

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15324

研究課題名(和文)悪性中皮腫の細胞表面巨大分子複合体による病態制御機構の解明

研究課題名(英文) Large molecular complex of cell surface in malignant pleural mesothelioma as a novel treatment target

研究代表者

大沼 圭 (OHNUMA, Kei)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10396872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜悪性中皮腫(MPM)は胸膜中皮細胞を発生母地とする極めて悪性度の高い腫瘍である。多くの新薬の臨床試験が行われているが、いまだ期待される新薬はない。われわれが開発発見したCD26分子及びCD26抗体に基づいた本研究により、MPMの治療抵抗性、浸潤転移などの臨床的特性が明らかになり、CD26及びその関連分子を中心としたMPMの浸潤転移機構を解明した。特にSSTR4、ペリオスチン、インテグリンを含むCD26分子複合体の詳細を解明し、細胞内及び細胞外を相互につなげるMPM細胞膜のプラットフォームの本体を明らかにした。その結果、MPMの病態解明及び新規治療薬開発の基盤を構築することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare and aggressive neoplasm deriving from the pleural mesothelial lining. Despite the modest clinical benefit of a multimodality treatment approach including surgery, combination chemotherapy and radiation, prognosis remains grim with poor overall survival. New approaches based on deregulated pathways and targeted therapies are required to improve survival of MPM patients. We have had a long-standing interest in the role of CD26 in cancer biology and its suitability as a novel therapeutic target in selected neoplasms. Our previous work demonstrated that CD26 is preferentially expressed in MPM cells but not in normal mesothelial cells. Recently, we reported robust in vivo data on the anti-tumor activity of anti-CD26 monoclonal antibody in mouse xenograft models. We herein showed significant novel findings and the early clinical development of a CD26-targeted therapy for MPM, advances that can lead to a more hopeful future for MPM patients.

研究分野：小児科学

キーワード：悪性中皮腫 CD26 ソマトスタチン受容体 ペリオスチン CD26抗体療法

1. 研究開始当初の背景

(1) アスベストは建築資材など様々な用途で使用されて、潜伏期 20-40 年を経て胸膜悪性中皮腫 (MPM) を引き起こし、2006 年に 1050 名であった死亡者数は 2013 年には 1410 名に増加し、最近、最高裁はアスベスト訴訟における国の賠償責任を認める判決を下し、大きな社会問題となっている。MPM は難治性腫瘍であり多くの新薬の臨床試験が行われているが、いまだ期待される新薬は登場していない。

(2) われわれは T 細胞活性化分子 CD26 を研究する過程で、CD26 は正常中皮で発現はないが上皮型 MPM は 8 割の症例に発現していることを発見した。さらに、ヒト化 CD26 抗体の開発、CD26 遺伝子の単離を世界に先駆けて行い当分野では世界の最先端にありその独創性も高い。CD26 分子は MPM の増殖、浸潤に重要な役割を果たし、ヒト化 CD26 抗体がそれらの機能を抑制することも明らかとし、フランスで第 I 相臨床試験を終え、第 II 相臨床試験実施を準備している。しかし、CD26 抗体の作用機序の詳細は明らかではなく、より一層の治療効果を得るために CD26 分子による MPM の制御シグナル分子の解明が必要である。そこで、われわれは CD26 の細胞内シグナル分子同定を目的として、CD26 の細胞内ドメインの機能を喪失させるため、CD10 の細胞内ドメインに置換した遺伝子組換え CD26-CD10 キメラ体を作成して MPM に発現させたところ、ネイティブな CD26 を発現した MPM に比べ、細胞増殖・遊走・浸潤能が著しく低下した。この時、ネイティブ CD26 陽性 MPM、キメラ体発現 MPM 及び CD26 陰性 MPM 細胞の細胞膜タンパク質を抽出し、CD26 細胞内ドメイン結合分子を免疫沈降法で分離し、質量分析で解析したところ、CD26 細胞質ドメインに会合するタンパク質としてソマトスタチン受容体 4 (SSTR4) を同定した。さらに、ネイティブ CD26 発現 MPM では、CD26 陰性あるいはキメラ体発現 MPM 細胞に比べ、細胞外マトリックスタンパク質であるペリオスチンの発現が著しく増加していること、また、CD26 はテトラスパン分子 CD9、インテグリンとの相互作用がその浸潤に重要であることを発見した。以上の研究結果より、CD26 を中心とした細胞膜分子複合体が MPM の浸潤・転移等の病態と予後に深く関与していることが強く示唆され、ヒト化 CD26 抗体との併用化学療法剤の選択さらに有効治療法の存在しない MPM の新たな治療薬開発を目指し今回の研究を立案した。

(3) 現在 MPM は有効な化学療法が乏しく、予後は極めて不良で、有効な治療薬開発は急務である。申請者らはヒト化 CD26 抗体を開発し、フランスで悪性中皮腫を中心とした第 I 相臨床試験が終了しており、近々に本邦でも臨床試験を計画中である。

MPM は難治性腫瘍であり多くの新薬の臨床試験が行われているが、いまだ期待される新薬は登場していない。ヒト化 CD26 抗体療法

のみならず、新たな分子基盤に基づく治療法を加えて集学的治療法の確立が急務であり、本研究の CD26 を中心とした効果的な抗体併用療法及び浸潤転移機構の解析は有効な新規治療薬開発にも大きく貢献すると考えられ、治療法を待ち望んでいる患者への社会的責務を果たすことにつながる。

2. 研究の目的

本研究は MPM の治療抵抗性、浸潤転移などの臨床的特性を明らかにするため、CD26 及びその関連分子に焦点をあて、MPM の浸潤転移機構の解明をめざしプロテオーム解析を行う。特に SSTR4、ペリオスチン、インテグリンを含む CD26 分子複合体の詳細を解明して、細胞内及び細胞外を相互につなげる MPM 細胞膜のプラットフォームの本体を明らかにすることで、MPM の病態解明及び新規治療薬開発の基盤を構築する。

3. 研究の方法

MPM の治療抵抗性、高浸潤転移能などの臨床的特性を明らかにし、CD26 抗体の作用メカニズムと併用療法剤の分子標的探索を行うため、CD26 及びその関連分子に焦点をあて、われわれがこれまで蓄積してきた基礎及び臨床データに基づき、種々の MPM 細胞株による *in vitro*、*in vivo* 実験で解析する。この結果を踏まえ、プロテオーム解析によって MPM の浸潤転移機構の解明を行う。特に、われわれが発見した、MPM 細胞膜 CD26 を中心としてインテグリンやペリオスチン、SSTR4 を含んだ約 600kDa の巨大分子複合体がいかに MPM の制御を行っているかという点に焦点を絞って解析する。本研究は、ヒト化 CD26 抗体との併用化学療法剤の選択さらに有効治療法の存在しない MPM の新たな治療薬開発にも発展が期待できる。

(1) われわれはこれまでに、CD26 の発現が MPM の増殖、遊走、浸潤を促進して病態に強く関係しており、CD26 抗体が新規の治療薬となることを発見してきた。このとき、CD26 抗体は抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性とともに、細胞周期を止めて抗腫瘍効果を発揮することを示したが、詳細な分子メカニズムは未解明であった。そこで、CD26 陰性 MPM 細胞由来細胞株 (MSTO 細胞) にネイティブな CD26 あるいは CD26 細胞質ドメイン機能を欠失した CD26-CD10 キメラ体を遺伝子導入した細胞株作成し、CD26 と相互作用するシグナル分子や細胞膜分子を探索したところ、ネイティブタンパク質免疫沈降によって SSTR4 を同定した (次ページ左側の図 1)。内分泌腫瘍ではソマトスタチン受容体が活性化されると細胞増殖や遊走が抑制されることが報告されているが、MPM における作用は未解明であった。われわれは、SSTR4 作動薬 L803087 と CD26 抗体併用による MPM 細胞の増殖、遊走、浸潤抑制作用を *in vitro* 及び *in vivo* で示した。この効果をさらに証明するために、本研究で

は、種々の CD26 陽性 MPM 細胞株を NOG マウスに移植して、CD26 抗体、L803087 投与実験を行う。同時に、CD26 と SSTR4 による MPM 細胞の増殖、遊走、浸潤メカニズムを解明するため、主なドメインの削除変異体を作成し、種々の MPM 細胞に遺伝子導入してタンパク質を発現させ、免疫沈降法及び蛍光顕微鏡観察によって、機能的な結合ドメインを決定する。

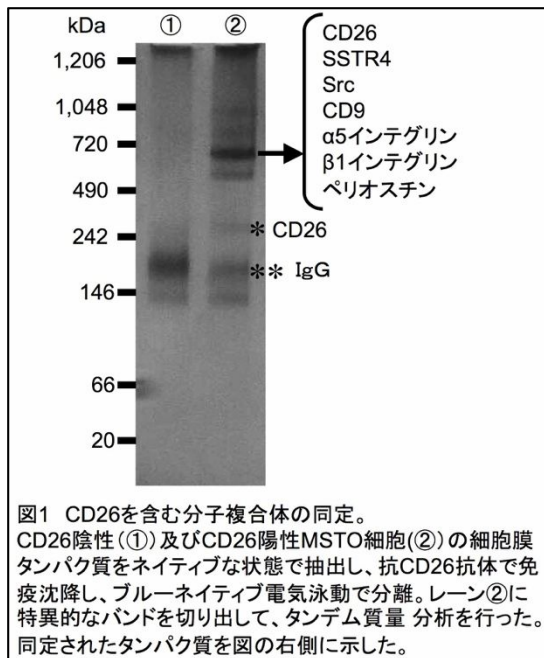


図1 CD26を含む分子複合体の同定。
CD26陰性(①)及びCD26陽性MSTO細胞(②)の細胞膜タンパク質をネイティブ状態で抽出し、抗CD26抗体で免疫沈降し、ブルーネイティブ電気泳動で分離。レーン②に特異的なバンドを切り出して、タンデム質量分析を行った。同定されたタンパク質を図の右側に示した。

(2) 上記の(1)に関連して、CD26 との結合が確かめられたタンパク質の発現を RNAi で抑制し、CD26 分子複合体による細胞増殖、遊走、浸潤の制御を実証する。また、これらタンパク質を恒常的にノックダウンした種々の MPM 細胞株(ルシフェラーゼ遺伝子導入済み)を樹立し、マウスに移植して MPM の増殖や浸潤・転移を *in vivo* 実験にて解析する。さらに、これらの細胞株を移植した NOG マウスに CD26 抗体、SSTR4 作用薬を投与して、治療効果を証明する。

(3) SSTR4 とともに CD26 と結合が確かめられたタンパク質であるペリオスチンは種々のがんにおいてインテグリンを介して浸潤促進作用を示す細胞外マトリックスタンパク質であるが、MPM における役割は明らかになっていない。われわれは、ネイティブ CD26、CD26-CD10 キメラ体発現 MPM 細胞株を樹立して、CD26 の細胞内ドメインがペリオスチンの発現増加に必要であり、細胞遊走、浸潤を増加させることを見出したが、ペリオスチンの発現を制御する詳細なシグナル分子機構は明らかになっていない。そこで、CD26 細胞内ドメインの発現レベルが異なる種々の MPM 細胞株を用いて、CD26 細胞内ドメインと相互作用してペリオスチンの転写を促進するシグナル分子や転写因子を同定する。特に、予備実験で同定した CD26 に会合するシグナル分子 Src を中心に、ペリオスチン発現増強に関わる CD26 下流のシグナルカスケードを解

明する。また、申請者はテトラスパニン CD9 が CD26 とインテグリンの相互作用を調節することを見出したが、これらが MPM をいかに制御するかは未解明である。そこで、インテグリンや CD9、ペリオスチン、SSTR4、Src との相互作用を実証する。

(4) 上記で同定した分子の発現を臨床検体で確認する。絞られた候補分子について、集積した症例の MPM での発現を評価し、臨床特性との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) 種々の CD26 陽性 MPM 細胞株(MES01、JMN、H2452、H226、H28)を NOG マウスに移植して、CD26 抗体、L803087 投与を行った。各細胞株 1×10^4 個を NOG マウスの腹腔に接種し、翌日より CD26 抗体(100 μ g/body)或いは L803087(50 μ M/body)を1日おきに腹腔内投与した。薬剤コントロールとしてヒト免疫グロブリン或いは DMSO を投与した。接種したいずれの細胞株においても、CD26 抗体 + L803087 併用群は、CD26 抗体単独群、L803087 単独群、コントロール群に比して生存率が有意に延長し、腫瘍の増大が有意に抑制された。このことは、MPM の治療において、CD26 抗体と SSTR4 拮抗薬の併用が、単独投与よりも、より効果的であることを示している。

つぎに、CD26 と SSTR4 による MPM 細胞の増殖、遊走、浸潤メカニズムを解明するため、主なドメインの削除変異体を作成し、MPM 細胞株に遺伝子導入してトランスフェクタントを作成した。まず、CD26 分子の削除変異体として、以前からわれわれが報告しているように、CD26 分子のシグナル伝達には CD26 分子の細胞内ドメインが重要である。そこで、CD26 分子の細胞内ドメインを削除したトランスフェクタントを作成した(CD26 陰性の MPM 細胞株 MSTO にレトロウイルスで遺伝子導入した)。細胞増殖能を軟寒天コロニー形成法で評価したところ、CD26 分子全長を導入した細胞株は、CD26 細胞内ドメインを削除した変異株及びコントロール株に比べて、有意にコロニー形成能が高かった。同様に、細胞遊走能、浸潤能をボイデンチャンパー法で評価したところ、CD26 分子全長を導入した細胞株は、CD26 細胞内ドメインを削除した変異株及びコントロール株に比べて、有意に遊走能及び浸潤能が高かった。これらの結果は、CD26 分子が MPM の細胞増殖、遊走、浸潤に正に制御しており、CD26 分子の細胞内ドメインを介した細胞内シグナル制御が重要であることを示唆している。

SSTR4 のシグナル伝達には C 末端ドメインが必須であることが報告されている。そこで、全長 SSTR4 或いは C 末端ドメインを欠失した削除変異体を作成し、SSTR4 陰性細胞株に強制発現した細胞を用いて免疫沈降実験及び蛍光顕微鏡による細胞内局在観察を行った。その結果、SSTR4 分子の C 末端ドメイン及び CD26 分子の細胞内ドメインを介して SSTR4 分

子と CD26 分子が会合していることが示された。すなわち、細胞内シグナルに關与するドメインを介した CD26・SSTR4 分子の会合が、MPM の細胞増殖、遊走、浸潤に關与しており、これら分子の会合による細胞増殖、遊走、浸潤のメカニズムの解明が、新規治療標的となることが示唆された。

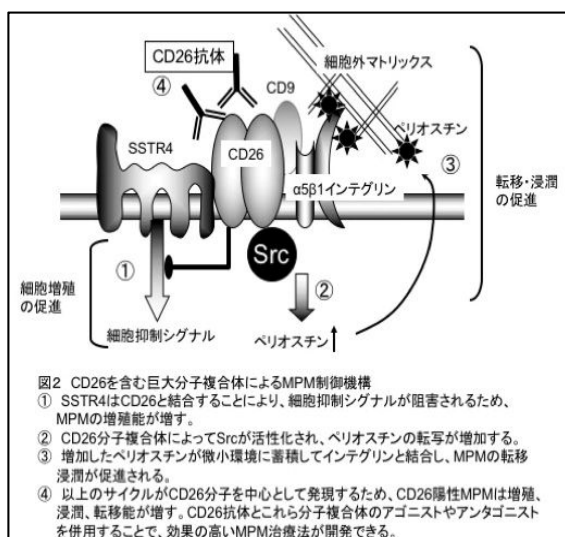
(2) CD26 を内因性に発現する MPM 細胞株 (JMN, MES01) に対して、RNAi によって CD26 の発現を抑制するトランスフェクタントを樹立した。L803087 を添加して、(1) と同様に細胞増殖、遊走、浸潤能を評価した。その結果、CD26 を内因性に発現しているコントロール細胞株では L803087 による細胞増殖、遊走、浸潤抑制効果は認められなかった。しかし、CD26 を抑制した細胞株においては、L803087 によって細胞増殖、遊走、浸潤が有意に抑制された。すなわち、SSTR4 による細胞増殖、遊走、浸潤抑制作用は、CD26 分子によって阻害されていることが示唆された。一方、CD26 陰性 MPM 細胞株に CD26 全長或いは CD26 細胞内ドメイン削除変異体を恒常的に発現した MPM 細胞株に対して、RNAi によって SSTR4 の発現を抑制した細胞株を樹立した。これらの細胞について、(1) と同様に細胞増殖、遊走、浸潤能を評価した。その結果、細胞増殖、遊走、浸潤能が低かった CD26 陰性細胞及び CD26 細胞内ドメイン削除変異体導入細胞は、SSTR4 抑制によって、CD26 陽性細胞株と同等に強い細胞増殖、遊走、浸潤が認められた。これらの結果は、MPM において SSTR4 作動薬 L803087 による癌細胞抑制効果を得るためには、CD26 分子と SSTR4 分子の会合を阻害することが必要であることが示唆された。

次に、CD26 を内因性に発現する MPM 細胞株 (JMN, MES01) に対して、RNAi によって CD26 の発現を抑制するトランスフェクタントを NOG マウスに移植し、CD26 抗体、L803087 投与を行った。各細胞株 1×10^4 個を NOG マウスの腹腔に接種し、翌日より CD26 抗体 (100 μ g/body) 或いは L803087 (50 μ M/body) を 1 日おきに腹腔内投与した。薬剤コントロールとしてヒト免疫グロブリン或いは DMSO を投与した。CD26 の発現を抑制した細胞株において、L803087 投与群はコントロール群に比して生存率が有意に延長し、腫瘍の増大が有意に抑制された。このとき、CD26 抗体併用による治療効果の有意差は認められなかった。このことは、SSTR4 による細胞増殖、遊走、浸潤抑制作用は、CD26 分子によって阻害されていることが *in vivo* 実験においても示唆された。

以上の結果より、MPM 細胞において CD26 分子と SSTR4 分子との会合により、SSTR4 の抑制シグナルが阻害されているところ、CD26 抗体によって、CD26 と SSTR4 の会合が解離すると、SSTR4 の抑制シグナルが発揮され、その結果、MPM 細胞の増殖、遊走、浸潤が L803087 によって抑制され、CD26 抗体と L803087 の併用による MPM への治療効果が発揮されるものと推測される。

(3) CD26 細胞内ドメインの発現レベルが異なる種々の MPM 細胞株を用いて、CD26 細胞内ドメインと相互作用してペリオスチンの転写を促進するシグナル分子や転写因子を解明するため、CD26 に会合するシグナル分子 Src を標的として解析を行った。まず、CD26 を内因性に発現する MPM 細胞株 (JMN, MES01) に対して、RNAi によって CD26 の発現を抑制するトランスフェクタントを用い、Src のリン酸化をウエスタン解析で評価したところ、CD26 の発現によって Src はリン酸化されているが、CD26 の発現を抑制すると Src のリン酸化も抑制された。また、CD26 陰性細胞株及び CD26 細胞内ドメイン削除変異体導入細胞株においても、Src のリン酸化は抑制されていた。すなわち、CD26 の細胞内ドメインを介した細胞内シグナル伝達機構により Src のリン酸化が行われていることが示唆された。Src の下流でペリオスチンの発現調節に關わる転写因子を探索するため細胞質及び核内タンパク質の探索を行ったところ、Twist1 の活性化が CD26-Src の下流でペリオスチンの発現を活性化していることを発見した。さらに、ペリオスチンの発現増強により、MPM 細胞の増殖、遊走、浸潤能が有意の増加することを示した。また、細胞外マトリックスのインテグリンやその結合タンパク CD9、ペリオスチンの相互作用を RNAi 実験により実証した。以上の結果は、CD26 によって MPM は内因性のペリオスチンを発現して、このペリオスチンを足場として周囲の微小環境と相互作用することにより、MPM の増殖、遊走、浸潤に深く関わっていることを示唆している。

以上の (1) ~ (3) の一連の結果から、MPM において、CD26 を中心とした細胞膜分子複合体は、SSTR4、CD9、Src 等から構成され、細胞の内外のシグナル分子を制御して MPM の細胞増殖、遊走、浸潤を制御していることが解明された (図 2)。その結果、CD26 抗体による MPM の治療は、これら癌細胞のシグナル及び癌微小環境を標的とした包括的なメカニズムにより、より効果的な作用を発揮することが明らかとなった (図 2)。



(4) CD26抗体によるMPM等の難治性癌に対する第1相臨床試験を実施したが、このときのサブ解析において、上記で同定した分子の発現を臨床検体で確認した。

本研究成果、特に、MPMにおけるSSTR4の発見は、内分泌腫瘍の治療で臨床応用されているソマトスタチンアナログによるMPM治療の可能性を示唆するものであり、従来の抗癌剤より安全で有効性の高い革新的治療法につながる。すなわち、アスベストは建築資材など様々な用途で使用されて、潜伏期20-40年を経てMPMを引き起こし、2006年に1050名であった死亡者数は2013年には1410名に増加し、最近、最高裁はアスベスト訴訟における国の賠償責任を認める判決を下し、大きな社会問題となっている。MPMは難治性腫瘍であり多くの新薬の臨床試験が行われているが、いまだ期待される新薬は登場していない。本研究成果は、ヒト化CD26抗体の併用療法として期待できる新たな分子基盤に基づく集学的治療法につながる。また、CD26分子は大腸がん、肺がん、肝がん、前立腺がん、卵巣・子宮体がん、悪性リンパ腫、白血病にも発現しており、多くのがんの病態解明や治療法の開発に発展し得る。さらに、CD26はMPMや大腸がん、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病のがん幹細胞のマーカーであり、がん幹細胞の関与が指摘されているこれらのがんにおいて、転移や再発などを防ぐ根治療法の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

Angevin E, Isambert N, Trillet-Lenoir V, You B, Alexandre J, Zalcmán G, Vielh P, Farace F, Valleix F, Podoll T, Kuramochi Y, Miyashita I, Hosono O, Dang NH, Ohnuma K, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C. First-in-Human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *Br J Cancer*. 2017; 116:1126-1134.

(doi: 10.1038/bjc.2017.62) 査読あり

Ohnuma K, Hatano R, Itoh T, Iwao N. Role of IL-26+CD26+CD4 T Cells in pulmonary chronic graft-versus-host disease and treatment with caveolin-1-Ig Fc conjugate. *Crit Rev Immunol*. 2016;36:239-267. (doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016018772) 査読有り

森本幾夫, 大沼圭. CD26分子に基づく悪性中皮腫への新治療法開発. *癌と化学療法*. 2016;43:855-862. 査読無し

大沼圭, 森本幾夫. 標的別分子標的薬モノクローナル抗体. *腎臓内科*. 2016;4:52-60. 査読無し

Hatano R, Ohnuma K, Otsuka H, Komiya E, Taki I, Iwata S, Dang NH, Okumura K, Morimoto C. CD26-mediated induction of EGR2 and IL-10 as potential regulatory mechanism for CD26 costimulatory pathway. *J Immunol*. 2015;194:960-972. (doi: 10.4049/jimmunol.1402143) 査読あり

〔図書〕(計1件)

Ohnuma K, Hatano R, Yamazaki H, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. CD-26 targeted Therapy: A New Horizon in Malignant Pleural Mesothelioma Management. In: *Horizons in Cancer Research* (Nova Science Publishers, Inc.). Vol 64: Chapter 6. 129-162, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/research/collaboration/result/kihukoza.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 圭 (OHNUMA, Kei)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 10396872

(2) 研究分担者

岩尾 憲明 (IWA0, Noriaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 00309139

岩田 哲史 (IWATA, Satoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号: 00396871