ヒト化抗CD317抗体の抗腫瘍効果に関する研究

学位論文内容の要旨

抗がん剤の中で現在注目されているのが抗体医薬である。抗体医薬にはいくつかの作用機序があるが、抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) は標的細胞に結合した抗体をNK細胞、マクロファージ、好中球などのエフェクター細胞がFc γ 受容体を介して認識し、標的細胞を殺傷する。

多発性骨髄腫は形質細胞が骨髄内で腫瘍化した造血器腫瘍である。我々は多発性骨髄腫に対する抗体医薬を開発するため骨髄腫細胞株をマウスに免疫し、骨髄腫細胞特異的な抗体 (mAHM; マウスIgG2a) を樹立した。抗原はCD317であった。CD317は分子量29.33 kDaの糖タンパクであり、N端の膜貫通領域とC端のglycosylphosphatidylinositolアンカーにより細胞膜に局在する。mAHMはADCC活性を有し、多発性骨髄腫マウスモデルで抗腫瘍効果を示した。我々はmAHMを医薬品として開発するためヒト化を行い、AHM (ヒトIgG1) を作製した。

本研究では、多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞におけるCD317発現量とAHMのADCC活性について解析するとともに、多発性骨髄腫マウスモデルを用いてAHMの抗腫瘍効果を検討した。さらに腎がんおよびメラノーマへのAHMの適応を検討した。

1. 骨髄腫細胞におけるCD317発現量とAHMのADCC活性

細胞上のCD317発現量をフローサイトメトリーを用いて簡便に測定する方法を構築した。まずCHO細胞にCD317を発現させ、発現量の異なるクローンを樹立した。これらの細胞を蛍光標識AHMを用いたフローサイトメトリーおよび¹²⁵I標識AHMを用いたスキッチャード分析により測定し、CD317発現量 (細胞あたりのCD317分子数) を蛍光強度に対してプロットすることにより検量線を作成した。この検量線を用いて多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞におけるCD317発現量を測定したところ、14例中12例が $1 \times 10^4/\text{cell}$ 以上の発現を示し、その平均値は $2.5 \times 10^4/\text{cell}$ であった。正常末梢血リンパ球および単球における発現量はそれぞれ $2.3 \times 10^3/\text{cell}$ 、 $1 \times 10^4/\text{cell}$ であり、骨髄腫細胞の方がCD317を強く発現していた。

次にCD317発現量とAHMのADCC活性の相関について解析した。ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) をエフェクター細胞に用いたところ、AHMのADCC活性がCD317発現量と相関した。

以上から、多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞におけるCD317発現量を測定することにより、AHMが奏功する患者を選択できる可能性を示した。

2. 多発性骨髄腫マウスモデルにおけるAHMの抗腫瘍効果

ヒト骨髄腫細胞株KPMM2およびヒト形質細胞性白血病細胞株ARH-77はSCIDマウスに尾静脈から移植すると骨髄に生着し、腫瘍細胞が産生する抗体分子であるMタンパクが血中に増加するとともに骨病変を呈し、多発性骨髄腫の臨床症状をよく反映するモデルである。またヒト骨髄腫細胞株RPMI8226はSCIDマウス皮下に移植すると固形腫

瘍を形成する。これら3つのモデルを用いてAHMの抗腫瘍効果を評価した。

KPMM2モデルでは、腫瘍細胞を移植した10日後にAHMを尾静脈から投与した。対照として、多発性骨髄腫の治療に用いられる化学療法剤メルファランを10-14日目に1日1回経口投与した。その結果、AHMはマウスを有意に延命させ、血清中Mタンパク濃度も有意に抑制した。その効果はメルファランと同等であった。骨髄中の腫瘍細胞数を測定したところ、AHM投与群では投与6時間後から腫瘍細胞比率が低下した。この効果はマウスFc γ 受容体に対する中和抗体の投与により阻害され、AHMがADCCにより腫瘍細胞を殺傷することが示された。ARH-77モデルでもマウスの延命とMタンパク濃度の抑制が認められた。RPMI8226モデルでもAHMは腫瘍体積を有意に抑制した。

続いてマウスエフェクター細胞を介したAHMのADCC活性について検討した。マウス脾臓細胞はARH-77細胞に対してADCCを誘導した。予めNK細胞を除去したマウスの脾臓細胞ではこの活性が消失した。一方マウスマクロファージはKPMM2およびARH-77細胞に対してADCCを誘導した。この活性はマウスFc γ 受容体に対する中和抗体により抑制された。

以上の結果から、AHMがNK細胞またはマクロファージを介したADCCにより腫瘍細胞を殺傷し、多発性骨髄腫マウスモデルで抗腫瘍効果を発揮することが示された。従ってAHMが多発性骨髄腫の治療薬として有効である可能性を明らかにした。

3. 腎がんおよびメラノーマに対するAHMの抗腫瘍効果

腎細胞がん(腎がん)および悪性黒色腫(メラノーマ)は化学療法や放射線療法に抵抗性で、その治療は原発巣の摘除が原則である。転移性腎がんやメラノーマの治療にはインターフェロン α (IFN- α)が用いられるが生存率は低く、より効果の高い薬剤の開発が望まれている。一方でCD317遺伝子のプロモーター領域にはインターフェロン応答性の転写因子の結合配列が存在し、IFN- α によりCD317の発現が誘導される可能性が考えられた。そこでヒト腎がんおよびメラノーマ細胞株をIFN- α で処理し、CD317発現量とAHM、mAHMのADCC活性を検討した。さらに腎がんマウスモデルを用いてIFN- α の併用による抗腫瘍効果を検討した。

腎がん細胞株10株、メラノーマ細胞株5株をIFN- α 存在下で3日間培養したところ、腎がん細胞株2株、メラノーマ細胞株1株を除く全ての細胞株でCD317発現量が増加した。次に腎がん細胞株A498、SN12C、メラノーマ細胞株A2058、SEKIに対するADCCを検討した。エフェクター細胞にヒトPBMCを用いたところ、IFN- α 存在下で培養した細胞に対してAHMはより強いADCCを誘導した。マウスエフェクター細胞を用いた場合でも、IFN- α 存在下で培養した細胞に対してADCC活性が増強された。

次に腎がんマウスモデルにおけるIFN- α の併用効果を検討した。A498またはSN12C細胞を皮下に移植したマウスにIFN- α を投与したところ、腫瘍細胞におけるCD317発現量が増加した。これらのモデルを用いて抗腫瘍効果を検討したところ、いずれでもmAHMとIFN- α の併用により効果が増強された。SN12CモデルではAHMとIFN- α の併用でも効果が認められた。

以上から、腎がんおよびメラノーマにおけるCD317発現量がIFN- α により増加し、AHMとIFN- α の併用が有効である可能性を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 菅 原 満
副 査 講 師 南 保 明日香
副 査 特任准教授 平 田 裕 一 (東京大学先端科学
技術研究センター)

学 位 論 文 題 名

ヒト化抗CD317抗体の抗腫瘍効果に関する研究

抗がん剤の中で現在注目されているのが抗体医薬である。抗体医薬にはいくつかの作用機序があるが、抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) は標的細胞に結合した抗体をNK細胞、マクロファージ、好中球などのエフェクター細胞がFc γ 受容体を介して認識し、標的細胞を殺傷する。

我々は多発性骨髄腫に対する抗体医薬を開発するため骨髄腫細胞株をマウスに免疫し、骨髄腫細胞抗原 CD317 に対する特異的抗体 (mAHM; マウス IgG2a) を樹立した。mAHM は ADCC 活性を有し、多発性骨髄腫マウスモデルで抗腫瘍効果を示した。また、我々は mAHM を医薬品として開発するためヒト化を行い、AHM (ヒト IgG1) を作製した。

本研究では、多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞における CD317 発現量と AHM の ADCC 活性について解析するとともに、多発性骨髄腫マウスモデルを用いて AHM の抗腫瘍効果を検討した。さらに腎がんおよびメラノーマへの AHM の適応を検討した。

1. 骨髄腫細胞における CD317 発現量と AHM の ADCC 活性

細胞上の CD317 発現量をフローサイトメトリーを用いて簡便に測定する方法を構築した。本法を用いて多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞における CD317 発現量を測定したところ、14 例中 12 例が $1 \times 10^4/\text{cell}$ 以上の発現を示し、その平均値は $2.5 \times 10^4/\text{cell}$ であった。正常末梢血リンパ球および単球における発現量はそれぞれ $2-3 \times 10^3/\text{cell}$ 、 $1 \times 10^4/\text{cell}$ であり、骨髄腫細胞の方が CD317 を強く発現していた。次に CD317 発現量と AHM の ADCC 活性の相関について解析した。ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞に用いたところ、AHM の ADCC 活性が CD317 発現量と相関した。

以上から、多発性骨髄腫患者の腫瘍細胞における CD317 発現量を測定することにより、AHM が奏功する患者を選択できる可能性を示した。

2. 多発性骨髄腫マウスモデルにおける AHM の抗腫瘍効果

ヒト骨髄腫細胞株 KPMM2 およびヒト形質細胞性白血病細胞株 ARH-77 は SCID マウスに尾静脈から移植すると骨髄に生着し、血中 M タンパクの増加と骨病変を呈し、多発性骨髄腫の臨床症状をよく反映するモデルである。またヒト骨髄腫細胞株 RPMI8226 は SCID マウス皮下に移植すると固形腫瘍を形成する。これら 3 つのモデルを用いて AHM の抗腫瘍効果を評価した。

KPMM2 モデルでは、腫瘍細胞を移植した 10 日後に AHM を尾静脈から投与した。対照として、多発性骨髄腫の治療に用いられる化学療法剤メルファランを経口投与した。その結果、AHM はマウスを有意に延命させ、血清中 M タンパク濃度も有意に抑制した。その効果はメルファランと同等であった。骨髄中の腫瘍細胞数を測定したところ、AHM 投与群では腫瘍細胞比率が低下し、この効果はマウス Fc γ 受容体に対する中和抗体の投与により阻害され、AHM が ADCC により腫瘍細胞を殺傷することが示された。ARH-77 モデルでも同様の効果が認められた。RPMI8226 モデルでも AHM は腫瘍体積を有意に抑制した。

続いてマウスエフェクター細胞を介した AHM の ADCC 活性について検討した。マウス脾臓細胞は ARH-77 細胞に対して ADCC を誘導した。予め NK 細胞を除去したマウスの脾臓細胞ではこの活性が消失した。一方マウスマクロファージは KPMM2 および ARH-77 細胞に対して ADCC を誘導し、この活性はマウス Fc γ 受容体に対する中和抗体により抑制された。

以上の結果から、AHM が NK 細胞またはマクロファージを介した ADCC により腫瘍細胞を殺傷し、多発性骨髄腫マウスモデルで抗腫瘍効果を発揮することが示された。従って AHM が多発性骨髄腫の治療薬として有効である可能性を明らかにした。

3. 腎がんおよびメラノーマに対する AHM の抗腫瘍効果

腎細胞がん（腎がん）および悪性黒色腫（メラノーマ）は化学療法や放射線療法に抵抗性で、その治療は原発巣の摘除が原則である。転移性腎がんやメラノーマの治療にはインターフェロン α (IFN- α) が用いられるが生存率は低く、より効果の高い薬剤の開発が望まれている。一方で CD317 遺伝子のプロモーター領域にはインターフェロン応答性の転写因子の結合配列が存在し、IFN- α により CD317 の発現が誘導される可能性が考えられた。そこでヒト腎がんおよびメラノーマ細胞株を IFN- α で処理し、CD317 発現量と AHM、mAHM の ADCC 活性を検討した。さらに腎がんマウスモデルを用いて IFN- α の併用による抗腫瘍効果を検討した。腎がん細胞株 10 株、メラノーマ細胞株 5 株を IFN- α 存在下で培養したところ、腎がん細胞株 2 株、メラノーマ細胞株 1 株を除く全ての細胞株で CD317 発現量が増加した。次に腎がん細胞株 A498、SN12C、メラノーマ細胞株 A2058、SEKI に対する ADCC を検討したところ、IFN- α 存在下で培養した細胞に対して AHM はより強い ADCC を誘導した。次に腎がんマウスモデルにおける IFN- α の併用効果を検討した。A498 または SN12C 細胞を移植したマウスに IFN- α を投与したところ、腫瘍細胞における CD317 発現量が増加した。これらのモデルを用いて抗腫瘍効果を検討したところ、いずれでも mAHM と IFN- α の併用により効果が増強された。SN12C モデルでは AHM と IFN- α の併用でも効果が認められた。

以上から、腎がんおよびメラノーマにおける CD317 発現量が IFN- α により増加し、AHM と IFN- α の併用が有効である可能性を明らかにした。