

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^イイ-一般-003)

平成 24 年度～平成 26 年度
総合研究報告書

研究代表者 森本 幾夫

平成 26(2015)年 3 月

目 次

・ 総合研究報告

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

・ 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 33

・ 研究成果の刊行物・別刷 …………… 43

【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

本研究は悪性中皮腫へのヒト化 CD26 抗体療法確立のため、病理組織上の CD26 発現評価可能な抗体を開発し、コンパニオン診断薬及び患者血清中の可溶性 CD26/DPPIV 酵素活性測定診断系を確立し、更に CD26 発現評価は化学療法剤の治療効果予測因子のバイオマーカーになり得るかも決定する。

腫瘍病理組織の CD26 発現評価に適したコンパニオン診断薬として新規 CD26 単クローン抗体を開発するため、Urea buffer で変性処理した可溶性 CD26 を免疫し、ハイブリドーマを作製し、組織染色可能な CD26 単クローン抗体を開発した。これらの抗体は R&D 社のポリクローナル CD26 抗体と比較しても同等の染色パターンをとった。悪性中皮腫以外に正常前立腺、腎細胞癌、肝癌なども R&D 社の抗体と遜色ない染色パターンを示した。これらの抗体は異なるロット間でも安定した染色性を示し、4、-80 とともに 12 ヶ月保存しても安定であることが確認された。また新規 CD26 単クローン抗体と R&D 社ポリクローナル抗体について染色条件の比較、組織標本の抗原賦活性化条件の検討、抗体処理方法の検討等の解析を行い、新規 CD26 単クローン抗体は R&D 社のポリクローナル抗体と比較しても良質の抗体と言えた。

CD26 発現評価は化学療法剤の効果予測マーカーとして有望であることを報告した (Clin Cancer Res 2012)。この時は化学療法施行評価症例は 40 例と少数であったため症例を追加して 108 例の悪性中皮腫について検討した。化学療法施行例は 73 例で CD26 陽性は 53 例、CD26 陰性は 20 例であった。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 CD26 陽性例は化学療法に良く反応して陰性例と比して生存期間は有意に長いことが明らかとなった ($P=0.0280$)。メカニズムとして CD26 を強発現させた MSTO 中皮腫株 (TR) 及び CD26 陽性 Meso1 株の CD26 ノックダウン株 (KD) を用いてマイクロアレイ解析を行い、細胞死、化学療法剤感受性、細胞周期関連遺伝子などについてその発現の増減について検討したところ、CD26 陽性中皮腫での化学療法への感受性の増加を支持する結果であった。更に悪性中皮腫細胞膜上の CD26 発現が高い程化学療法剤によく反応し、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。

ヒト化 CD26 抗体投与患者では血清中に存在する可溶性 CD26/DPPIV が抗体と反応して低値をとる可能性があるため血清中の CD26 (sCD26)/DPPIV 酵素値のモニターは重要である。従来の我々の開発した sCD26 ELISA 系や複数の市販キットはヒト化 CD26 抗体存在下で可溶性 CD26 値は測定不可であった。新しい CD26 エピトープを認識する 9C11 抗体を見だし、本抗体を用いて ELISA 系を構築したところヒト化 CD26 抗体存在下の正常人血清でも可溶性 CD26 は測定でき、多数の正常人血清、悪性中皮腫患者においても従来の ELISA 系と比して同様の結果を得て最適条件を確立した。フランスの第 相臨床試験の患者血清についてもブロックされることなく可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素値は測定でき、ヒト化 CD26 抗体の投与量が増加するにつれ可溶性 CD26/DPPIV 酵素値は低下する傾向にあった。可溶性 CD26 ELISA 系の性能試験は良好で検体反応時間の短縮化は可能であったが、DPPIV 酵素活性測定系の性能については血清中の干渉因子がその測定に影響する可能性が示唆された。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 陽性腫瘍への第 相臨床試験は平成 26 年 9 月半ばに終了し、安全性を確認し、治療効果を示唆するデータも得られた。平成 28 年 8 月頃を目処に本邦でも第 相臨床試験をスタート予定である。

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

A . 研究目的

CD26 分子は DPP 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。研究代表者は、高親和性で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。本抗体が悪性中皮腫細胞の増殖、浸潤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 2013 年には 1425 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う結果も得ている。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。具体的には (1) 森本、山田は悪性中皮腫の免疫染色に適した新規抗ヒト CD26 単クローン抗体を開発し、病理組織での CD26 発現評価の至適条件などを決定し、CD26 抗体療法の適用患者選択のための、コンパニオン診断薬の確立を目指すことを目的とした。(2) 山田、岸本は悪性中皮腫患者の腫瘍病理組織の CD26 発現を評価して、その病態及び臨床像並びに化学療法剤とその治療効果予測解析を行うことを目的とした。(3) 森本、岸本はヒト化 CD26 抗体治療患者での可溶性 CD26/DPPIV 酵素活性測定キットを開発するため血清中にヒト化 CD26 抗体が存在しても測定可能な可溶性 CD26 ELISA 測定系を開発し、フランスでのヒト化 CD26 抗体の第 Ⅰ相臨床試験患者血清中の可溶性 CD26/DPPIV 酵素活性を測定し、更に本邦悪性中皮腫患者血清及び胸水中の可溶性 CD26/DPPIV 酵素値の病態及び予後に関する研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1 森本・山田

研究協力者:大沼・波多野

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。

2 山田

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、私の臨床試験で用いている R&D 社製抗 CD26 ヤギ・ポリクロナール抗体 (Lot.No. JOQ107061) および新規モノクロナール抗体クローン 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)。

3 岸本・山田

研究協力者:青江・藤本

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, Litteton, 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-1 β , 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, FGF β , 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。

4 森本・岸本

研究協力者:大沼・波多野・藤本・青江

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、5 μ g/ml の捕捉抗体 (CD26 単クローン抗体 5F8) を各穴 100 μ l ずつ分注し、4 で一晚静置する。

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 300 μ l の PBS-Tween で 3 回洗浄後、200 μ l 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 で一晚静

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、発色反応を停止させる。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。

5 岸本・森本

研究協力者:藤本・青江・大沼・波多野

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 森本・山田

研究協力者:波多野・大沼

1) 新規抗ヒト CD26 抗体を用いた免疫組織染色の結果

Urea 変性可溶性 CD26 をマウスに免疫してハイブリドーマ作製の取り組みにより、フローサイトメトリーによる 1st スクリーニングと ELISA による 2nd スクリーニングのどちらも陽性の 31 クローンが選出された。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、それら 31 クローンの培養上清で免疫組織染色を検討した結果、MBL 社の抗ヒト CD26 単クローン抗体と比較して明瞭に CD26 を検出できる 6 クローンが得られ、中でも特に優れた染色性を示す 2 クローン (19-32 と 18-110) に絞り込んだ。これらの抗体のヒト CD26 への結合特異性を確認するため、過剰量の組換え可溶性 CD26 と preincubation した CD26 抗体を一次抗体の代わりに用いて悪性中皮腫の染色を行った結果、可溶性 CD26 との前処理により染色は完全に阻害された。この結果から新規抗ヒト CD26 単クローン抗体を用いて認められる染色はいずれも CD26 特異的であることが示された。

さらに、これらの抗体を用いて悪性中皮腫

以外の CD26 陽性腫瘍の免疫組織染色も行った。肝細胞がん、腎細胞がん、前立腺がん、大腸腺がん、肺腺がん、いずれに対しても新規抗ヒト CD26 単クローン抗体 18-110 と 19-32 は R&D 社の抗ヒト CD26 ポリクローナル抗体と同レベルの鮮明さと染色強度を示した。

2) 新規抗ヒト CD26 抗体のヒト化 CD26 抗体との結合競合性の解析とエピトープマッピングの結果

治療用ヒト化 CD26 抗体の適用患者選択のために腫瘍組織における CD26 発現の診断は不可欠だが、CD26 抗体療法が腫瘍上および様々な組織における CD26 発現に及ぼす影響の解析も重要である。そのため、開発した新規抗ヒト CD26 単クローン抗体のヒト化 CD26 抗体との CD26 への結合競合性の解析を行った。CD26 を安定して発現させた Jurkat 細胞株に未標識のヒト化 CD26 抗体を結合させた後、新規抗ヒト CD26 抗体、または当研究室でこれまでに開発したエピトープがわかっている抗ヒト CD26 抗体 (1F7 または 5F8) を添加し、PE 標識 Goat Anti-Mouse Ig 抗体で染色した結果、ヒト化 CD26 抗体と同等のエピトープを持つ 1F7 はヒト化抗体が結合している CD26 には全く結合できないのに対し、ヒト化抗体とはエピトープが異なる 5F8 はヒト化 CD26 抗体による影響を受けないことが確認された。同様に新規抗体の CD26 への結合を解析した結果、クローン 19-32 はヒト化 CD26 抗体の影響を全く受けないのに対し、クローン 18-110 は CD26 への結合が完全に阻害された。このことから、19-32 はヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープを持つのに対し、

18-110 はヒト化抗体と同等のエピトープを持つことが示された。

新規抗ヒト CD26 単クローン抗体のより詳細なエピトープを明らかにするため、当研究室でこれまでに開発したそれぞれ異なるエピトープを認識する 5 種類の抗ヒト CD26 単クローン抗体 (4G8, 1F7, 5F8, 16D4B, 9C11) との結合競合性の解析を行った。その結果、クローン 19-32 は CD26 の N 末端側 1-247 アミノ酸残基に結合する 4G8 と同等のエピトープを持ち、クローン 18-110 は CD26 の 248-358 アミノ酸残基に結合する 1F7 およびヒト化 CD26 抗体と同等のエピトープを持つことが示された。

3) 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、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。

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。

4) 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。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。

2 山田

開発中の新規単クローン抗体については、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 クローンを選別した。その中で、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、3 クローンについて、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。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性に認められる症例（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
ことが明らかとなってきた。

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, MSTO-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。

3 岸本・山田

研究協力者:青江・藤本

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
での解析では、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、有意な関連が認められた。
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。

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。ま
た、Pemetrexed の使用の有無でも有意差が
認められた。

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。

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。

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。

4 森本・岸本

研究協力者:大沼・波多野・藤本・青江

1) 従来の ELISA 法を用いたヒト化 CD26 抗体添加による可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素値

我々が確立した従来の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素値測定 ELISA 法は 5F8 抗体を固相化し、その後血清を加え、可溶性 CD26 をプレート上に捕捉し、その後可溶性 CD26 の測定はビオチンラベルした 1F7 抗体を加え、更にアビジンラベルした Alkaline phosphatase を加えて、PNPP を加えて発色させ測定する。DPPIV 酵素活性は 5F8 抗体で捕捉した可溶性 CD26 プレートに Gly-Pro-pNA を基質として加え測定する。正常人血清中にヒト化 CD26 抗体(YS110) を 1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml、10000ng/ml、100000ng/ml となるように希

釈して加えて上記プレートにて可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性を測定した。正常人 2 症例ともにヒト化 CD26 抗体が 1µg/ml 以上では 1F7 と同一エピトープであるため競合して可溶性 CD26 は検出不能となった。DPPIV 酵素については 5F8 抗体はヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープであるためヒト化抗体存在下でも可溶性 CD26 はプレート上に捕捉され、測定可能であった。

2) 市販の可溶性 CD26 ELISA キットにおけるヒト化 CD26 抗体存在下での正常人血清中の可溶性 CD26 の測定

R and D 社及び Bender 社からの可溶性 CD26 ELISA キットを用いて同様に測定した。R&D 社は抗体の一つをポリクローナル抗体、ベンダー社は伴に単クローン抗体を用いた ELISA 系である。ヒト化 CD26 抗体添加正常人血清において我々の従来の ELISA 系同様に両者共に 1µg/ml の点で結合が阻害され、それ以上で測定不能であった。

3) 独立したエピトープを認識する CD26 抗体の 9C11mAb について

我々は以前に 50 種以上の CD26 単クローン抗体を開発し、13 種の CD26 抗体について 5 つのエピトープ群に分けられることを報告しているが (Mol Immunol 1998; 35: 13-21) 9C11 は 1F7、ヒト化 CD26 抗体と異なるエピトープで、さらに 5F8 が認識するエピトープとも異なる。CD26 陽性 Jurkat T 細胞株を用いたが FACS での染色では染色はブロックされることなく全く影響を与えなかった。

4) 9C11 抗体を 2 次抗体とした可溶性 CD26 の測定について

9C11 は今まで用いた CD26 抗体とは異なるエピトープを認識することが明らかとなったので、従来の可溶性 CD26 測定 ELISA キットにおいて 1F7 biotin を 9C11 biotin に置き換えて ELISA アッセイを施行した。

9C11 を用いた場合はヒト化 CD26 抗体の存在で sCD26 値はやや低下するものの、1F7 biotin の場合と異なり YS110 が 1 μ g/ml 以上においても競合せずに測定可能であることが明らかとなった。

5) 二次抗体として 1F7 及び 9C11 抗体を用いた種々の検体の測定値比較

従来の 1F7 を用いた ELISA 及び 9C11 を用いた ELISA 法での種々の検体の測定値比較を行った。可溶性 CD26 測定の標準となる組み替え可溶性 CD26 の精製標準品について両者で測定したところ R=0.977 及び R=0.982 と両者は非常によく相関した。更に実際の患者の臨床検体(血清、胸水)についても両者の比較をしたところ少数患者で少しのずれが生じているがほぼ両者は相関することが明らかとなった。

6) 二次抗体として 1F7 及び 9C11 抗体を用いた種々の検体の可溶性 CD26 の測定値比較

ヒト化 CD26 抗体と同一エピトープの 1F7 を 9C11 に置き換えて ELISA アッセイを行うことで正常人血清中にヒト化 CD26 抗体を加えても可溶性 CD26 は測定できることを平成 24 年度報告した。そこで従来の 1F7 を用いた ELISA 法及び 9C11 を用いた ELISA 法での悪性中皮腫胸水及び血清検体

の測定値比較を行った。可溶性 CD26 測定の標準となる組み替え可溶性 CD26 の精製標準品について両者で測定したところ R=0.977 及び R=0.982 と両者は非常によく相関した。更に実際の患者の臨床検体(血清、胸水)についても両者の比較をしたところ少数患者で少しのずれが生じているがほぼ両者は相関することが明らかとなった。

7) 9C11 を用いた新しい ELISA と市販の ELISA キットとの比較

我々が確立した新しい ELISA と代表的な市販 ELISA キットである R&D 社のキットで正常人 10 例の血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性について比較検討を行った。DPPIV 酵素活性値に比して可溶性 CD26 値は我々が確立した ELISA は市販の ELISA キットよりも感度が非常に高いことが明らかとなり、可溶性 CD26 値を適切に測定できることが明らかとなった。

8) 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。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。

9) 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。その結果、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。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 (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。Recovery は回収率 80~120%範囲内と良好な結果を示した。更に Linearity についても直線性 80~120%範囲内と良好な結果を示した。健常成人の血清検体の 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。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、健常成人血清 11 例について検討した。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 1 晩から 2 時間まで短縮可能である。

10) 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。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。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が極低濃度 (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。「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。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。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。

5 岸本・森本

研究協力者:藤本・青江・大沼・波多野

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 を胸膜ブランク群と比較したところ、胸膜ブランク群に比べ有意に低値であった。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 活性を胸膜ブランク群と比較したところ、やはり胸膜ブラン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。

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)。

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比べ高値であり、特に CD26 に関しては統計学的に有意であった(P=0.027)。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。しかし 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)。

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

1 森本・山田

研究協力者:波多野・大沼

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遙かに明瞭に 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ェスタンブロット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、今後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ティング方法を選択する必要がある。

2 山田

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、陽性シグナルが得られており、有用な抗体である可能性が高いと考えられる。また岡山労災病院における中皮腫59症例のCD26発現解析から、スコア評価では中皮腫の陽性率が82%であり、これまでの検討と同様の結果であった。一方、仏での臨床試験の陽性基準では、陽性率が73%となり、現在の臨床試験の陽性基準が厳しいものであると考えられた。また中皮腫細胞におけるCD26陽性所見は、細胞質から細胞膜、核まで、症例により多彩な局在を示しており、これらの客観的な評価が、バ

バイオマーカーとしての CD26 の検討には重要と推測された。

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。

3 岸本・山田

研究協力者:青江・藤本

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。治療効果が予測できるマーカーが存在すれば治療効果の期待できる症例を適切に選択できる可能性がある。今回の結果は、CD26 発現がそのようなマーカーとなり得る可能性を示唆している。

今回の観察期間を延長した生存解析においても、CD26 発現は良好な予後を示している。また今回、全体例では化学療法の有無は予後と有意な関連を見いだせなかったが、化

学療法を行った集団のみで解析すると CD26 発現は予後に対して有意な影響を示していた。

CD26 発現と胸水中のマーカー (Osteopontin, Fibulin-3, ERC/mesothelin) を検討したが今回の検討では有意な関連は見いだせなかった。しかしながら、少数例での検討であり、今回の結果だけで結論を導き出すことは困難で新規症例の解析を追加していくことが重要と考えられた。

更に 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。

4 森本・岸本

研究協力者:大沼・波多野

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、血清中に存在する可溶性 CD26 (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 キットにおいても血清中にヒト化 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。

5 岸本・森本

研究協力者: 藤本・青江・大沼

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

(1) 変性処理した組み換え可溶性 CD26 を免疫することで R&D 社のポリクローナル

CD26 抗体に匹敵する病理組織染色性を示す新しい CD26 単クローン抗体を開発した。これらの抗体は異なるロット間でも安定した染色性を示し、4、-80 とともに 12 ヶ月保存しても安定であり、悪性中皮腫における CD26 発現の病理診断に有用な単クローン抗体である。(2) CD26 発現は悪性中皮腫上皮型細胞で発現頻度が高く、肉腫型で低く、さらに症例数を増加しても CD26 発現症例群で化学療法の治療効果がより良好で陰性群より予後も良かった。また CD26 発現は血清 MIP-1 濃度との関連を示唆する結果が示された。(3) 血清中の可溶性 CD26 値は石綿ばく露患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。さらに血清及び胸膜中の可溶性 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。(4) 新たなエピトープと反応する CD26 抗体 9C11 を同定し、この抗体を用いることで血清中にヒト化 CD26 抗体存在下でも CD26/DPPIV 値を測定できる新 ELISA 系を確立した。フランスでの悪性中皮腫をターゲットにしたヒト化 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 値は適切に測定できた。可溶性 CD26 ELISA アッセイの性能はとても良く、反応時間も 1 晩から 2 時間に短縮可能であった。DPPIV 酵素活性測定アッセイ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 . 研究発表

1 . 論文発表

(森本)

- 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) 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.* 2014; 9: 30.
- 11) Okamoto T, Iwata S, Yamazaki H, Hatano R, Komiya E, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. CD9 Negatively Regulates CD26 Expression and Inhibits CD26-Mediated Enhancement of Invasive Potential of Malignant Mesothelioma cells. *PLoS One.* 2014; 9: e86671.
- 12) Havre PA, Dang LH, Ohnuma K, Iwata S, Morimoto C, Dang NH. CD26 Expression on T-Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) Line Karpas 299 is Associated with Increased Expression of Versican and MT1-MMP and Enhanced Adhesion. *BMC Cancer.* 2013; 13: 517.
- 13) Ohnuma K, Haagmans BL, Hatano R, Raj VS, Mou H, Iwata S, Dang NH, Bosch BJ, Morimoto C. Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection by Anti-CD26 Monoclonal Antibody. *J Virol;* 2013; 87: 13892-9.
- 14) Saito T, Ohnuma K, Suzuki H, Dang NH, Hatano R, Ninomiya H, Morimoto C. Polyarthropathy in type 2 diabetes patients treated with DPP4 inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 102: e8-e12.
- 15) Tao X, Hill TE, Morimoto C, Peters CJ, Ksiazek TG, Tseng CT. Bilateral Entry and Release of Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Induces Profound Apoptosis of Human Bronchial Epithelial Cells. *J Virol.* 2013; 87: 9953-8.
- 16) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol.* 2013; 162: 263-77.
- 17) Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear Localization of CD26 Induced by a

- Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. *PLoS One*. 2013; 8: e62304.
- 18) Ikeda T, Kurosawa M, Morimoto C, Kitayama S, Nukina N. Multiple effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neuropsychiatric disorders. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 436: 121-7.
- 19) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Komoriya K, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated costimulation in human CD8+T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immunol*. 2013; 138: 165-72.
- 20) Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K. CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma. *Oncol Rep*. 2013; 29: 21-8.
- 21) Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Sano M, Matsuhashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of HEXIM1 Prevents Right Ventricular Hypertrophy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *PLoS One*. 2012; 7: e52522.
- 22) Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C. Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 6326-6338.
- (岸本)
- 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) 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*. 2014; 110:2232-45.
- 5) 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.
- 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Fuchimoto Y, Fujimoto N, Asano M, Kitamura K, Ozaki S, Hirayama S, Nishi H, Taguchi K, Kishimoto T. Simultaneous occurrence of bilateral malignant pleural mesothelioma. *Int Canc Conf J.* 2013; 3: 150-152.
 - 9) Noguchi K, Fujimoto N, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Hotta K, Kato K, Toda H, Taguchi K, Kishimoto T. Extrapulmonary small cell carcinoma mimicking malignant pleural mesothelioma. *J Clin Pathol.* 2013; 66(5):450-1.
 - 10) 岸本卓巳。アスベスト関連疾患。日本臨床。2014; 72(2): 300-305.
 - 11) Muraoka T, Soh J, Toyooka S, Aoe K, Fujimoto N, Hashida S, Maki Y, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Kishimoto T, Otsuki T, Miyoshi S. The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2013; 82: 485-490.
 - 12) 加藤勝也、岸本卓巳、金澤右。アスベスト関連肺胸膜病変画像診断。2013; 33(5): 473-484.
 - 13) Fujimoto N, Gemba K, Asano M, Fuchimoto Y, Wada S, Ono K, Ozaki S, Kishimoto T. Hyaluronic acid in the pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma. *Respir Investig.* 2013; 51(2):92-7.
 - 14) Gemba K, Fujimoto N, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. *Acta Oncol.* 2013; 52: 803-8.
 - 15) Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K. CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma. *Oncol Rep.* 2013; 29: 21-8.
 - 16) Shinjo K, Okamoto Y, An B, Toshihiko Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2012; 33: 1277-85.
 - 17) Morimoto D, Fujimoto N, Nishi H, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Taguchi K, Kishimoto T. Malignant pleural mesothelioma localized in the thoracic wall. *Journal of Thoracic Oncology: case report*

- 2012; 7: e21-22.
- 18) Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, Kanazawa S, Miyoshi S. MicroRNA miR-34b/c Enhances Cellular Radiosensitivity of Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Anticancer research*. 2012; 32: 4871-5.
 - 19) 福岡和也、関戸好孝、 樋田豊明、河原邦光、 太田三徳、松村晃秀、 岡田守人、岸本卓巳、 中野喜久雄、中野孝司. 悪性中皮腫の血清診断における可溶性メソテリン関連ペプチド(SMRP : Soluble Mesothelin-related Peptides)の有用性に関する多施設共同試験. *医学と薬学* 2012; 68: 177-183.
- (山田)
- 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*. 2014; 9(12):e115647.
 - 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.* 2014; 29(11):2439-2455.
 - 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.* 2014; 447(4):609-615.
 - 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*. 2014; 110(9):2232-2245.
 - 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.* 2014; 9:30.
 - 6) Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in mated mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132: 1111-20.
 - 7) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol.* 2013; 162: 263-77.
 - 8) Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by

- Modulating of POLR2A Transcription. PLoS One. 2013; 8(4):e62304.
- 9) Shiheido H, Naito Y, Kimura H, Genma H, Takashima H, Ono T, Hirano T, Du W, Yamada T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H. An Anilinoquinazoline Derivative Induces Apoptosis of Multiple Myeloma Cells through Interaction with hCAP-G2, a Subunit of Condensin II. PLoS ONE. 2012; 7: e44889.
 - 10) Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H; Ogawa Y, Du W; Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H. A Phthalimide Derivative that Inhibits Centrosomal Clustering is Effective on Multiple Myeloma. PLoS ONE. 2012; 7: e38878.
 - 11) Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C. Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2012; 18: 6326-38.
 - 12) Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Sasaki H, Amagai M. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. Journal of Allergy Clinical Immunology. 2012; 129: 1538-46.
- ## 2. 学会発表
- (森本)
- 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) 波多野良, 大沼圭, 森本幾夫. T 細胞共刺激分子 CD26 を標的とした関節リウマチの新規アップストリーム治療法の開発について. 第 57 回日本リウマチ学会学術集会, 2013 年 4 月 18 - 20 日, 京都
 - 4) Angevin E, Trillet Lenoir V, Alexandre J, Isambert N, Viehl P, Farace F, Valleix F, Podoll T, Shimasaki M, Miyashita I, Hosono O, Dang NH, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C. First in Human Phase I administration of YS110, a humanized monoclonal antibody directed against the CD26 molecule in cancer patients. 37th The European Society for Medical Oncology (ESMO) Congress, 28 September-2 October 2012, Vienna, Austria
 - 5) Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, Ohnuma K, Hosono O, Hiraki A, Fujii

- M, Yamada T, Dang NH, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T, Morimoto C. CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
- 6) Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Yamada T, Morimoto C. Humanized anti-CD26 mAb Leads to Prophylaxis and Treatment of GVHD in Hu-PBL-NOG Model Mice. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19 - 21 日, 京都
- (岸本)
- 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 岸本卓巳. 石綿関連疾患の臨床について. 第87回日本呼吸器学会近畿地方会教育講演 2013年12月7日, 大阪.
 - 11) 岸本卓巳. 悪性胸膜中皮腫の病態と治療の進歩. 日本呼吸器学会第34回生涯教育講演 2013年11月10日, 仙台.
 - 12) 岸本卓巳. 中皮腫の診断と治療. 第51回日本癌治療学会 2013年10月25日, 京都.
 - 13) 岸本卓巳. 石綿関連疾患の労災認定基準について. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 2013年4月20日, 東京.
 - 14) 岸本卓巳. 悪性胸膜中皮腫の病態と治療の進歩. 日本呼吸器学会 第34回生涯教育講演会(春期)2013年4月18日, 東京.
 - 15) 青江啓介、三村雄輔、三村由香、宇都宮利彰、村田順之、大石景士、原田千尋、大藤貴、尾形佳子、岸野大蔵、片山英樹、近森研一、前田忠士、上岡博. 悪性胸膜中皮腫診断における胸水中 Fibulin-3 の検討. 第54回日本肺癌学会総会、2013年11月22日, 東京.
 - 16) 村田順之、近森研一、宇都宮利彰、坂本健次、原田千尋、大石景士、岸野大蔵、青江啓介、前田忠士、上岡博. 胸水貯留を契機に発見され、胸腔鏡で診断し得た胸膜原発悪性リンパ腫(DLBCL)の1例. 第49回日本呼吸器学会中国・四国地方会、2013年7月19日, 高松.
 - 17) 宇都宮利彰、大石景士、村田順之、坂本健次、尾形佳子、大藤貴、前田忠士、青江啓介、上岡博、村上知之. 胸水貯留を認めたサルコイドーシスの1例. 第49回日本呼吸器学会中国・四国地方会、2013年7月19日, 高松.
 - 18) 青江啓介、岡部和倫、村上知之、宇都宮利彰、村田順之、原田千尋、坂本健次、大石景士、大藤貴、神徳済、尾形佳子、岸野大蔵、近森研一、前田忠士、佐野史歩、高萩亮宏、林達朗、田中俊樹、田尾裕之、松田英祐、松本常男、上岡博. 胸腔鏡検査でも診断困難な胸膜中皮腫の1例. 第36回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、2013年6月21日, 大宮.
 - 19) 村田順之、青江啓介、坂本健次、大石景士、原田千尋、岸野大蔵、近森研一、前田忠士、上岡博. 癌性胸水に対する胸膜癒着術の検討. 第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月21日, 東京.
 - 20) 岡部和倫、青江啓介、上岡博、加藤勝也. 悪性胸膜中皮腫における肺内アスベスト小体数と胸膜プラークの検討. 第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月21日, 東京.
 - 21) 青江啓介、宇都宮利彰、岸野大蔵、近森研一、前田忠士、岡部和倫、村上知之、上岡博. 国立病院機構山口宇部医療センターで経験した中皮腫を含む重複癌症例の検討. 第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月21日, 東京.
 - 22) 藤本伸一、青江啓介、大泉聡史、上月俊幸、亀井敏昭、三浦溥太郎、井内康輝、岸本卓巳. 胸膜中皮腫における胸水ヒアルロン酸に関する調査解析(環境省請負業務). 第110回日本内科学会総会講演会 2013年4月12-14日, 東京.
 - 23) Fujimoto N, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Kishimoto T. Potential value of molecular markers in pleural fluid for differential

- diagnosis of malignant pleural mesothelioma. CHEST 2013, 26-31, Oct 2013, Chicago, USA
- 24) 藤本伸一、岸本卓巳、吉岡弘鎮、國政啓、西山明宏、岩破将博、佐藤晃子、瀧川奈義夫、田端雅弘、野上尚之、上月稔幸、新海哲、張田信吾、谷本光音、木浦勝行。進行 NonSq-NSCLC に対する CDDP/DOC/BEV 後の BEV/PEM 維持療法: OLCSG0903。第 52 回日本肺癌学会中国・四国支部会 2013 年 7 月 19 - 20 日, 高松
- 25) Fujimoto N, Kato K, Usami I, Sakai K, Tokuyama T, Hayashi S, Miyamoto K, Kishimoto T. Clinical investigation of asbestos-related diffuse pleural thickening in Japan. American Thoracic Society International Conference 2013, 17-22, 2 May 2013, Philadelphia, USA
- 26) Fujimoto N. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. Asian asbestos Initiative 5th Inter National Seminar (AAI), November 6-8 2012, Busan, Korea
- 27) Gemba K, Fujimoto N, Kato K, Aoe K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
- 28) Okabe K, Matsuda E, Tao H, Hayashi T, Tanaka T, Sano H, Takahagi A, Aoe K, Taguchi K. Trimodality therapy with extrapleural pneumonectomy, radiation therapy, and chemotherapy for malignant pleural mesothelioma. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
- 29) Fujimoto N, Gemba K, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 11-14 September 2012, Boston, USA
- 30) Fujimoto N, Gemba K, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T. National survey of malignant mesothelioma in Japan. The 103th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 31 March-5 April 2012, Chicago, USA
- 31) 岸本卓巳. 臨床からみたアスベスト関連疾患 アスベストによる健康障害 - 過去・現在・未来 -. 第 60 回日本職業・災害医学会学術大会, 2012 年 12 月 2 - 3 日, 大阪
- 32) 岸本卓巳. 石綿肺によるびまん性胸膜肥厚、良性石綿胸水について. 第 60 回日本職業・災害医学会学術大会, 2012 年 12 月 2 - 3 日, 大阪
- 33) 藤本伸一、浅野美智子、淵本康子、小野勝一郎、小崎晋司、西英行、岸本卓巳. 胸膜中皮腫を中心とした胸水中の分子マーカーの検討. 第 53 回日本肺癌学会総

- 会ワークショップ4「悪性胸膜中皮腫の診断における最近の進歩」. 2012年11月8-9日, 岡山
- 34) 山本寛斎、多田龍平、枝園和彦、古川公之、宗淳一、三村雄輔、片山英樹、青江啓介、岡部和倫、松本常男、豊岡伸一、三好新一郎. 新規に樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株の分子生物学的解析. 第53回日本肺癌学会総会, 2012年11月, 岡山
- 35) 岡部和倫、松田英祐、田尾裕之、林達朗、田中俊樹、佐野史歩、高萩亮宏、青江啓介、前田忠士、上岡博、田口耕太郎、橋本かおり、松本常男. 悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療. 第53回日本肺癌学会総会, 2012年11月, 岡山
- 36) 青江啓介、VJ Amatya、藤本伸一、大沼圭、細野治、平木章夫、藤井昌学、山田健人、NH Dang、武島幸男、井内康輝、岸本卓巳、森本幾夫. 悪性胸膜中皮腫におけるCD26発現と化学療法効果・予後の検討. 第53回日本肺癌学会総会, 2012年11月, 岡山
- 37) 藤本伸一、玄馬頭一、加藤勝也、青江啓介、武島幸男、井内康輝、岸本卓巳. 我が国の悪性中皮腫における石綿ばく露および臨床像に関する全国調査. 第50回日本癌治療学会学術集会, 2012年10月25-27日, 横浜
- 38) 宇都宮利彰、村上知之、青江啓介、岸野大蔵、近森研一、片山英樹、前田忠士、村田順之、坂本健次、大藤貴、大石景士、関千尋、神徳済、尾形佳子、佐野史歩、林達朗、田中俊樹、田尾裕之、松田英祐、岡部和倫、上岡博. 骨および軟骨形成を認めた悪性胸膜中皮腫の1例. 第47回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2012年7月, 下関
- 39) 松嶋敦、高木努、島袋郁子、小畑秀登、青江啓介、田尾裕之、岡部和倫、村上知之. 難治性の縦隔炎を合併し診断に苦慮した悪性胸膜中皮腫の一例. 第47回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2012年7月, 下関
- (山田)
- 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
 - 2) Yamada T. CD26 Signaling Involves Human Functional Osteoclast Development. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-4日, 神戸.
 - 3) 山田健人 ヒト化CD26モノクローナル抗体によるがん抗体療法とその分子機構 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日, 札幌
 - 4) Yamada T. Impairment of cell growth by down regulation of NCAP2 gene transcription mediated with nuclear transported CD26 using humanized anti-CD26 monoclonal antibody. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会, 2012年5月28-31日, 神戸
- G . 知的財産権の取得状況**
- 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】

1)

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。

2)

発明の名称：MERS コロナウイルス感染予防治療剤

発明者：森本幾夫、大沼圭

出願者：順天堂大学

種類：特許権

番号：特願 2013-187124

出願日：2013年9月17日

出願国：PCT加盟国

概略：ヒト化CD26抗体がMERSコロナウイルス感染の予防及び治療に用いることができるという特許である。

3)

発明の名称：抗ヒト化CD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片

発明者：森本幾夫、大沼圭、波多野良、
山田健人

出願者：順天堂大学

種類：特許権

番号：特願2013-158533

出願日：2013年7月31日

出願国：PCT加盟国

概略：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が可能なコンパニオン診断薬としての新規抗ヒト CD26 単クローン抗体開発の特許である。

< 研究成果の刊行に関する一覧表 (森本) >

【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	2439-55	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2232-45	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
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
Okamoto T, Iwata S, Yamazaki H, Hatano R, Komiya E, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C.	CD9 Negatively Regulates CD26 Expression and Inhibits CD26-Mediated Enhancement of Invasive Potential of Malignant Mesothelioma cells.	PLoS One	9	e86671	2014
Havre PA, Dang LH, Ohnuma K, Iwata S, Morimoto C, Dang NH.	CD26 Expression on T-Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) Line Karpas 299 is Associated with Increased Expression of Versican and MT1-MMP and Enhanced Adhesion.	BMC Cancer	13	517	2013

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, Haagmans BL, Hatano R, Raj VS, Mou H, Iwata S, Dang NH, Bosch BJ, Morimoto C.	Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection by Anti-CD26 Monoclonal Antibody.	J Virol.	87	13892-9	2013
Saito T, Ohnuma K, Suzuki H, Dang NH, Hatano R, Ninomiya H, Morimoto C.	Polyarthropathy in type 2 diabetes patients treated with DPP4 inhibitors.	Diabetes Res Clin Pract.	102	e8-e12	2013
Tao X, Hill TE, Morimoto C, Peters CJ, Ksiazek TG, Tseng CT.	Bilateral Entry and Release of Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Induces Profound Apoptosis of Human Bronchial Epithelial Cells.	J Virol.	87	9953-8	2013
Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C.	Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody.	Br J Haematol.	162	263-77	2013
Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T.	Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription.	PLoS One	8	e62304	2013
Ikeda T, Kurosawa M, Morimoto C, Kitayama S, Nukina N.	Multiple effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neuropsychiatric disorders.	Biochem Biophys Res Commun.	436	121-7	2013
Ohnuma K, Morimoto C.	DPP4 (dipeptidyl-peptidase 4).	Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol	17	301-312	2013
Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Komoriya K, Dang NH, Morimoto C.	CD26-mediated costimulation in human CD8+T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production.	Immunol.	138	165-72	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K.	CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma.	Oncol Rep.	29	21-8	2013
Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Sano M, Matsuhashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H.	Cardiomyocyte-Specific Overexpression of HEXIM1 Prevents Right Ventricular Hypertrophy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice.	PLoS One.	7	e52522.	2012
Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta- Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C.	Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer.	Clin Cancer Res.	18	6326-38	2012

< 研究成果の刊行に関する一覧表（岸本） >

【書籍】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
青江啓介	一部に骨形成を伴った胸膜中皮腫症例	岸本卓巳	アスベスト関連疾患早期発見・診断の手引き - 中皮腫を正しく診断するために - (改訂版)	日本労務研究会	東京	2013	25-27
青江啓介	悪性胸膜中皮腫と鑑別困難な症例 (滑膜肉腫の症例)	独立行政法人労働者健康福祉機構編	アスベスト関連疾患日常診療ガイド(増補改訂2版)	労働調査会	東京	2012	41-42

【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
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・災害医学会会誌	62(2)	117-122	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Makimoto G, Fujiwara K, Fujimoto N, Yamadori I, Sato T, Kishimoto T.	Phrenic nerve paralysis 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
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	2232-2245	2014
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
Fuchimoto Y, Fujimoto N, Asano M, Kitamura K, Ozaki S, Hirayama S, Nishi H, Taguchi K, Kishimoto T.	Simultaneous occurrence of bilateral malignant pleural mesothelioma.	Int Canc Conf J.	3	150-152	2013
Noguchi K, Fujimoto N, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Hotta K, Kato K, Toda H, Taguchi K, Kishimoto T.	Extrapulmonary small cell carcinoma mimicking malignant pleural mesothelioma.	J Clin Pathol.	66	450-1	2013
岸本卓巳	アスベスト関連疾患	日本臨床	72	300-305	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muraoka T, Soh J, Toyooka S, Aoe K, Fujimoto N, Hashida S, Maki Y, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Kishimoto T, Otsuki T, Miyoshi S.	The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma.	Lung Cancer	82	485-490	2013
加藤勝也、岸本卓巳、金澤右	アスベスト関連肺胸膜病変	画像診断	33	473-484	2013
Fujimoto N, Gemba K, Asano M, Fuchimoto Y, Wada S, Ono K, Ozaki S, Kishimoto T.	Hyaluronic acid in the pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma.	Respir investing.	51	92-97	2013
Gemba K, Fujimoto N, Aoe K, Kato K, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T.	Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan.	Acta Oncol.	52	803-8	2013
Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K.	CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma.	Oncol Rep.	29	21-8	2013
Shinjo K, Okamoto Y, An B, Toshihiko Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y.	Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma.	Carcinogenesis.	33	1277-85	2012
Morimoto D, Fujimoto N, Nishi H, Asano M, Fuchimoto Y, Ono K, Ozaki S, Taguchi K, Kishimoto T.	Malignant pleural mesothelioma localized in the thoracic wall.	Journal of Thoracic Oncology: case report	7	e21-22	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, Kanazawa S, Miyoshi S.	MicroRNA miR-34b/c Enhances Cellular Radiosensitivity of Malignant Pleural Mesothelioma Cells.	Anticancer research.	32	4871-5	2012
福岡和也、関戸好孝、 樋田豊明、河原邦光、 太田三徳、松村晃秀、 岡田守人、岸本卓巳、 中野喜久雄、中野孝 司	悪性中皮腫の血清診断 における可溶性メソテリン 関連ペプチド(SMRP: Soluble Mesothelin- related Peptides)の有用 性に関する多施設共同 試験	医学と薬学	68	177-183	2012

< 研究成果の刊行に関する一覧表（山田） >

【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
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	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	2439-2455	2014
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.	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
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
Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M.	A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in matted mice.	J Allergy Clin Immunol.	132	1111-20	2013
Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C.	Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody.	Br J Haematol.	162	263-77	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T.	Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription.	PLoS One	8	e62304	2013
Shiheido H, Naito Y, Kimura H, Genma H, Takashima H, Ono T, Hirano T, Du W, Yamada T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H	An Anilinoquinazoline Derivative Induces Apoptosis of Multiple Myeloma Cells through Interaction with hCAP-G2, a Subunit of Condensin II.	PLoS ONE	7	e44889	2012
Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H; Ogawa Y, Du W; Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H	A Phthalimide Derivative that Inhibits Centrosomal Clustering is Effective on Multiple Myeloma.	PLoS ONE	7	e38878	2012
Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C.	Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer.	Clin Cancer Res.	18	6326-38	2012
Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Sasaki H, Amagai M	Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice.	Journal of Allergy Clinical Immunology	129	1538-46	2012