

研究結果の概要（総合研究報告）

（研究代表者）

機関名	順天堂大学大学院医学研究科
部署・職名	免疫病・がん先端治療学講座 特任教授
氏名	森本幾夫

研究課題名（課題番号）：悪性胸膜中皮腫のヒト化 CD26 抗体療法確立のための予後・治療効果予測バイオマーカーの開発（180101-01）

研究実施期間：平成 30 年 5 月 15 日から令和 3 年 3 月 31 日まで 3 年間

【研究目的】

悪性胸膜中皮腫は現時点で効果的な治療法はなく、予後は極めて不良で労災疾病行政上も大きな問題であり、有効な新規治療法の確立は急務である。研究代表者は抗腫瘍効果の強いヒト化 CD26 抗体の開発に成功し、悪性中皮腫における CD26 発現の解析、抗体の抗腫瘍作用機構の解明に取り組み、この抗体は抗体医薬特有の ADCC に加え、CD26 陽性腫瘍に結合することで腫瘍の増殖抑制に働くこと、さらに近年では腫瘍免疫の促進にも働さうることを明らかにしてきた。さらに、抗体療法の確立に不可欠な病理組織の CD26 発現診断用抗体、可溶性 CD26/DPP4 値測定系を開発した。フランスにてヒト化 CD26 抗体の治療抵抗性悪性中皮腫を中心とした First-in-Human 第 I 相臨床試験を施行し、免疫チェックポイント阻害薬のような特記すべき有害事象もなく、有効性を示唆するデータも得られたが(Br J Cancer. 2017)、どの患者が CD26 抗体療法の適用となるかが課題とされた。

フランスでの臨床試験患者血清を解析し、CD26/DPP4 値の変動解析が Stable Disease(SD)/Progressive Disease(PD)の予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された($p < 0.016$)。この予備結果の実証、及び新規治療効果予測バイオマーカーの確立を目指し、本邦で 2017 年から開始した悪性中皮腫の第 I/II 相臨床試験(第 I 相 9 例が 2018 年に終了し、第 II 相も 2019 年度内に全 31 例への抗体投与が終了)の検体を用いて、この 3 年間の研究目的として 1)病理組織での CD26 発現の定量・定性解析の確立と治療効果との相関解析、及び腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞の解析、2)CD26 抗体の治療効果・予後を予測しうる血清バイオマーカー、末梢血リンパ球バイオマーカーの確立に取り組む。さらに第 I/II 相臨床試験の治療効果と相関する新規バイオマーカーの絞り込みを行い、統計解析のもとバイオマーカーの同定を試みる。全症例で Partial Response(PR)または SD が 4 サイクル以上持続した CD26 抗体治療が特に有効だった検体に着目して解析を行う。3)フランスでの第 I 相臨床試験において血清中 CD26/DPP4 値変動が治療予測のバイオマーカーとして有用である可能性が得られたが、そのメカニズムを明らかにする。4)CD26 及び USP22 分子はともに癌幹細胞マーカーともいわれており悪性中皮腫における CD26 と USP22 を介した細胞周期の制御機構と、CD26 抗体処理による影響について解析を行い、USP22 が新たな治療ターゲットとなり得るか、あるいは予後予測のバイオマーカーとなり得るか検討する。5)国内臨床試験において、免疫チェックポイント阻害薬である PD-1 抗体抵抗例に対しても CD26 抗体が有効な症例が認められた。そこで、ヒト化 CD26 抗体と免疫チェックポイント阻害薬との併用効果を検討するために、ヒト免疫化マウスを用いて悪性中皮腫株 JMN 担癌モデルマウスを構築し、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果を検討する。

上記の研究目的を達成することで、安全かつ革新的な CD26 抗体の確立と抗体療法適用患者の適切な選択が可能になることを目指す。

【研究方法】

目的 1)：国内第 I 相(9 例)および第 II 相(31 例)の計 40 症例を用いて、中皮腫組織の CD26 発現評価を行う。R&D 社のポリクローナル抗体および研究代表者等が開発した単クローン抗体を用いて中皮腫の CD26 染色を施行する。さらに中皮腫組織に浸潤する免疫細胞を解析し、SD/PD との関係解析する。目的 2)：国内第 I/II 相臨床試験患者の抗体投与前後 (Day0,15,29) 並びに SD、PR となった患者ではその持続期間中の血清を用いて①可溶性 CD26 タンパク量②DPP4 酵素活性、ならびに CD26/DPP4 によって制御されうる各種③サイトカイン④ケモカインの経時変化を研究代表者等が開発した測定系および Bio-Plex システムを用いて解析する。

目的 3) : 国内第 I/II 相臨床試験患者の CD26 抗体投与前の末梢血中 CD4 および CD8T 細胞を用いて、末梢血 T 細胞のフェノタイプと CD26 抗体治療の有効性との関係を明らかにする。そのため①末梢血中の免疫細胞組成②T 細胞の CD26 およびケモカインレセプター発現③細胞傷害性エフェクターT 細胞および制御性 T 細胞の割合④主要な免疫チェックポイント分子の発現を解析する。

目的 4) : CD26 陽性/陰性の中皮腫細胞株及び正常細胞を用いて、*in vitro* でヒト化 CD26 抗体が培養上清中の可溶性 CD26/DPP4 産生に与える影響を解析する。

目的 5) : USP22 と CD26 分子との関係および USP22 が悪性中皮腫の新しい治療ターゲット・治療効果予測バイオマーカーとなり得るかを明らかにするために①CD26 陽性の中皮腫細胞株 MES01 及び JMN を用いた。ヒト化 CD26 抗体は Ys AC 社から入手。②中皮腫患者検体は慶應大学医学部規則により適切に処理し、USP22 及び CD26 分子の免疫組織染色を行った。③細胞は固定・膜透過し抗体と反応させた後 FACS Calibur(BD)で解析した。④中皮腫細胞に shRNA を遺伝子導入するにはレンチウイルスシステムを用いた。USP22 の全長 cDNA を導入するには pDON5 ベクターと Lipofectamine を用いた。⑤細胞懸濁液をヒト化 CD26 抗体と混ぜ Protein G で吸着させたものを洗浄し、通常の方法でウェスタンブロットを行った。定量に c-Digit Blot Scanner を用いた。⑥細胞増殖は MTT アッセイにて評価した。マウス移植実験は背部または経静脈的に中皮腫細胞株を注射し、経時的に生存を計測した。目的 6) : 免疫不全マウスの NOG マウスに低線量放射線を照射してヒト臍帯血 CD34+造血幹細胞を移入し、ヒト免疫化マウスを作製した。その後ヒト悪性中皮腫株 JMN 細胞を皮下移入し、ヒト化 CD26 抗体及びマウス抗ヒト PD-1 単クローン抗体を投与して併用効果を検討する。

【研究成果】

- 1) 臨床試験の悪性中皮腫病理組織を用いて CD26 発現評価を行い、半定量的解析法を確立した。また FFPE 検体で使用可能な新規モノクローナル抗体 U16-3, U38-8 を開発し、CD26 抗体療法におけるコンパニオン診断薬に有用であることを示した。国内第 I/II 相臨床試験において、悪性中皮腫の病理検体として、第 I 相は 9 例中 6 例、第 II 相は 31 例全例の計 37 症例が収集され、36 例は CD26 発現の評価が可能であった。R&D 社ポリクローナル抗体による免疫染色 (A 法) および新規開発されたコンパニオン診断キットによる免疫染色 (B 法) の二つの染色方法により CD26 発現について検討した。A 法での CD26 陽性率が 20%以上の症例は 36 例中 30 例、20%未満の症例が 6 例であった。B 法では 20%以上の症例は 36 例中 32 例、20%未満の症例が 4 例であった。また A 法よりも B 法で CD26 陽性率が上昇した症例は 36 例中 23 例であり、その中で陽性率が 20%以上上昇した症例が 11 例認められた。B 法では CD26 染色性の向上が正常ヒト組織で認められたため、新規コンパニオン診断キットによるこの免疫染色法が中皮腫における CD26 発現をより正確に評価するのに適していると考えられた。中皮腫腫瘍部分へのリンパ球並びに CD26 陽性単核細胞 (リンパ球と単球等) 浸潤について治療効果との比較を試みた。その結果、long SD 5 症例中では腫瘍浸潤リンパ球 3+が 4 症例、+1 が 1 症例であり、治療効果が長い症例では CD26+単核細胞浸潤が多い傾向があった。一方、PD 16 症例では、腫瘍浸潤リンパ球が 3+は 3 症例、+2 は 5 症例、+1 は 8 症例であり、CD26+単核細胞浸潤が少ない傾向が窺われた。これらの結果は、中皮腫においてリンパ球浸潤および CD26 陽性単核細胞の半定量評価が治療効果予測のバイオマーカーとなる可能性を示唆する。
- 2) 国内第 I/II 相臨床試験患者と健常者の血清中サイトカイン・ケモカインの多項目解析を行い、ヒト化 CD26 抗体の有効性予測バイオマーカー候補として SDF-1 α β , MIP-1d, MCP1 を見出した。また、Gro-b, CTACK, MCP2 も有効性の予測に役立つ可能性が考えられる。血清中の可溶性 CD26 濃度/DPP4 酵素活性の変動解析については、CD26 抗体の投与量と投与頻度によって血清検体採取のタイミングを再度検討する必要があることが示された。
- 3) 国内第 I/II 相臨床試験患者の末梢血リンパ球のフェノタイプ解析を行い、悪性中皮腫患者では CXCR3 の発現が低下している傾向が見られ、CD26 抗体有効例では特に CD8 T 細胞で細胞傷害性エフェクターT 細胞(CD26 陰性・CD28 陰性・KLRG1 陽性サブセット)の割合が高く、免疫チェックポイント分子の中で PD1 と TIGIT の発現陽性率が高い可能性を見出した。
- 4) フランスでのヒト化 CD26 抗体 YS110 の第 I 相臨床試験において、YS110 投与に伴う血清中 CD26/DPP4(sCD26/DPP4) titer の変動が、YS110 投与の予後・治療効果を予測するバイオマーカーとして有用である可能性が得られた。そのメカニズムを明らかにするために、CD26 陽性/陰性の腫瘍及び正常細胞を用いて、*in vitro* での検証を行った。細胞膜上の CD26 の発現が高い細胞であれば腫瘍・正常細胞ともに培養上清中に sCD26 を産生し、YS110 の容量依存的、及び経時的に

sCD26 の産生が阻害されることを明らかにした。

- 5) USP22 の発現抑制は中皮腫細胞の増殖を抑制した。ヒト化 CD26 抗体処理は細胞膜上の CD26 を細胞内に移行させ、UPS22 と物理的に接触させ、CDKI p21 の発現上昇を誘導することで腫瘍増殖を抑制した。ヒト化 CD26 抗体処理により USP22 の発現が低下することを見出し、中皮腫のみならず様々な CD26 陽性がんに対して増殖抑制に働きうることが示唆された。また、悪性中皮腫での USP22 の発現評価はヒト化 CD26 抗体の治療効果予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。
- 6) 治療抵抗性の悪性中皮腫患者に対して、CD26 抗体単剤でも高い割合で SD・PR となり抗腫瘍効果は認められたが、より長期間抗腫瘍効果を発揮し、無増悪生存期間を与えられる本抗体を用いた新たな併用療法の開発も重要な課題である。そこで、ヒト免疫化マウスを用いたヒト悪性中皮腫細胞株担癌モデルを確立し、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果を検討した結果、それぞれの単剤よりも強い相乗効果が認められる予備実験データを得た。

【結論】

- 1) 臨床試験の悪性中皮腫病理組織を用いて CD26 発現評価を行い、半定量的解析法を確立した。また FFPE 検体で使用可能な新規モノクローナル抗体 U16-3, U38-8 を開発し、CD26 抗体療法におけるコンパニオン診断薬に有用であることを示した。中皮腫における腫瘍浸潤リンパ球および腫瘍浸潤 CD26+単核細胞が本抗体療法の新たなバイオマーカーとなる可能性が示された。
- 2) 国内第 I/II 相臨床試験の最終集計結果をもとに、これまでの血清データの再解析を行い、ヒト化 CD26 抗体の予後・治療効果予測バイオマーカー候補として、SDF-1・MIP-1d・MCP1 を見出し、また補足マーカーとして Gro-b・CTACK・MCP2 を見出した。
- 3) 国内 I/II 相臨床試験患者の末梢血リンパ球のフェノタイプ解析により、CD26 抗体有効例では特に CD8T 細胞で細胞傷害性エフェクターT 細胞(CD26 陰性・CD28 陰性・KLRG1 陽性サブセット)の割合が高く、免疫チェックポイント分子の中で PD1 と TIGIT の発現陽性率が高い可能性を見出した。
- 4) フランスでの第 I 相臨床試験において YS110 投与に伴う血清中可溶性 CD26/DPP4(sCD26/DPP4) titer の変動を解析した結果、CD26 抗体の予後・治療効果を予測するバイオマーカーとして有用である可能性が得られた。さらに CD26 の発現が高い細胞であれば腫瘍・正常細胞ともに培養上清中に sCD26 を産生し、YS110 の容量依存的に sCD26 の産生が阻害されることを明らかにした。
- 5) USP22 分子も悪性中皮腫の新たな治療標的になりうることを見出し、またヒト化 CD26 抗体の治療効果予測バイオマーカーにもなりうることを示唆された。
- 6) ヒト免疫化マウスにヒト悪性中皮腫細胞株を皮下移入する担癌モデルにおいて、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果を検討した結果、それぞれの単剤よりも強い腫瘍増殖抑制効果が見られることが示唆された。

【今後の展望】

本研究課題の遂行により、国内第 I/II 相臨床試験は合計 40 症例で症例数の制約がある中、ヒト化 CD26 抗体の有効性を予測し得るいくつかの興味深いバイオマーカー候補を見出した。今後、CD26 抗体の臨床応用を目指すうえでこれらのバイオマーカー候補が有効性予測に役立つことを期待する。

国内第 I/II 相臨床試験において、免疫チェックポイント阻害薬抵抗性患者に対してもヒト化 CD26 抗体は有効である結果が得られたが、単剤のみよりもより長期間抗腫瘍効果を発揮し、無増悪生存期間を与えられる本抗体を用いた PD-1 抗体との併用など新たな併用療法の開発も重要な課題である。