

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4年4月1日から令和5年3月31日まで

【研究目的】

悪性中皮腫は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 CD26 の抗体開発、cDNA の単離を世界に先駆けて行い (Immunol Rev 1998)、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 抗体を開発し、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。臨床試験では CD26 抗体では**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**。さらに CD26 抗体が **ICI 抵抗性患者にも有効である可能性が示唆**された。併用療法では単剤よりも 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。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。ヒト化 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の作製

NOG マウスに低線量(100cGy)で放射線照射し、翌日ヒト臍帯血を尾静脈内から移入した。ヒト造血幹細胞を移入して 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。ヒト造血幹細胞を移植して 13 週後のヒト T 細胞が生着したマウスに、悪性中皮腫株 JMN または H226 を側腹部に皮下移入した。その後、小さな腫瘍形成を確認した時点から、ヒト化 CD26 抗体単独, mouse anti-human PD-1 mAb 単独, ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体の併用をそれぞれ週 3 回投与した。腫瘍サイズは週に 2 回採寸し、JMN または H226 を移入して 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。腫瘍の一部は病理解析のために 10%ホルマリンで固定し、残りは酵素処理を行い、DNase I (Roche)存在下で組織を破碎して腫瘍組織中の細胞を得た。

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、溶血と固定処理を行い、洗浄した後、BD LSRFortessa で測定を行い、得られたデータを FlowJo (BD Biosciences)で解析した。

3) マウス血清中の可溶性ヒト CD26 値とマウス CD26 値、及びその DPP4 酵素活性値の測定

ヒト免疫化マウスに JMN または H226 を皮下移入して 5 週間後から抗体投与を開始し、9 週間後にマウスを解剖する際、採血して血清を保存した。マウス血清中の可溶性ヒト CD26 値の測定は、sandwich ELISA により行った。可溶性マウス CD26 値の測定は、Mouse DPPIV/CD26 DuoSet ELISA (R&D Systems)を用いて行った。マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で吸光値を測定し、得られたデータを Microplate Manager 6 (Bio-Rad)で解析した。

4) 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。

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の提供を受けた。

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 Total RNA 抽出を行った後 cDNA の合成と増幅を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。

7) 免疫組織染色

悪性中皮腫病理組織スライドをオートクレーブで賦活化後遺伝子 X と Y に対する一次抗体で反応させ、洗浄後に二次抗体と反応させ、洗浄した後、ジアミノベンチジンにて発色させた。染色標本は 2 名の病理医が個別に観察し、++、+、+/-、- の四段階で評価を行った。

【研究成果】

1) ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果の検討

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、ヒト悪性中皮腫細胞株 H226(上皮型)および JMN(肉腫型)をマウスの側腹部に皮下移入した。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、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、併用投与群ではさらに腫瘍サイズが小さいことが示された。JMN と比較して H226 の方が併用投与の効果が顕著であった。病理学的にも CD26 抗体と PD-1 抗体を併用投与した群では、Ki-67 陽性のがん細胞の数が顕著に少ないことが示された。

2) 腫瘍浸潤リンパ球の解析

皮下の腫瘍を回収して一部は病理学的解析とフローサイトメトリーによる腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の割合の解析を行い、残りは TIL の精製に用いてフェノタイプの解析、mRNA 発現解析を行った。CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群ではヒト T 細胞およびがん細胞膜上の CD26 の発現が顕著に低下していることが示された。このことは、CD26 抗体が結合することで細胞膜上から細胞内への CD26 分子の移行が起こっていると予想される。また、脾臓の T 細胞だけでなく、腫瘍内の T 細胞でも同様の変化が見られたことから、マウスに投与した CD26 抗体は腫瘍周囲に浸潤する T 細胞にも結合していると考えられる。同様に、細胞膜上の PD-1 の発現も解析した結果、ヒト T 細胞の細胞膜上の PD-1 の発現も顕著に低下していることが示された。

肉腫型の JMN では、CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与により、腫瘍内に浸潤したヒト CD8 T 細胞数が control IgG 投与群と比べて有意に増加した。一方で、JMN よりも強い抗腫瘍効果が認められた上皮型の H226 では、CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与により、腫瘍内のヒト CD8 T 細胞数が control IgG 投与群と比べて有意に増加するとともにヒト CD4 T 細胞数もいずれの群と比べても有意に増加していた。このことから、CD8 T 細胞だけでなく CD4 T 細胞の浸潤を促進することも、腫瘍免疫を亢進するうえで重要であることが示唆された。

3) 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

バイオマーカー解析に同意が得られた臨床試験患者 23 例中「男性・上皮型・Nivolumab 投与無し」の条件で無増悪生存期間 PFS が長い SD 3 例と PD 4 例から腫瘍部位を切り出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。PD 群と比較して SD 群で高発現している遺伝子群と SD 群と比較して PD 群で高発現している遺伝子群をヒートマップにまとめ、SD 症例では抗線維化、炎症亢進、増殖・代謝亢進に関わる遺伝子の発現が高く、SD 症例 3 例に共通して PD 症例よりも顕著に発現が高い遺伝子 X を見出した。また、PD 症例では骨格筋や横紋筋、筋収縮、筋線維芽細胞に関係する遺伝子の発現が高く、PD 症例 4 例に共通して SD 症例よりも顕著に発現が高い遺伝子 Y を見出した。CD26 抗体有効例と PD 症例とを判別できるバイオマーカー候補分子として特に X と Y に着目し、悪性中皮腫組織の免疫染色に最適な抗体、及び、染色条件の検討を行い、最適条件を決定した。

【結論】

ヒト悪性中皮腫細胞株 H226 と JMN 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された。腫瘍浸潤リンパ球の解析を行った結果、CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与を行った群の中でも特に強い抗腫瘍効果が認められた個体では、ヒト CD8 T 細胞とともに CD4 T 細胞の浸潤も顕著であった。CD26 抗体は CD26 陽性がん細胞に直接作用するとともに、ヒト T 細胞とがん細胞膜上の CD26 発現・可溶性 CD26 量を低下させることで DPP4 酵素活性低下にも働くことを示した。

ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の 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、mRNA レベルにおいて SD 症例で共通して発現が顕著に高い遺伝子 X と PD 症例で共通して発現が顕著に高い遺伝子 Y を見出し、免疫染色で悪性中皮腫組織におけるそれ

らの発現評価を行える最適染色条件を決定した。

【今後の展望】

悪性中皮腫細胞株を皮下移入する今回のモデルと並行して、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。

CD26 抗体療法が有効な患者を選択できるバイオマーカーを同定できれば、PD-1 抗体が有効であった悪性中皮腫患者、無効であった悪性中皮腫患者それぞれで、有効性予測バイオマーカーの陽性率を解析することで、CD26 抗体と PD-1 抗体との併用療法が期待できる患者、PD-1 抗体が無効でも CD26 抗体による治療が期待できる患者の割合を予測することへの応用も期待される。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発現評価を腫瘍組織で行える方法を次年度には確立したい。