



Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab zogamicin, CMA-676) shows cytocidal effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein-expressing sublines.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内藤, 健助 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1618

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	医博論第 341号	学位授与年月日	平成13年 3月 7日
氏 名	内 藤 健 助		
論文題目	Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab zogamicin, CMA-676) shows cytocidal effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein-expressing sublines (カリキマイシン結合ヒト化抗 CD33 モノクローナル抗体(ゲムツマブゾガミシン, CMA-676)は CD33 陽性白血病細胞株に殺細胞効果を示すが、P糖蛋白発現娘細胞株には殺細胞効果を示さない)		

博士(医学) 内 藤 健 助

論文題目

Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab zogamicin, CMA-676) shows cytotoxic effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein-expressing sublines.

(カリキアマイシン結合ヒト化抗CD33モノクローナル抗体(ゲムツマブゾガミシン, CMA-676)はCD33陽性白血病細胞株に殺細胞効果を示すが、P糖蛋白発現娘細胞株には殺細胞効果を示さない)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

急性骨髄性白血病(AML)の寛解導入率は約80%まで向上したが、5年生存率は約35%であり、再発が問題となっている。再発後の治療は抗白血病薬の効果が低く、これは白血病細胞の薬剤耐性に起因するとされる。この薬剤耐性を克服するため、種々の試みがなされている。

CD33をターゲットとした分子標的治療もその一つである。CD33はAML症例の90%以上に発現しているが、多能性幹細胞や骨髄系以外の細胞や組織には発現が認められない。

CMA-676はヒト化抗CD33抗体と抗腫瘍性抗生物質calicheamicinとの結合体である。本邦においても臨床試験が開始されたが、CMA-676の細胞周期に及ぼす効果や多剤耐性細胞株への効果は報告されていない。そこで、これらの効果を明らかにしようとした。

〔材料ならびに方法〕

細胞株

白血病細胞株であるHL60, NOMO-1, NOMO-1のdoxorubicin耐性株NOMO-1/ADR, NB4, NB4にmdr-1 DNAを導入したNB4/MDR, K562およびEBV陽性のリンパ腫細胞株であるDaudiを使用した。各細胞株のCD33, CD34発現をflow cytometerにて解析した。

薬剤耐性

Rhodamine 123による色素取込試験、およびbiotinylated MRK16抗体とavidine-biotin結合を利用したstreptavidine-RED670による後染色にてP-糖蛋白(P-gp)発現を解析した。また、polymerase chain reactionにてMDR-1発現を解析した。

細胞増殖

³H-thymidine up take法と、propidium iodide(PI)染色(5 μ g/ml)にて生細胞数をflow cytometerで解析した。

細胞周期

PI染色(50 μ g/ml)し、flow cytometerにて解析した。

〔結果〕

HL60, NOMO-1, NOMO-1/ADR, NB4, NB4/MDRにおいてCD33は99.7~99.9%陽性であり、CD34は陰性であった。K562におけるCD33陽性率は62.9%であった。DaudiではCD33, CD34とも陰性であった。

HL60にCMA-676を添加し、HL60の³H-thymidine取り込みを48時間まで測定した。CMA-676の濃度を5, 10, 100ng/mlと上げるにつれ、³H-thymidine取り込みは減少した。また、CMA-676は5, 10, 100ng/mlの濃度でHL60, NOMO-1, NB4の細胞増殖を用量依存的に抑制した。K562においてCMA-676は10ng/mlでは細

胞増殖を抑制しなかったが、100ng/mlにて細胞増殖を抑制した。Daudiでは100ng/mlでも細胞増殖は抑制されなかった。

薬剤耐性株であるNOMO-1/ADR, NB4/MDRにおいては、CMA-676の濃度を10,000ng/mlにあけても細胞増殖は抑制されなかった。耐性克服剤であるMS209 10 μ MあるいはPSC833 10 μ Mを併用するとCMA-676の細胞傷害活性が回復し、細胞増殖抑制効果が認められるようになった。

CMA-676 100ng/ml添加にてHL60, NOMO-1, NB4ではG2/M期への集積およびhypodiploid portionの増加が認められた。K562およびDaudiではG2/M期への集積が軽度認められた。

薬剤耐性株であるNOMO-1/ADR, NB4/MDRにおいては、CMA-676の濃度を10,000ng/mlにあけてもG2/M期への集積は認められなかった。耐性克服剤であるMS209 10 μ MあるいはPSC833 10 μ Mを併用するとCMA-676の細胞傷害活性が回復し、G2/M期への集積およびhypodiploid portionの増加が認められるようになった。

[考察および結論]

CMA-676はCD33陽性細胞株に濃度依存性に作用し、殺細胞効果を示した。細胞周期解析ではG2/M期への集積およびhypodiploid portionの増加が認められた。CMA-676は細胞回転をG2期あるいはM期で停止させ、細胞死を誘導すると考えられた。

P-gp発現娘細胞株(NOMO-1/ADR)やmdr-1 DNAを導入した娘細胞株(NB4/MDR)においては、CMA-676の細胞増殖抑制効果は認められず、細胞周期への影響もみられなかった。MS209あるいはPSC833を併用したところ、薬剤耐性株に対するCMA-676の殺細胞効果が回復した。

P-gpは分子量170kDの膜蛋白であり、構造や作用点の異なる抗癌剤を始め多くの薬物をATPに依存して細胞内から細胞外へ汲み出すポンプとして機能している。P-gp発現細胞株においては、CMA-676は細胞内に取り込まれcalicheamicinを遊離するが、遊離したcalicheamicinがP-gpにより細胞外へ排出されたものと思われる。耐性克服剤併用によりP-gpの機能が阻害され、CMA-676の有効性がより高まると考えられた。

論文審査の結果の要旨

急性骨髄性白血病の寛解導入率は約80%まで向上したが、5年生存率は約35%であり、再発が問題となっている。再発後は化学療法の効果が低く、これは白血病細胞の薬剤耐性に起因するとされている。本研究は白血病細胞膜表面のCD33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CMA-676が白血病細胞株に対して選択的な殺細胞効果を有していること、CMA-676が多剤耐性細胞株に対してもP糖蛋白阻害剤を併用することにより効果を示すこと、を明らかにした研究である。

用いた細胞株は白血病細胞株HL60, NOMO-1, NB4, K562, リンパ腫細胞株Daudi, NOMO-1のdoxorubicin耐性株であるNOMO-1/ADR, NB4にmdr-1 DNAを導入したNB4/MDRの6種類である。CD33の発現をflow cytometerで解析し、CMA-676の殺細胞効果を³H-thymidineの取り込みと生細胞数の変化で評価し、あわせて細胞周期に及ぼす影響も検討した。多剤耐性株ではP糖蛋白阻害剤であるMS209あるいはPSC833の存在の有無によるCMA-676の効果につき比較した。

CD33の陽性率はHL60, NOMO-1, NOMO-1/ADR, NB4, NB4/MDRにおいて99%以上、K562では62.9%であり、Daudiでは陰性であった。CMA-676は5ng/ml以上の濃度でHL60の³H-thymidineの取り込みを減

少させた。また5ng/ml以上の濃度でHL60, NOMO-1, NB4の細胞増殖を用量依存的に抑制した。K562では10ng/mlでは細胞増殖が抑制されなかったが、100ng/mlで抑制された。Daudiでは100ng/mlでも細胞増殖が抑制されなかった。多剤耐性株のNOMO-1/ADR, NB4/MDRにおいては10,000ng/mlの濃度のCMA-676にても細胞増殖は抑制されなかったが、P糖蛋白阻害剤を併用すると細胞増殖抑制効果が認められた。HL60, NOMO-1, NB4ではCMA-676の添加により、またNOMO-1/ADR, NB4/MDRではCMA-676にP糖蛋白阻害剤を併用することにより、G2/M期への集積とhypodiploid portionの増加が認められた。

これらの結果は、(1)CMA-676がCD33陽性細胞のみに選択的に効果を発現すること、(2)CMA-676は多剤耐性株には効果が認められないこと、(3)しかしP糖蛋白阻害剤を併用することで多剤耐性株に対しても効果を発現しうること、(4)CMA-676は細胞回転をG2期またはM期で停止させ細胞死を誘導すること、を示している。

申請者の研究はin vitroにおいてCMA-676の標的特異的な効果を明らかにし、CMA-676が臨床においても白血病治療薬として有望であることを示唆する優れた研究と評価された。

審査の過程において、申請者に対し次のような質問がなされた。

- 1) カリキアマイシンの核内への移行について
- 2) カリキアマイシンの代謝について
- 3) CMA-676が誘導するのはアポトーシスかネクローシスか
- 4) CD33に結合する接着分子について
- 5) 急性骨髄性白血病患者におけるCD33の発現頻度とその発現程度について
- 6) 培養細胞株K562でCD33の発現が62.9%とはどういうことか
- 7) カリキアマイシンを結合させたことによる抗体の抗原への結合能の変化について
- 8) CMA-676の血中での安定性について
- 9) 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
- 10) 抗体が結合することによるCD33の発現の変化について
- 11) CD33の正常組織での発現とCMA-676の副作用について
- 12) P糖蛋白阻害剤の効果について

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