HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Reduced effect of gemtuzumab ozogamicin (CMA-676) on P-glycoprotein and/or CD34-positive leukemia cells and its restoration by multidrug resistance modifiers

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松井, 啓隆 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1257

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　４０４号	学位授与年月日	平成１５年　３月２６日
氏　　名	松　井　啓　隆		
論文題目	Reduced effect of gemtuzumab ozogamicin (CMA-676) on P-glycoprotein and/or CD34-positive leukemia cells and its restoration by multidrug resistance modifiers (P 糖蛋白／CD34 発現白血病細胞に対するゲムツズマブオゾガミシン(CMA-676)の効果減弱と耐性克服剤併用による効果回復)		

博士(医学)　松 井 啓 隆

論文題目

Reduced effect of gemtuzumab ozogamicin (CMA-676) on P-glycoprotein and/or CD34-positive leukemia cells and its restoration by multidrug resistance modifiers

(P糖蛋白／CD34発現白血病細胞に対するゲムツズマブオゾガミシン(CMA-676)の効果減弱と耐性克服剤併用による効果回復)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

急性骨髄性白血病(AML)の化学療法による寛解導入率は約80%まで向上したが、再発後の症例においては薬剤耐性とその克服が依然重要な課題である。近年、再発例を含め難治AMLに対する新しい治療方法が検討されており、抗体療法もその一つである。現在AMLに対する抗体療法で最も臨床応用が進んでいるのはゲムツズマブオゾガミシン(CMA-676)であり、AMLの90%以上に発現するCD33抗原を標的とし、新規抗腫瘍性抗生物質であるカリキアマイシンを結合していることより優れた白血病細胞特異性と抗白血病効果を有する。しかし、白血病細胞株を用いた当教室の検討により、CMA-676も他の多くの抗白血病薬と同様P糖蛋白(P-gp)等の薬剤耐性機構の影響を受けその効果が減弱することが証明された。そこで今回我々は、AML細胞上のP-gpや、同様にAMLの薬剤耐性への関与が指摘されている多剤耐性関連蛋白(MRP1)といった薬剤耐性機構の発現量とCMA-676の殺細胞効果について、AML臨床検体を用いて検討を行った。また細胞表面抗原の一部は薬剤耐性に関与するとの報告があり、併せて白血病細胞表面抗原の発現量とCMA-676の殺細胞効果との関連について検討を行った。

〔材料ならびに方法〕

AML27症例より採取された骨髄血を用い、in vitroにおけるCMA-676の殺細胞効果を細胞周期の変化として解析することを試みた。比重分離された単核球分画の細胞にCMA-676(100ng/ml)を添加し、次に細胞を4'-6'-diamidino-2-phenyl-indole(DAPI)と蛍光標識抗CD33(PE)、CD34(FITC)、CD45(PC5)モノクローナル抗体にて染色した。DAPIはUVレーザーにより励起されるDNA結合性の蛍光色素で、PE、FITC、PC5の各蛍光色素はアルゴンレーザーにより励起され各々異なる波長の蛍光を発する。今回UVレーザーとアルゴンレーザーを装着したフローサイトメーターを使用することにより、CD45弱陽性分画として選別されたAML細胞上の細胞周期、CD33、CD34発現量を同時解析した。更にCMA-676に加えて耐性克服剤を添加し同様の解析を行うことにより、CMA-676の殺細胞効果に及ぼす薬剤耐性機構の影響を検討した。耐性克服剤は、P-gpに特異性の高いPSC833とMS209、またMRP1に特異性の高いprobenecidを使用した。AML細胞上のP-gp、MRP1発現量はそれぞれMRK16抗体、抗MRP1抗体で染色後、フローサイトメトリーにより解析した。

また蛍光色素rhodamine 123(Rh123)やcalcein acetoxymethyl ester(calcein-AM)はそれぞれP-gpやMRP1を介して細胞外に排出される。そこで、これら色素の細胞内取込量を耐性克服剤の存在下・非存在下で比較することにより、AML細胞のP-gpあるいはMRP1を介した色素排泄能を定量した。

〔結果〕

CMA-676添加により、AML細胞における細胞周期上のDNA断片化細胞(hypodiploid)はCMA-676非

添加群の10.4±9.4%より21.1±13.9%へと有意に増加し、殺細胞効果が認められた。このCMA-676による殺細胞効果は、CMA-676単独投与と比較しPSC833併用により25.3±14.5%(p=0.001)、MS209併用により24.5±14.2%(p=0.001)へと増強された。またCMA-676の殺細胞効果はAML細胞上のP-gp発現量(p=0.004)、P-gpを介したRh123取込能(p=0.0004)とそれぞれ負の相関関係を認めた。一方、MRP1発現量やMRP1を介したcalcein-AM排泄能との相関は見られなかった。細胞表面抗原の検討では、CMA-676によるhypodiploidはCD33+CD34-AML細胞と比較しCD33+CD34+AML細胞では認められにくく(p=0.002)、CD34+細胞ではCMA-676が効きにくいことが示唆された。検討しえた6症例で、CD33+CD34+AML細胞ではCD33+CD34-AML細胞よりP-gpが高発現であった(p=0.048)。CD33+CD34+AML細胞ではPSC833を併用しても、CMA-676による殺細胞効果の回復は部分的であった(p=0.028)。

〔考察〕

CMA-676はAML細胞に対して殺細胞効果を示すが、臨床検体においても当教室の白血病細胞株での検討結果と同様に、その殺細胞効果が薬剤耐性機構の影響を受けることが判明した。通常の抗白血病薬とP-gp特異的耐性克服剤の併用では、生理的にP-gpを発現する組織での薬剤濃度上昇による副作用の増強が懸念されるのに対し、CMA-676とP-gp特異的耐性克服剤の併用では、理論的にはCD33陽性細胞のみにCMA-676が取りこまれることとなり、CD33陽性細胞のみに殺細胞効果を示すと考えられる。一方、CD34陽性AML細胞におけるCMA-676の殺細胞効果の減弱についてもP-gpの関与が推測されたが、P-gp以外の薬剤耐性機構が並存している可能性も示唆された。

〔結論〕

CMA-676は標的抗原であるCD33を介しAML細胞に対する特異性を高めることにより殺細胞効果を高め、同時に副作用を軽減させる可能性があるため、難治症例や高齢者に対する有効性が期待される。今回の検討でCMA-676も他の多くの抗白血病薬と同様に薬剤耐性機構の影響を受けることが判明した。しかし、CMA-676投与前にP-gpやCD33、CD34等の発現量を測定すること、対象例には耐性克服剤を併用すること等、CMA-676の最適な投与方法に関して道が開けた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、急性骨髄性白血病(AML)患者の90%以上に発現するCD33抗原を認識するヒト化抗体に抗腫瘍性抗生物質であるカリキアマイシンを結合したゲムツズマブオゾガミシン(CMA-676)の効果について、AML患者から採取された白血病細胞を用い、細胞表面抗原の発現および薬剤耐性との関連を検討したものである。

本研究の要旨は以下の通りである。27名のAML患者から得られた骨髄血を用い、CD45の発現から白血病細胞を選択した。白血病細胞のCD33、CD34、P糖蛋白(P-gp)および多剤耐性関連蛋白(MRP1)の発現をフローサイトメトリーで解析するとともに、P-gpやMRP1を介する色素排泄能を定量した。さらにCMA-676の殺細胞効果に及ぼす薬剤耐性克服剤の影響を検討した。CMA-676の殺細胞効果はDNA断片化細胞の割合で評価した。この結果、CMA-676の殺細胞効果はCD33の発現量と正の相関関係を示し、P-gp阻害剤を併用することによりさらに増強された。CMA-676の殺細胞効果は、P-gp発現量、P-gpを介

した色素排泄能とそれぞれの負の相関関係を示したが、MRP1 の発現量や MRP1 を介した色素排泄能とは相関が認められなかった。CD33 陽性細胞の内、CD34 陽性細胞は CD34 陰性細胞より CMA-676 の殺細胞効果が低く、P-gp が高発現であった。また CD34 陽性細胞では P-gp 阻害剤を併用することにより CMA-676 の殺細胞効果は増強したが、CD34 陰性細胞に対する効果までは到らなかった。

これらの結果は、AML において(1) CD33 や CD34、P-gp の発現を解析することにより CMA-676 の効果が予測しうること、(2) P-gp を発現している CD33 陽性患者においては P-gp 阻害剤の併用が有効と推測されること、(3) しかし CD34 陽性患者においては P-gp 以外の薬剤耐性の機構が働いている可能性があること、を示している。

申請者の研究は CMA-676 の効果と細胞表面抗原の発現および薬剤耐性との関連を明らかにしたものであり、CMA-676 が将来 AML 治療薬として用いられる際に重要な示唆を与える優れた研究と評価された。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1) CD33 を発現する正常細胞に対する CMA-676 の副作用について
2) 正常細胞と白血病細胞の CD33 の発現量の相違について
3) CMA-676 が細胞内に取り込まれた後の CD33 の発現量の変化について
4) CD34 と P-gp の関係について
5) フローサイトメトリーで解析するにあたり、細胞を固定した理由について
6) CMA-676 の薬物動態について
7) カリキアマイシンを結合していない抗体の抗腫瘍効果について
8) カリキアマイシンの細胞内濃度と P-gp の発現の関係について
9) 殺細胞効果を評価するための他の指標について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　阪原晴海
副査　梅村和夫　副査　本郷輝明