

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 日から平成 31 年 3 月 31 日まで

【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/DPPIV 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た。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。

そこでフランスでの臨床試験患者血清を解析し、CD26/DPPIV 値の変動解析が SD/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 7 月から開始した悪性中皮腫の第 I/II 相臨床試験検体を用いて、(1) 病理組織での CD26 発現の定量・定性解析の確立と、腫瘍組織 DNA・RNA profile と治療効果との相関解析 (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、及び (3) 末梢血リンパ球バイオマーカーの確立に取り組み (4) さらに CD26 および USP22 分子ともに癌幹細胞マーカーとも言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および CD26 抗体処理による影響についての解析を行い、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を検討した。

平成 30 年度は平成 30 年 3 月に最終患者への投与が終了した国内第 I 相臨床試験検体 (全 9 例) を用いて、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、次年度から第 II 相臨床試験検体 (全 30 例予定) の解析を加え、統計解析のもと CD26/DPPIV 値の変動解析や新規バイオマーカーを同定する。これにより、安全かつ革新的な CD26 抗体療法の確立と、抗体療法適用患者の適切な選択を可能にする。

【研究方法】

目的(1) : 国内第 I 相パート前症例 (9 例) および対照症例 (抗体治療を受けていない中皮腫症例および良性石綿胸水、胸膜ブランク) を用いてバイオマーカー候補を同定。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 染色を施行し解析を行う。

目的(2) : 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 2) DPPIV 酵素活性 ; CD26/DPPIV 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。さらに臨床試験患者の末梢血中 CD4 および CD8T 細胞を用いて CD26 抗体治療が免疫系、特に腫瘍免疫に及ぼす影響を明らかにする。そのため 1) 末梢血中の免疫細胞組成 2) T 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。

目的(3) : 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・治療効果予測マーカーとなりうるかを明らかにするために、1) CD26 陽性の中皮腫細胞株 MES01 および JMN を用いた。ヒト化 CD26 単クローン抗体は Y's 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 および 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 単クローン抗体と混ぜ 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を注射し、経時的に生存を計測した。

【研究成果】

- 1) 臨床試験における悪性中皮腫検体における 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。
- 2) 悪性中皮腫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 抗体の予後・治療効果予測バイオマーカー候補として、IL-10, MIF, Eotaxin/CCL11, IL-1 β , IL-33 を見出した。また、国内第 I 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、特に CD8 T細胞で CD26 陽性率の低下、細胞傷害性エフェクターT細胞の増加、免疫チェックポイント分子の中で TIGIT と PD1 の発現陽性率の増加が認められた。
- 3) USP22 の発現抑制は中皮腫細胞の増殖を抑制した。ヒト化 CD26 単クローン抗体処理は細胞膜上の CD26 を細胞内に移行させ、USP22 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を示唆された。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。

【結論】

- 1) 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、IL-10, MIF, Eotaxin/CCL11, IL-1 β , IL-33 を見出した。また、国内第 I 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特に CD8 T細胞で CD26 陽性率の低下、細胞傷害性エフェクターT細胞の増加、免疫チェックポイント分子の中で TIGIT と PD1 の発現陽性率の増加が認められた。
- 2) 臨床試験における悪性中皮腫検体における 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。
- 3) 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だし、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。

【今後の展望】

次年度は、今年度に引き続き国内第 II 相臨床試験被験者や対照症例の解析検体数をさらに増やすとともに、血清中可溶性 CD26 濃度/DPPIV 酵素活性値に加え、様々なバイオマーカー候補の発現と、ヒト化 CD26 抗体の治療有効性との相関関係を解析し、予後・治療効果バイオマーカーを同定する。

継続して国内第 II 相臨床試験の悪性中皮腫の病理組織像および CD26 発現を解析し、組織型や CD26 発現の細胞局在、陽性率、陽性強度、細胞増殖期率など中皮腫の様々な病理学的パラメーターを解析し、ヒト化 CD26 抗体の有効性評価項目との相関を統計学的に解析することで、CD26 抗体の予後・治療効果予測バイオマーカーとなりうるかどうかを検討する。