

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

【ヒト化 CD26 抗体投与患者検体の可溶性 CD26/DDPⅣ 酵素測定法の開発】

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 客員教授

共同研究者 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 准教授

共同研究者 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 博士研究員

**研究要旨**

可溶性 CD26 は DPPIV 酵素活性を含み、血清及び胸水中に存在する。現在糖尿病治療薬として DPPIV 酵素阻害薬が広く用いられているが、ヒト化 CD26 抗体投与では血清中の可溶性 CD26 値及び DPPIV 酵素値を治療経過でモニターしていくことは抗体療法が安全に行われるために必須である。

従来の可溶性 CD26 測定 ELISA 法及び市販の ELISA キットともに正常人血清中にヒト化 CD26 抗体が存在するとブロックされ測定不能であったが、9C11 という新しい CD26 抗体を従来用いていたヒト化 CD26 抗体と同一エピトープの 1F7 に置き換えて ELISA を行くと、ヒト化抗体存在下でも可溶性 CD26 は測定可能であり、新しい ELISA 系を確立した。この ELISA 系は従来の ELISA 系と比しても同等の測定感度を持ち、市販の ELISA キットよりも格段に感度は高かった。フランスの第 Ⅲ 相臨床試験が終了したのでヒト化 CD26 抗体投与の全検体について患者血清中の可溶性 CD26/DDPⅣ 酵素値を測定したところ、新しい ELISA 系はヒト化抗体存在下でも測定が可能であり、さらにヒト化 CD26 抗体の投与量が増加するにつれて可溶性 CD26/DDPⅣ 値は低下する傾向にあった。可溶性 CD26 ELISA キットの性能試験は良好であるが DPPIV 酵素活性測定キットの性能については血清中の干渉因子がその測定に一部影響する可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

CD26 分子は DPPIV 酵素を含む T 細胞活性化分子で、我々は単クローン CD26 抗体の開発、CD26 cDNA の単離を世界に先駆けて行った。この研究過程で悪性中皮腫細胞株

が CD26 を発現していることを偶然発見した。更に高親和性で生物学的活性の強い良質なヒト化 CD26 抗体(YS110)を開発した。本抗体は *in vitro* で中皮種細胞株の増殖を抑制し、中皮腫株移植免疫不全マウスに投与し

たところ腫瘍縮小と生存延長をきたした。実際の悪性中皮腫患者病理組織では正常中皮では発現のない CD26 が悪性中皮腫、特に上皮型では 8 割以上に発現していることを見出し、本抗体が悪性中皮腫の新規治療法として有望な可能性が強く示唆された。

悪性中皮腫はアスベストばく露により引き起こされ、今後益々増加すると予想され、死亡者数も 2013 年には 1425 名にのぼり、大きな社会問題となっている。予後はきわめて不良で平均生存期間は約 1 年で、新規かつ有効な治療法開発は急務である。

我々は悪性中皮腫への新規治療法候補としてヒト化 CD26 抗体を開発し、フランスで悪性中皮腫及びその他 CD26 陽性悪性腫瘍患者を中心として第 1 相臨床試験を施行していたが、平成 26 年 9 月に終了し、安全性が確認され、更に期待される効果を示唆する結果も得られ、本邦でもできるだけ早期に臨床試験が施行できるように現在計画中である。

可溶性 CD26(sCD26)は DPPIV 酵素活性を含み、血清及び胸水中に存在する。現在糖尿病治療薬として DPPIV 酵素阻害薬が広く用いられているが、ヒト化 CD26 抗体を投与すると血清中の sCD26 と反応し、sCD26 値及び DPPIV 酵素値が減少することが予想されるため、sCD26、DPPIV 酵素値を治療経過でモニターしていくことは安全に抗体療法が行われるために必須である。

sCD26 レベル測定系として異なるエピトープと反応する CD26 抗体 5F8 及び 1F7 を用いたサンドイッチ ELISA 系を確立した (J.Rheumatol.29:1855,2002)。しかしヒト化 CD26 抗体治療患者では血清中の sCD26 にヒト化 CD26 抗体が結合するため、ヒト

化抗体と同じエピトープを認識する 1F7 を用いる従来の ELISA 系では(5F8 は異なる)競合し、sCD26 は測定は不可能であった。さらに市販の sCD26 測定キットにおいてもヒト化 CD26 抗体存在下では測定はできなかった。昨年度に従来の CD26 単クローン抗体 1F7 と異なるエピトープを持つ CD26 抗体 9C11 を見出し、本抗体を用いることで、ヒト化 CD26 抗体存在下でも sCD26 が測定できる ELISA 系を開発した。昨年度はフランスの第 1 相臨床試験患者サンプルも測定可能なことを明らかにしたが本年度は第 1 相臨床試験も終了したので、全てのサンプルの測定及び可溶性 CD26 ELISA 法及び DPPIV 酵素活性値測定法の性能試験データ及び手順簡便化の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 抗体

CD26 抗体である 1F7、5F8 及び 9C11 は当研究室で開発された。ヒト化 CD26 抗体(YS110)は Y's セラピューティクス社から供与された。

### 2) 可溶性 CD26 ELISA 及び DPPIV 酵素活性測定アッセイ

【可溶性 CD26 の測定 <サンドイッチ ELISA >】

#### 1. 捕捉抗体プレートの作成

96 穴平底プレートに、5µg/ml の捕捉抗体 (CD26 単クローン抗体 5F8)を各穴 100µl ずつ分注し、4℃で一晩静置する。

#### 2. 捕捉抗体プレートのブロッキング

上記 1 のプレートを各穴 300µl の PBS-Tween で 3 回洗浄後、200µl のブロッキングバッファーを分注し、室温で 2 時間

静置し、各穴 300 $\mu$ l の PBS-Tween で 3 回洗  
浄して 3 の検体分注に供する。

### 3. 血清及び標準曲線用組換え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween20 で 20 倍に希釈した対象血  
清を 100 $\mu$ l ずつ 2 穴に分注する。標準曲線  
を作成するため、段階希釈 (500, 250, 125,  
62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95, 0.98, 0.49, 0  
ng/ml) した組換え可溶性 CD26 標準試薬  
(R&D systems, Inc.) を 100 $\mu$ l ずつ 2 穴に  
分注する。プレートを密封し、4 で一晩静  
置する。

### 4. 可溶性 CD26 の測定

上記 3 のプレートを各穴 300 $\mu$ l の  
PBS-Tween で 3 回洗浄後、0.5 $\mu$ g/ml の検出  
抗体 (ビオチン化 CD26 単クローン抗体  
9C11 あるいは 1F7) を各穴 100 $\mu$ l ずつ分注  
し、室温で 2 時間静置する。300 $\mu$ l の  
PBS-Tween で 3 回洗浄後、1 万倍希釈した  
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase 液を  
100 $\mu$ l ずつ分注する。プレートを遮光して、  
室温で 1 時間静置する。300 $\mu$ l の PBS-Tween  
で 3 回洗浄後、PNPP を 100 $\mu$ l ずつ分注し、  
遮光して室温で 10 分間静置した後、  
2N-NaOH 溶液を 100 $\mu$ l ずつ分注して、発  
行反応を停止させる。プレートリーダーで吸  
光度を測定する (吸光度 405nm、レファレン  
ス 655nm)。

#### 【DPPIV 酵素活性の測定】

1. 捕捉抗体プレートの作成とブロッキング  
上記 2) の 1 及び 2 と同様に捕捉抗体プレ  
ートを作成し、ブロッキングをする。
2. 血清及びポジティブコントロール用組換  
え可溶性 CD26 の添加

PBS-Tween で 10 倍に希釈した対象血清

を 100 $\mu$ l ずつ 2 穴に分注する。ポジティブ  
コントロールとして 500ng/ml に調整した  
組換え可溶性 CD26 標準試薬 (R&D  
systems, Inc.) を 100 $\mu$ l ずつ 2 穴に分注す  
る。プレートを密封し、4 で一晩静置する。

### 3. DPPIV 酵素活性の測定

上記 2 のプレートを各穴 300 $\mu$ l の  
PBS-Tween で 3 回洗浄後、1mg/ml に調整  
した Gly-Pro-pNA を血清及びポジティブコ  
ントロールを添加したウェルに 150 $\mu$ l ずつ  
分注する。標準曲線を作成するため、段階希  
釈 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6,  
7.8, 3.9, 0  $\mu$ M) した pNA 溶液を 150 $\mu$ l ずつ  
分注する。直ちにプレートリーダーで吸光度  
を測定する (吸光度 405nm、レファレンス  
655nm)。その後 75 分後まで (15 分毎に)  
吸光度を測定し、DPPIV 活性 ( $\mu$ M/min)  
を計測する。

#### 【比較対照とした既存の市販測定キット】

a) R & D Systems, Inc.

キ ャ ッ ト 名 : Quantikine Human  
CD26/DPPIV Immunoassay

捕捉抗体: 抗ヒト CD26 単クローン抗体

検出抗体: HRP 標識・抗ヒト CD26 ポリク  
ローナル抗体

発色: 化学発光 (吸光度 450nm)

b) Bender MedSystems GmbH (現  
eBioscience)

キ ャ ッ ト 名 : Human sCD26 Platinum  
ELISA

捕捉抗体: 抗ヒト CD26 単クローン抗体

検出抗体: ビオチン化抗ヒト CD26 単ク  
ローン抗体、Streptavidin-HRP

発色: 化学発光 (吸光度 450nm)

3) 健常人血清、本邦患者検体及びフランス  
の第 相臨床試験の患者血清について

健常人血清は研究室で働く研究者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。

悪性中皮腫患者血清、胸水は1998年から2011年までに岡山労災病院及び山口宇部医療センターにおいて悪性中皮腫として診断・治療を受けた症例でインフォームドコンセントを得られた症例を用いている。

フランスでの第 相臨床試験は平成 21 年 1 月からスタートして、第 6 コホートからなり、第 1 コホート 0.1mg/kg、第 2 コホート 0.4mg/kg、第 3 コホート 1mg/kg、第 4 コホート 2mg/kg、第 5 コホート 4mg/kg、第 6 コホート 6mg/kg で各コホートは 3 症例からなっている。第 4 コホートの途中までは 2 週間ごとの 1 ヶ月間月 3 回投与であった。その後第 4 コホートの途中から 1 ヶ月間毎週投与で月 5 回投与とプロトコールの変更を行っている。平成 26 年 9 月に第 相臨床試験は終了した。合計 34 例の標準治療に抵抗性の悪性中皮腫患者( 23 例 )腎癌( 10 例 )、膀胱移行上皮癌( 1 例 )であった。

(倫理面への配慮)

本研究の、特に臨床研究においては、文書により被験患者本人の同意を得た上で行うものとする。本研究にまつわる個人情報には厳重な管理のもと守秘義務を遵守する。また解析検討結果を公表する際には個人名の漏えい防止を徹底し、プライバシーの保護に努める。さらに個人に帰属する結果を個人に求められた場合には、その個人本人のもののみ伝達する旨である。

なお、フランスで実施されているヒト化 CD26 抗体投与の第 相臨床試験における対象症例血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 活性の測定及びコントロール症例の可溶性

CD26 及び DPPIV 酵素活性の測定については順天堂大学の倫理審査委員会の審査にて承認されている(順天医倫第 2012076 及び 2012087)。検体の使用は患者の同意が得られているかあるいは岡山労災病院、山口宇部医療センターの臨床研究審査委員会で承認を得て研究内容について院内掲示などで周知を図った。

試料を匿名化することで個人のプライバシーが漏れることのないように配慮した。

### C. 研究結果

1) フランスの第 相臨床試験の患者血清中の可溶性 CD26 及び DPPIV 酵素活性値

フランスの第 相臨床試験患者検体は第 4 コホート途中までの 1 ヶ月隔週投与例ではヒト化 CD26 抗体投与前、投与直後、2 日後、15 日後投与前、投与直後の血清、第 4 コホート途中以後はヒト化 CD26 抗体は 1 ヶ月毎週投与となったため、ヒト化 CD26 抗体投与前、投与直後、2 日後、15 日後投与前、投与直後、29 日後投与前、投与直後の血清からなり、新しい ELISA 法にて可溶性 CD26 及び DPPIV 値を測定した。図 1 にヒト化 CD26 抗体の血清中濃度、図 2 に可溶性 CD26 の血清中濃度を示した。ヒト化 CD26 抗体はコホートが上がり、投与濃度が増加するにつれ、血中濃度も上昇していた。それに対応して可溶性 CD26 濃度は低下していることが観察された。DPPIV 酵素活性についても可溶性 CD26 濃度に並行して動き低下していくことが明らかとなった(図 3)。

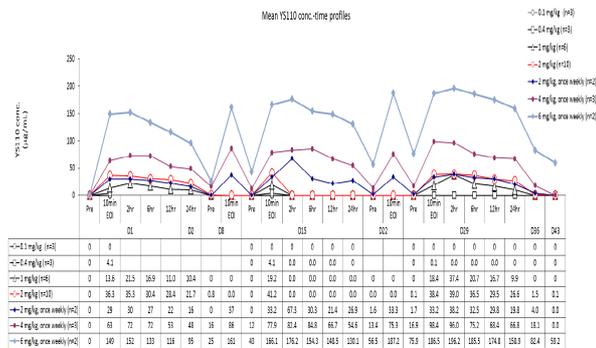


図1 ヒト化CD26抗体の血清中濃度平均値の推移

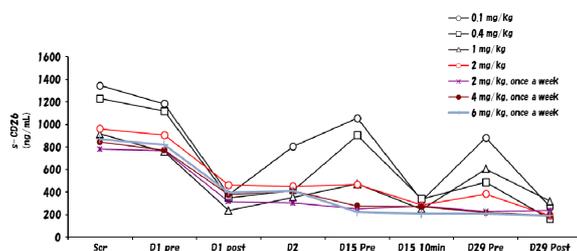


図2 可溶性CD26の血清中平均濃度の推移

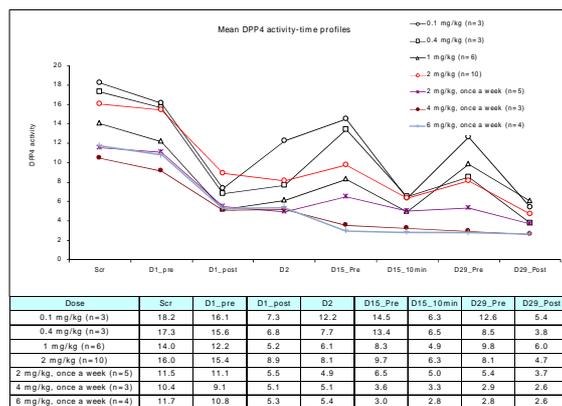


図3 DPPIV酵素活性の血清中平均値の推移

## 2) 可溶性 CD26 ELISA アッセイの性能試験と測定時間の簡便化

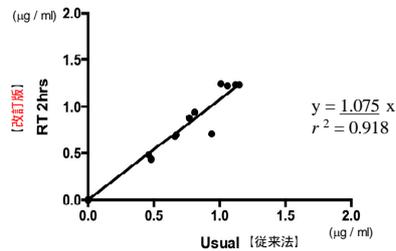
4 種類の濃度の標準試料 (5, 50, 150, 400ng/ml) を同時に 8 回測定することで同時再現性試験とした。表 1 に示したように変動係数 (CV: Coefficient of variation) は

10%以下と良好な結果を示した。次に 4 種類の濃度の標準試料 (5, 50, 150, 400ng/ml) を 5 回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。表 2 に示したように変動係数 (CV) が 10%以下と良好な結果を示した。添加回収試験 (Recovery) と直線性試験 (Linearity) について添加回収試験 (Recovery) は R&D system 社の Spike and Recovery Test protocol に従って実地した (図 4-1)。「試料」は健康成人血清を 20 倍希釈したものを使用。「添加あり」は recombinant CD26 (R&D#1180-SE) を最終濃度 (50ng/ml) になるようにサンプルに添加した。図 4-2 に結果を示したが Recovery は回収率 80~120%範囲内と良好な結果を示した。更に Linearity についても図 4-2 に結果を示したが直線性 80~120%範囲内と良好な結果を示した。健康成人の血清検体の 2 週間までの 4 保存及び血清検体を 10 回まで凍結融解をくり回したが共に測定値の変化は認められなかった(データは未表示)。可溶性 CD26 定量 ELISA アッセイの性能試験のまとめであるが性能試験の結果は良好であった。すなわち検量線、血清検体、捕捉抗体、検出抗体、希釈液等いずれも適切であると言える。最後に可溶性 CD26 濃度測定 ELISA アッセイの短縮化の検討を行った。検体反応について従来法は一晩・静置・4 で施行したが改訂版として 2 時間穏やかに振盪・室温で行い、健康成人血清 11 例について検討した。図 5 に示すように可溶性 CD26 測定は室温 2 時間の検体反応時間で従来法と同等の測定結果が得られた。以上より可溶性 CD26 測定に関して検体反応時間は一晩から 2 時間まで短縮可能である。

**表1 同時再現性試験(Intra-assay):可溶性CD26定量アッセイ**

標準試料	テスト1	テスト2	テスト3	テスト4	テスト5	テスト6	テスト7	テスト8	Mean	SD	CV (%)
5 ng/ml	5.33	4.96	4.62	4.85	5.06	5.04	4.89	5.06	4.98	0.20	4.09
50 ng/ml	48.50	50.98	49.30	51.20	51.47	51.60	51.68	53.58	51.04	1.55	3.04
150 ng/ml	142.47	155.10	153.40	152.34	159.13	156.74	155.68	162.53	154.67	5.89	3.81
400 ng/ml	388.49	399.37	398.86	417.97	392.53	406.96	390.13	418.48	401.60	11.83	2.95

4種類の濃度の標準試料(5, 50, 150, 400ng/ml)を同時に8回測定することで同時再現性試験とした。  
変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。



**図5 可溶性CD26測定値の比較(従来法 v.s. 改訂版)**

可溶性CD26測定は、室温2時間の検体反応時間で従来法と同等の測定結果が得られた。

可溶性CD26測定に関して、検体反応時間は一晩から2時間まで短縮可能である。

**表2 測定間再現性試験(Inter-assay):可溶性CD26定量アッセイ**

標準試料	プレート1	プレート2	プレート3	プレート4	プレート5	Mean	SD	CV (%)
5 ng/ml	4.89	5.02	5.33	5.06	4.89	5.04	0.18	3.55
50 ng/ml	50.27	49.62	48.50	49.60	49.79	49.56	0.65	1.31
150 ng/ml	150.54	154.83	142.47	149.57	148.05	149.09	4.48	3.00
400 ng/ml	396.01	394.05	388.49	395.09	411.59	397.05	8.64	2.18

4種類の濃度の標準試料(5, 50, 150, 400ng/ml)を5回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。  
変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。

### 3) DPPIV 酵素活性アッセイの性能試験と測定時間の簡便化

可溶性 CD26 同様に 4 種類の濃度の標準試料 (10, 100, 300, 800ng/ml) を同時に 6 回測定することで同時再現性試験とした。表 3 に示したように 100ng/ml~800ng/ml では

変動係数 CV が 10% 以下と良好な結果を示した。しかし極低濃度 (10ng/ml) では、ばらつきが大きかった。次に 4 種類の濃度の標準試料 (10, 100, 300, 800ng/ml) を 5 回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。表 4 に示すように 100ng/ml ~ 800ng/ml では変動係数 CV が 10% 以下と良好な結果を示した。しかし極低濃 (10ng/ml) ではばらつきが大きかった。添加回収試験 (Recovery) と直線性試験 (Linearity) に

ついて添加回収試験 (Recovery) は R&D system 社の Spike and Recovery Test protocol に従って実施した (図 4-1 参照)。「試料」は健常成人血清を 10 倍希釈したものを使用。「添加あり」は recombinant CD26 (R&D#1180-SE) を最終濃度 500ng/ml になるようにサンプルに添加した。Recovery は

図 6 上段に示すように回収率 80~120% 範囲内と良好な結果を示した。しかし「希釈なし」はやや不良であった。Linearity については図 6 下段に示すように添加なしの試料の直

#### 1) アッセイの実施

キット付属のプロトコルに従い、で調整した試料を用いてアッセイを行います  
プレートのウェル配置図

	1	2	3	4	5	6
A	スタンダード1		試料(添加あり)		コントロール(添加あり)	
B	スタンダード2	1:2 希釈の試料(添加あり)			1:2 希釈の試料(添加あり)	
C	スタンダード3	1:4 希釈の試料(添加あり)			1:4 希釈の試料(添加あり)	
D	スタンダード4	1:8 希釈の試料(添加あり)			1:8 希釈の試料(添加あり)	
E	スタンダード5		試料(添加なし)			
F	スタンダード6	1:2 希釈の試料(添加あり)				
G	スタンダード7	1:4 希釈の試料(添加あり)				
H	ブランク	1:8 希釈の試料(添加あり)				

#### 2) 測定値の算出・解析

以下の計算式を使用して、測定値を算出し、解析を行います

##### 1. 添加回収試験

$$\text{回収率 (\% Recovery)} = \frac{\text{「試料(添加あり)」の測定値} - \text{「試料(添加なし)」の測定値}}{\text{添加した標準物質の量}} \times 100$$

##### 2. 直線性試験

・「試料(添加あり)」の直線性を検討する場合、「試料(添加あり)」の測定値を「予測値とする」  
・「試料(添加なし)」の直線性を検討する場合、「試料(添加なし)」の測定値を「予測値とする」

$$1:2 \text{ 希釈の回収率 (\%)} = \frac{1:2 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 2} \times 100$$

$$1:4 \text{ 希釈の回収率 (\%)} = \frac{1:4 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 4} \times 100$$

$$1:8 \text{ 希釈の回収率 (\%)} = \frac{1:8 \text{ 希釈試料の測定値}}{\text{予測値} \div 8} \times 100$$

**図4-1 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)の実施方法**

#### 添加回収試験(Recovery)

	試料(添加あり)	試料(添加なし)	回収率(%)
希釈なし	83.19	37.89	95.17
1/2希釈	43.13	20.39	98.44
1/4希釈	21.29	11.10	90.98
1/8希釈	11.72	4.83	109.19

回収率 80 ~ 120% 範囲内と良好な結果を示した。

#### 直線性試験(Linearity)

		直線性 (%)
試料(添加あり)	1/2希釈	103.69
	1/4希釈	102.37
	1/8希釈	112.71
試料(添加なし)	1/2希釈	107.63
	1/4希釈	117.18
	1/8希釈	101.98

直線性 80 ~ 120% 範囲内と良好な結果を示した。

**図4-2 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)**

添加回収試験(recovery)はR&D Systems社のSpike and Recovery Test Protocolに従って実施した。「試料」は健常成人血清(を20倍希釈したもの)を使用。「添加あり」はrecombinant CD26を最終濃度50ng/mLになるようにサンプルに添加した。

線性は良好な結果を示した。添加ありの試料の直線性はやや不良であった。健常成人の血清検体を4で保存してDPPIV酵素活性を検討したところ2週間までは測定値の変化は認められなかった。次に健常成人の血清検体を10回まで凍結融解をくり返したが、測定値の変化は認められなかった。最後にDPPIV酵素活性測定アッセイの測定時間の短縮化の検討を行った。従来の検体反応時間は一晩・静置・4で施行していたが2時間・穏やかに振盪、室温に変更して健常成人血清11例についてDPPIV酵素活性値を測定した。図7に示すようにDPPIV酵素活性は室温2時間の検体反応条件では低く測定されることが明らかになった。

表3 同時再現性試験(Intra-assay) : DPPIV酵素活性アッセイの性能試験

標準試料	テスト1	テスト2	テスト3	テスト4	テスト5	テスト6	Mean	SD	CV (%)
10 ng/ml	0.41	0.19	0.26	0.24	0.32	0.25	0.278	0.077	27.59
100 ng/ml	1.77	1.84	1.49	1.59	1.5	1.6	1.632	0.143	8.78
300 ng/ml	3.87	3.54	3.5	3.63	3.66	3.78	3.663	0.141	3.85
800 ng/ml	5.57	6.04	5.74	5.88	6.71	5.72	5.943	0.408	6.86

4種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を同時に6回測定することで同時再現性試験とした。DPPIV酵素活性値は $\mu\text{M}/\text{min}$ で表示した。

100ng/ml~800ng/mlでは変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。極低濃度(10ng/ml)ではバラつきが大きかった。

表4 測定間再現性試験(Inter-assay) : DPPIV酵素活性アッセイの性能試験

標準試料	プレート1	プレート2	プレート3	プレート4	プレート5	Mean	SD	CV (%)
10 ng/ml	0.28	0.33	0.24	0.23	0.30	0.27	0.04	14.69
100 ng/ml	1.63	1.99	1.86	1.77	1.82	1.81	0.13	7.17
300 ng/ml	3.66	3.68	3.37	3.36	3.89	3.59	0.23	6.31
800 ng/ml	5.94	5.53	5.76	6.25	5.82	5.86	0.26	4.50

4種類の濃度の標準試料(10, 100, 300, 800ng/ml)を5回繰り返して測定することで測定間再現性試験とした。DPPIV酵素活性値は $\mu\text{M}/\text{min}$ で表示した。

100ng/ml~800ng/mlでは変動係数CVが10%以下と良好な結果を示した。極低濃度(10ng/ml)ではバラつきが大きかった。

#### 添加回収試験(Recovery)

	試料(添加あり)	試料(添加なし)	回収率(%)
希釈なし	5.49	1.26	73.18
1/2希釈	3.96	0.69	88.62
1/4希釈	2.30	0.39	90.09
1/8希釈	1.25	0.24	90.18

回収率80~120%範囲内と良好な結果を示した。「希釈なし」はやや不良であった。

#### 直線性試験(Linearity)

		直線性(%)
試料(添加あり)	1/2希釈	119.88
	1/4希釈	128.55
	1/8希釈	134.06
試料(添加なし)	1/2希釈	108.61
	1/4希釈	117.84
	1/8希釈	118.12

添加なしの試料の直線性は良好な結果を示した。添加ありの試料の直線性はやや不良であった。

図6 添加回収試験(Recovery)と直線性試験(Linearity)

添加回収試験(recovery)はR&D Systems社のSpike and Recovery Test Protocolに従って実施した。「試料」は健常成人血清(を10倍希釈したもの)を使用。「添加あり」はrecombinant CD26を最終濃度500ng/mLになるようにサンプルに添加した。

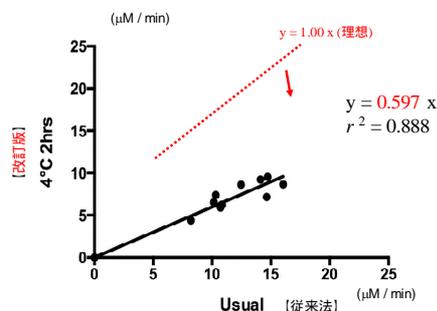


図7 DPPIV活性測定値の比較(従来法 v.s. 改訂版)

DPPIV活性測定は、2時間の検体反応時間では、低く測定される

DPPIV活性測定系では、検体希釈によるマトリックス効果の影響も考慮する必要あり

## D. 考察

現在、糖尿病治療薬としてDPPIV酵素阻害薬が登場し、幅広く臨床現場に用いられている。

ヒト化 CD26 抗体を投与すると、血清中に存在する sCD26 と反応し、投与患者では sCD26 値及び DPPIV 酵素値が減少することが予想されることから sCD26 及び DPPIV 酵素活性値を治療経過でモニターにしていくことは抗体療法が安全に施行されるためにも必須である。

今までに可溶性 CD26 測定系として異なるエピトープと反応する CD26 抗体、5F8 及び 1F7 を用いたサンドイッチ ELISA 法及び DPPIV 酵素測定法としては固相化した 5F8 に可溶性 CD26 を捕捉させ、Gly-Pro-pNA を加えて、DPPIV 活性を測定する方法を確立した。しかしヒト化 CD26 抗体と 1F7 は同一エピトープを認識する CD26 抗体であるため(5F8 は異なるエピトープ)ヒト化 CD26 抗体治療患者では血清中の sCD26 にヒト化抗体が結合するため従来の CD26 検出 ELISA 系の 1F7 では sCD26 への結合が競合するために sCD26 は測定できなかった。

更に市販の可溶性 CD26 測定 ELISA キットにおいてもヒト化 CD26 抗体が存在すると測定不能であった。今まで我々の開発した CD26 抗体の中で 9C11 抗体が従来の ELISA に用いていた 1F7, 5F8 及びヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープと反応する抗体であることを同定し可溶性 CD26 検出 ELISA 系において 1F7 biotin の代わりに 9C11 biotin に置き換えて、正常人血清にヒト化 CD26 抗体を加えてアッセイを行ったところ競合することなく可溶性 CD26 の測定が可能であった。しかも 9C11 を用いた新規 ELISA は市販の R&D 社の ELISA キットよりも感度が高いことが明らかとなった。フランスでのヒト化 CD26 抗体の第 相臨床試験は平成 26 年 9 月に終了して、安全性の確認及び期待される効果を示唆するデータも得られた。その全ての抗体投与患者において血清中の可溶性 CD26 は測定可能であり、更に抗体投与量が増加するにつれて、可溶性 CD26 濃度は低下し、可溶性 CD26 値と DPPIV 酵素活性値は相関して動くことから DPPIV 酵素値も低下して DPPIV 阻害剤が投与されている病態を呈する可能性があり、ヒト化 CD26 抗体投与例において糖尿病薬服用者については特に低血糖発作などに注意する必要性が示唆された。可溶性 CD26 定量 ELISA アッセイシステムの性能試験の結果はとても良好であった。更に可溶性 CD26 測定は検体反応時間も従来の一晩から二時間に短縮できた。一方で DPPIV 酵素活性アッセイシステムでは血清中の可溶性 CD26/DPPIV 分子のキャプチャー性能は良好であったが、極低濃度ではその測定にばらつきがあったり、添加ありの試料の直線性はやや不良であることが観察された。また

DPPIV 酵素活性測定法については可溶性 CD26 測定 ELISA とは異なり検体反応時間を短縮すると DPPIV 酵素活性は低く測定された。これは DPPIV 酵素活性測定の際に血清中に干渉因子が存在し、その為に測定結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。また DPPIV 酵素活性アッセイシステムの手順簡便化のためには測定干渉因子を最小化する条件検討が必要なことが明らかになった。今後標準物質を用いて市販の液層測定系と対比して検討予定である。

## E. 結論

従来の可溶性 CD26/DPPIV 測定 ELISA 系に用いていた 2 種の CD26 抗体及びヒト化 CD26 抗体とは異なるエピトープの CD26 抗体 9C11 を用いることにより血清中にヒト化 CD26 抗体存在下でも可溶性 CD26/DPPIV を測定できる新 ELISA 系を確立した。本 ELISA 系は従来の ELISA 系と同等の感度を示し、市販の ELISA キットよりも格段に感度は高かった。フランスのヒト化 CD26 抗体投与の第 相臨床試験患者血清においてもブロックされることなく可溶性 CD26/DPPIV 値は適切に測定することができた。可溶性 CD26 ELISA アッセイシステムの性能はとても良好で検体反応時間も短縮できることが明らかとなった。しかし DPPIV 酵素活性測定アッセイでは血清中に存在する干渉因子などの影響で希釈検体などで測定値に影響を与える可能性が示唆され、また検体反応時間の簡便化はそれらの干渉因子の存在などで現時点では難しいことが示唆された。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Regulation of pulmonary GVHD by IL-26+CD4 T lymphocytes through CD26/caveolin-1 interaction. J Immunol. 2015; in press.
- 2) Otsuki N, Iwata S, Yamada T, Hosono O, Dang NH, Hatano R, Ohnuma K, Morimoto C. Modulation of immunological responses and amelioration of collagen-induced arthritis by the novel roxithromycin derivative 5-I. Mod Rheumatol. 2015; in press.
- 3) Ohnuma K, Saito T, Hatano R, Hosono O, Iwata S, Dang NH, Ninomiya H, Morimoto C. Comparison of two commercial ELISAs against an in-house ELISA for measuring soluble CD26 in human serum. J Clin Lab Anal. 2015; in press
- 4) 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
- 5) Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. PLoS One 2014; 9:e115647
- 6) 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. 2014; 29: 2439-2455
- 7) Komiya E, Ohnuma K, Yamazaki H, Hatano R, Iwata S, Okamoto T, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 4: 609-615
- 8) Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma. Br J Cancer. 2014; 110: 2232-2245
- 9) Kwan JC, Liu Y, Ratnayake R, Hatano R, Kuribara A, Morimoto C, Ohnuma K, Paul VJ, Ye T, Luesch H. Grassyptolides as Natural Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 8 and T-Cell Activation. Chembiochem. 2014; 15:799-804.

### 2 . 学会発表

- 1) 大沼圭, 齊藤辰彦, 波多野良, 岩田哲史, 鈴木博史, 森本幾夫. DPP4 阻害剤の服用によって誘発される多関節症とそのバイオマーカー. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014 年 4 月 24 - 26 日, 東京
- 2) 波多野良, 大沼圭, 岩田哲史, 石井智徳, 関川巖, 森本幾夫. IL-10 産生誘導による CD26 共刺激経路の negative feedback 機構の解析. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014 年 4 月 24 - 26

日, 東京

## 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

#### 【本研究の進捗による特許出願】

発明の名称：免疫抑制剤

発明者：森本幾夫、大沼圭、波多野良

出願者：順天堂大学

種類：特許権

番号：特願2014-199260

出願日：2014年9月29日

出願国：PCT加盟国

概略：CD26分子のリガントCav-Ig蛋白が慢性GVHD治療に有効であるという特許である。