標準試料(5, 50, 150, 400ng/ml)を5回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。
変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。

3) DPPIV 酵素活性アッセイの性能試験と測定時間の簡便化

可溶性 CD26 同様に 4 種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を同時に 6 回測定することで同時再現性試験とした。表 3 に示したように 100ng/ml~800ng/ml では

変動係数 CV が 10% 以下と良好な結果を示した。しかし極低濃度(10ng/ml)では、ばらつきが大きかった。次に 4 種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を 5 回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。表 4 に示すように 100ng/ml ~ 800ng/ml では変動係数 CV が 10% 以下と良好な結果を示した。しかし極低濃(10ng/ml)ではばらつきが大きかった。添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)について添加回収試験(Recovery)は R&D system 社の Spike and Recovery Test protocol に従って実施した(図 4-1 参照)。

「試料」は健常成人血清を 10 倍希釈したものを使用。「添加あり」は recombinant CD26 (R&D#1180-SE)を最終濃度 500ng/ml になるようにサンプルに添加した。Recovery は図 6 上段に示すように回収率 80~120% 範囲内と良好な結果を示した。しかし「希釈なし」はやや不良であった。Linearity については図 6 下段に示すように添加なしの試料の直

1) アッセイの実施

キット付属のプロトコルに従い、で調整した試料を用いてアッセイを行います
プレートのウェル配置図

	1	2	3	4	5	6
A	スタンダード1		試料(添加あり)		コントロール(添加あり)	
B	スタンダード2	1:2 希釈の試料(添加あり)		1:2 希釈の試料(添加あり)		
C	スタンダード3	1:4 希釈の試料(添加あり)		1:4 希釈の試料(添加あり)		
D	スタンダード4	1:8 希釈の試料(添加あり)		1:8 希釈の試料(添加あり)		
E	スタンダード5		試料(添加なし)			
F	スタンダード6	1:2 希釈の試料(添加あり)				
G	スタンダード7	1:4 希釈の試料(添加あり)				
H	ブランク	1:8 希釈の試料(添加あり)				

2) 測定値の算出・解析

以下の計算式を使用して、測定値を算出し、解析を行います

1. 添加回収試験

$$\text{回収率(\% Recovery)} = \frac{\text{「試料(添加あり)」の測定値} - \text{「試料(添加なし)」の測定値}}{\text{添加した標準物質の量}} \times 100$$

2. 直線性試験

・「試料(添加あり)」の直線性を検討する場合、「試料(添加あり)」の測定値を「予測値とする」
・「試料(添加なし)」の直線性を検討する場合、「試料(添加なし)」の測定値を「予測値とする」

$$1:2 \text{ 希釈の回収率(\%)} = \frac{1:2 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 2} \times 100$$

$$1:4 \text{ 希釈の回収率(\%)} = \frac{1:4 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 4} \times 100$$

$$1:8 \text{ 希釈の回収率(\%)} = \frac{1:8 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 8} \times 100$$

図4-1 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)の実施方法

添加回収試験(Recovery)

	試料(添加あり)	試料(添加なし)	回収率(%)
希釈なし	83.19	37.89	95.17
1/2希釈	43.13	20.39	98.44
1/4希釈	21.29	11.10	90.98
1/8希釈	11.72	4.83	109.19

回収率 80 ~ 120% 範囲内と良好な結果を示した。

直線性試験(Linearity)

		直線性(%)
試料(添加あり)	1/2希釈	103.69
	1/4希釈	102.37
	1/8希釈	112.71
試料(添加なし)	1/2希釈	107.63
	1/4希釈	117.18
	1/8希釈	101.98

直線性 80 ~ 120% 範囲内と良好な結果を示した。

図4-2 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)

添加回収試験(recovery)はR&D Systems社のSpike and Recovery Test Protocolに従って実施した。「試料」は健常成人血清(を20倍希釈したもの)を使用。「添加あり」はrecombinant CD26を最終濃度50ng/mLになるようにサンプルに添加した。

線性は良好な結果を示した。添加ありの試料の直線性はやや不良であった。健常成人の血清検体を4で保存してDPPIV酵素活性を検討したところ2週間までは測定値の変化は認められなかった。次に健常成人の血清検体を10回まで凍結融解をくり返したが、測定値の変化は認められなかった。最後にDPPIV酵素活性測定アッセイの測定時間の短縮化の検討を行った。従来の検体反応時間は一晩・静置・4で施行していたが2時間・穏やかに振盪、室温に変更して健常成人血清11例についてDPPIV酵素活性値を測定した。図7に示すようにDPPIV酵素活性は室温2時間の検体反応条件では低く測定されることが明らかになった。

表3 同時再現性試験(Intra-assay) : DPPIV酵素活性アッセイの性能試験

標準試料	テスト1	テスト2	テスト3	テスト4	テスト5	テスト6	Mean	SD	CV (%)
10 ng/ml	0.41	0.19	0.26	0.24	0.32	0.25	0.278	0.077	27.59
100 ng/ml	1.77	1.84	1.49	1.59	1.5	1.6	1.632	0.143	8.78
300 ng/ml	3.87	3.54	3.5	3.63	3.66	3.78	3.663	0.141	3.85
800 ng/ml	5.57	6.04	5.74	5.88	6.71	5.72	5.943	0.408	6.86

4種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を同時に6回測定することで同時再現性試験とした。DPPIV酵素活性値は $\mu\text{M}/\text{min}$ で表示した。

100ng/ml~800ng/mlでは変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。極低濃度(10ng/ml)ではバラつきが大きかった。

表4 測定間再現性試験(Inter-assay) : DPPIV酵素活性アッセイの性能試験

標準試料	プレート1	プレート2	プレート3	プレート4	プレート5	Mean	SD	CV (%)
10 ng/ml	0.28	0.33	0.24	0.23	0.30	0.27	0.04	14.69
100 ng/ml	1.63	1.99	1.86	1.77	1.82	1.81	0.13	7.17
300 ng/ml	3.66	3.68	3.37	3.36	3.89	3.59	0.23	6.31
800 ng/ml	5.94	5.53	5.76	6.25	5.82	5.86	0.26	4.50

4種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を5回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。DPPIV酵素活性値は $\mu\text{M}/\text{min}$ で表示した。

100ng/ml~800ng/mlでは変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。極低濃度(10ng/ml)ではバラつきが大きかった。

添加回収試験(Recovery)

	試料(添加あり)	試料(添加なし)	回収率(%)
希釈なし	5.49	1.26	73.18
1/2希釈	3.96	0.69	88.62
1/4希釈	2.30	0.39	90.09
1/8希釈	1.25	0.24	90.18

回収率80~120%範囲内と良好な結果を示した。「希釈なし」はやや不良であった。

直線性試験(Linearity)

		直線性(%)
試料(添加あり)	1/2希釈	119.88
	1/4希釈	128.55
	1/8希釈	134.06
試料(添加なし)	1/2希釈	108.61
	1/4希釈	117.84
	1/8希釈	118.12

添加なしの試料の直線性は良好な結果を示した。添加ありの試料の直線性はやや不良であった。

図6 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)

添加回収試験(recovery)はR&D Systems社のSpike and Recovery Test Protocolに従って実施した。「試料」は健常成人血清(を10倍希釈したもの)を使用。「添加あり」はrecombinant CD26を最終濃度500ng/mLになるようにサンプルに添加した。

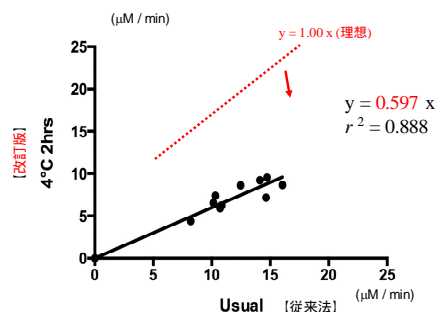


図7 DPPIV活性測定値の比較(従来法 v.s. 改訂版)

DPPIV活性測定は、2時間の検体反応時間では、低く測定される

DPPIV活性測定系では、検体希釈によるマトリックス効果の影響も考慮する必要あり

D. 考察

現在、糖尿病治療薬としてDPPIV酵素阻害薬が登場し、幅広く臨床現場に用いられている。

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 は異なるエピトープ)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 1F7 biotin の代わりに 9C11 biotin に置き換えて、正常人血清にヒト化 CD26 抗体を加えてアッセイを行ったところ競合することなく可溶性 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 R&D 社の 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 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糖尿病薬服用者については特に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。今後標準物質を用いて市販の液層測定系と対比して検討予定である。

E. 結論

従来の可溶性 CD26/DPPIV 測定 ELISA 系に用いていた 2 種の CD26 抗体及びヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープの 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。本 ELISA 系は従来の ELISA 系と同等の感度を示し、市販の ELISA キットよりも格段に感度は高かった。フランスのヒト化 CD26 抗体投与の第 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検体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、また検体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。

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. Grassyptolides as Natural Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 8 and T-Cell Activation. *Chembiochem.* 2014; 15:799-804.

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

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。

< 研究成果の刊行に関する一覧表 >

【雑 誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.			in press
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.			in press
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.			in press
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.	194	960-972	2015
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
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	2439-2255	2014
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.	4	609-615	2014

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	2232-2245	2014
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	15	799-804	2014
Fujimoto N, Kato K, Usami I, Sakai F, Tokuyama T, Hayashi S, Miyamoto K, Kishimoto T.	Asbestos-Related Diffuse Pleural Thickening.	Respiration	88	277-284	2014
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 Oncology	7	389-392	2014
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
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	じん肺症における血中アディポネクチンと炎症性マーカーについての検討	日本職業・災害医学会誌	62(3)	184-188	2014
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	日本職業・災害医学会誌	62(2)	117-122	2014