

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: jpn<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-31<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 松井, 啓隆<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1257">http://hdl.handle.net/10271/1257</a>                           |

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

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髓血を用い、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 $10.4 \pm 9.4\%$ より $21.1 \pm 13.9\%$ 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 $25.3 \pm 14.5\%$  ( $p=0.001$ )、MS209 併用により $24.5 \pm 14.2\%$  ( $p=0.001$ )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マイシンを結合したゲムツズマブオゾガミン(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髓血を用い、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