

厚生労働科学研究費補助金
労災疾病臨床研究事業

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

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森本 幾夫

令和6(2024)年3月

目 次

I. 総括研究報告

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
..... 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 特任教授

II. 分担研究報告

1. ヒト免疫化マウスモデルにおけるヒト化 CD26 抗体と抗 PD-1 抗体との併用療法の
抗腫瘍作用メカニズムの解析
..... 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 特任教授

研究分担者 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 特任准教授

研究分担者 岸本 卓巳
独立行政法人労働者健康安全機構
アスベスト疾患研究・研修センター 所長

研究分担者 山田 健人
埼玉医科大学医学部 病理学 教授

研究協力者 伊藤 匠
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 特任助教

研究協力者 金子 有太郎
ワイズ・エー・シー株式会社 代表取締役 CEO
近畿大学 客員教授 (元)

2. ヒト化 CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーの探索：
国内第 I/II 相臨床試験検体を用いたこれまでの検討の総括
..... 25

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 特任教授

研究分担者 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 特任准教授

研究分担者 山田 健人
埼玉医科大学医学部 病理学 教授

研究分担者 岸本 卓巳
独立行政法人労働者健康安全機構
アスベスト疾患研究・研修センター 所長

研究協力者 伊藤 匠
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 特任助教

研究協力者 藤本 伸一
岡山労災病院 腫瘍内科部長

研究協力者 青江 啓介
山口宇部医療センター 腫瘍内科 内科系診療部長

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・33

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

労災疾病臨床研究事業費補助金
総括研究報告書

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

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 特任教授

研究要旨

悪性胸膜中皮腫は主にアスベストばく露によって起こる難治性悪性腫瘍であり、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ている。われわれはヒト化 CD26 抗体 YS110 を開発し、国内でも悪性胸膜中皮腫を対象に第 I/II 相臨床試験を実施した。第 II 相臨床試験の最終患者への投与は既に終了し、結果の集計が完了したところだが、安全性が確認され、フランスでの第 I 相臨床試験と同等の有効性を示唆する結果が得られている。

治療抵抗性の悪性中皮腫患者に対して、CD26 抗体単剤投与でも高い割合で Stable Disease (SD)・Partial Response となり抗腫瘍効果が認められたが、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、ヒト免疫化マウスに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を確立し、YS110 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的な腫瘍増殖抑制効果が認められるデータが得られ、非臨床 POC データを取得した。このモデルにおいて、CD26 抗体投与によりヒト T 細胞の腫瘍内浸潤が促進されるメカニズムの詳細を明らかにしたが、CD26 抗体はさらに T 細胞の活性化亢進にも働くとも考えられた。

また、ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いてバイオマーカー探索研究を実施した結果、(1)腫瘍病理組織の解析からは SD 症例で共通して高発現している遺伝子 X を、Progressive Disease (PD)症例で共通して高発現している遺伝子 Y を見出した。また、(2)血清の解析からは CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量・DPP4 酵素活性の測定が CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーになり得ること、サイトカイン・ケモカインの中では SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 などが有効性を予測できる候補分子となることを見出した。

研究分担者

岸本 卓巳：独立行政法人労働者健康安全
機構 アスベスト疾患研究・
研修センター 所長

山田 健人：埼玉医科大学医学部 病理学
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
特任准教授

研究協力者

藤本 伸一：岡山労災病院 腫瘍内科部長

青江 啓介：山口宇部医療センター 腫瘍
内科 内科系診療部長

伊藤 匠：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
特任助教

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
非常勤講師

金子 有太郎：ワイズ・エー・シー株式会
社 代表取締役 CEO
近畿大学 客員教授(元)

A. 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 CD26 の抗体開発、cDNA の単離を世界に先駆けて行い(Immunol Rev 1998)、30 年以上に渡り 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(Clin Cancer Res 2007, PLoS One 2013, Nat Immunol 2015)。フランスにて治療抵抗性の悪性中皮腫を中心とした計 33

例に First-in-Human 第 I 相臨床試験を実施し、**安全性が確認され、有効性を示唆するデータも得られた**(Br J Cancer 2017)。本邦でも治療抵抗性の悪性中皮腫を対象に第 I 相臨床試験を開始し(第 1~3 コホート)、全 9 例への投与が終了した(Lung Cancer 2019)。本結果から抗体推奨用量を 6mg/kg として開始した第 II 相臨床試験も全 31 例への投与が終了した。国内の臨床試験でもフランスでの臨床試験と同等の有効性を示す結果が得られている(論文投稿中)。重要なことに、CD26 抗体ではフランスでの第 I 相臨床試験 33 例、国内での第 I/II 相臨床試験 40 例中、**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、国内臨床試験 40 例中、PD-1 抗体(Nivolumab (Nivo))無効例が 13 例含まれており、うち評価可能 11 例中 Partial Response (PR)が 1 例・Stable Disease (SD)が 7 例・Progressive Disease (PD)が 3 例で、72.7% (8/11)が PR・SD であり、**ICI 抵抗性患者にも CD26 抗体が有効である可能性が示唆**された。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。治療抵抗性の悪性中皮腫 34 例に対する本邦での Nivo の第 II 相臨床試験では無増悪生存期間(PFS)が 6.1 ヶ月と突出して良好な結果が得られているが(Clin Cancer Res 2019)、欧米での治療抵抗性悪性中皮腫に対する臨床試験では、PD-1 抗体は Nivo, Pembrolizumab とともに単剤では PFS 2.6-4.5 ヶ月ほどで、Nivo と CTLA-4 抗体の併用でも悪性中皮腫 38 例で PFS は 6.2 ヶ月である(Front Oncol 2020)。このように一般的に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。ヒト化 CD26 抗体の国内臨床試験でも全 40 例中 Nivo 抵抗性再発例が 13 例含まれていたことから、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。

以上から、**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。

(1)ヒト免疫化マウスを作製し、このマウスを用いたヒト悪性中皮腫細胞株担癌モデルにおいてヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果およびその抗腫瘍作用メカニズムを検討する。

(2)CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)中皮腫組織、(2)血清、(3)末梢リンパ球を用いた解析を実施し、CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーの探索を行う。

B. 研究方法

各分担研究報告書に著述

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞および成人健常者の末梢血を用いた研究については、森本が講座責任者である順天堂大学大学院医学研究科で本研究を行うための研究計画書等を倫理審査委員会へ提出し、承認を得ている(順大医倫第 2018127 号, 第 2020280 号, 2020291 号)。またヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験の患者検体を用いたバイオマーカー探索研究については、臨床試験審査委員会、各治験実施施設内の治験審査委員会にて、試験の実施と合わせてバイオマーカー探索用採血・腫瘍組織検体の提供について協議され、実施承認を取得済みである。研究対象者に対する人的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、利益等の説明を行い、書面でのインフォームド・コンセントを得ている。

動物実験の実施はいわゆる 3R に基づいて行い、順天堂大学医学部実験動物委員会に

実験計画書を提出し審議の上、承認されている(承認番号: 2023031)。

C. 研究結果

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、ヒトの造血幹細胞を尾静脈より移植した。

中皮腫株 H226 (上皮型)および JMN (肉腫型)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(以下、CD26 抗体)単独, mouse anti-human PD-1 mAb (以下、PD-1 抗体)単独, CD26 抗体と PD-1 抗体の併用をそれぞれ 200μg/dose で週 2 回投与を続けた。その結果、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たが、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、5 匹中 3 匹は腫瘍サイズが縮小した。

2) 腫瘍浸潤リンパ球の解析

H226 及び JMN をヒト免疫化マウスに皮下移入して 9 週間後にマウス皮下の腫瘍を回収して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。

まず腫瘍内に浸潤したヒト CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の細胞数と割合の解析を行った。JMN 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 細胞の割合が control IgG 投与群と比べて有意に増加した ($p=0.019$)。一方で、JMN よりも強い抗腫瘍効果が認められた 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 細胞の割合が control IgG 投与群と比べて有意に増加するとともに ($p=0.040$)、ヒト CD4 T 細胞の割合もいずれの群と比べても有意に増加していた。特に、併用投与によって腫瘍サイズが縮小した個体では、ヒト CD4 T 細胞の浸潤が顕著に増加していたことから、少なくともこのモデルでは CD8 T 細胞だけでなく CD4 T 細胞の浸潤も促進することが、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。

次に、腫瘍内に浸潤したヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞のエフェクター機能を中心としたフェノタイプ解析を行った。まず代表的な細胞傷害性因子である Granzyme B の細胞内発現をフローサイトメトリーで解析した結果、ヒト CD8 T 細胞では陽性細胞が検出され、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 Granzyme B 陽性細胞の割合が増加し、併用投与群ではさらに増加することが示されたが、ヒト CD4 T 細胞ではいずれの群でもほとんど発現が認められなかった。次に、腫瘍から精製したヒト T 細胞にタンパク質分泌阻害剤の monensin (GolgiStop) 存在化で PMA と ionomycin の刺激を加えて細胞内サイトカイン(ヒト IFN- γ および TNF- α)発現をフローサイトメトリーで解析した。IFN- γ と TNF- α はヒト CD4 およびヒト CD8 T 細胞の両方で陽性細胞が検出され、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 CD4 および CD8 T 細

胞両方の IFN- γ と TNF- α 陽性細胞の割合が増加し、併用投与群ではさらに増加することが示された。これらの結果から、CD26 抗体は腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するとともに、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体単独でもヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の活性化が亢進され、PD-1 抗体と併用投与することでより強く活性化が誘導されることが示唆された。

3) CD26 抗体が腫瘍内へのリンパ球浸潤を促進するメカニズムの解析

CD26 抗体投与によって腫瘍内へのヒト T 細胞の浸潤が促進するメカニズムとして、まず CD26 分子に含まれる DPP4 酵素活性への影響が考えられる。生体内では様々なタンパク質・ペプチドが DPP4 酵素の基質となり、免疫細胞の遊走に重要な役割を持つケモカインも含まれ、その多くが DPP4 による切断を受けると活性が低下することが報告されている(J Leukoc Biol 2016)。さらに、DPP4 と結合親和性が高いケモカインの上位 5 種はいずれも T 細胞遊走ケモカインである(J Leukoc Biol 2016)。マウスに同種同系のマウスがん細胞株を移入し、そこに DPP4 酵素阻害薬である sitagliptin を混餌投与すると、DPP4 によるケモカインの切断が阻害され、活性が維持されることで腫瘍内への免疫細胞浸潤が増加することが示されている(Nat Immunol 2015, 2019)。また、研究代表者らがフランスで実施した CD26 抗体の第 I 相臨床試験において、SD 症例では PD 症例と比較して、CD26 抗体投与後の血清中 DPP4 酵素活性が低いことを見出した(Biomark Res 2021)。以上より、CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムの一つに DPP4 酵

素活性の低下と、引き続いての腫瘍内への免疫細胞浸潤の増加が考えられた。

そこで、ヒト免疫化マウスのシステムにおける CD26 抗体の DPP4 酵素活性への影響を解析した。まず腫瘍内および脾臓のヒト CD4 および CD8 T 細胞膜上の CD26 発現の解析を行った結果、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群では、脾臓および腫瘍内のヒト CD4・CD8 T 細胞のいずれも細胞膜上の CD26 の発現が顕著に低下していることが示された。フローサイトメトリーにはマウスに投与しているヒト化 CD26 抗体とはエピトープが異なる抗体を使用しているため、ヒト化 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ことが予想される。JMN および H226 を皮下移入して形成した腫瘍の細胞膜上の CD26 発現に関しても、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群で細胞膜上の CD26 の発現低下が示された。さらに、マウス血清中のヒト可溶性 CD26 量を測定した結果、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群で control 抗体投与群の約 70% 近く可溶性 CD26 量が低下することを示した。以上のことから、このヒト免疫化マウスモデルでも CD26 抗体投与によって、ヒト T 細胞やヒトがん細胞の細胞膜上の CD26 分子と血清中のヒト可溶性 CD26 の量が大幅に減少し、DPP4 酵素活性の低下が起こっていると考えられる。

次に、Bio-Plex システムによりヒト免疫化マウス血清中のサイトカイン・ケモカイン 40 種類の多項目解析を行った。このモデルにおいて、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

Th1 遊走ケモカインである CXCL9/MIG と CXCL10/IP-10、Th2 遊走ケモカインである CCL17/TARC と CCL22/MDC の血清中濃度が増加することを明らかにした。以上より、CD26 抗体投与によって腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するメカニズムとして、細胞膜上や血液中の CD26 分子数が減少することで DPP4 酵素活性の低下し、DPP4 によるケモカインの切断と活性低下が起こりにくくなることに加え、このモデルでは CD26 抗体投与によって CXCL9, CXCL10, CCL17, CCL22 の血中濃度も増加することが関係していると考えられる。

4) CD26 抗体が腫瘍浸潤 T 細胞の活性化を亢進するメカニズムの解析

上述のように、CD26 抗体は腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するとともに、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体単独でもヒト CD4・CD8 T 細胞の活性化が亢進され、PD-1 抗体と併用投与することでより強く活性化が誘導されることが示された。CD26 抗体投与によって、何故ヒト CD4 および CD8 T 細胞の活性化が亢進されるのかについては現在もメカニズム解明に取り組んでいるところである。

研究代表者らはこれまで CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムとして、CD26 を細胞膜上に発現するがん細胞に抗体が結合することで増殖を直接的に抑制する作用に着目してきたが、DPP4 酵素活性を低下させることがケモカインの活性維持に繋がり免疫細胞の腫瘍内浸潤を促進することに加え、CD26 抗体によって T 細胞遊走ケモカイン産生自体も増加すること、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体によっても T 細胞の活性化が亢

進することを見出した。

5) 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

本パートの目的は、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探索することである。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のは、第 I/II 相全 40 例中 23 例で、23 例中、性別・組織型・Nivolumab 投与の有無が同じ条件で、SD 症例と PD 症例を 3 例以上取れるのは、「男性・上皮型・Nivolumab 投与無し」(SD 6 例/PD 4 例)のみであり、そ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、Total RNA 抽出、DNA マイクロアレイ解析を行った。

SD 群 3 例と PD 群 4 例との間で遺伝子発現の群比較を行い、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た。

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 症例では腫瘍部位を切り出して遺伝子発現解析を行ったが、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。

長期間 PFS が持続する 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、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)中皮腫組織で簡便に発現評価ができる方法として免

疫染色の検討を行った。複数の市販の免疫組織染色用抗体、染色条件(抗体濃度や抗原賦活化条件)の検討を行ったが、DNA マイクロアレイの結果と一致して PFS が長い症例では X の発現が顕著に高く、PD 症例では Y の発現が高い結果にはならなかった。

そこで、DNA マイクロアレイ解析と同様に mRNA レベルで発現量を評価する手法として、in situ hybridization を検討した。しかしながら、医療施設によって腫瘍組織の固定の仕方が異なり、mRNA の分解が進んでいる FFPE 標本ではポジティブコントロールである β -actin ですら陰性となるものも多く、FFPE 中皮腫組織の mRNA 発現量を in situ hybridization で評価することは難しいと考えられ、今後さらなる発現評価方法の検討が必要と考えられる。

6) 国内第 I/II 相臨床試験患者の血清検体の経時的解析

次に、血清検体を用いた解析結果について記載する。CD26 抗体の国内臨床試験で血清のバイオマーカー解析に同意が得られたのは、第 I/II 相全 40 例中 29 例(うち抗腫瘍効果評価可能は 25 例)であった。フランスでの第 I 相臨床試験の血清検体を解析した結果、国内第 I/II 相試験の血清検体においても、同様に SD 症例では PD 症例よりも CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量と DPP4 酵素活性値が低いことが示された。

次に、Bio-Plex システムによりサイトカイン・ケモカイン 49 種類の多項目測定を行い、抗腫瘍効果評価可能 25 症例を PR・long SD, short SD, PD に分けて解析を行った。健常者と比較して中皮腫患者は多くのサイトカイン・ケモカインの血清中濃度が高値で

あった。その中で、PD 症例の平均値が特に高値であり、PR・SD 症例の平均値の方が低値である因子を複数種類見出したが、各群の個体差が大きいこともあり PD 群と PR・SD 群とで有意差は認められなかった。単独で CD26 抗体有効例を判別できるバイオマーカーになるサイトカイン・ケモカインは見出せなかったが、SDF-1 α,β /CXCL12や MCP2/CCL8 など複数の候補因子の血清中濃度を調べることで、有効性を予測できる可能性も考えられ、さらに症例数を増やしての解析が期待される。

7) 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

末梢血リンパ球のバイオマーカー解析に同意が得られたのは、国内第 I/II 相全 40 例中 28 例(うち抗腫瘍効果評価可能は 24 例)であった。上述の血清解析と同様に、抗腫瘍効果評価可能 24 症例を PR・long SD, short SD, PD に分けて解析を行った。末梢血 CD4、CD8 T 細胞の CD26 発現や Naive・Central Memory・Effector Memory・Terminal Effector の割合、各種免疫チェックポイント分子の発現などの解析を行ったが、いずれも PR・SD 症例と PD 症例間で有意な差は認められなかった。

CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーではないが、健常者と中皮腫患者との間で明確に異なる点として、中皮腫患者の末梢血 CD8 T 細胞は CD26 陰性 CD28 陰性の Terminal Effector の割合が健常者と比較して顕著に高く、さらに健常者の末梢血 CD4 T 細胞にはほとんど存在しない CD26 陰性 CD28 陰性の Terminal Effector が中皮腫患者では異常に増加していることを見出した。

この細胞集団は CD4、CD8 T 細胞ともに Perforin 強陽性、Granzyme A・B 陽性の細胞傷害性エフェクター細胞であり、アスベストばく露から発症までの潜伏期間が約 30 年と言われる胸膜中皮腫に特徴的な末梢血 T 細胞の変化と予想される。

また、CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験には、抗ヒト PD1 抗体 Nivolumab を投与して無効だった患者も含まれている。その Nivolumab 投与歴のある患者では末梢血 CD4・CD8 T 細胞ともに PD1 の陽性率が極端に低かった。この PD1 の発現低下は PD1 抗体治療を行った患者の大きな特徴と考えられる。

D. 考察

ヒト化 CD26 抗体の副作用が少ない利点を活かした新たな併用療法を開発するために、ヒト免疫化マウスを用いたヒト中皮腫株担癌モデルにて、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用療法の抗腫瘍効果とその作用メカニズムの解析を行った。

CD26 分子は T 細胞における機能や免疫細胞における発現パターンがヒトとマウスとでは大きく異なるため、CD26 抗体の腫瘍免疫への影響を解析するにはヒト免疫系での解析が不可欠である。また、ICI が抗腫瘍効果を発揮するためにも、T 細胞を中心とした免疫系の存在が不可欠であり、ヒト化 CD26 抗体と ICI との併用効果を検討する実験にはヒト免疫化マウスを用いる必要がある。

CD26 抗体が抗腫瘍効果を発揮するうえで、抗体が CD26 分子上のどの部位に結合するか(エピトープ)が重要であり、CD26 抗体の抗腫瘍効果のデータを取得するには、抗

マウス CD26 抗体ではなく、臨床応用を目標としたヒト化 CD26 抗体を用いることが不可欠である。ヒト化 CD26 抗体はマウス CD26 には交差性を示さず全く結合しないことから、ヒト CD26 を発現したがん細胞を用いた実験系が不可欠になる。

以上の理由から、CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果のデータを取得するには、ヒト免疫系での実験が必要だが、ヒト免疫化マウスを用いた担癌モデルには問題点も存在する。一つは、免疫細胞がヒト臍帯血造血幹細胞由来の HLA を発現しているのに対し、ヒト腫瘍細胞株は異なる HLA を発現しているため、同種異系(allogeneic)の T 細胞応答を見ることになり、本来のがん抗原特異的な応答とは異なる。また、ヒト免疫細胞の組成に関しても、今回のモデルではヒト T 細胞と B 細胞はマウス体内で十分な生着が認められるが、ヒト NK 細胞や抗原提示細胞を含む骨髄系免疫細胞の生着率は非常に低い。しかし現時点ではヒトの造血幹細胞から全ての免疫細胞を発生・分化させることはできず、また、線維芽細胞など腫瘍周囲の間質はマウス由来の細胞であることなど、ヒトのがん微小環境をマウスですべて再現することは不可能に近い。

CD26 はヒト T 細胞に活性化シグナルを伝達する共刺激分子であることを研究代表者らは見出し(J Immunol 1989)、さらにヒト T 細胞を NOG マウスに移植する急性および慢性炎症モデルにおいて、ヒト化 CD26 抗体や Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる CD26 共刺激のブロックが、ヒト T 細胞の活性化を抑制し、マウスの体重減少を軽減して生存日数を延長させることを示してきた(Br J Haematol 2013, J Immunol 2015)。

一方で今回のヒトがん細胞担癌ヒト免疫化マウスモデルでは、CD26 抗体を投与することで腫瘍に浸潤したヒト T 細胞のサイトカイン発現や Granzyme B 発現が亢進しており、活性化の亢進に作用していることが示唆された。近年、T 細胞やがん細胞以外の細胞での CD26 の機能や DPP4 酵素活性の役割についての論文が多く出ており、その一つに線維芽細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、上皮細胞などで、細胞膜上の CD26 分子が TGF- β 刺激応答に関係することが報告されている(Kidney Int 2015)。CD26 は細胞膜上でインテグリン β 1 と会合している。TGF- β が細胞内にシグナルを伝達するには TGF β R1 と TGF β R2 の細胞膜上でのヘテロダイマー形成が不可欠であり、その TGF β R のヘテロダイマー形成には CD26/インテグリン β 1 がどちらも重要であり、CD26 かインテグリン β 1 のどちらかをノックダウンすると TGF- β 刺激時の TGF β R のヘテロダイマー形成が阻害され、下流の Smad のリン酸化も減少し、TGF- β 刺激応答が低下することが報告されている(Kidney Int 2015)。様々な細胞で細胞膜上の CD26 発現と TGF- β 刺激応答の関係性が報告されており、CD26 抗体投与時に細胞膜上の CD26 発現が顕著に低下した CD4 および CD8 T 細胞が、がん微小環境での TGF- β による活性化抑制作用を受けにくくなり、その結果 control 抗体投与群よりも活性化している可能性を現在検討している。

ヒト化 CD26 抗体の予後・治療効果予測バイオマーカーを探索するために、CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いて解析を行ってきた。

腫瘍病理組織の DNA マイクロアレイの結果から、SD 症例群と PD 症例群との間で mRNA 発現量に顕著な差が見られた遺伝子 X と Y に着目し、腫瘍病理組織の免疫染色による発現評価を行ってきたが、市販の複数の抗体を様々な染色条件で検討しても DNA マイクロアレイでの結果ほど明瞭な差が認められなかった。免疫組織染色はホルマリン固定された組織のタンパクレベルでの発現を評価する方法として重宝されるが、mRNA 発現とタンパク質発現が必ずしも一致しないことや、免疫組織染色の感度あるいは定量性が低い問題もある。さらに *in situ hybridization* で評価する方法を検討したが、FFPE 腫瘍組織の *in situ hybridization* はおそらく mRNA の分解度合いが強く影響する実験手法であり、ポジティブコントロールである β -actin ですら陰性となるものも多く、この手法での評価は難しいと考えられた。

CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量と DPP4 酵素活性値の変動解析は、CD26 抗体療法の有効性予測バイオマーカーになることをフランス第 I 相臨床試験の血清検体の解析で示した(Biomark Res 2021)。しかしフランス第 I 相臨床試験と異なり国内第 I/II 相臨床試験では毎週 1 回投与を行ううえに投与量もほとんどが 6mg/kg の高容量で、抗体 3 回目投与前(day15pre)の時点で全ての症例が低値で維持されていた。このことから、抗体投与直後に下がった血清中可溶性 CD26 値/DPP4 酵素活性値の変動(回復)を解析するためには、抗体を毎週 1 回高容量投与するプロトコルでは、day2 から day8pre (抗体 2 回目を投与する前)にかけて今回の day15pre よりも早い段階での血清採取をした方が PR・SD 群と PD 群との間

でより明白な差が見られたと予想される。また、SDF-1 α , β /CXCL12 や MCP2/CCL8 など複数の候補因子の血清濃度を調べることで有効性を予測できる可能性も考えられ、検体数を増やしてさらなる解析が待たれる。

末梢血リンパ球解析では、末梢血 CD4 および CD8 T 細胞のフェノタイプ解析を行い、CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムの一つに DPP4 酵素活性の低下とそれにとまなうケモカインによる Th1 細胞の遊走が関与している可能性があるため、T 細胞の CXCR3 の発現も測定した。しかしながら、胸膜中皮腫患者の CD4 および CD8 T 細胞の CXCR3 の陽性率は健常者と比較して低いことが示された。このことは、胸膜中皮腫患者では末梢血 CD4 および CD8 T 細胞の両方で細胞傷害活性を有する Terminal Effector のサブセットが顕著に増加していたことと関係している。この細胞集団は関節リウマチなどで多く報告されており、Th1・Th2・Th17 を遊走させるケモカインのレセプターである CXCR3・CCR4・CCR6 などは発現しておらず、CCR5 や CX3CR1 を発現していて Memory T 細胞とは異なるケモカインで炎症組織への遊走が制御されていることが示唆されている。末梢血中に CXCR3 陽性 T 細胞が多いタイプの胸膜中皮腫以外の腫瘍であれば、CD26 抗体は腫瘍組織への T 細胞浸潤をより増強させる可能性が期待できることを示唆している。

E. 結論

ヒト T 細胞と B 細胞が十分に生着した免疫化マウスの作製に成功し、ヒト中皮腫細胞株 H226 と JMN 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

との併用効果について非臨床 POC データを取得した。CD26 抗体投与によってヒト T 細胞の腫瘍内浸潤が促進されるメカニズムの詳細を明らかにした。

ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いたバイオマーカー探索研究の結果、(1)腫瘍病理組織の解析からは SD 症例で共通して高発現している遺伝子 X を、PD 症例で共通して高発現している遺伝子 Y を見出した。また、(2)血清の解析からは抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量・DPP4 酵素活性の測定が CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーになり得ること、サイトカイン・ケモカインの中では SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 などが有効性を予測できる候補分子となることを見出した。これらの成果が今後の CD26 抗体療法開発に繋がることを期待する。

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. 今後の展望

ヒト化 CD26 抗体単剤でも化学療法剤や Nivolumab 抵抗性の胸膜中皮腫患者に対して高い割合で一定期間 SD となり、一部の患者では SD が長期間持続するものの ICI と同様にやがて PD となってしまうことが CD26 抗体単剤治療の課題である。本研究で説明したように、CD26 抗体には非常に多彩な抗腫瘍作用メカニズムがあり、T 細胞の腫瘍内浸潤を促進させ、癌微小環境のサイトカインバランスを変化させ、さらには PD-1 抗体とは異なるメカニズムで T 細胞の活性化

も亢進すると予想され、ヒト免疫化マウスモデルだけでなく胸膜中皮腫患者に対しても、PD1 抗体との併用で相乗的な抗腫瘍効果が得られることが期待され、ヒト化 CD26 抗体と ICI との併用療法の臨床試験を計画している。

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 抗体が無効であった胸膜中皮腫患者で、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の割合を予測することへの応用も期待される。また、腫瘍組織の解析から見出された遺伝子 X や Y、血清の解析から見出された SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 が何故 CD26 抗体治療の有効性と関係するのかを考察することで、CD26 抗体の新たな抗腫瘍作用メカニズムの解明にも繋がることを期待される。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okaya T, Kawasaki T, Sato S, Koyanagi Y, Tatsumi K, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C, Kasuya Y, Hasegawa Y, Ohara O, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):748.
- 2) Nishida H, Suzuki R, Nakajima K, Hayashi M, Morimoto C, Yamada T. HDAC inhibition involves CD26 induction on multiple myeloma cells via the c-Myc/Sp1-mediated promoter activation. *Cancer Res Commun.* 2024;4(2):349-364.
- 3) Kobayashi E, Kamihara Y, Arai M, Wada A, Kikuchi S, Hatano R, Iwao N, Susukida T, Ozawa T, Adachi Y, Kishi H, Dang NH,

- Yamada T, Hayakawa Y, Morimoto C, Sato T. Development of a Novel CD26-Targeted Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for CD-26-Expressing T-Cell Malignancies. *Cells*. 2023;12(16): 2059.
- 4) Kikuchi S, Wada A, Kamihara Y, Okazaki K, Jawaid P, Rehman MU, Kobayashi E, Susukida T, Minemura T, Nabe Y, Iwao N, Ozawa T, Hatano R, Yamada M, Kishi H, Matsuya Y, Mizuguchi M, Hayakawa Y, Dang NH, Sakamoto Y, Morimoto C, Sato T. DPP8 Selective Inhibitor Tominostat as a Novel and Broad-Spectrum Anticancer Agent against Hematological Malignancies. *Cells*. 2023;12(7):1100.
 - 5) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Sato S, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Physiol Rep*. 2023;11(6):e15645.
 - 6) Kobayashi S, Fugo K, Hatano R, Yamazaki K, Morimoto C, Terawaki H. Anti-glomerular Basement Membrane Disease Concomitant with MPO-ANCA Positivity Concurrent with High Serum Levels of Interleukin-26 Following Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Intern Med*. 2023;62(7):1043-1048.
 - 7) Fujimoto N. Spare the lung: surgical treatment approach for malignant pleural mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2023;12(2):197-199.
 - 8) Hasegawa S, Shintani Y, Takuwa T, Aoe K, Kato K, Fujimoto N, Hida Y, Morise M, Moriya Y, Morohoshi T, Suzuki H, Chida M, Endo S, Kadokura M, Okumura M, Hattori S, Date H, Yoshino I. Nationwide prospective registry database of patients with newly diagnosed untreated pleural mesothelioma in Japan. *Cancer Sci*. 2024;115(2):507-528
2. 著書
なし
 3. 学会発表
 1. 岩尾憲明, 岩澤卓弥, 波多野良, 森本幾夫. Humanized anti-CD26 antibody suppresses the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. 第82回日本癌学会, 横浜, 2023年9月21日
 2. 上野剛、山下素弘、重松久乃、末久弘、寺本典弘、西英之、岸本卓巳、廣島健三. 初回胸膜生検で悪性胸膜中皮腫の診断に難渋した2例. 第40回日本呼吸器気外科学会学術集会. 2023年7月13～14日 (新潟).
 3. Sato S, Kawasaki T, Hatano R, Koyanagi Y, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for CD26/DPP4 in LPS-induced Lung Injury in Mice. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日
 4. Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Takahashi Y, Sato S, Ohnuma K, Morimoto C, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for CD26/DPP4 in Mouse Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日
 5. Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Suzuki T. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in CD26/DPP4 deficient mice. 第63回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2023年4月28日
 6. 三上翔平、柘野浩史、鈴木彩海、永井裕大、加藤諒、光井佳代子、浅野基、松下

公紀、藤本伸一、岸本卓巳. 腹膜中皮腫
の 17 例. 第 109 回日本消化器病学会総
会. 2023 年 4 月 6~8 日 (長崎).

I. 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

II. 分担研究報告

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

ヒト免疫化マウスモデルにおけるヒト化 CD26 抗体と抗 PD-1 抗体との併用療法の
抗腫瘍作用メカニズムの解析

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 特任教授
研究分担者	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 特任准教授
研究分担者	岸本 卓巳	独立行政法人労働者健康安全機構 アスベスト疾患研究・研修センター 所長
研究分担者	山田 健人	埼玉医科大学医学部 病理学 教授
研究協力者	伊藤 匠	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 特任助教
研究協力者	金子有太郎	ワイズ・エー・シー株式会社 代表取締役 CEO 近畿大学 客員教授(元)

研究要旨

胸膜中皮腫は主にアスベストばく露によって起こる難治性悪性腫瘍だが、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。われわれは胸膜中皮腫に発現する CD26 に着目し、ヒト化 CD26 抗体を開発した。フランスにて中皮腫を中心とした第 I 相臨床試験を、国内でも中皮腫を対象とした第 I/II 相臨床試験を実施した。第 II 相臨床試験が終了し、安全性が確認され、フランスでの第 I 相臨床試験と同等の有効性を示唆する結果が得られている。治療抵抗性の中皮腫患者に対して、CD26 抗体単剤でも高い割合で Stable Disease (SD) となり一部の患者では SD が長期間持続したが、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は重要な課題である。そこで、ヒト免疫化マウスを用いたヒト中皮腫細胞株担癌モデルを確立し、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データを得た。CD26 抗体は単剤でも腫瘍の周囲に浸潤するヒト T 細胞、特に CD4 T 細胞の浸潤を促進するとともに、T 細胞の Granzyme B 発現やサイトカイン・ケモカイン産生を増強させて活性化に働き、PD-1 抗体と併用することで浸潤する T 細胞数やエフェクター分子の発現が相乗的に増強されることが示された。多彩な抗腫瘍作用メカニズムを持つ CD26 抗体と PD-1 抗体との併用療法の治療効果が期待される。

A. 研究目的

胸膜中皮腫は主に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約 30-50 年とされ、日本を含め中国やインドなどアジア・中東では患者数が今後さらに増加すると考えられている。予後は極めて悪く、現時点で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 抗体を開発してフランスにて中皮腫を中心に First-in-Human 第 I 相臨床試験を行った。Infusion reaction (急性輸注反応)を除いて特記すべき副作用もなく、安全性が確認されるとともに、抗がん剤抵抗性の悪性中皮腫患者 19 例中 10 例が modified RESIST 評価で Stable Disease (SD)となり、そのうち 5 例は 6 ヶ月以上、最長で 399 日 SD が持続し、有効性を示唆する結果も得られた(Br J Cancer. 2017)。

本邦でも抗がん剤抵抗性の胸膜中皮腫を対象に第 I/II 相臨床試験を実施し、第 I 相は 1~3 コホート各 3 例ずつの計 9 例、第 II 相は 31 例に投与を行った。第 I/II 相で計 40 例に投与を行い、安全性が高く、抗がん剤抵抗性の中皮腫患者に対して高い割合で抗腫瘍効果が一定期間認められるも、Complete Response (CR)はなく、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)と同様にやがて Progressive Disease (PD)となることが課題として挙げられた。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が望まれる。

ヒト化 CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムとして、抗体医薬特有の抗体依存性細胞傷

害(ADCC)活性に加え、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を明らかにしてきた(Clin Cancer Res. 2001, Immunology. 2002, Clin Cancer Res. 2007, PLoS One. 2013)。また、CD26 抗体は、CD26 分子が有する DPP4 酵素活性には直接影響しないが、細胞膜上の CD26 分子の数や膜から切断されて体液中に存在する可溶性 CD26 の数を減少させるため、CD26 抗体を投与すると DPP4 酵素活性も低下する。近年の知見から、DPP4 酵素活性を阻害すると DPP4 によるケモカインの切断と活性低下が妨げられ、腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞が増加する、すなわち腫瘍免疫亢進に働くことが強く示唆され(Nat Immunol. 2015, 2019)、CD26 抗体は多様なメカニズムを介して抗腫瘍効果を発揮していると考えられる。特記すべきは、国内第 I/II 相臨床試験 40 例の中には PD-1 抗体 Nivolumab 無効例が 13 例含まれており、それらの患者に対しても同様に高い割合で抗腫瘍効果が認められたことから、CD26 抗体は ICI 抵抗性の患者にも有効であること、ICI とは異なるメカニズムで抗腫瘍効果を発揮することが強く示唆された。

そこで、副作用が非常に少ない CD26 抗体の利点を活かした他の分子標的薬、特に ICI との併用療法を開発すべく、CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果を検討した。ICI が抗腫瘍効果を発揮するためには T 細胞を中心とした免疫細胞が不可欠であり、マウスに同系のマウス腫瘍株を移入する担癌モデルがよく用いられる。一方で、CD26 抗体が抗腫瘍効果を発揮するためにはヒト CD26 分子上の結合部位も重要であり(Clin Cancer Res. 2007)、ヒトとマウスとは免

疫系における CD26 の機能も大きく異なることから (Immunol Rev. 1998)、ヒト化 CD26 抗体のデータ取得にはヒト腫瘍株並びにヒト免疫系での解析が必須である。以上の理由から、ヒト免疫化マウスを作製し、このマウスを用いたヒト中皮腫株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。

B. 研究方法

1) 細胞

ヒト中皮腫細胞株 H226(上皮型)と JMN(肉腫型)は、10% FBS を添加した RPMI1640 培地中で 37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した。ヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞は RIKEN BioResource Center から購入した。

2) マウス

NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug/ShiJic})マウス(以下、NOG マウス)は In-Vivo Science Inc.から購入した。マウスは順天堂大学の specific pathogen free (SPF)施設で飼育した。

3) 抗体と試薬

Flow cytometry には下記のヒト抗原特異抗体を用いた。BUV395-labeled anti-CD3 mAb (clone SK7), PE-labeled anti-CD26 mAb (clone M-A261) 及び APC-R700-labeled anti-CD4 (clone RPA-T4)は BD Biosciences から購入した。Brilliant Violet 421-labeled anti-CD45 mAb (clone HI30), Brilliant Violet 510-labeled anti-CD14 mAb (clone M5E2), Brilliant Violet 605-labeled anti-CD11c mAb (clone 3.9),

FITC-labeled anti-CD11b mAb (clone ICRF44), PerCP/Cy5.5-labeled anti-CD8 mAb (clone RPA-T8), PE/Cy7-labeled anti-CD56 mAb (clone 5.1H11), APC-labeled anti-CD19 mAb (clone 4G7)及び APC/Fire 750-labeled anti-mouse CD45 mAb (clone 30-F11)及び抗体の非特異的な結合をブロックするための Human TruStain FcX, TruStain FcX (anti-mouse CD16/32)は BioLegend から購入した。また、Brilliant Violet 同士の非特異的な結合を抑えるための Brilliant Stain Buffer plus は BD Biosciences から購入した。

4) 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、翌日ヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞 1x10⁵ cells 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、JMN または H226 の細胞懸濁液と Matrigel を 1:1 混合して 1 匹あたり 1x10⁶ cells ずつ側腹部に皮下移入した。JMN または 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 μ g/dose で週 2 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。腫瘍の一部は病理解析のために 10%ホ

ルマリンで固定し、残りは Liberase TL Research Grade (Roche) 0.25mg/ml で酵素処理を行い、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。腫瘍内浸潤リンパ球のフローサイトメトリー解析では、MagniSort Human CD3 Positive Selection Kit (invitrogen)及び EasySep Magnet (STEMCELL)を用いてリンパ球精製を行った。定量 RT-PCR 解析では、ヒト CD4 T 細胞(gated on hCD45+hCD3+hCD4+ cells)とヒト CD8 T 細胞(gated on hCD45+hCD3+hCD8+ cells)を BD FACSAria IIIu セルソーター(BD Biosciences)で分取した。また、腫瘍内浸潤リンパ球との性質比較のために、脾臓のリンパ球解析も行った。

5) 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、Human と Mouse に対する TruStain FcX を両方添加し、蛍光色素標識抗体で染色した後、BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences)にて溶血と固定処理を行い、洗浄した後、BD LSRFortessa (BD Biosciences)で測定を行い、得られたデータを FlowJo (BD Biosciences)で解析した。

6) 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、研究代表者森本が開発した、ヒト化

CD26 抗体とはエピトープがそれぞれ異なる mouse anti-human CD26 mAb 2 クローン (clone 5F8 と 9C11)を用いた sandwich ELISA により行った。可溶性マウス CD26 値の測定は、Mouse DPP4/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。

7) Bio-Plex マルチプレックスアッセイ

ヒト免疫化マウスを用いた担癌モデルにおいて、JMN および H226 を皮下移入したヒト免疫化マウスから採血を行うとともに、比較対象としてヒト造血幹細胞を移植して JMN や H226 の腫瘍皮下移入は行わないヒト免疫化マウス、ヒト造血幹細胞の移植はせずに JMN や H226 の腫瘍皮下移入のみを行った NOG マウス、ヒト造血幹細胞移植も腫瘍皮下移入も行わない通常飼育のみの NOG マウスを用いた。採血はマウス尾静脈から行った。それぞれのマウス血清中のヒトサイトカイン・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。Bio-Plex Pro Human Chemokine 40-Plex panel (Bio-Rad)を用いて、付属のプロトコルに従い Bio-Plex system (Bio-Rad)で測定を行い、得られたデータを Bio-Plex Manager (Bio-Rad)で解析した。

8) 定量 RT-PCR アッセイ

ヒト免疫化マウスの JMN および H226 の皮下腫瘍から精製したヒト CD4 T 細胞およびヒト CD8 T 細胞を溶解し、RNeasy Micro キット(Qiagen)を用いて、付属のプロトコルに従い Total RNA 抽出を行った。続いて

PrimeScript II first strand cDNA 合成キット(TaKaRa Bio)を用いて cDNA の合成を行い、SYBR Select Master Mix を用いて 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems)で測定を行い、得られたデータを 7500 System SDS software (Applied Biosystems)で解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を用いた研究については、森本が講座責任者である順天堂大学大学院医学研究科で本研究を行うための研究計画書等を倫理審査委員会へ提出し、承認を得ている(順大医倫第 2020280 号)。動物実験の実施はいわゆる 3R に基づいて行い、順天堂大学医学部実験動物委員会に実験計画書を提出し審議の上、承認されている(承認番号: 2023031)。

C. 研究結果

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、ヒトの造血幹細胞を尾静脈より移植した。ヒト造血幹細胞を移植して 10 週間経過するまではマウスの血中のヒト免疫細胞の約 90%が B 細胞(CD19 陽性)で、13 週目ではヒトの血球細胞の約 10-15%が T 細胞、17 週目では約 25-35%が T 細胞であることが確認された(2021 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金研究報告書に記載)。

中皮腫細胞株 H226(上皮型)および JMN(肉腫型)は、in vivo での増殖が非常に遅く、マウスの皮下に移入してから腫瘍を形成するまでに 5-6 週間かかるため、マウス体

内でヒト T 細胞の細胞数が増えてくる造血幹細胞移植 13 週目に中皮腫細胞株を皮下移入することとした。

H226 および JMN 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(以下、CD26 抗体)単独, mouse anti-human PD-1 mAb (以下、PD-1 抗体)単独, CD26 抗体と PD-1 抗体の併用をそれぞれ 200 μ g/dose で週 2 回投与を続けた。腫瘍サイズを週に 2 回採寸した結果、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たが、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は顕著で、5 匹中 3 匹は腫瘍サイズが縮小した(2022 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。

2) 腫瘍浸潤リンパ球の解析

H226 及び JMN をヒト免疫化マウスに皮下移入して 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。

まず腫瘍内に浸潤したヒト CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の細胞数と割合の解析を行った。肉腫型の JMN では、CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与により、腫瘍内のヒト CD8 T 細胞の割合が control IgG 投与群と比べて有意に増加した($p=0.019$)。一方で、JMN よりもよい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 細胞の割合が control IgG 投与群と比べて有意に増加するとともに($p=0.040$)、ヒト CD4 T 細胞の割合もいずれの群と比べても有意に増加していた。特に、併用投与によって腫瘍サイズが縮小した個体では、ヒト CD4 T 細胞の浸潤が顕著に増加していたことから、少なくともこのモデルでは CD8 T 細胞だけでなく CD4 T 細胞の浸潤も促進することが、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(2022 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。

次に、腫瘍内に浸潤したヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞のエフェクター機能を中心としたフェノタイプ解析を行った。まず代表的な細胞傷害性因子である Granzyme B の細胞内発現をフローサイトメトリーで解析した結果、ヒト CD4 T 細胞ではいずれの群でもほとんど発現が認められなかったが、ヒト CD8 T 細胞では陽性細胞が検出され、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 Granzyme B 陽性細胞の割合が増加し、併用投与群ではさらに増加することが示された(データ未掲載)。次に、腫瘍から精製したヒト T 細胞にタンパク質分泌阻害剤の monensin (GolgiStop)存在化で PMA と ionomycin の刺激を加えて培養し、細胞内サイトカイン(ヒト IFN- γ および TNF- α)発現をフローサイトメトリーで解析した。IFN- γ と TNF- α はヒト CD4 T 細胞とヒト CD8 T 細胞の両方で陽性細胞が検出され、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 CD4 T 細胞・CD8 T 細胞両方の IFN- γ と TNF- α 陽性細胞の割合が増加し、併用投与群ではさらに増加することが示

された(データ未掲載)。これらの結果から、CD26 抗体は腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するとともに、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体単独でもヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の活性化が亢進され、PD-1 抗体と併用投与することでより強く活性化が誘導されることが示された。

3) CD26 抗体が腫瘍内へのリンパ球浸潤を促進するメカニズムの解析

CD26 抗体投与によって腫瘍内へのヒト T 細胞の浸潤が促進するメカニズムとして、まず CD26 分子が持つ DPP4 酵素活性への影響が考えられる。生体内では様々なタンパク質・ペプチドが DPP4 酵素の基質となり、免疫細胞の遊走に重要な役割を持つケモカインも含まれ、その多くが DPP4 による切断を受けると活性が低下することが報告されている(J Leukoc Biol. 2016)。さらに、DPP4 と結合親和性が高いケモカインの上位 5 種はいずれも T 細胞遊走ケモカインである(J Leukoc Biol. 2016)。マウスに同種同系のマウスがん細胞株を移入し、そこに DPP4 酵素阻害薬である sitagliptin を混餌投与すると、DPP4 によるケモカインの切断が阻害され、活性が維持されることで腫瘍内への免疫細胞浸潤が増加することが示されている(Nat Immunol. 2015, 2019)。また、研究代表者らがフランスで実施した CD26 抗体の第 I 相臨床試験において、SD 症例では PD 症例と比較して、CD26 抗体投与後の血清中 DPP4 酵素活性が低いことを見出した(Biomark Res. 2021)。以上より、CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムの一つに DPP4 酵素活性の低下と、引き続いての腫瘍内への免疫細胞浸潤の増加が考えられる。

そこで、ヒト免疫化マウスのシステムにおける CD26 抗体の DPP4 酵素活性への影響を解析した。まず腫瘍内および脾臓のヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の細胞膜上の CD26 発現の解析を行った結果、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群では、脾臓および腫瘍内のヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞のいずれも細胞膜上の CD26 の発現が顕著に低下していることが示された(データ未掲載)。フローサイトメトリーにはマウスに投与しているヒト化 CD26 抗体とはエピトープが異なる CD26 抗体を使用しているため、ヒト化 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ことが予想される。JMN および H226 を皮下移入して形成した腫瘍の細胞膜上の CD26 発現に関しても、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群で細胞膜上の CD26 の発現低下が示された(データ未掲載)。さらに、マウス血清中のヒト可溶性 CD26 量を測定した結果、CD26 抗体単独または CD26 抗体と PD-1 抗体の併用投与群で control 抗体投与群の約 70%近く可溶性 CD26 量が低下することを示した(データ未掲載)。以上のことから、このヒト免疫化マウスモデルでも CD26 抗体投与によって、ヒト T 細胞やヒトがん細胞の細胞膜上の CD26 分子と血清中のヒト可溶性 CD26 の量が大幅に減少し、DPP4 酵素活性の低下が起こっていると考えられる。ただし、このヒト化 CD26 抗体はマウス CD26 には全く結合しないため、このモデルではマウスの細胞に発現する CD26 分子とその DPP4 酵素活性には影響を与えない。

次に、Bio-Plex システムによりヒト免疫

化マウス血清中のサイトカイン・ケモカイン 40 種類の多項目解析を行った。このモデルにおいて、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 Th1 遊走ケモカインである CXCL9/MIG と CXCL10/IP-10、Th2 遊走ケモカインである CCL17/TARC と CCL22/MDC の血清中濃度が増加することを明らかにした(データ未掲載)。これら 4 種のケモカインのうち、CXCL9、CXCL10、CCL22 の 3 種は DPP4 の基質であり、DPP4 との結合親和性がいずれも高いことが報告されている。その他のヒト T 細胞遊走ケモカインはこのモデルではほとんど検出されなかった。以上より、CD26 抗体投与によって腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するメカニズムとして、細胞膜上や血液中の CD26 分子数が減少することで DPP4 酵素活性の低下し、DPP4 によるケモカインの切断と活性低下が起こりにくくなることに加え、このモデルでは CD26 抗体投与によって CXCL9、CXCL10、CCL17、CCL22 の血中濃度も増加することが関係していると考えられる。

4) CD26 抗体が腫瘍浸潤 T 細胞の活性化を亢進するメカニズムの解析

上述のように、CD26 抗体は腫瘍内へのヒト T 細胞浸潤を促進するとともに、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体単独でもヒト CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の活性化が亢進され、PD-1 抗体と併用投与することでより強く活性化が誘導されることが示された。CD26 抗体投与によって、何故ヒト CD4 T 細胞や CD8 T 細胞の活性化が亢進されるのかについては現在もメカニズム解明に取り組んでいるところであり、考察のパートに記載する。

研究代表者らはこれまで CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムとして、CD26 を細胞膜上に発現するがん細胞に抗体が結合することで増殖を直接的に抑制する作用に着目してきたが、近年の研究から DPP4 酵素活性を低下させることがケモカインの活性維持に繋がり免疫細胞の腫瘍内浸潤を促進すること、さらには CD26 抗体によって T 細胞遊走ケモカイン産生自体も増加すること、PD-1 抗体だけでなく CD26 抗体によっても T 細胞の活性化が亢進することを見出した。

D. 考察

ヒト化 CD26 抗体の副作用が少ない利点を活かした新たな併用療法を開発するために、ヒト免疫化マウスを用いたヒト中皮腫株担癌モデルにて、ヒト化 CD26 抗体と PD-1 抗体との併用療法の抗腫瘍作用メカニズムの解析を行った。

マウスと MHC のハプロタイプを揃えたマウスがん細胞株を移入した担癌モデルでは、がんと免疫系が同種同系となり、がん抗原に特異的な免疫応答を解析することができる。より疾患の病態を模倣したモデルの方が望ましいことは言うまでもないが、CD26 分子の研究ではマウスの免疫系を用いることができない理由が複数存在する。

CD26 は腫瘍だけでなく T 細胞にも発現しており、近年の研究から CD26 抗体の抗腫瘍作用はがんへの直接的な影響だけでなく、T 細胞を介した腫瘍免疫への影響もあることが強く示唆される。CD26 はヒト T 細胞に活性化シグナルを伝達する T 細胞共刺激分子でもあり、ヒト化 CD26 抗体は CD26 のリガンドである caveolin-1 と CD26 との結合、つまりは T 細胞への CD26 共刺激シ

グナルの伝達をブロックする。一方で、マウス T 細胞の CD26 は共刺激分子として機能しない。また、ヒト T 細胞では CD26 は強陽性・弱陽性・陰性の三相性パターンを示すのに対し、マウス T 細胞は一律に弱陽性である。T 細胞以外の免疫細胞における CD26 の発現も、ヒトとマウスとは異なる。このように、T 細胞における機能や免疫細胞における発現パターンがヒトとマウスとは大きく異なるため、CD26 抗体の腫瘍免疫への影響を解析するにはヒト免疫系での解析が不可欠である。また、ICI が抗腫瘍効果を発揮するためにも、T 細胞を中心とした免疫系の存在が不可欠であり、ヒト化 CD26 抗体と ICI との併用効果を検討する実験にはヒト免疫化マウスを用いる必要がある。

CD26 抗体が抗腫瘍効果を発揮するうえで、抗体が CD26 分子上のどの部位に結合するか(エピトープ)が重要であり、CD26 抗体の抗腫瘍効果のデータを取得するには、抗マウス CD26 抗体ではなく、臨床応用を目標としたヒト化 CD26 抗体を用いることが不可欠である。ヒト化 CD26 抗体はマウス CD26 には交差性を示さず全く結合しないことから、ヒト CD26 を発現したがん細胞を用いた実験系が不可欠になる。

以上の理由から、CD26 抗体と PD-1 抗体との併用効果のデータを取得するには、ヒト免疫系での実験が必要だが、ヒト免疫化マウスを用いた担癌モデルには問題点も存在する。一つは、免疫細胞がヒト臍帯血造血幹細胞由来の HLA を発現しているのに対し、ヒト腫瘍細胞株は異なる HLA を発現しているため、同種異系(allogeneic)の T 細胞応答を見ることになり、本来のがん抗原特異的な応答とは異なる。また、ヒト免疫細胞の組成に

関しても、今回のモデルではヒト T 細胞と B 細胞はマウス体内で十分な生着が認められるが、ヒト NK 細胞や抗原提示細胞を含む骨髄系免疫細胞の生着率は非常に低い。この問題を解決するために、ヒト IL-2, IL-15, IL-3, GM-CSF などの遺伝子を強制発現させた NOG マウスが樹立・市販されつつあるが、現時点ではヒトの造血幹細胞から全ての免疫細胞を発生・分化させることはできず、また、線維芽細胞など腫瘍周囲の間質はマウス由来の細胞であることなど、ヒトのがん微小環境をマウスで再現することは不可能に近い。

CD26 はヒト T 細胞に活性化シグナルを伝達する共刺激分子であることを研究代表者らは見出し(J Immunol. 1989)、さらにヒト T 細胞を NOG マウスに移植する急性および慢性炎症モデルにおいて、ヒト化 CD26 抗体や Caveolin-1-Fc 融合タンパクによる CD26 共刺激のブロックが、ヒト T 細胞の活性化を抑制し、マウスの体重減少を軽減して生存日数を延長させることを示してきた(Br J Haematol. 2013, J Immunol. 2015)。一方で今回のヒトがん細胞担癌ヒト免疫化マウスモデルでは、CD26 抗体を投与することで腫瘍に浸潤したヒト T 細胞のサイトカイン発現や Granzyme B 発現が亢進しており、活性化の亢進に作用していることが示唆された。近年、T 細胞やがん細胞以外の細胞での CD26 の機能や DPP4 酵素活性の役割についての論文が多く出ており、その一つに線維芽細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、上皮細胞などで、細胞膜上の CD26 分子が TGF- β 刺激応答に関係することが報告されている(Kidney Int. 2015)。CD26 は細胞膜上でインテグリン $\beta 1$ と会合している。

TGF- β が細胞内にシグナルを伝達するには TGF β R1 と TGF β R2 の細胞膜上でのヘテロダイマー形成が不可欠であり、その TGF β R のヘテロダイマー形成には CD26/インテグリン $\beta 1$ がどちらも重要であり、CD26 かインテグリン $\beta 1$ のどちらかをノックダウンすると TGF- β 刺激時の TGF β R のヘテロダイマー形成が阻害され、下流の Smad のリン酸化も減少し、TGF- β 刺激応答が低下することが報告されている(Kidney Int. 2015)。様々な細胞で細胞膜上の CD26 発現と TGF- β 刺激応答の関係性が報告されており、CD26 抗体投与時に細胞膜上の CD26 発現が顕著に低下した CD4 T 細胞や CD8 T 細胞が、がん微小環境での TGF- β による活性化抑制作用を受けにくくなり、その結果 control 抗体投与群よりも活性化している可能性を現在検討している。

E. 結論

ヒト T 細胞と B 細胞が十分に生着した免疫化マウスの作製に成功し、ヒト中皮腫細胞株 H226 と JMN 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 抗体との併用効果について非臨床 POC データを取得した。CD26 抗体投与によってヒト T 細胞の腫瘍内浸潤が促進されるメカニズムの詳細を明らかにしたが、さらに CD26 抗体は T 細胞の活性化亢進にも働くと考えられ、今後の新たな研究が期待される。

F. 今後の展望

ヒト化 CD26 抗体単剤でも化学療法剤や Nivolumab 抵抗性の胸膜中皮腫患者に対して高い割合で一定期間 SD となり、一部の患者では SD が長期間持続する点は評価でき

るが、ICIと同様にやがてPDとなってしまうことがCD26抗体単剤治療の課題である。本研究で示したように、CD26抗体には非常に多彩な抗腫瘍作用メカニズムがあり、T細胞の腫瘍内浸潤を促進させ、癌微小環境のサイトカインバランスを変化させ、さらにはPD-1抗体とは異なるメカニズムでT細胞の活性化も亢進すると予想され、ヒト免疫化マウスモデルだけでなく胸膜中皮腫患者に対しても、PD1抗体との併用で相乗的な抗腫瘍効果が得られることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida H, Suzuki R, Nakajima K, Hayashi M, Morimoto C, Yamada T. HDAC inhibition induces CD26 expression on myeloma cells via the c-Myc/Sp1-mediated promoter activation. *Cancer Res Commun.* in press.
- 2) Okaya T, Kawasaki T, Sato S, Koyanagi Y, Tatsumi K, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C, Kasuya Y, Hasegawa Y, Ohara O, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):748.
- 3) Kobayashi E, Kamihara Y, Arai M, Wada A, Kikuchi S, Hatano R, Iwao N, Susukida T, Ozawa T, Adachi Y, Kishi H, Dang NH, Yamada T, Hayakawa Y, Morimoto C, Sato T. Development of a Novel CD26-Targeted Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for CD-26-Expressing T-Cell Malignancies. *Cells.* 2023;12(16): 2059.
- 4) Kikuchi S, Wada A, Kamihara Y, Okazaki K, Jawaid P, Rehman MU, Kobayashi E, Susukida T, Minemura T, Nabe Y, Iwao N, Ozawa T, Hatano R, Yamada M, Kishi H, Matsuya Y, Mizuguchi M, Hayakawa Y,

Dang NH, Sakamoto Y, Morimoto C, Sato T. DPP8 Selective Inhibitor Tominostat as a Novel and Broad-Spectrum Anticancer Agent against Hematological Malignancies. *Cells.* 2023;12(7):1100.

- 5) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Sato S, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Physiol Rep.* 2023;11(6):e15645.
- 6) Kobayashi S, Fugo K, Hatano R, Yamazaki K, Morimoto C, Terawaki H. Anti-glomerular Basement Membrane Disease Concomitant with MPO-ANCA Positivity Concurrent with High Serum Levels of Interleukin-26 Following Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Intern Med.* 2023;62(7):1043-1048.

2. 著書

なし

3. 学会発表

- 1) 岩尾憲明, 岩澤卓弥, 波多野良, 森本幾夫. Humanized anti-CD26 antibody suppresses the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. 第82回日本癌学会, 横浜, 2023年9月21日
- 2) Sato S, Kawasaki T, Hatano R, Koyanagi Y, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for CD26/DPP4 in LPS-induced Lung Injury in Mice. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日
- 3) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Takahashi Y, Sato S, Ohnuma K, Morimoto C, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for

CD26/DPP4 in Mouse Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日

- 4) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Suzuki T. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in CD26/DPP4 deficient mice. 第63回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2023年4月28日

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

労災疾病臨床研究事業費補助金

分担研究報告書

ヒト化 CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーの探索：
国内第 I/II 相臨床試験検体を用いたこれまでの検討の総括

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 特任教授
研究分担者	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 特任准教授
研究分担者	山田 健人	埼玉医科大学医学部 病理学 教授
研究分担者	岸本 卓巳	独立行政法人労働者健康安全機構 アスベスト疾患研究・研修センター 所長
研究協力者	伊藤 匠	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 特任助教
研究協力者	藤本 伸一	岡山労災病院 腫瘍内科部長
研究協力者	青江 啓介	山口宇部医療センター 腫瘍内科 内科系診療部長

研究要旨

胸膜中皮腫は主にアスベストばく露によって起こる難治性悪性腫瘍であり、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、胸膜中皮腫に発現する CD26 に着目し、ヒト化 CD26 抗体を開発しフランスにて第 I 相臨床試験を実施した後、国内で治療抵抗性の胸膜中皮腫患者を対象に、第 I 相 9 例・第 II 相 31 例(計 40 例)の第 I/II 相臨床試験を実施した。安全性が確認され治療薬としての有効性を示唆する結果も得られた。これまでに、国内第 I/II 相臨床試験の患者から提供を受けた(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いて、CD26 抗体治療が有効な患者を選択できるバイオマーカーの探索に取り組んできた。CD26 抗体の抗腫瘍効果が Partial Response (PR) または Stable Disease (SD) が長期間持続した患者と、Progressive Disease (PD) であった患者とに分けて比較を行い、腫瘍病理組織および血清の解析ではいくつかのバイオマーカー候補を見出した。バイオマーカーとして臨床に役立てるには、さらに検体数を増やすことや評価方法の改善が必要だが、候補バイオマーカーの探索に有効な解析方法と難しい方法がわかり、また、CD26 抗体の新たな抗腫瘍作用メカニズムの解明に活用できる成果も得られ、今後の CD26 抗体療法開発に繋がる有益な情報を得ることができた。

A. 研究目的

胸膜中皮腫は主に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。予後は極めて悪く、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 抗体を開発してフランスにて中皮腫を中心に **First-in-Human** 第 I 相臨床試験を行った。

フランスでの第 I 相試験を終え、CD26 抗体療法がより安全かつ効果的に行われるうえで、治療効果や予後を予測できるバイオマーカーの探索が課題として挙げられた。本抗体療法適用患者を適切に選択できれば期待していた治療効果が得られない患者にまで高額な医療費負担を強いることがなくなり、労災補償行政にも貢献できる。

そこで、本抗体の予後・治療効果予測バイオマーカーを同定するために、本邦で開始した治療抵抗性(標準治療で **Progressive Disease (PD)**)の胸膜中皮腫に対する CD26 抗体の第 I/II 相臨床試験患者の(1)中皮腫病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いた解析に取り組んできた。

これまでに検討してきた CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーの探索結果について報告する。

B. 研究方法

1) 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, day8, day15, day22, day29 まで週 1 回の間隔で 5 回静脈内投与を行い、投与を開始してから 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、**Partial Response (PR)** または **Stable Disease (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 回の間隔で 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。

2) 腫瘍病理組織

CD26 抗体の胸膜中皮腫に対する国内第 I/II 相臨床試験は第 I 相が全 9 例、第 II 相が全 31 例で行われたが、そ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のは、第 I 相が 2 例、第 II 相が 21 例の計 23 例であった。化学療法剤や抗 PD-1 抗体 **Nivolumab** 治療を開始する前に採取された中皮腫組織をホルマリン固定して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。

3) 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。全 7 サンプルの中で最も得られた RNA 量が少なかったサンプルに合わせて RNA 44ng から **TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich)** と **Titanium Taq DNA Polymerase (Clontech)**を用いて cDNA の合成と増幅を行った。**SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies)**を用いて cDNA の断片化、DNA の Cy3 標識、精製を行った後、**SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8 x 60K Ver 3.0 (Design ID:072363)**

(Agilent Technologies)を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。

4) 血清中可溶性 CD26 値と DPP4 酵素活性値の測定

研究代表者森本が開発した、ヒト化 CD26 抗体とはエピトープがそれぞれ異なる mouse anti-human CD26 mAb 2 クローン (clone 5F8 と 9C11)を用いて、sandwich ELISA による血清中可溶性 CD26 値の定量と、DPP4 酵素活性値の測定を行った。株式会社新日本科学にて測定した値を解析に用いた。

5) 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 3 time point で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。Bio-Plex Pro Human Chemokine 40-Plex panel および Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine 15-Plex panel (Bio-Rad)を用いて、付属のプロトコルに従い Bio-Plex system (Bio-Rad)で測定を行い、得られたデータを Bio-Plex Manager (Bio-Rad)で解析した。

6) フローサイトメトリー

成人健常者および国内第 I/II 相臨床試験患者から提供を受けた末梢血を、BD Pharm Lyse Lysing Buffer (BD Biosciences)にて溶血処理を行い、洗浄した後、Human TruStain FcX を添加し、続いて蛍光色素で標識した各種抗体を添加して細胞膜上の目的タンパク質の染色を行った。FACS

Calibur (BD Biosciences)で測定を行い、得られたデータを FlowJo (BD Biosciences)で解析した。

7) 抗体と試薬

Flow cytometry には下記のヒト抗原特異抗体を用いた。PE-labeled anti-CD26 mAb (clone M-A261)は BD Biosciences から購入した。PE/Cy7-labeled anti-KLRG1 mAb (clone 13F12F2), PE/Cy7-labeled anti-TIGIT mAb (clone MBSA43), APC-labeled anti-KLRG1 mAb (clone 13F12F2), APC-labeled anti-TIGIT mAb (clone MBSA43) 及び APC-labeled anti-LAG3 mAb (clone 3DS223H)は eBioscience から購入した。FITC-labeled anti-CD4 mAb (clone RPA-T4), FITC-labeled anti-CD8 mAb (clone HIT8a), PE/Cy7-labeled anti-CD25 mAb (clone clone M-A251), PE/Cy7-labeled anti-CD28 mAb (clone clone CD28.2), PE/Cy7-labeled anti-CD56 mAb (clone 5.1H11), PE/Cy7-labeled anti-PD1 mAb (clone EH12.2H7), APC-labeled anti-CD28 mAb (clone clone CD28.2), APC-labeled anti-CD57 mAb (clone clone HCD57), APC-labeled anti-CXCR3 mAb (clone G025H7), APC-labeled anti-TRAIL mAb (clone RIK-2), APC-labeled anti-BTLA mAb (clone MIH26), APC-labeled anti-PD1 mAb (clone EH12.2H7), APC-labeled anti-Tim3 mAb (clone F38-2E2)及び抗体の非特異的な結合をブロックするための Human TruStain FcX は BioLegend から購入した。

(倫理面への配慮)

成人健常者の末梢血を用いた研究については、森本が講座責任者である順天堂大学大学院医学研究科で本研究を行うための研究計画書等を倫理審査委員会へ提出し、承認を得ている(順大医倫第 2018127 号)。また、ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験の患者検体を用いたバイオマーカー探索研究については、臨床試験審査委員会、各治験実施施設内の治験審査委員会にて、試験の実施と合わせてバイオマーカー探索用採血・腫瘍組織検体の提供について協議され、実施承認を取得済みである。検体の提供を受ける際には、研究対象者に対する人的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、利益等の説明を行い、書面でのインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

1) 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

本パートの目的は、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探索することである。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のは、第 I/II 相全 40 例中 23 例で、23 例中、性別・組織型・Nivolumab 投与の有無が同じ条件で、SD 症例と PD 症例を 3 例以上取れるのは、「男性・上皮型・Nivolumab 投与無し」(SD 6 例/PD 4 例)のみであったため、そ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、Total RNA 抽出、DNA マイクロアレイ解析を行った。

SD 群 3 例と PD 群 4 例との間で遺伝子発現の群比較を行い、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た(2021 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。

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 症例では腫瘍部位を切り出して遺伝子発現解析を行ったものの、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。

長期間 PFS が持続する 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、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)中皮腫組織で簡便に発現評価ができる方法として免疫染色の検討を行ってきた。しかしながら、複数の市販の免疫組織染色用抗体、染色条件(抗体濃度や抗原賦活化条件)の検討を行ったが、DNA マイクロアレイの結果と一致して PFS が長い症例では X の発現が顕著に高く、PD 症例では Y の発現が高い結果にはならなかった(データ未掲載)。

そこで、タンパク質レベルではなく、DNA マイクロアレイ解析と同様に mRNA レベルで発現量を評価する手法として、*in situ hybridization* を検討した。しかしながら、医療施設によって腫瘍組織の固定の仕方が異なり、mRNA の分解が進んでいる FFPE 標本ではポジティブコントロールである β -actin ですら陰性となるものも多く(データ未掲載)、FFPE 中皮腫組織の mRNA 発現量を *in situ hybridization* で評価することは難しいと考えられた。DNA マイクロアレ

イ解析から見出した CD26 抗体の有効性予測バイオマーカー候補分子を、FFPE 中皮腫組織で簡便に評価する方法に関しては、今後もさらなる検討が必要である。

2) 国内第 I/II 相臨床試験患者の血清検体の経時的解析

次に、血清検体を用いた解析結果について記載する。CD26 抗体の国内臨床試験で血清のバイオマーカー解析に同意が得られたのは、第 I/II 相全 40 例中 29 例(うち抗腫瘍効果評価可能は 25 例)であった。フランスでの第 I 相臨床試験の血清検体を解析した結果、CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量と DPP4 酵素活性値が SD 症例では PD 症例よりも有意に低いことを見出し、抗体投与後の変動解析が CD26 抗体療法の有効性予測バイオマーカーになることを報告した (Biomark Res. 2021)。国内第 I/II 相試験の血清検体においても、同様に SD 症例では PD 症例よりも CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量と DPP4 酵素活性値が低いことが示された(2020 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。

次に、Bio-Plex システムによりサイトカイン・ケモカイン 49 種類の多項目測定を行い、抗腫瘍効果評価可能 25 症例を PR・long SD, short SD, PD に分けて解析を行った。健常者と比較して中皮腫患者は多くのサイトカイン・ケモカインの血清中濃度が高値であった。その中で、PD 症例の平均値が特に高値であり、PR・SD 症例の平均値の方が低値である因子を複数種類見出したが、各群の個体差が大きいこともあり PD 群と PR・SD 群とで有意差は認められなかった。単独で CD26 抗体有効例を判別できるバイオマ

ーカーになるサイトカイン・ケモカインは見出せなかったが、SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 など複数の候補因子の血清中濃度を調べることで、有効性を予測できる可能性も考えられ、さらに症例数を増やしての解析が期待される。

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

最後に、国内第 I/II 相臨床試験患者の抗体初回投与前の末梢血を用いて、フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球のフェノタイプ解析の結果について記載する。末梢血リンパ球のバイオマーカー解析に同意が得られたのは、第 I/II 相全 40 例中 28 例(うち抗腫瘍効果評価可能は 24 例)であった。上述の血清解析と同様に、抗腫瘍効果評価可能 24 症例を PR・long SD, short SD, PD に分けて解析を行った。末梢血 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の CD26 発現や Naive・Central Memory・Effector Memory・Terminal Effector の割合、各種免疫チェックポイント分子の発現などの解析を行ったが、いずれも PR・SD 症例と PD 症例間で有意な差は認められなかった。

CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーではないが、健常者と中皮腫患者との間で明確に異なる点として、中皮腫患者の末梢血 CD8 T 細胞は CD26 陰性 CD28 陰性の Terminal Effector の割合が健常者と比較して顕著に高く、さらに健常者の末梢血 CD4 T 細胞にはほとんど存在しない CD26 陰性 CD28 陰性の Terminal Effector が中皮腫患者では異常に増加していることを見出した。この細胞集団は CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに Perforin 強陽性、Granzyme A・B 陽

性の細胞傷害性エフェクター細胞であり、アスベストばく露から発症までの潜伏期間が約 30 年と言われる胸膜中皮腫に特徴的な末梢血 T 細胞の変化と予想される。

また、CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験には、抗ヒト PD1 抗体 Nivolumab を投与して無効だった患者も含まれている。その Nivolumab 投与歴のある患者では末梢血 CD4 T 細胞・CD8 T 細胞ともに PD1 の陽性率が極端に低かった(2020 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。この PD1 の発現低下は PD1 抗体治療を行った患者の大きな特徴と考えられる。

D. 考察

ヒト化 CD26 抗体の予後・治療効果予測バイオマーカーを探索するために、CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いて解析を行ってきた。一つの因子の発現量だけで PR・SD や PFS が長期間持続した患者を選択できるバイオマーカーの同定には至っていないが、腫瘍病理組織および血清の解析ではいくつかのバイオマーカー候補分子を見出すことができた。

腫瘍病理組織の DNA マイクロアレイの結果から、SD 症例群と PD 症例群との間で mRNA 発現量に顕著な差が見られた遺伝子 X と Y に着目し、腫瘍病理組織の免疫染色による発現評価を行ってきたが、市販の複数の抗体を様々な染色条件で検討しても DNA マイクロアレイでの結果ほど明瞭な差が認められなかった(データ未掲載)。免疫組織染色はホルマリン固定された組織のタンパクレベルでの発現を評価する方法として重宝されるが、mRNA 発現とタンパク質発現が

必ずしも一致しないことや、免疫組織染色の感度あるいは定量性が低い問題もある。そこで、腫瘍組織における遺伝子 X と Y の mRNA 発現を in situ hybridization で評価する方法を検討したが、FFPE 腫瘍組織の in situ hybridization はおそらく mRNA の分解度合いが強く影響する実験手法であり、ポジティブコントロールである β -actin ですら陰性となるものも多く、この手法での評価は難しいと考えられた。DNA マイクロアレイと同様に、FFPE 標本から腫瘍部位を切り出して Total RNA 抽出を行い、定量 RT-PCR によって mRNA 発現量を評価する方法を検討したいが、今回の第 I/II 相試験で提供してもらえた FFPE 標本の枚数と組織量が少ない問題があり、今回の臨床試験患者の検体では検討することができなかった。

CD26 抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量と DPP4 酵素活性値の変動解析は、CD26 抗体療法の有効性予測バイオマーカーになることをフランス第 I 相臨床試験の血清検体の解析で示した(Biomark Res. 2021)。しかしながら、フランス第 I 相では CD26 抗体初回投与直後(day1post)に可溶性 CD26 値及び DPP4 酵素活性値が顕著に低下し、2 週に 1 度の頻度で CD26 抗体を 2 回目投与する前(day15pre)の時点では値が部分的に回復した。国内第 I/II 相臨床試験では毎週 1 回投与を行ううえに投与量もほとんどが 6mg/kg の高容量で、抗体 3 回目投与前(day15pre)の時点で全ての症例が低値で維持されていた(2020 年度 労災疾病臨床研究事業費補助金 研究報告書に記載)。このことから、抗体投与直後に下がった血清中可溶性 CD26 値/DPP4 酵素活性値の変動(回復)を解析するためには、抗体を毎週 1 回高容量投

与するプロトコルでは、day2 から day8pre (抗体 2 回目を投与する前)にかけて今回の day15pre よりも早い段階での血清採取をした方が PR・SD 群と PD 群との間でより明白な差が見られたと予想される。

末梢血リンパ球解析では、末梢血 CD4 T 細胞, CD8 T 細胞のフェノタイプ解析を行い、CD26 抗体の抗腫瘍作用メカニズムの一つに DPP4 酵素活性の低下とそれにとまなうケモカインによる Th1 細胞の遊走が関与している可能性があるため、T 細胞の CXCR3 の発現も測定した。しかしながら、胸膜中皮腫患者の CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の CXCR3 の陽性率は健常者と比較して低いことが示された(データ未掲載)。このことは、胸膜中皮腫患者では末梢血 CD4 T 細胞・CD8 T 細胞の両方で細胞傷害活性を有する Terminal Effector のサブセットが顕著に増加していたことと関係している。この細胞集団は関節リウマチや粥状動脈硬化などで多く報告されており、Th1・Th2・Th17 を遊走させるケモカインのレセプターである CXCR3・CCR4・CCR6 などは発現しておらず、CCR5 や CX3CR1 を発現していて Memory T 細胞とは異なるケモカインで炎症組織への遊走が制御されていることが示唆されている。このことは、末梢血中に CXCR3 陽性 T 細胞が多いタイプの胸膜中皮腫以外の腫瘍であれば、CD26 抗体は腫瘍組織への T 細胞浸潤をより増強させる可能性が期待できる可能性を示唆している。

E. 結論

ヒト化 CD26 抗体の国内第 I/II 相臨床試験患者の(1)腫瘍病理組織、(2)血清、(3)末梢血リンパ球を用いたバイオマーカー探索研

究の結果、(1)腫瘍病理組織の解析からは SD 症例で共通して高発現している遺伝子 X を、PD 症例で共通して高発現している遺伝子 Y を見出した。また、(2)血清の解析からは抗体投与後の血清中の可溶性 CD26 量・DPP4 酵素活性の測定が CD26 抗体の有効性予測バイオマーカーになり得ること、サイトカイン・ケモカインの中では SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 などが有効性を予測できる候補分子となることを見出した。これらの成果が今後の CD26 抗体療法開発に繋がることを期待する。

F. 今後の展望

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 抗体が無効であった胸膜中皮腫患者で、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の割合を予測することへの応用も期待される。また、腫瘍病理組織の解析から見出された遺伝子 X や Y、血清の解析から見出された SDF-1 α,β /CXCL12 や MCP2/CCL8 が何故 CD26 抗体治療の有効性と関係するのかを考察することで、CD26 抗体の新たな抗腫瘍作用メカニズムの解明にも繋がることを期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida H, Suzuki R, Nakajima K, Hayashi M, Morimoto C, Yamada T. HDAC inhibition induces CD26 expression on myeloma cells via the c-Myc/Sp1-mediated promoter activation. Cancer Res Commun. in press.
- 2) Okaya T, Kawasaki T, Sato S, Koyanagi Y,

- Tatsumi K, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C, Kasuya Y, Hasegawa Y, Ohara O, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):748.
- 3) Kobayashi E, Kamihara Y, Arai M, Wada A, Kikuchi S, Hatano R, Iwao N, Susukida T, Ozawa T, Adachi Y, Kishi H, Dang NH, Yamada T, Hayakawa Y, Morimoto C, Sato T. Development of a Novel CD26-Targeted Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for CD-26-Expressing T-Cell Malignancies. *Cells.* 2023;12(16): 2059.
- 4) Kikuchi S, Wada A, Kamihara Y, Okazaki K, Jawaid P, Rehman MU, Kobayashi E, Susukida T, Minemura T, Nabe Y, Iwao N, Ozawa T, Hatano R, Yamada M, Kishi H, Matsuya Y, Mizuguchi M, Hayakawa Y, Dang NH, Sakamoto Y, Morimoto C, Sato T. DPP8 Selective Inhibitor Tominostat as a Novel and Broad-Spectrum Anticancer Agent against Hematological Malignancies. *Cells.* 2023;12(7):1100.
- 5) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Sato S, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Physiol Rep.* 2023;11(6):e15645.
- 6) Kobayashi S, Fugo K, Hatano R, Yamazaki K, Morimoto C, Terawaki H. Anti-glomerular Basement Membrane Disease Concomitant with MPO-ANCA Positivity Concurrent with High Serum Levels of Interleukin-26 Following Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Intern Med.* 2023;62(7):1043-1048.
- 2. 著書**
なし
- 3. 学会発表**
- 1) 岩尾憲明, 岩澤卓弥, 波多野良, 森本幾夫. Humanized anti-CD26 antibody suppresses the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. 第82回日本癌学会, 横浜, 2023年9月21日
- 2) Sato S, Kawasaki T, Hatano R, Koyanagi Y, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for CD26/DPP4 in LPS-induced Lung Injury in Mice. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日
- 3) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Takahashi Y, Sato S, Ohnuma K, Morimoto C, Tatsumi K, Suzuki T. Functional Roles for CD26/DPP4 in Mouse Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. American Thoracic Society 2023 International Conference, Washington, DC, USA, 2023年5月19日
- 4) Koyanagi Y, Kawasaki T, Kasuya Y, Hatano R, Suzuki T. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in CD26/DPP4 deficient mice. 第63回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2023年4月28日
- 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