

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430157

研究課題名(和文) 難治性溶骨性骨転移のヒト化抗CD26モノクローナル抗体を用いた分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular-targeted therapy by humanized anti-CD26 monoclonal antibody in refractory osteolytic bone metastasis

研究代表者

西田 浩子(NISHIDA, HIROKO Nishida)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80317130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CD26は、正常ヒト破骨細胞に機能的に発現し、ヒトがんの溶骨性骨転移において、活性化破骨細胞に高発現する。CD26はヒト破骨細胞発生において、単球、マクロファージ、破骨前駆細胞、破骨細胞と、分化するにつれ発現が増強した。ヒト化抗CD26モノクローナル抗体は、破骨前駆細胞分化段階で作用し、RANK下流シグナルにおいて、細胞質内のMKK3/6、p38MAPKリン酸化、続く核内のmi/Mitfリン酸化を阻害し、TRAP発現を抑制し、破骨細胞への分化を阻害する一方、直接成熟破骨細胞に作用しなかった。ヒト化抗CD26抗体は、ヒト溶骨性骨腫瘍において、骨破壊抑制に有用な治療戦略となりうる。

研究成果の概要(英文)：CD26 is expressed on normal human osteoclasts (OCs) and is intensely expressed on activated OCs in osteolytic bone tumors. M-CSF and sRANKL induced human OC differentiation in association with CD26 expression on monocyte-macrophage lineage cells. CD26 expression was accompanied by increased phosphorylation of p38 MAPK, which was crucial for early human OC differentiation. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody, huCD26mAb, dose-dependently impaired the formation and function of TRAP/CD26 positive multi-nucleated OCs. It was revealed that huCD26mAb inhibited early OC differentiation via the inactivation of MKK3/6, p38 MAPK in the cytoplasm and subsequent dephosphorylation of mi/Mitf in the nucleus of human OC precursor cells, immediately after RANKL bound to RANK. However, it did not directly inhibit mature OCs. Our results suggest that targeting human OC precursor cells with huCD26mAb may have therapeutic potential for the treatment of osteolytic tumors to reduce bone destruction.

研究分野：血液内科学、腫瘍治療学

キーワード：CD26 破骨細胞 破骨前駆細胞 ヒト化抗CD26モノクローナル抗体 p38MAPK mi/Mitf 骨吸収 溶骨性骨転移

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨組織はカルシウムを蓄え、血清カルシウムが低下すると骨カルシウムが血中に動員され、血清カルシウムの恒常性が保たれる。健常人においては、通常、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成は均衡を保ちながら骨強度を維持している(骨のリモデリング)。ところが、多発性骨髄腫や腺癌、骨肉腫の骨髄微小環境では、腫瘍細胞の増殖とともに、骨芽細胞と破骨細胞の平衡状態が維持されず、骨吸収作用をもつ破骨細胞の活性化が亢進し、骨芽細胞の骨吸収が抑制され、骨破壊が急速に進行し、溶骨性骨転移病変が形成される。現在これらの疾患に対して、腫瘍細胞根絶のため治療に加え、骨髄微小環境を標的とした治療の研究が進み、活性化破骨細胞の骨吸収を抑制する目的で、新規分子標的療法の開発が期待されている。

(2) 破骨細胞には、様々な細胞表面分子の発現が認められるが、我々は、正常ヒト破骨細胞に CD26 が機能的に発現していることを初めて見出しさらに、多発性骨髄腫や乳癌などの溶骨性骨転移において、活性化破骨細胞に CD26 が高度に発現することを見出した。CD26 は分子量 110kDa の膜貫通型糖蛋白で DPPIV 活性を有し、T 細胞活性化に関与する。我々は、CD26 が広汎なヒトがんを発現しがん発症に関し、ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体が悪性中皮腫や悪性リンパ腫、腎細胞癌において、抗腫瘍効果があることを、既に報告した。実際、CD26 は正常ヒト造血幹細胞には発現がみられないが、単球、マクロファージに分化した段階で発現がみられ、そして、破骨前駆細胞、成熟破骨細胞と分化成熟が進むにつれ、発現が増強していくことも明らかとなり、CD26 が骨融解を媒介する因子として作用している可能性が示唆された。しかし、CD26 の骨代謝への影響についての検討はこれまでにない。溶骨性骨転移における骨病変の回復は困難で、骨破壊の抑制は、原病の新規治療の開発とともに、臨床上、重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、ヒト破骨細胞発生・分化・活性化における CD26 の発現と機能について解析を行い、溶骨性骨転移を有する悪性腫瘍において、ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体投与による骨融解抑制効果およびその作用機序を明らかにする。さらに、溶骨性骨転移において、ヒト化抗 CD26 抗体の効果を溶骨性骨転移モデルを用いて生体内で検討し、ヒト破骨細胞に発現する CD26 を標的とした新規分子標的療法の開発を行い、臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 正常ヒト破骨細胞発生・分化・活性化における CD26 の機能：

ヒト正常骨髄単核球に M-CSF、sRANKL を添加した培養系で、成熟破骨細胞の分化誘導をはかり(破骨細胞培養)、ヒト破骨細胞発生過程における CD26 発現の経時的推移を、フローサイトメトリー、免疫組織化学、ウエスタンブロット、ELISA を用い解析する。また、経時的に、培地中の TRAP-5b 活性及び collagen type1 測定を行い成熟破骨細胞の機能を ELISA を用い評価する。また、リン酸カルシウムと結合した蛍光標識コンドロイチン硫酸上で破骨細胞培養を行い、成熟破骨細胞の Pit 形成と面積および、培地中の蛍光強度を測定し骨吸収能評価を行う。次に、ヒト骨髄単核球に M-CSF 添加培養、成熟マクロファージ(破骨前駆細胞)を分化誘導する。そして sRANKL 添加刺激と同時(0 分)、15 分後、30 分後、60 分後につき細胞を回収し、細胞内の RANK 下流シグナルについて、破骨細胞分化シグナル関連蛋白の発現を、ウエスタンブロットを用い解析する。また、破骨細胞培養で得られた成熟破骨細胞においても破骨細胞分化・成熟に関連する蛋白の発現について解析を行う。

(2) ヒト化抗 CD26 モノクローナル投与のヒト破骨細胞発生・分化・活性化に及ぼす効果および機序の検討：

ヒト破骨細胞培養系に、ヒト化抗 CD26 抗体を添加し、抗体投与、さらに抗体濃度が破骨細胞分化および成熟に及ぼす効果、およびその作用時期を明らかにする。抗体投与開始時期は、(a)ヒト骨髄単核球、(b)マクロファージ(破骨前駆細胞)、(c)成熟破骨細胞とし、培養 10 日目に TRAP/CD26 染色を施行し、各々について、顕微鏡を用い多核破骨細胞数を計測し、破骨細胞機能(TRAP 活性、骨吸収能)の評価を行い、ヒト破骨細胞形成過程においてヒト化抗 CD26 抗体の作用する時期を明らかにする。

次に、ヒト化抗 CD26 抗体が破骨細胞形成を抑制する作用機序を明らかにするため、(b)マクロファージ(破骨前駆細胞)、(c)成熟破骨細胞について、細胞内の破骨細胞分化シグナル関連蛋白および核内転写因子発現、CD26 発現について、経時的な発現変化をウエスタンブロットを用い解析を行い、コントロールと比較し、ヒト破骨細胞分化・活性化を抑制するシグナル伝達経路を解明する。さらに、ヒト化抗 CD26 抗体より精製した F(ab)<sub>2</sub>、p38MAPK 阻害剤、DPPIV 阻害剤のヒト破骨細胞分化・活性化に及ぼす効果についても解析する。

ヒト多発性骨髄腫患者由来骨髄単核球を用い、同様に破骨細胞培養を行い、ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体投与による骨融解抑制効果及び作用機序を検討する。

(3) ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体の in vivo での治療効果の検討：ヒト溶骨性骨転移モデルマウスは、ヒト骨髄腫病変と骨破壊

病変を形成する NOD/SCID-hu 骨髄腫モデルを用いる。NOD/SCID マウス皮下にヒト骨片を移植し、4 週後生着が得られたら、骨片内にヒト骨髄腫細胞株を直接移植し作成する。そして腫瘍増殖確認後、ヒト化抗 CD26 抗体を  $200 \mu\text{g/dose}$  で腹腔内投与を週 3 回、4 週投与を行い、病理組織、骨形態学的評価、 $\mu\text{CT}$  を行い、骨髄腫骨病変に及ぼす効果を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 正常ヒト破骨細胞発生・分化・活性化における CD26 の機能：

ヒト正常骨髄、骨折患者より得られた骨髄、さらに、溶骨性骨腫瘍として骨肉腫、腺癌、多発性骨髄腫より得られた骨髄において免疫染色を施行すると、TRAP 陽性(図 1-1A)かつ CD26 免疫染色陽性(図 1-1B-F, G; TRAP+/CD26+)の破骨細胞が認められ、これらは、ビトロネクチン受容体陽性(図 1-1H)、カルシトニン受容体陽性(図 1-1I)を呈した。さらに、ヒト正常骨髄単核球を用い、破骨細胞培養を行うと、培養 3 日目にはマクロファージが分化し、培養 7 日目には、大型の成熟多核破骨細胞が分化し(図 1-2A)、これらは、酵素組織化学を用いた染色で TRAP 陽性、かつ免疫染色で CD26 陽性を示した(図 1-2B)。フローサイトメトリーによる解析でも、破骨細胞培養において、単球、マクロファージ、破骨前駆細胞、破骨細胞と分化するにつれ、CD26 発現は増加し、培養 7 日目には CD26 陽性細胞は 72.2%と増加し(図 2-1)、成熟破骨細胞と考えられた。PCR による解析でも同様に、破骨細胞は、TRAP かつ CD26 発現がみられ、同時に、NFATc1, CathepsinK, DC-STAMP, C-Fos, C-Jun,  $\alpha\text{v-Integrin}$ , MMP9 など破骨細胞分化成熟に関わる遺伝子発現が認められた。次に、破骨細胞機能評価のため、蛍光標識コンドロイチン硫酸で標識したリン酸カルシウム固着プレート上で破骨細胞培養を行うと、成熟破骨細胞分化に伴い、pit 形成がみられ、培養上清の蛍光強度は増強した。また、ELISA を用い TRAP, Collagen type1 活性の定量解析では、著明な増加を認めた。

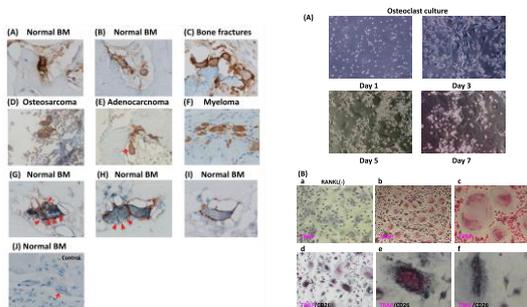


図 1-1

図 1-2

##### (2) ヒト化抗 CD26 モノクローナル投与のヒト破骨細胞発生・分化・活性化に及ぼす効果および機序の検討：

ヒト破骨細胞培養において、培養開始とともに

ヒト化抗 CD26 抗体( $0,0.1,1.0,10 \mu\text{g/ml}$ )添加を行うと、培養開始 7 日目には、コントロール群と比較し、添加した抗体濃度依存性に多核破骨細胞数は有意に減少し、特に、8 核以上の成熟破骨細胞数の減少は顕著であった(図 2-2A,C,D)。フローサイトメトリーでは、培養 7 日目には CD26 陽性細胞は 14.8%と減少を認めた(図 2-3)。そして、リン酸カルシウム上で行った破骨細胞培養では、抗体濃度依存性に pit 形成の減少、培養上清の蛍光強度の減少がみられ、ELISA をを用いた破骨細胞機能の定量評価でも TRAP 活性、Collagen type1 活性の低下を認めた(図 2-4B-G)。PCR では、破骨細胞分化成熟と関連する TRAP, CD26, NFATc1, CathepsinK, DC-STAMP, C-Fos,  $\alpha\text{v-Integrin}$ , MMP9 の発現は低下した(図 3-1)。

一方、破骨細胞培養開始 5 日目(破骨前駆細胞つまり単核破骨細胞が分化した後)よりヒト化抗 CD26 抗体投与を行うと、7 日目、10 日目には、抗体濃度によらず、多核破骨細胞数の有意な減少はみられなかった(図 2-3E)。さらに、培養開始 8 日目(成熟多核破骨細胞が分化後)よりヒト化抗 CD26 抗体投与を行うと、培養 10 日目に、抗体濃度によらず、多核破骨細胞数の有意な減少はみられなかった。フローサイトメトリーを用いた解析でも、CD26 陽性細胞は破骨細胞培養 7 日目には、CD26 陽性細胞は 71.3%と増加し(図 2-3B)、コントロールと比較し有意差を認めなかった。リン酸カルシウム上で行った破骨細胞培養でも、破骨前駆細胞分化後(day5)、成熟破骨細胞分化後(day7)よりヒト化抗 CD26 抗体添加を行うと、いずれも、pit 形成、培養上清の蛍光強度の有意な抑制はみられず(図 2-4B-D)、ELISA でも TRAP 活性および Collagen type1 活性の有意な抑制はみられず、破骨細胞機能は維持された(図 2-4F-G)。ウエスタンブロットでも、同様の結果を得た(図 3-2A)

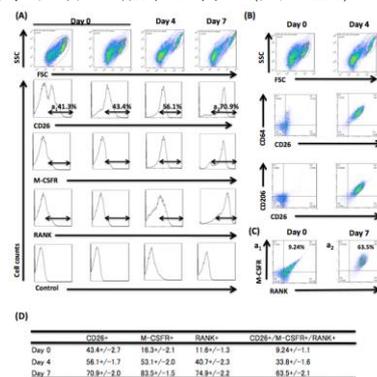


図 2-1

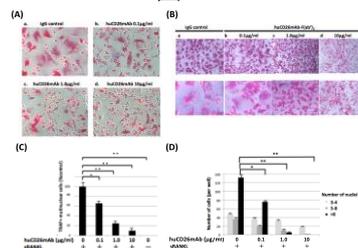


図 2-2

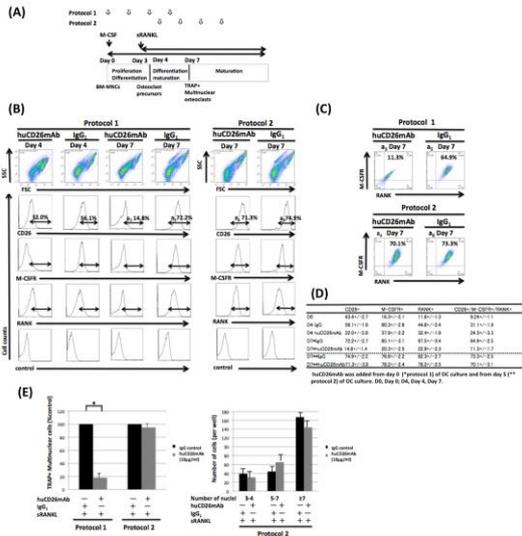


図 2-3

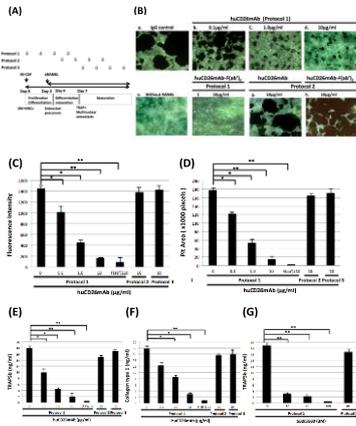


図 2-4

以上より、ヒト化抗 CD26 抗体は、破骨細胞形成の後期の成熟段階より前期の分化段階に参与する可能性が示唆された。そこで、ヒト破骨細胞形成過程において、RANK 下流シグナル伝達経路と関連する MAP キナーゼ発現にヒト抗 CD26 抗体が及ぼす効果をウエスタンブロットを用い解析を行った。つまり、破骨細胞培養 day3 に得られた破骨前駆細胞に、RANKL 刺激開始直前、15 分、30 分、60 分後に細胞質内の MKK3/6 および p38MAPK リン酸化、それに続き、核内の mi/Mitf リン酸化が認められ RANKL 刺激 24 時間後まで維持されたのに対し、抗 CD26 抗体投与したでは、RANKL 刺激後の MKK3/6 および p38MAPK リン酸化は速やかに抑制され、続き mi/Mitf リン酸化も抑制されることがわかった(図 3-2B,C)。他の MAP キナーゼとして SAPK/JNK, ERK, IKK $\beta$  リン酸化は抑制は抗体投与によらず維持された。これらは、p38M 一方、破骨細胞培養 day7 に得られた成熟破骨細胞では、抗 CD26 抗体投与の如何によらず、MKK3/6、p38MAPK および mi/Mitf リン酸化はみられなかった。以上の結果は、ヒト化抗 CD26 抗体の Fc 部分を欠損した F(ab) $'_2$  および p38MAPK 阻害剤投与が破骨細胞分化、破骨

細胞機能に及ぼす効果を検討したところ、ヒト化抗 CD26 抗体投与下と同様の結果を得た(図 3-2D)。一方、DPPIV 阻害剤投与下では、破骨細胞培養において、破骨細胞分化が見られ、CD26 が有する DPPIV 酵素活性の抑制と、破骨細胞分化抑制との関連は否定的であった(図 3-2D-F)。

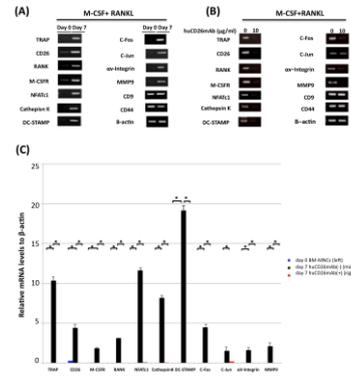


図 3-1

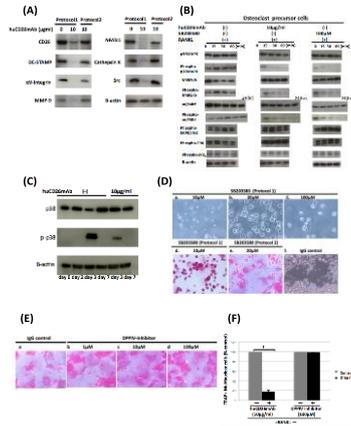


図 3-2

ヒト多発性骨髄腫患者より得られた骨髄単核球を用いて行った破骨細胞培養においても、同様に、大型の成熟多核破骨細胞形成が得られ、ヒト化抗 CD26 抗体投与及びこうした CD26 抗体より得られた F(ab) $'_2$  により、破骨細胞分化抑制が得られた。

(3) ヒト化抗 CD26 モノクローナ抗体の in vivo での治療効果の検討：

ヒト正常骨片を NOD/SCID マウス皮下に移植後、骨片骨髄内にヒト骨髄腫細胞株 KMS18 細胞を直接注入し作成した NOD/SCID-hu 骨髄腫モデルマウスにおいて、腫瘍増殖確認後 (4 週後)、ヒト化抗 CD26 抗体(200 $\mu$ g dose/回、隔日)を、4 週腹腔内投与を行い、in vivo での治療効果を検討した。コントロールでは腫瘍進展とともに、破骨細胞活性化が見られ、骨融解が進行していたが、抗体投与群では、病理組織上、骨髄内の TRAP 陽性破骨細胞数は減少し、骨融解病変形成の抑制が得られた。よって、骨髄腫マウスモデルにおいて、腫瘍進展に伴う骨破壊の進行に対し、ヒト化抗 CD26 抗体の治療効果が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 西田浩子、遠藤聖、波多野まみ、立川伸雄、間嶋絵梨、橋田里妙、堀眞佐男、小原克之。孤立性中枢神経再発をきたした II 型腸症関連 T 細胞性リンパ腫。 **臨床血液**. 56, 692-698, 2015. 査読有
2. Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Blockade of CD26 signaling inhibits human osteoclast development. **J Bone Miner Res**. 29, 2439-2455, 2014. 査読有
3. Nishida H, Hashida R, Hatano M, Hori M, Obara K. Optic nerve involvement of Waldenström's macroglobulinemia - with autopsy findings. **Neurol Sci**. 35, 1299-1302, 2014. 査読有
4. Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear localization of CD26 induced by a humanized monoclonal antibody inhibits tumor cell growth by modulating of POLR2A transcription. **PLoS One**. 8, e62304, 2013. 査読有
5. Nishida H, Sakauchi M, Nemoto M, Hatano M, Koyama K, Hori M, Obara K. A report of 2 cases of disseminated invasive aspergillosis with myocarditis in immunocompromised patients. **OJPathology**. 3, 166-169, 2013. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. CD26 is a novel target for the treatment of tumor progression and its related osteolytic bone disease. 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 12/5/2015. Orlando, FL, USA.
2. Nishida H, Madokoro H, Suzuki H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Blockade of CD26 signaling using humanized antibody reduces myeloma cell growth and its bone disease. 第 77 回日本血液学会学術集会. 10/18/2015. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢 (石川県金沢市) .
3. Nishida H, Hashida R, Hatano M, Hori M, Obara K. Optic nerve involvement of Waldenström's macroglobulinemia. 第 77 回日本血液学会学術集会. 10/16/2015. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢 (石川県金沢市) .
4. Hayashi M, Yamada K, Nishida H, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Antitumor activity of anti-CD26 humanized monoclonal antibody conjugated with triplide via intranuclear transportation. 第 74 回日本癌学会学術集会. 10/10/2015. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) .
5. 西田浩子、間所裕子、林睦、坂本亨宇、

山田健人。破骨細胞による骨髄腫細胞の CD26 発現誘導と細胞増殖・生存の亢進～ヒト化抗 CD26 抗体療法を目指して。第 104 回日本病理学会総会. 5/2/2015. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) .

6. Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody blocks osteoclast differentiation in multiple myeloma. 第 76 回日本血液学会学術集会. 11/1/2014. ロイトン札幌 (北海道札幌市) .
7. Nishida H, Hori M, Hatano M, Yamaguchi K, Obara K. Sustained complete remission in a patient with primary B-cell lymphoma of the caudal equina. 第 76 回日本血液学会学術集会. 11/1/2014. ロイトン札幌 (北海道札幌市) .
8. Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Targeting CD26 on both osteoclast and tumor cell in osteolytic bone metastasis with humanized anti-CD26 monoclonal antibody. 第 73 回日本癌学会学術集会. 9/27/2014. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) .
9. 西田浩子、林睦、坂本亨宇、山田健人。ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体によるヒト破骨細胞分化抑制。第 103 回日本病理学会総会. 4/24/2014. 広島国際会議場 (広島県広島市) .
10. Nishida H, Suzuki H, Madokoro H, Hayashi M, Morimoto M, Sakamoto M, Yamada T. Humanized Anti-CD26 Monoclonal Antibody Inhibits Osteoclast Bone Resorption Activity via Blockade of P38MAPK Signaling in Multiple Myeloma. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 12/7/2013. New Orleans, LO, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 浩子 (NISHIDA, Hiroko)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80317130

### (2) 研究分担者

山田 健人 (YAMADA, Taketo)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60230463