

# 研究結果の概要

(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) : 悪性胸膜中皮腫に対するヒト化抗 CD26 抗体と免疫チェックポイント阻害薬との革新的併用療法の開発 (210901-02)

研究実施期間 : 令和3年4月1日から令和4年3月31日まで

## 【研究目的】

悪性中皮腫は主にアスベスト暴露により発症する難治性がんであり、予後は極めて不良で労災疾病行政上も大きな問題となっている。

研究代表者は30年に渡りCD26研究を続け、特にCD26のヒト免疫及びがんにおける機能、臨床応用の研究で世界をリードしている。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の発現、抗体の抗腫瘍作用機構を明らかにしてきた。フランスおよび本邦で臨床試験を実施した結果、CD26抗体は免疫チェックポイント阻害薬(ICI)で報告されているような自己免疫疾患様の有害事象はなく、安全性が証明されている。特記すべきは、CD26抗体がICI抵抗性の悪性中皮腫患者にも有効である可能性が示唆されたことである。近年、CTLA-4抗体、PD-1抗体などのICIの登場は、特に悪性黒色腫や肺癌などの領域で治療に変革をもたらした。しかしながら、CD26抗体の国内臨床試験でも全40例中PD-1抗体Nivolumab無効例が13例含まれており、ICI単剤での治療ではまだ十分とは言えず、ICIの治療抵抗性患者の治療をいかに向上させるかも今後、克服すべき課題といえる。CTLA-4抗体とPD-1抗体との併用療法も臨床試験が行われているが、単剤よりも無増悪生存期間(PFS)は向上するものの副作用出現率も上昇するため、更なる治療手段の改善が必要である。

以上から、CD26抗体単剤でも有効性を示す結果は得られているが、多くの悪性中皮腫患者に、より長期間抗腫瘍効果を発揮できる、有効かつ安全な新規治療法の確立を最終的な目標とし、CD26抗体とICIとの併用療法の開発を行う。

## 【研究方法】

### 1) ヒト免疫化マウスを用いた担癌モデル

NOGマウスに低線量(100cGy)で放射線照射しヒト臍帯血CD34陽性造血幹細胞 $1 \times 10^5$  cellsを尾静脈内から移入した。移入後5週、9週、13週、17週後にマウス尾静脈から経時的に採血を行い、ヒト免疫細胞の生着を確認した。悪性中皮腫株JMNおよびH226を皮下移入して5週間経過し、小さな腫瘍形成を確認した時点から、control human IgG1 (Bio X Cell)、ヒト化CD26抗体(Y's AC Co., Ltd)単独、mouse anti-human PD-1 mAb (Bio X Cell; clone J116)単独、ヒト化CD26抗体とPD-1抗体の併用をそれぞれ200  $\mu$ g/doseで週3回投与を続けた。腫瘍サイズは週に2回採寸し、JMNまたはH226移入9週間後にマウスを解剖し、皮下の腫瘍を回収して重量を測定した。腫瘍の一部はホルマリン固定して病理解析に用い、残りは腫瘍内浸潤リンパ球の解析に用いた。

### 2) フローサイトメトリー

マウス体内のヒト免疫細胞の生着を確認するために、マウスの尾静脈から採血して得た末梢血を蛍光色素標識抗体で染色した後測定を行い、得られたデータをFlowJo (BD Biosciences)で解析した。

### 3) 国内第I/II相臨床試験プロトコル

第I相臨床試験はヒト化CD26抗体を2mg/kg, 4mg/kg, 6mg/kgでそれぞれ3例ずつ、初回投与日をday1としてday1, 8, 15, 22, 29まで週1回の間隔で5回静脈内投与を行い、投与開始6週間後(day42)の時点で医師による抗腫瘍効果の判定が行われ、PRまたはSDと判定された患者は、上記の抗体5回投与、6週間後に抗腫瘍効果判定を1サイクルとしてPDになるまでサイクルを継続した。

第II相臨床試験は全31例にCD26抗体を6mg/kgで週1回5回静脈内投与を行い、上記と同様に抗体5回投与、6週間後に抗腫瘍効果判定を1サイクルとしてPDになるまでサイクルを継続した。

### 4) Bio-Plex マルチプレックスアッセイ

成人健常者および国内第I/II相臨床試験患者のCD26抗体初回投与前(day1pre)・3回目投与前(day15pre)・5回目投与前(day29pre)の血清の提供を受け、血清中サイトカイン・ケモカイン濃度を

Bio-Plex マルチプレックスシステムにより測定した。得られたデータを Bio-Plex Manager (Bio-Rad) で解析した。

#### 5) 腫瘍病理組織

国内第 I/II 相臨床試験の中で腫瘍病理組織のバイオマーカー探索に同意が得られた検体で作製されたパラフィンブロックの組織切片的の提供を受け、マイクロダイセクションにより腫瘍部分の切り出しを行った。

#### 6) DNA マイクロアレイ解析

ホルマリン固定・パラフィン包埋された悪性中皮腫組織からマイクロダイセクションで切り出した腫瘍部位を溶解し、miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN)を用いて Total RNA 抽出を行った。最も RNA 量が少なかったサンプルに合わせて cDNA の合成と増幅を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。

### 【研究成果】

#### 1) ヒト免疫化マウスの作製

ヒト化 CD26 抗体はマウス CD26 には結合しないため、重度の免疫不全マウスである NOG マウスに低線量の放射線を照射し、ヒトの造血幹細胞を移植する必要がある。ヒト臍帯血造血幹細胞分画の解凍と洗浄条件を検討し、高い確率でヒト T 細胞が発生する方法を確立した。

#### 2) ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果の検討

JMN および H226 をヒト免疫化マウスの側腹部に皮下移入して 5 週間経過し、小さな腫瘍形成を確認した時点から、control human IgG1, ヒト化 CD26 抗体単独, mouse anti-human PD-1 mAb (以下、PD-1 抗体)単独, ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体の併用をそれぞれ 200µg/dose で週 3 回投与を続けた。腫瘍サイズを週に 2 回採寸した結果、JMN と H226 の両方ともで、control 抗体投与群と比較して、CD26 抗体単独、PD-1 抗体単独それぞれで腫瘍増殖の抑制が見られ、両抗体投与群ではさらに腫瘍サイズが小さいことが示された。

#### 3) ヒト化 CD26 抗体の新たな抗腫瘍作用メカニズムの可能性

CD26 抗体には多様な抗腫瘍作用メカニズムが考えられ、CD26 を発現するがん細胞の細胞膜上の CD26 に抗体が結合することによる、直接的な増殖抑制作用や、細胞表面上や血液中の CD26 量を減らすことにより DPP4 酵素活性を低下させ、その結果、腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞数を増加させる作用が考えられる。CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の血清検体を用いて、多種類の血清中サイトカイン・ケモカインの濃度変化を解析した結果、CD26 抗体投与によって絶対量が増加するもの、減少するものがあることが示された。このことから、CD26 抗体は DPP4 酵素活性を低下させることで、酵素によるケモカインの切断とそれにとまなう活性低下を妨げるだけでなく、ケモカイン産生量自体にも影響を与え、腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞を変化させることが予想された。

#### 4) 国内第 I/II 相臨床試験患者の腫瘍病理組織の遺伝子発現解析

CD26 抗体の国内臨床試験で腫瘍病理組織のバイオマーカー解析に同意が得られた検体で DNA マイクロアレイ解析を行った。性別・組織型・Nivolumab 投与の有無が同じ条件の症例中、無増悪生存期間 PFS が長い 3 例と PD 4 例から腫瘍部位をマイクロダイセクションで切り出し、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、SD 症例 3 例に共通して高発現しており PD 症例 4 例ではほとんど発現していない遺伝子 X を見出した。また、SD 症例 3 例に共通してほとんど発現しておらず PD 症例では発現が見られる遺伝子 Y と Z の絞り込みを行った。今後、X, Y, Z に関して腫瘍病理組織の免疫染色を行い、PFS の期間が長く CD26 抗体療法が特に有効な症例と有効ではない PD 症例との判別に有用かどうか検討する。

### 【結論】

ヒト T 細胞と B 細胞が生着したヒト免疫化マウスの作製に成功し、ヒト悪性中皮腫細胞株 JMN と H226 を皮下移入する担がんモデルにおいて、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果を検討し、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された。また、CD26 抗体の新たな作用として、Th1 細胞遊走ケモカインの産生を顕著に増加させることを見出した。

ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の悪性中皮腫組織から腫瘍部位を切り出し、得られた微量の Total RNA を用いて SD 症例 3 例と PD 症例 4 例の DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、SD 症例で共通して発現が高い遺伝子 X と共通して発現が低い遺伝子 Y, Z を見出した。

### 【今後の展望】

CD26 抗体と PD1 抗体との抗腫瘍作用メカニズムの違いについてより詳細に解析し、併用効果の有効性を実証する。また、悪性中皮腫細胞株を皮下移入するモデルの他に、より患者のがん細胞の特性を維持していると考えられる悪性中皮腫の患者腫瘍移植(PDX; Patient-derived xenograft)モデルにおいても併用効果の有効性を検討する。

国内第 I/II 相臨床試験患者の腫瘍病理組織、ならびに PD-1 抗体治療の有効例・無効例の悪性中皮腫病理組織を用いて、今回の DNA マイクロアレイ解析により得られた候補分子の免疫染色を行い、これらの分子がヒト化 CD26 抗体の有効性を予測できるバイオマーカーになり得るか、PD-1 抗体の有効性・無効例の中で CD26 抗体治療が期待できる割合を明らかにする。