

急性骨髄性白血病に対する高antibody-dependent cellular cytotoxicity活性抗体の有用性の検討および治療薬を目指した新規抗CD33抗体医薬品の創製

村上, 拓也

<https://doi.org/10.15017/1785379>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

急性骨髄性白血病に対する高 antibody-dependent cellular cytotoxicity

活性型抗体の有用性の検討および

治療薬を目指した新規抗 CD33 抗体医薬品の創製

九州大学薬学研究院

創薬科学専攻

村上拓也

要旨

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) は、再発率が高く、化学療法に耐性を示す症例が多く存在するため、未だに予後不良な疾患であり、化学療法に替わる安全性が担保された治療効果の高い薬剤が求められている。近年の研究により、抗体医薬品がある種の血液がんに対して高い臨床効果を示すことが明らかとなってきた。抗体による癌細胞への傷害機構の一つに、抗体による Natural killer (NK) 細胞の活性化を介した抗体依存性細胞傷害活性 ((antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性) が知られている。これまでの研究において、我々は抗体の ADCC 活性を飛躍的に高める高 ADCC 活性化技術を確立している。本研究では、抗 ADCC 活性化技術を適応した抗 CD33 抗体の AML 細胞に対する効果を評価することで、高 ADCC 活性化型抗体の AML 治療における有用性について検討した。また、新規抗 CD33 抗体 hu877 の AML に対する治療効果の可能性を検討した。

本研究では上記の目的のため、ラット抗 CD33 抗体 877 をヒト化し、さらに高 ADCC 活性化技術を適応することで、新規ヒト化抗 CD33 抗体 hu877 を創出した。また、AML に対して臨床で開発されていた抗 CD33 抗体 Lintuzumab、さらに Lintuzumab に高 ADCC 活性化技術を適応した抗体 Lintuzumab F(-) を作製した。これらの抗体について、CD33 抗原に対する結合性、AML 細胞株に対する ADCC 活性を評価した。さらに hu877 および Lintuzumab について、より臨床予測性が高いと考えられる AML 患者由来細胞に対する ADCC 活性、ラット担癌モデルにおける抗腫瘍活性を評価した。また、hu877 と Lintuzumab の種交差性、抗体間の競合性および抗原の細胞内動態に対する影響を評価した。

これらの抗体の機能性を評価した結果、抗 CD33 抗体 hu877、Lintuzumab 及び Lintuzumab F(-) は CD33 抗原に対して高い結合活性を示した。また、高 ADCC 活性化技術を適応した hu877 及び Lintuzumab F(-) は、Lintuzumab よりも高い AML 細胞株に対する ADCC 活性を示し、また、hu877 は、Lintuzumab F(-) よりも高い活性を示した。さらに、hu877 は、AML 患者由来細胞に対する ADCC 活性およびラット担癌モデルにおける抗腫瘍活性において、Lintuzumab よりも高い活性を示した。また、hu877 は、Lintuzumab に対して、異なる種交差性を示し、抗原の内在化や表面抗原量の減少をさせにくい特徴を有していた。

本研究での検討の結果により、高 ADCC 活性型抗 CD33 抗体が AML に対して有用な治療薬となる可能性が示された。さらに、本研究において創出された新規抗 CD33 抗体 hu877 は、より高い抗腫瘍活性により、Lintuzumab よりも高い臨床効果を期待できる AML に対する抗体医薬品となる可能性が強く示唆された。

研究背景

急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia; AML）は、血液がんの一種であり、骨髄および末梢血における未成熟な骨髄細胞（芽球）の異常増殖により特徴付けられる疾患である。60歳未満のAML治療の場合、cytarabine（Ara-C）などを用いた標準化学療法により70-80%程度の高い完全寛解導入率が得られる。しかしながら、再発率が高く、化学療法に耐性を示す症例も多く存在する。さらに、高齢者においては毒性の強い化学療法を行うことが出来ず、寛解導入率は低く、予後不良である [1]。このため、化学療法剤に代わる、より安全性が高い治療薬が望まれている。

近年の研究により、抗体医薬品がある種の血液がんに対して高い臨床効果を示すことが明らかとなってきた。抗CD20抗体であるRituximabは、non-Hodgkin lymphomaの治療を改善し、抗CCR4抗体であるMogamulizumab（KW-0761）は急性T細胞性白血病に対して画期的な臨床効果を示した [2, 3]。これらの抗体医薬品の抗血液がん作用は、ヒトIgG1型抗体の有する抗体依存的細胞傷害活性（Antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC）活性が強く関与していることが報告されている。ADCC活性は、抗原を発現しているターゲット細胞とエフェクター細胞であるナチュラルキラー細胞（natural killer; NK）細胞が抗体を介して架橋されることでNK細胞が活性化し、granzyme、perforinなどの細胞傷害因子が放出されることにより発現される。この抗原-抗体反応を介したADCC活性はターゲット細胞に対する特異的が高いため、化学療法剤による治療で懸念されるような非特異的な傷害による副作用が少ないと考えられている。

ヒトIgG1のCH2ドメインに存在するN型糖鎖に α 1,6 フコース転移酵素（FUT8）によって付加される単糖であるフコースを除去することにより、抗体のADCC活性を飛躍的に向上させることができる [4]。またFUT8を欠損させた細胞で任意のヒトIgG1抗体を産生させることにより、フコースを完全除去した高ADCC活性型抗体を作製することができる [5]。

CD33（siglec-3）は、骨髄細胞のマーカーとして知られているシアル酸結合性のI型膜蛋白質である。AML、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndromes; MDS）などの骨髄細胞の異常を認める疾患において、CD33の発現が亢進することが報告されている [6]。さらに、近年、CD34陽性/CD38陰性/CD123陽性のAML幹細胞でCD33の発現が認められることが報告されている [7]。

Lintuzumab は ADCC 活性を主な作用機序とする抗 CD33 抗体であり、AML、MDS を適用疾患として開発されていた [8]。Phase I 試験において半数程度の患者の末梢血および骨髄中の芽球を減少させることが確認され、一部の患者では完全寛解が認められた。加えて、完全寛解に至った患者の一部に長期間 Lintuzumab が投与されたが重篤な毒性は認められなかった [9]。しかしながら、化学療法剤との併用で行われた Phase IIb 試験において、標準化学療法に対して十分な上乗せ効果を示すことができず、Lintuzumab の開発は中止された [10]。これらの結果は、CD33 が AML 治療において、細胞傷害活性を有する抗体の標的として安全域を確保しつつ薬効を発現できる抗原であること、さらに、より高い細胞傷害活性を有し、芽球をより強力に除去できる抗体医薬品を創製することにより、高い臨床効果を示すことができる可能性を示唆している。

本研究では、CD33 をモデル抗原として、高 ADCC 活性化技術を適応した Lintuzumab および新規抗 CD33 抗体 hu877 の AML 細胞に対する効果を評価することで、高 ADCC 活性型抗体の AML 治療における有用性について検討した。

略号表

AML; acute myeloid leukemia: 急性骨髓性白血病

ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity : 抗体依存的傷害

NK; natural killer

MDS; myelodysplastic syndromes: 骨髓異形成症候群

CHO; Chinese hamster ovary

DNP; 2,4-Dinitrophenol

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

BSA; Bovine serum albumin: ウシ血清アルブミン

CDRs; complementarity-determining regions: 相補性決定領域

MFI; mean fluorescent intensity: 平均蛍光強度

PBMCs; peripheral blood mononuclear cells: 末梢血単核球細胞

CLL; chronic lymphocytic leukemia: 慢性リンパ性白血病

CDC; complement-dependent cytotoxicity: 補体依存的傷害

PE; Phycoerythrin

材料および方法

ヒト血液試料

ヒト末梢血試料は、協和発酵キリンにおいて適切にインフォームドコンセントが得られ、登録された健全ボランティアより無作為に選定された方から採取したものをを用いた。

細胞および実験動物

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株である DG44 は、コロンビア大学 Lawrence Chasin 博士より譲渡いただいた。ヒト AML 細胞株である KG-1、KG-1a、HL-60、THP-1、TF-1、MV4-11、Kasumi-3、HEL92.1.7、マウスミエローマ細胞である P3-U1 は American Type Culture Collection より購入した。ヒト AML 細胞株である NB-4、ML-1、ML-2、ME-1、MOLM-13 は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures より購入した。ヒト AML 細胞株である CMK11-5 は JCRB 細胞バンクより購入した。ヒト AML 細胞株である EOL-1 は理研バイオリソースセンターより購入した。上記の細胞株は、購入元が提供する培養方法に従って継代培養した。AML 患者由来骨髄細胞は AllCells より購入した。SD ラットおよび F344 / NJcl-rnu / rnu ラットは日本クレアより購入した。CD33 発現 CHO 細胞は、ヒト CD33 (NM001177608)、カニクイザル CD33 (XM_005590081.2)、チンパンジー CD33 (XM_009436143.1) の遺伝子配列を pKANTEK93 ベクター [11] に挿入し作製した発現ベクターを電圧ポレーション法により CHO 細胞に導入し、高発現株を限界希釈法によるシングルセルクローニングにより単離することで樹立した。

リコンビナント CD33 の作製

ヒスチジンタグ付加リコンビナント CD33 (CD33-His₆) は下記の方法により取得した。ヒト CD33 細胞外領域 (1 から 258 番目までのアミノ酸残基) のカルボキシル末端にヒスチジンタグ (HHHHHH) を付加したタンパク質を CHO 細胞で発現し、培養上清より Ni-NTA レジン (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。

抗 DNP 抗体の作製

リコンビナント抗 2, 4-dinitrophenol (DNP) 抗体 (ヒト IgG1/ κ アイソタイプ) は、完全ヒト抗体を産生する KM マウス [12] に Keyhole Limpet Hemocyanin-DNP を免疫することでハイブリドーマを樹立することで得た。その細胞より抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を同定した [13]。

抗 CD33 抗体 Lintuzumab の遺伝配列取得および作製

Caron PC らの報告 [8] をもとに Lintuzumab の重鎖および軽鎖可変領域の遺伝子配列情報を取得した。その配列をヒト IgG1 の H 鎖および L 鎖の定常領域遺伝子配列を含む発現ベクターである pKANTEX93 ベクターに挿入し、CHO 細胞に遺伝子導入し、培養上清より Protein A (GEヘルスケア) を用いて精製した。

ラット抗 CD33 モノクローナル抗体 877 の取得

SD ラットに CD33 発現 CHO 細胞 (1×10^7 細胞) を 4 回免疫し、最終免疫より 3 日後に脾臓を採取した。この脾臓より取得した脾臓細胞とマウスミエローマ細胞である P3-U1 を 10 : 1 の割合で polyethylene glycol 1000 (純正化学) を用いて細胞融合させハイブリドーマを作製した。下記に示す enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) によりヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選抜した。これらのハイブリドーマに対し、さらに限界希釈法によるシングルセルクローニングを 2 回行い単クローン化した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

抗原への結合を評価する ELISA は下記の方法により行った。PBS を用いて $2 \mu\text{g/mL}$ に希釈したリコンビナントヒト CD33 (rhCD33-Fc, R&D システムズ) を 96 ウェル ELISA プレートに添加後、 4°C で一晩静置し吸着させた。1.0% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS (1% BSA / PBS) で室温 1 時間ブロッキング後、1% BSA / PBS で希釈した抗体を室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween を含む PBS (T-PBS) で洗浄後、1% BSA / PBS で希釈した HRP-conjugated goat anti-rat IgG (Zymed Laboratories) を室温 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄後、基質として

H₂O₂ / 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt) を添加し発色させた。反応停止液として 5% SDS 溶液を添加後、吸光波長 415 nm の吸光度およびリファレンス波長 490 nm の吸光度を測定した。

ヒト化抗 CD33 モノクローナル抗体 hu877 の遺伝子配列の取得

ヒト化抗 CD33 抗体 hu877 は、ヒト IgG1 の定常領域および可変領域のフレームワークにラット抗 CD33 モノクローナル抗体 877 の相補性決定領域 (complementarity-determining regions; CDRs) を移植することにより作製した [14]。ラット抗体 877 を産生するハイブリドーマより VH および VL 領域をコードする cDNA を取得し、塩基配列を同定した (図 1)。その塩基配列をもとにラット抗体 877 の CDRs のアミノ酸配列を同定した。同定した CDRs をヒト IgG1 抗体可変領域のフレームワークに挿入したアミノ酸配列より、Discovery Studio (アクセルリス) を用いて 3 次元構造を表示した。この 3 次元構造とラット抗体 877 の可変領域アミノ酸配列より同様に表示した 3 次元構造とを比較し、移植したヒト IgG1 フレームワークのアミノ酸配列の中で、構造に寄与しうる残基を予測し、親抗体である 877 のフレームワークのアミノ酸残基に改変することで、hu877 の遺伝子配列を作製した。また、ラット抗体 877 の VH および VL 領域をコードする遺伝子配列をヒト IgG1 の定常領域に付加し、ヒト-ラットキメラ抗体 c877 の遺伝子配列とした。

VH

```
      10      20      30
877    1  LSQIQETGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYTIISGYEWTWIRK 40
hu877  1  QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSVSSGYEWTWIRK 40
                               CDR1

      50      60      70
877    41 FPGNRMEWMCYINSAGSTDYNPSLKSRVSITRDTSKNQFF 80
hu877  41 PPGKRMEWMCYINSAGSTDYNPSLKSRVTISRDTSKNQFS 80
                               CDR2

      90     100     110
877    81 LQLNSVTTEDTATYFCTHWDIHWGPGVMVTVSS 112
hu877  81 LKLSSVTAADTAVYYCTHWDIHWGQGTLVTVSS 112
                               CDR3
```

VL

```
      10      20      30
877    1  DVVLTQTLVAQPVRLGDQASISCRSSQSLVHSDGHTYLEW 40
hu877  1  DIVLTQSPPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLVHSDGHTYLEW 40
                               CDR1

      50      60      70
877    41 YLQKPGQSPQLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGDFTLKI 80
hu877  41 YLQKPGQSPQLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
                               CDR2

      90     100     110
877    81 SRVEPEDLGLYYCFQGTHDLPTFGGGKLELK 112
hu877  81 SRVEAEDVGVYYCFQGTHDLPTFGQGTKLEIK 112
                               CDR3
```

図1 新規抗 CD33 抗体 hu877 の可変領域のアミノ酸配列

ラット抗 CD33 抗体 877 およびヒト化抗体 hu877 の重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL) を示した。VH、VL の相補性決定領域 (CDR) を示し、N 末端側から CDR1 から 3 として示した。ヒトフレームワークのアミノ酸配列からラットフレームワークのアミノ酸配列に改変したアミノ酸残基を下線で示した。

デフコース型抗体の作製

デフコース型抗体 c877、hu877、Lintuzumab F(-)、抗 DNP 抗体は、FUT8 を欠損させた CHO 細胞 [15] にそれぞれの H 鎖および L 鎖定常領域を挿入した pKANTEX93 ベクターを遺伝子導入し、培養上清から Protein A を用いて精製することにより作製した。

表面プラズモン共鳴法による抗体結合性

表面プラズモン共鳴法での抗 CD33 抗体の結合性評価は、Biacore T100 (GE ヘルスケア) を用いて行った。抗ヒト IgG 抗体を固相化した CM5 sensor chip (GE ヘルスケア) に抗 CD33 抗体を反応させ、78.1 ng/mL から 1250 ng/mL の CD33-His₆ を流速毎分 30 μ L で反応させた。得られたセンサーグラムから Biacore T100 Evaluation software を用いて 1:1 Langmuir 結合モデルにおける結合速度定数 (ka) および解離速度定数 (kd) を解析した。解離定数 (K_D) は、解離速度定数 (kd) を結合速度定数 (ka) で除した値として算出した。

AML 細胞株の表面抗原量の定量

細胞表面抗原の定量は抗体結合数が既知である標識ビーズを含む QIFI Kit (DAKO) を用い、下記の方法により行った。1~5 x 10⁵ 細胞の AML 細胞株に、1% BSA、0.05% NaN₃、0.02% EDTA を含む PBS (染色バッファー) で希釈した正常マウス血清を加えブロッキングし、染色バッファー希釈したマウス抗ヒト CD33 抗体 (クローン P67.6, Santa Cruz Biotechnology) およびアインタイプコントロール抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を添加し、氷上で 60 分間反応させた。反応後、PBS で 2 回洗浄を行い、その細胞および添付のセットアップビーズ、キャリブレーションビーズに、染色バッファーで希釈調製した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (DAKO) を 30 μ L 添加し、氷上で 40 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、染色バッファーに懸濁し、フローサイトメーター (FC500 MPL, Beckman Coulter) で、平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) を測定した。得られた各平均蛍光強度より、QIFI KIT に添付された説明書に従い単位細胞あたりの抗体結合数 (site/cells) を算出した。

抗体の細胞への反応性

抗体の AML 患者由来骨髄細胞に対する反応性は下記の方法により測定した。Alexa Fluor® 647 で蛍光標識された hu877 および抗 DNP 抗体は、Alexa Fluor 647 Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、添付のプロトコールに従って作製した。AML 患者由来細胞 1 x 10⁵ 細胞に、ヒト IgG を加えブロッキングを行い、抗ヒト CD45-APC-Cy7 抗体 (Beckman

Coulter)、抗ヒトCD34- Phycoerythrin (PE) 抗体 (Beckman Coulter)、抗ヒトCD38-PE-Cy7 抗体 (Beckman Coulter) および蛍光標識された hu877 または抗 DNP 抗体を染色バッファーで希釈し添加し、氷上で 60 分間反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄を行い、染色バッファーで懸濁し、フローサイトメーターにより MFI を測定した。

抗体のヒト CD33、カニクイザル CD33、チンパンジーCD33 を発現させた CHO 細胞への反応性は下記の方法により測定した。3 x 10⁵ 細胞の CHO 細胞に希釈した正常マウス血清を加えブロッキングし、FCM バッファーで希釈調製した各抗体を添加し、氷上で 60 分間反応させた。その後、PBS で 2 回洗浄を行い、染色バッファーで希釈した FITC 標識抗ヒト IgG F(c) ポリクローナル抗体 (Acris Antibodies) を添加し、氷上で 40 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄を行った後、FCM バッファーに懸濁してフローサイトメーター用いて、MFI を測定した。

抗体処理による細胞表面 CD33 抗原量変化の測定

CD33 のインターナライズは下記のようにフローサイトメトリーを用いて測定した。AML 細胞株 CMK11-5 を 10%牛血清を含む RPMI 1640 (Invitrogen) に懸濁し、24 ウェルプレートに播種し、抗 CD33 抗体または抗 DNP 抗体 (陰性対照) を添加し 37°C、5%CO₂ で静置した。静置後、細胞を氷上で冷却した PBS で洗浄後、PE 付加マウス抗 CD33 抗体 (クローン HIM3-4、Santa Cruz Biosystems) または、PE 付加マウス抗アイソタイプコントロール抗体 (Santa Cruz Biosystems) を氷上で 1 時間反応させた。反応後、細胞を冷却した PBS で洗浄、染色バッファーに懸濁し、MFI をフローサイトメーターにより測定した。細胞表面上に残存する CD33 の割合を下記の計算式により算出した。

$$CD33 (\%) = (MFI_{sample} - MFI_{isotype}) / (MFI_{control} - MFI_{isotype}) \times 100$$

MFI_{sample} は抗 CD33 抗体添加後 PE 付加マウス抗 CD33 抗体で染色した各実験サンプルの MFI、MFI_{isotype} は PE 付加マウス抗アイソタイプコントロール抗体で染色したサンプルの MFI、MFI_{control} は抗 DNP 抗体添加後 PE 付加マウス抗 CD33 抗体で染色した各実験サンプルの MFI を示す。

共焦点蛍光顕微鏡を用いた抗 CD33 抗体の内在化の解析

共焦点蛍光顕微鏡による CD33 抗体の内在化の観察は下記の方法で行った。Alexa Fluor 488 付加ヤギ抗ヒト Fc 抗体 Fab 断片である Zenon Human IgG Labeling Kit (Invitrogen) を用いて抗 CD33 抗体を蛍光標識し、冷却した 10%牛血清を含む RPMI 1640 中で CMK11-5 細胞に 40 分間反応させた。反応後、PBS で洗浄し、未反応の抗 CD33 抗体を取り除いた。その後、37°C、5%CO₂ で静置した。静置後、冷却した PBS で洗浄し、さらに 4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。蛍光画像は共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (カールツァイス)により取得した。

抗体依存的細胞傷害 (ADCC) アッセイ

ADCC 活性は、LDH アッセイまたは ⁵¹Cr リリースアッセイにより評価した。健常人由来血液またはラット由来血液より Lymphoprep (Axis-Shield) を用いて濃度勾配遠心分離法を用いて末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を取得した。

LDH アッセイは下記の方法で行った。1 ウェルあたり 1 x 10⁴ 細胞の標的細胞と 2.5 x 10⁵ 細胞のエフェクター細胞を 5% FCS/phenol red-free PRMI 1640 (ADCC 用培地) に懸濁し U 底 96 ウェルプレートに播種した。ADCC 用培地により各濃度に希釈した抗 CD33 抗体および抗 DNP 抗体を播種した細胞に添加し、37°C、5%CO₂ で 4 時間静置した。静置後、上清中に含まれる LDH 活性を LDH detection reagent (CytoTox96, Promega) を用いて測定した。統計学的解析は、各細胞に対する各ドナー由来 PBMC をエフェクター細胞として用いた際の細胞障害活性 (%) について、独立 2 群間の t 検定を行った。p < 0.05 の場合に有意差ありとした。統計解析には SAS (SAS Institute Inc.) を用いて行った。

⁵¹Cr リリースアッセイは下記の方法で行った。標的細胞を 1 x 10⁶ 細胞あたり 15μL の FBS に懸濁し、標的細胞を 1 x 10⁶ 細胞あたり 50μL ⁵¹Cr 溶液を添加し 37°C、5%CO₂ で 1 時間静置した。静置後、ADCC 用培地にて 3 回洗浄、再懸濁し、U 底 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 x 10⁴ 細胞となるように播種した。それらにエフェクター細胞 2.5 x 10⁵ 細胞を加え、ADCC 用培地により各濃度に希釈した抗 CD33 抗体および抗 DNP 抗体を播種した細胞に添加し、37°C、5%CO₂ で 4 時

間静置した。静置後、上清を 96 ウェル測定用プレート (Perkin Elmer) に分取し、乾燥後、トプ
カウント (Perkin Elmer) を用いて γ 線強度を測定した。 ^{51}Cr リリースアッセイでの細胞傷害活性
は下記の計算式により算出した。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = (E - S) / (M - S) \times 100$$

E: 各実験サンプルの測定値、S: 抗体非添加サンプルの測定値、M: 9% Triton X-100 により細胞
を可溶化したサンプルの測定値

全血中での細胞除去アッセイ

全血中での細胞除去アッセイは、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (SIGMA) により
蛍光標識した標的細胞、希釈した抗体を全血中に添加し、振とう培養後、標的細胞数をフローサイ
トメーターを用いて測定した。浮遊細胞用 24 ウェルプレートに 1% ヘパリンナトリウム注 N を含む
健常人末梢血を 1 ウェルあたり 500 μL 分注した。PRMI 1640 にて希釈した抗体、蛍光標識した標
的細胞を添加し 37°C、5%CO₂ で 16 時間振とうして攪拌しながら反応させた。反応後、内部標準粒
子である Flow Beas (FB) として Flow-Count (Beckman Coulter 社) を添加し、ACK Lysing
Buffer (Lonza) を用いて、37°C、10 分間、振とうし溶血させた。溶血後、1% BSA-PBS にて 2 回
洗浄、再懸濁した。これらのサンプル中の蛍光標識された標的細胞の数をフローサイトメーター用い
て測定した。

ヌードラットにおける抗腫瘍活性

ヌードラットを用いた抗腫瘍試験は、協和発酵キリン株式会社実験動物委員会の承認のもと、実
施基準に従って実施した (承認番号: 11J0165)。Cyclophosphamide (塩野義製薬株式会社)
を生理食塩液 (大塚製薬株式会社) にて 25 mg/mL に溶解し、用量 100 mg/kg にてラット腹腔
内に投与した。Cyclophosphamide の投与 3 日後に、CMK 11-5 を RPMI 1640 に懸濁し、ヌー
ドラットの腹側皮下に 1 箇所あたり 1×10^7 細胞になるように移植した。細胞移植 13 日後に腫瘍の
長径、短径を測定して腫瘍体積を算出し、電子天秤を用いてラットの体重を測定し、この体重当
りの腫瘍体積をもとに群分けを行った。群分けした日を Day 0 とし、Day 0、4、7、12、15、19、22 及

び 26 に希釈した抗体を 3 mg/kg になるように静脈内投与した。Day 0、4、7、12、14、19、22、26、29 及び 32 に腫瘍の長径、短径及びラットの体重を測定し、腫瘍体積を算出した。腫瘍体積は下記の式を用いて算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \{\text{小径 (mm)}\}^2 \times 1/2$$

統計学的解析は、各測定日における腫瘍体積について、1-way ANOVA 検定および Tukey の多重比較検定を行った。p < 0.05 の場合に有意差ありとした。統計解析には SAS (SAS Institute Inc.) を用いて行った。

競合 ELISA

検出抗体である hu877、Lintuzumab のビオチン化は、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付のプロトコールに従って作製した。PBS を用いて 2 µg/mL に希釈した CD33-His₆ を 96 ウェル ELISA プレート添加後、4°C で一晩静置し吸着させた。1%BSA / PBS で室温 1 時間ブロッキング後、1%BSA / PBS で希釈した競合抗体および検出抗体であるビオチン化した hu877 または Lintuzumab を室温で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄後、1% BSA / PBS で希釈した HRP 標識した Streptavidin (Vector) を室温 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄後、基質として H₂O₂ / 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt) を添加し発色させた。反応停止液として 5% SDS 溶液を添加後、吸光波長 415 nm の吸光度およびリファレンス波長 490 nm の吸光度を測定した。

結果

抗 CD33 抗体の抗原結合活性

作製した抗 CD33 抗体 c877、hu877 および陽性対照である Lintuzumab、デフコース型である Lintuzumab F(-)の CD33 に対する抗原結合活性を表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果を表1および図 2 に示す。c877、hu877、Lintuzumab および Lintuzumab F(-)は、CD33 に対して解離定数 (K_D) として 10^{-8} 以上の高い結合活性を示した。hu877 は親抗体である c877 と比較して結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) とともに同程度の値を示した。hu877 は Lintuzumab および Lintuzumab F(-)に比べて 4 倍程度高い結合活性を有していた。

	Glycoform	k_a (1 / Ms)	k_d (1 / s)	K_D (nM)
c877	Defucosylated	1.15×10^6	1.46×10^{-3}	1.27
hu877	Defucosylated	1.07×10^6	1.27×10^{-3}	1.19
Lintuzumab	Fucosylated	8.24×10^5	3.89×10^{-3}	4.72
Lintuzumab F(-)	Defucosylated	8.17×10^5	3.83×10^{-3}	4.69

表1 抗 CD33 抗体の抗原結合活性

それぞれの抗体をセンサーチップ上に固相化し、リコンビナントヒト CD33 を反応させ、SPR 法により結合活性を測定した結果を示す。Glycoform はヒト IgG1 の重鎖 297 番目のアスパラギン酸残基に結合している N 結合型糖鎖のフコースの有無を示す。 k_a は結合速度定数、 k_d は解離速度定数、 K_D は k_d を k_a で除することで求められる解離定数を示す。

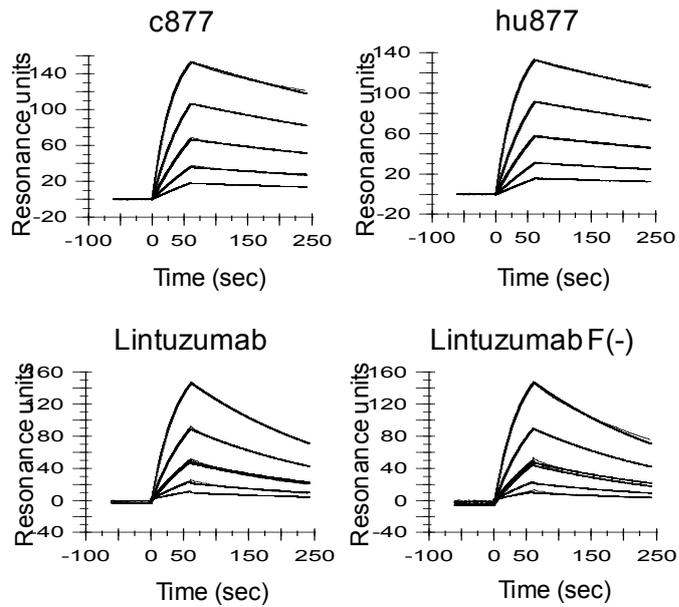


図 2 抗 CD33 抗体の抗原結合活性

それぞれの抗体をセンサーチップ上に固相化し、各濃度のリコンビナントヒト CD33 (グラフ中底部より 78.1 ,156 ,313 ,525 ,1250 ng/mL) を反応させることにより、SPR 法により測定されたセンサーグラムを示す。縦軸はセンサーチップ上の質量変化を表す Resonance Units を示す。横軸は、アナライト添加時を 0 秒とした時間 (sec) を示した。0 秒から 60 秒までの間は結合相、60 秒から 220 秒までは解離相となる。

AML 細胞株の CD33 抗原発現量

AML 細胞株における CD33 の発現量をフローサイトメトリーを用いて定量した。その結果を図 3 に示す。AML 細胞株 14 株を評価した結果、KG-1a、ME-1 は比較的低い発現量だった。その他の 12 株では、明確に発現が認められ、1 細胞あたり 1×10^4 から 2×10^5 程度の発現量だった。

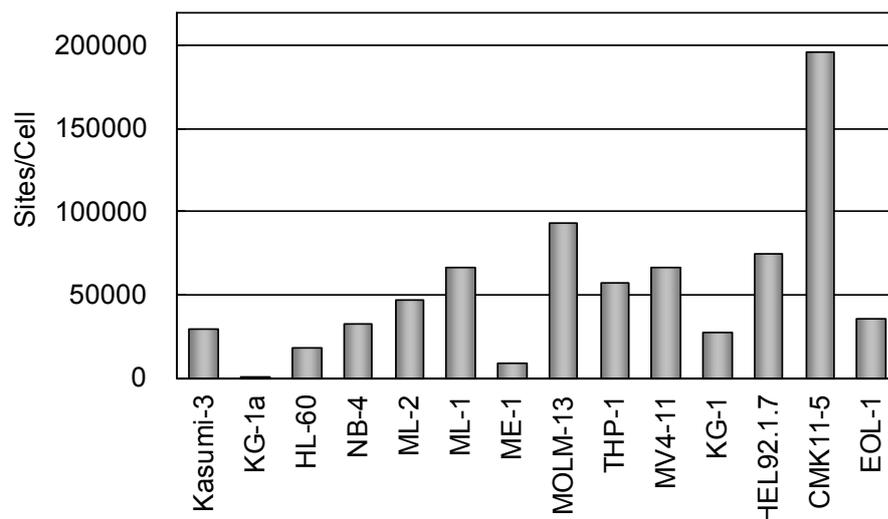


図 3 AML 細胞株の CD33 抗原発現量

AML 細胞株ごとのヒト CD33 の発現量を定量した値を示す。マウス抗ヒト CD33 抗体 P67.6 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびアイソタイプコントロール抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて染色した細胞と QIFI KIT 添付の標準ビーズの蛍光強度より算出した単位細胞あたりの抗体結合数 (sites/cell) を縦軸として、それぞれの AML 細胞株ごとの値を示した。

抗 CD33 抗体の AML 細胞株に対する ADCC 活性

抗 CD33 抗体 hu877、Lintuzumab、Lintuzumab F(-)について AML 細胞株に対する ADCC 活性を LDH 法を用いて評価した。その結果を図 4 に示す。hu877、Lintuzumab、Lintuzumab F(-)は AML 細胞株 NB-4、TF-1、THP-1、CMK11-5 に対して抗体濃度依存的な細胞傷害を誘導した。Lintuzumab では、ほとんど傷害活性を誘導できない THP-1 に対しても hu877、Lintuzumab F(-)は明確な傷害活性を示した。hu877 と Lintuzumab F(-)とを比較した場合、NB-4、CMK11-5において、hu877はLintuzumab F(-)に対して、より低濃度から傷害活性を誘導した。また、エフェクター細胞がない抗体のみの場合、細胞に対する傷害活性は認められなかった(図省略)。

ADCC 活性の強さに影響することが知れている因子として、エフェクター細胞である NK 細胞の PBMCs 中に占める割合や、FcγR の遺伝的多型が知られており、無作為に選定した健常人由来の PBMCs には個体差に起因する活性差が存在する。また、AML にはその形態、マーカー発現、癌化した細胞の分化度から M1 から M7 に分類され、それらは化学療法剤への反応性や悪性度が異なっている。このため、AML 細胞株についても抗体による ADCC 活性による傷害性に対して株ごとに異なる反応性を示すことが考えられる。これらのことから、次にさらに複数ドナー由来の PBMCs を用いて各種 AML 細胞株に対する ADCC 活性を評価した。その結果を図 5 に示す。hu877 は、用いた PBMCs によって活性強度は異なるものの、Kasumi-3、NB-4、EOL-1、MOLM-13、MV4-11、THP-1 に対して、平均 40%から 70%の ADCC 活性を誘導した。一方、Lintuzumab は、平均 10%から 20%の ADCC 活性しか誘導しなかった。

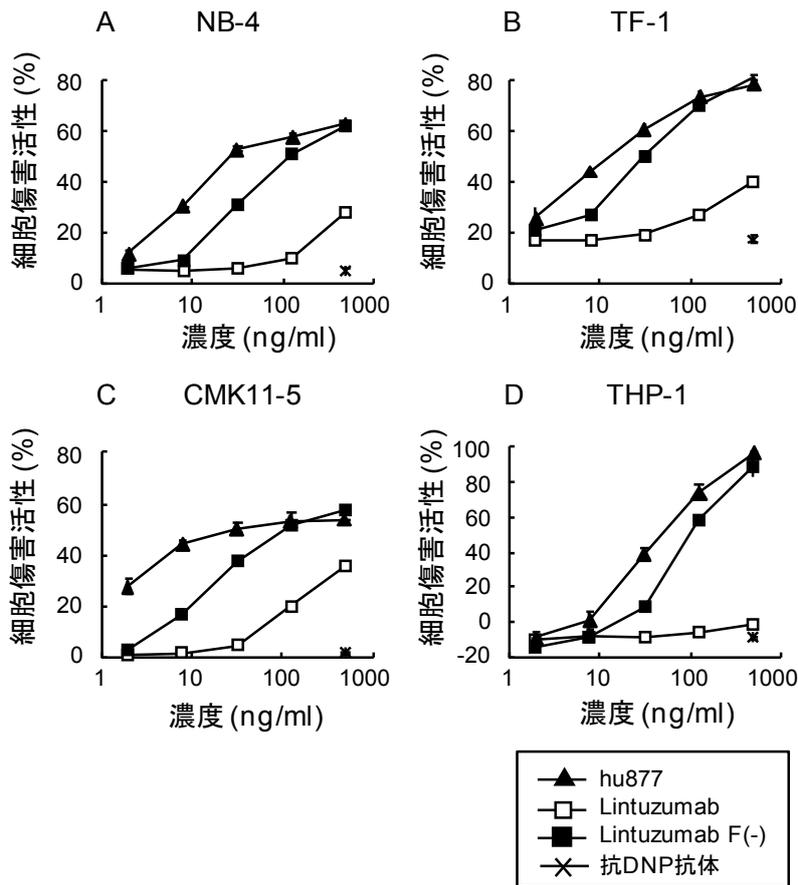


図4 AML細胞株に対するADCC活性

抗CD33抗体のAML細胞株に対するADCC活性をLDH法を用いて評価した結果を示す。標的細胞としてA: NB-4、B: TF-1、C: CMK11-5およびD: THP-1の結果をそれぞれ示す。横軸に各抗体の添加濃度 (ng/mL) を示し、縦軸に Triton X-100 により標的細胞を溶解した場合を100%としたときの、各サンプルでの標的細胞が傷害された割合 (%) を細胞傷害活性として示した。図中のエラーバーは標準偏差を示す。試験は n = 3 で実施した。

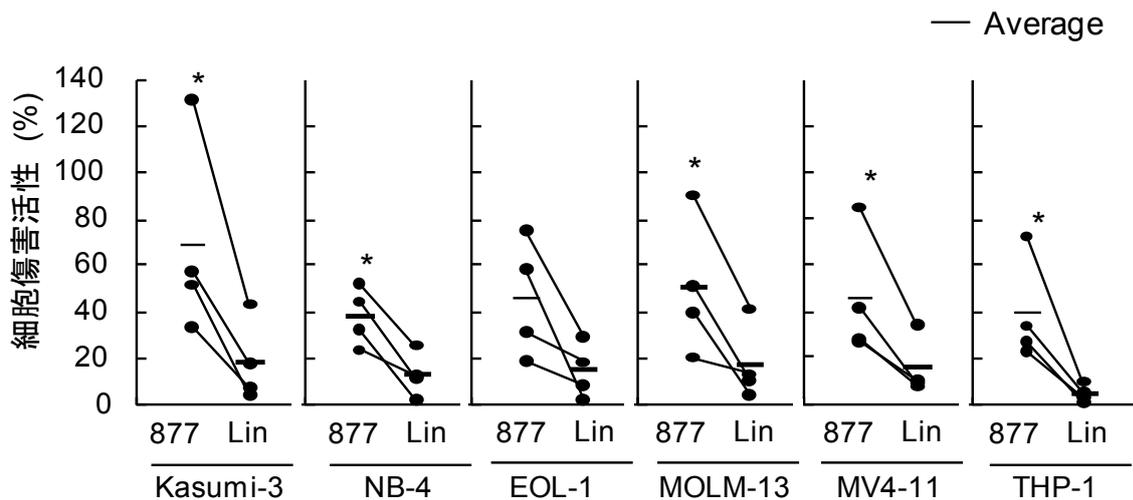


図5 各種 AML 細胞株に対する ADCC 活性

抗 CD33 抗体 (100 ng/mL) の AML 細胞株に対する ADCC 活性を LDH 法を用いて評価した結果を示す。標的細胞として Kasumi-3、NB-4、EOL-1、MOLM-13、MV4-11、THP-1 を用いた結果を示す。縦軸に Triton X-100 により標的細胞を溶解した場合を 100%としたときの、各サンプルでの標的細胞が傷害された割合 (%) を細胞傷害活性として示した。877: hu877、Lin: Lintuzumab として結果を示した。同じ標的細胞に対する同じドナー由来の PBMCs で行った結果を線で示した。図中の—は各標的細胞での複数ドナー由来 PBMCs で行った結果の平均値を示す。

*: vs Lintuzumab $p < 0.05$

抗 CD33 抗体の人全血中における細胞傷害活性

PBMCs を用いた ADCC 活性の評価に対して、生体中では血中に存在する内在性イムグロブリンなどの交雑成分が ADCC 活性に影響を与えることが考えられる。このため、新規抗 CD33 抗体の細胞傷害活性をより臨床に近い状態で評価するため、人全血中において、血液由来細胞をエフェクターとして、標的細胞である AML 細胞株と抗 CD33 抗体を添加し、抗 CD33 抗体による細胞傷害活性を評価した。その結果を図 6 に示した。hu877、Lintuzumab、Lintuzumab F(-)は NB-4、TF-1 に対して濃度依存的に細胞傷害活性を示した。NB-4 を標的とした場合、Lintuzumab F(-)は Lintuzumab に対して 10 分の 1 程度の濃度から細胞傷害活性を示した。hu877 は約 10 ng/mL の低濃度から約 90%の細胞を除去し、Lintuzumab、Lintuzumab F(-)と比較して、10 分の一から 100 分の 1 程度の低濃度より傷害活性を示した。また、TF-1 を標的とした場合も同様の結果が得られた。

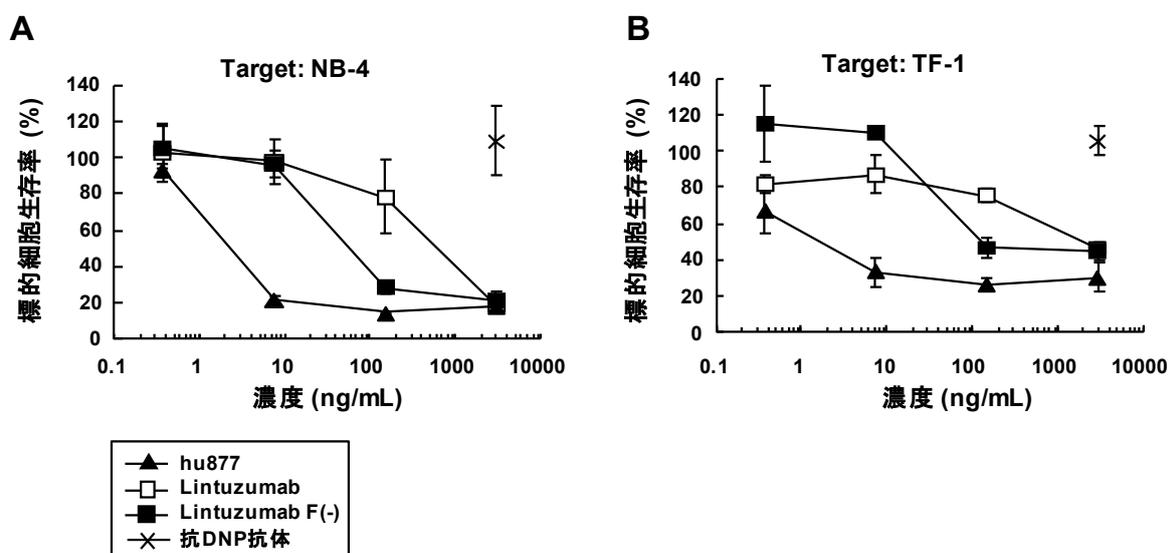


図 6 ヒト全血中における抗 CD33 抗体による細胞傷害活性

ヒト全血中におけるヒト AML 細胞株に対する抗 CD33 抗体による細胞傷害活性を示す。標的細胞として A: NB-4、B: TF-1 の結果をそれぞれ示す。横軸に添加した抗体の濃度 (ng/mL)、縦軸に標的細胞であるヒト AML 細胞の生存率 (%) を示した。図中のエラーバーは、標準偏差と示す。試験は n = 3 で実施した。

抗 CD33 抗体の患者由来芽球および AML 幹細胞画分に対する結合活性

AML は骨髄中の未分化な骨髄細胞(芽球)が異常増殖することによる引き起こされる疾患である。これら芽球は、AML 患者骨髄中の CD34 陽性/CD38 陽性細胞画分に多く含まれる。また、AML 幹細胞は、AML 患者骨髄中の CD34 陽性/CD38 陰性細胞画分に含まれていることが知られている。これらの芽球および AML 幹細胞は AML 治療において標的細胞とみなすことができる。

抗 CD33 抗体 hu877 が患者血中由来の芽球および AML 幹細胞に反応するかを検討した。その結果を図 7 に示した。内在性 IgG への2次抗体の交差性のため、hu877 に Alexa Fluor 647 を標識した抗体(hu877-Alexa647)を用いて染色した。その結果、hu877-Alexa647 は CD34 陽性/CD38 陽性細胞である芽球および AML 幹細胞が含まれる CD34 陽性/CD38 陰性細胞にも反応性を示した。

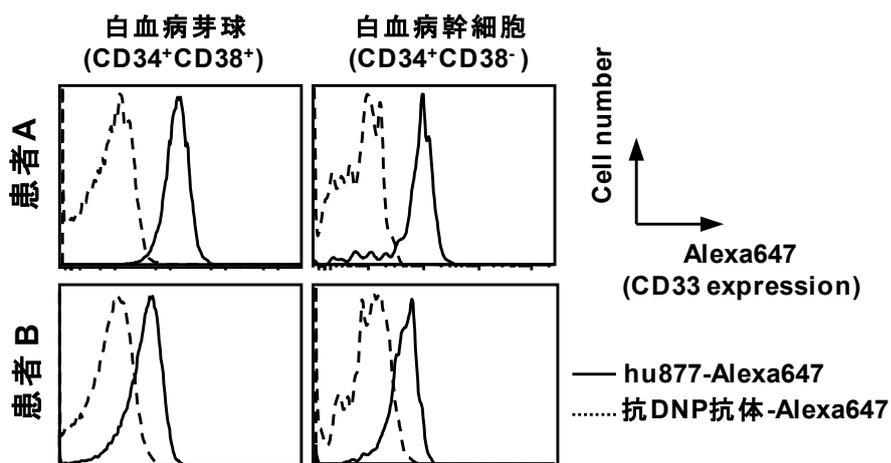


図 7 AML 患者由来白血病芽球および白血病幹細胞画分に対する結合活性

AML 患者 2 例 (患者 A、B) の骨髄由来細胞に対する抗 CD33 抗体 hu877 の反応性を示す。AML 患者由来骨髄細胞のヒト CD45 陽性画分を、CD34、CD38 により展開し、CD34 陽性、CD38 陽性画分を白血病芽球画分、CD34 陽性、CD38 陰性画分を白血病幹細胞画分とし、それぞれの画分に対する hu877 (実線) および抗 DNP 抗体 (点線) の反応性を示した。図の横軸は、蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

抗 CD33 抗体の AML 患者由来骨髄細胞に対する ADCC 活性

抗 CD33 抗体がプライマリー AML 細胞に対しても ADCC 活性を示すかを患者由来 AML 細胞を標的細胞、正常 PBMCs をエフェクター細胞として用いて検討した。その結果を図 8 に示した。hu877 は濃度依存的にプライマリー AML 細胞に対して ADCC 活性を示した。一方、Lintuzumab は僅かな ADCC 活性しか示さず、陰性対象抗体では、全く ADCC 活性は認められなかった。

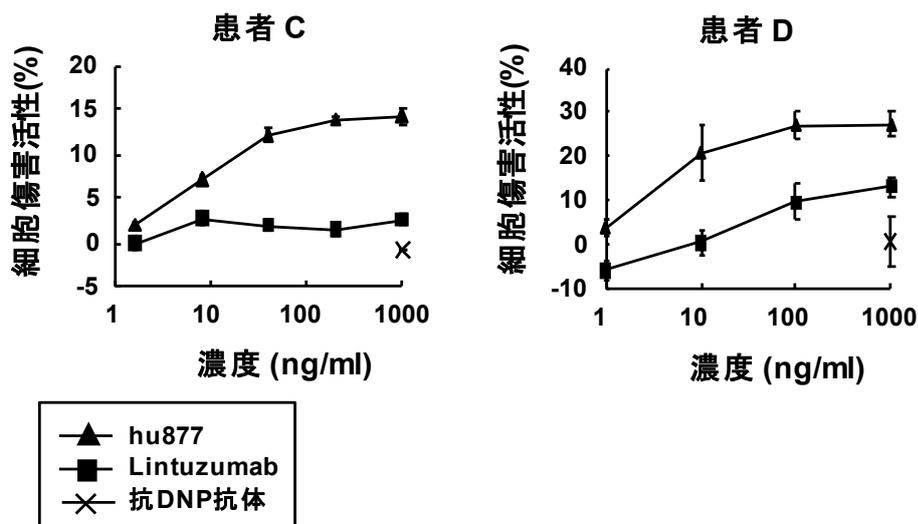


図 8 抗 CD33 抗体の AML 患者由来骨髄細胞に対する ADCC 活性

AML 患者 2 例 (患者 C、D) の骨髄由来細胞に対する抗 CD33 抗体の ADCC 活性を Cr リリース法により評価した結果を示す。横軸に添加した抗体の濃度 (ng/mL)、縦軸に Triton X-100 により標的細胞を溶解した場合を 100%としたときの各サンプルで標的細胞が傷害された割合 (%) を細胞傷害活性 (%) として示した。図中のエラーバーは、標準偏差と示す。試験は n = 3 で実施した。

ラットエフェクター細胞を用いた ADCC 活性

ラット PBMCs をエフェクター細胞とした場合も、ヒト由来 PBMCs と同様の ADCC 活性が認められることが報告されている [16]。このことから、ラット PBMCs をエフェクター細胞として、AML 細胞株に対するヒト化抗 CD33 抗体 hu877 の ADCC 活性を評価した。その結果を図 9 に示した。hu877、Lintuzumab は、AML 細胞株 CMK11-5 に対して、ラット PBMCs をエフェクター細胞とした場合も、ヒト PBMCs をエフェクター細胞とした場合と同様に、抗体濃度依存的な ADCC 活性を示した。また、ヒト PBMCs をエフェクター細胞とした場合と同様に、hu877 は Lintuzumab に対してより低濃度から活性を示し、また、より高い細胞傷害活性を示した。

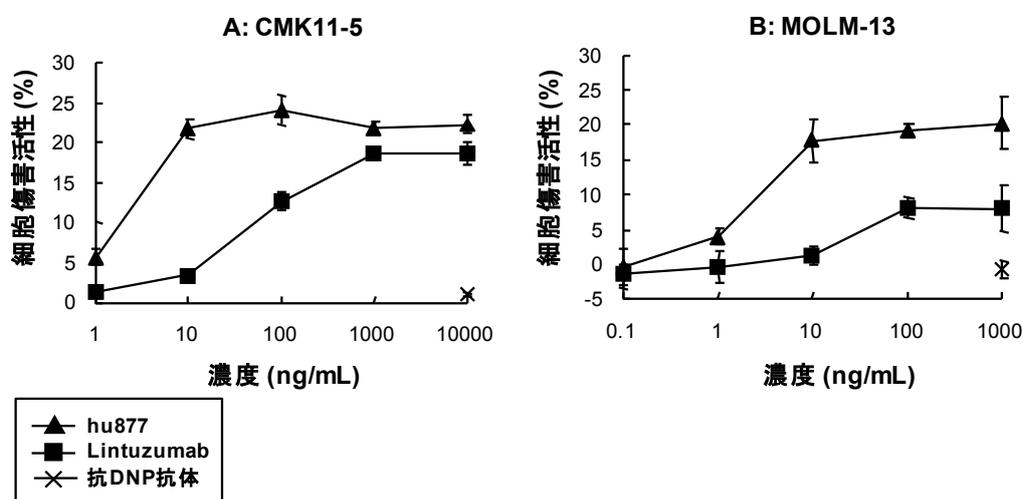


図 9 ラットエフェクター細胞を用いた ADCC 活性

ラット PBMCs をエフェクター細胞としたときの抗 CD33 抗体の AML 細胞株に対する ADCC 活性を LDH 法を用いて評価した結果を示す。標的細胞として A: CMK11-5、B: MOLM-13 を用いた結果をそれぞれ示す。横軸に各抗体の添加濃度 (ng/mL) を示し、縦軸に Triton X-100 により標的細胞を溶解した場合を 100%としたときの、各サンプルでの標的細胞が傷害された割合 (%) を細胞傷害活性として示した。図中のエラーバーは標準偏差を示す。試験は n = 3 で実施した。

ヌードラット担癌モデルにおける抗腫瘍活性

ヒト化抗 CD33 抗体 hu877 は、ラット PBMCs をエフェクターとした場合でも、ADCC 活性を示し、ADCC 活性を主な作用機序とする hu877 の抗腫瘍活性をラット in vivo モデルを用いて評価できると考えられた。このため、ヌードラットの皮下に CMK11-5 を移植するジェノグラフトモデルを作製し、hu877 の抗腫瘍活性を評価した。その結果を図 10 に示した。hu877 投与群は、溶媒投与群に比べて明らかな腫瘍増殖抑制効果を示した。また、hu877 投与群は Lintuzumab 投与群に比べても有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。

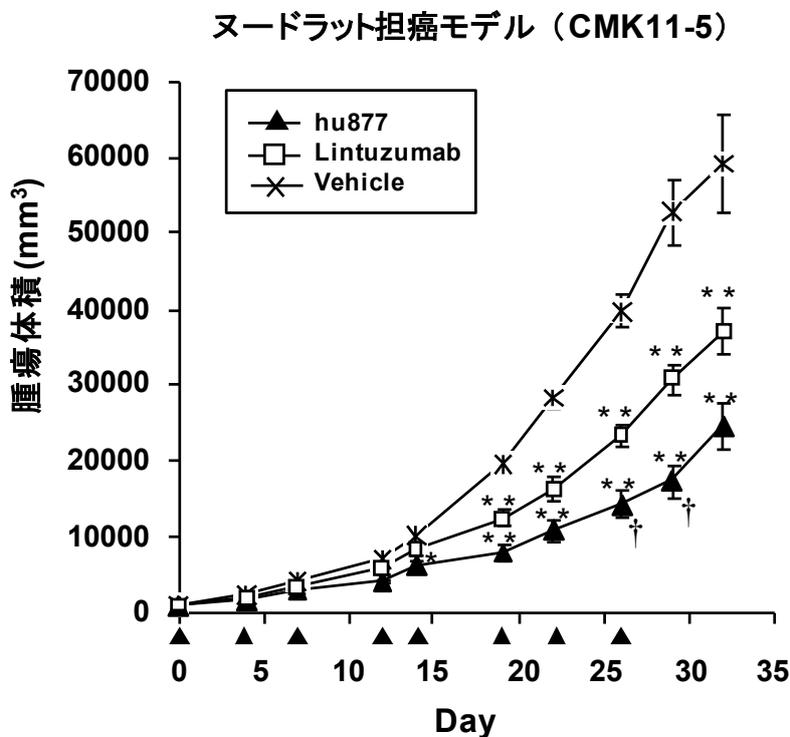


図 10 ヌードラット担癌モデルにおける抗腫瘍活性

ヌードラット CMK11-5 担癌モデルにおける抗 CD33 抗体の抗腫瘍活性を示す。横軸に腫瘍生着後の腫瘍体積により群分けを行った日を Day 0 としたときの日数 (Day) を示し、縦軸に皮下腫瘍の長径、単径から算出される腫瘍体積を示した。抗体投与を▲として示した。図中のエラーバーは標準誤差を示す。統計的解析結果は図中に下記のように示した。試験は各群 n = 5 で実施した。*: vs Vehicle, p < 0.05、**: vs Vehicle, p < 0.01、†: vs Lintuzumab, p < 0.05

抗 CD33 抗体 hu877 と Lintuzumab との競合性の解析

ヒト化抗 CD33 抗体 hu877 は、既存抗体である Lintuzumab のデフコース型である Lintuzumab F(-) に対して、より高い ADCC 活性を示した。上述したように、抗原結合性について、hu877 は Lintuzumab よりも強い結合性を有している。しかしながら、ADCC 活性を強さに関係する因子としてエピトープにより規定される抗原結合様式の違いが考えられる。このため、hu877 と Lintuzumab の結合領域の違いを解析するため、hu877 と Lintuzumab との競合性を競合 ELISA により評価した。その結果を図 11 に示した。hu877、Lintuzumab のどちらを検出抗体とした場合においても、競合抗体の濃度依存的にそれぞれの抗原結合を阻害した。hu877 を検出抗体として用い、Lintuzumab を競合抗体として用いた場合、hu877 を競合抗体とした場合よりも競合阻害能は低かった。これらことから、hu877 と Lintuzumab の結合領域が立体構造上近傍に位置する領域であることが示唆された。

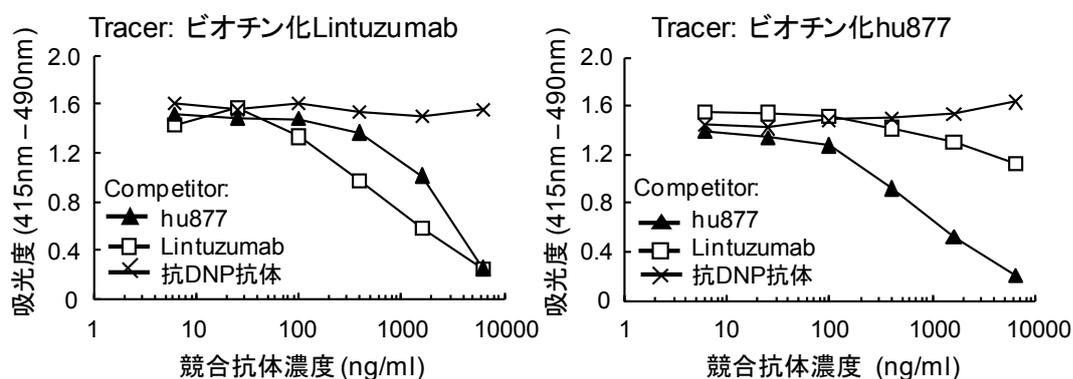


図 11 抗 CD33 抗体 hu877 と Lintuzumab との競合性

CD33 に対する抗 CD33 抗体の ELISA に対する各抗体の競合的結合阻害活性を示す。横軸に競合抗体濃度 (ng/mL) を示し、縦軸に検出抗体の結合量を表す吸光度 (測定波長 415 nm、レファレンス波長 490 nm) を示した。Lintuzumab、hu877 を検出抗体をとって実験を行った結果をそれぞれ、A: Lintuzumab、B: hu877 として示す。試験は n = 2 で実施した。

抗 CD33 抗体 hu877 および Lintuzumab の種交差性の解析

ヒト、チンパンジー、カニクイザルの CD33 のアミノ酸配列は高い相同性を示す(図 12)。このため、これらの抗原に対する反応性の違いを解析することにより、抗体の結合領域を推定できる。このため、ヒト化抗 CD33 抗体 hu877 と Lintuzumab のヒト、チンパンジー、カニクイザルの CD33 への結合性をフローサイトメトリーにより評価した。その結果を図 13 に示した。hu877 はヒト CD33 と同様にチンパンジー CD33 に結合し、カニクイザル CD33 に対しても弱い結合性を示した。一方、Lintuzumab はヒト CD33 に対して結合性を示したものの、チンパンジーおよびカニクイザル CD33 に対しては結合性を示さなかった。これらの結果から、hu877 と Lintuzumab は、CD33 の立体構造上近傍に位置する領域を認識するにも関わらず、異なるエピトープに結合していることが示唆された。

		10	20	30	
Human	1	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPVCTFFHPIPIYYDKNSPVH	40		
Chimpanzee	1	..KIR.....	40		
Cynomolgus	1	..RVR.E.....V..HTR.....	40		
		50	60	70	
Human	41	GYWFREGAIIISGDSPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLLDPS	80		
Chimpanzee	41P.V.....P.....L.	80		
Cynomolgus	41V.L.....	80		
		90	100	110	
Human	81	RNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLS	118		
Chimpanzee	81	118		
Cynomolgus	81K.....T...	118		

図 12 CD33 のヒト、カニクイザル、チンパンジー間の相同性

ヒト、カニクイザル、チンパンジーの CD33 のアミノ酸配列のシグナルペプチド配列以降をそれぞれ示した。ヒト CD33 アミノ酸配列と同じアミノ酸である箇所は、. で示した。

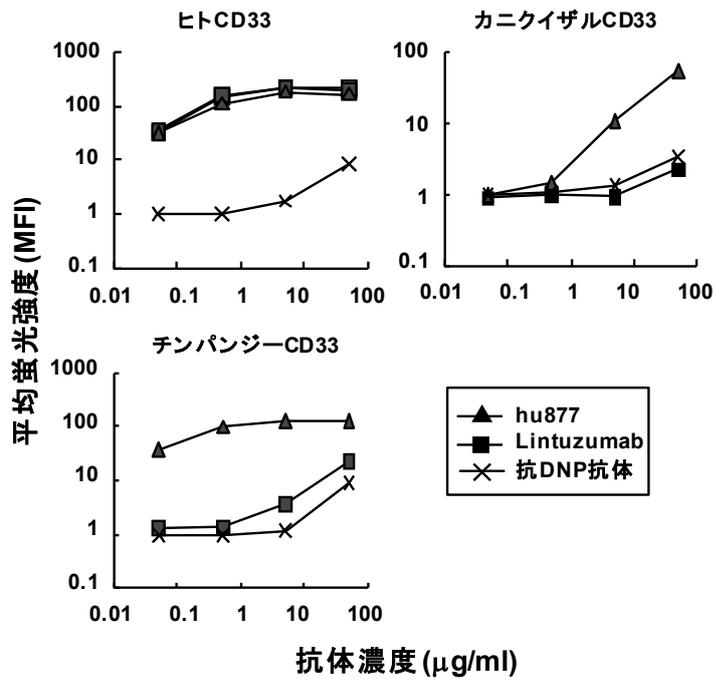


図 13 抗 CD33 抗体 hu877 および Lintuzumab の種交差性

抗 CD33 抗体のヒト、カニクイザル、チンパンジーCD33 抗原それぞれを強制発現させた CHO 細胞に対する反応性をフローサイトメトリーにより評価した結果を示す。横軸に、抗体濃度 (µg/mL) を示し、縦軸に平均蛍光強度 (MFI) を示した。

抗 CD33 抗体 hu877 および Lintuzumab の CD33 表面抗原量、内在化への影響

抗体の抗原への結合により、表面抗原の減少や抗原の内在化が引き起こされることが知られている。このことから、抗 CD33 抗体 hu877 および Lintuzumab による表面抗原の減少、内在化について評価した。その結果を図 14、15 に示した。

まず、表面抗原量の減少について、フローサイトメトリーを用いて評価した。その結果を図 14 に示した。CD33 抗体を細胞に作用させると、時間依存的、濃度依存的に細胞表面上の CD33 の減少が認められた。Lintuzumab および Lintuzumab F(-)は、反応 30 分から 48 時間まで 40%程度までの減少が認められた。一方、hu877は、48 時間においても 70%程度までの減少しか認められなかった。さらに抗体濃度については、Lintuzumab が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で 50%程度までの減少を誘導するのに対して、hu877 は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においても、80%程度までの減少しか誘導しなかった。

次に、抗体の内在化を、蛍光標識された抗 CD33 抗体を用いて評価した。その結果を図 15 に示した。標識した CD33 抗体を細胞に細胞表面に結合させ、37°C に一定時間静置した結果、Lintuzumab は、静置 30 分で細胞表面上、細胞内で抗原-抗体複合体どうしの会合によると考えられる点像が観察され、60 分では内在化により細胞表面上での蛍光輝度が低下し、細胞内に強い蛍光が認められた。一方、hu877 が 60 分においても細胞表面上に蛍光を認め、抗体-抗原複合体が内在化していないことが示唆された。この結果は、図 14 で示した結果と一致していると考えられる。

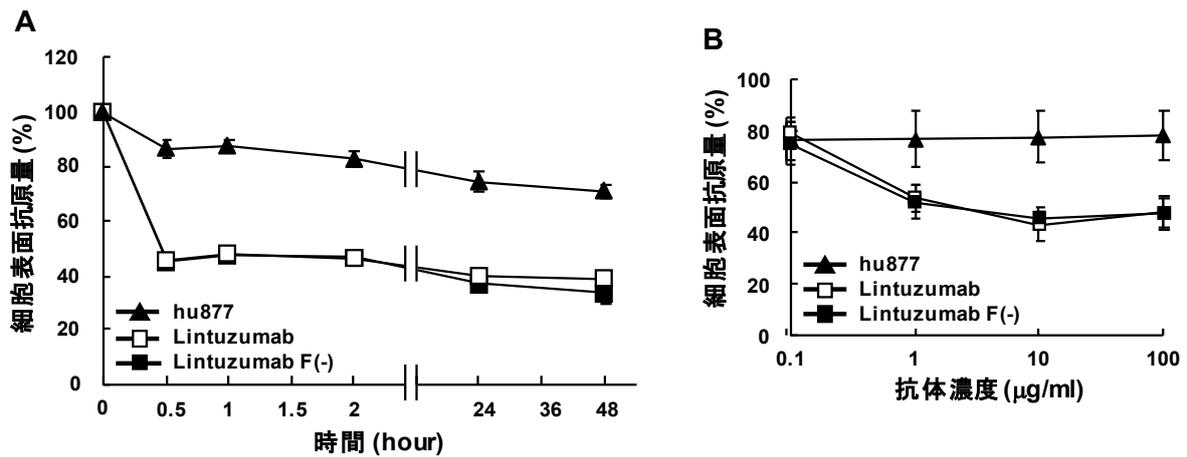


図 14 抗 CD33 抗体による細胞表面抗原量の変化

抗 CD33 抗体による AML セルライン細胞表面上の CD33 抗原量の変化を FCM にて評価した結果を示す。A: CMK11-5 に対して抗 CD33 抗体 (10 μg/ml) を添加し、各時間 37°C で反応させ、その後に蛍光標識されたマウス抗ヒト CD33 抗体 (HIM3-4) にて細胞表面上の CD33 抗原量を測定した結果を示す。横軸に反応時間 (hour) を示し、縦軸に抗体非処理の細胞での平均蛍光強度 (MFI) に対する各サンプルの MFI を表面抗原量 (%) として示した。B: A と同様に各濃度の CD33 抗体を細胞に添加し、48 時間、37°C で反応させ、細胞表面上の CD33 抗原量を測定した結果を示す。横軸に抗体濃度 (ng/mL) を示し、縦軸は、A 同様に表面抗原量 (%) を示した。図中のエラーバーは標準偏差を示す。試験は各点 n = 3 で実施した。

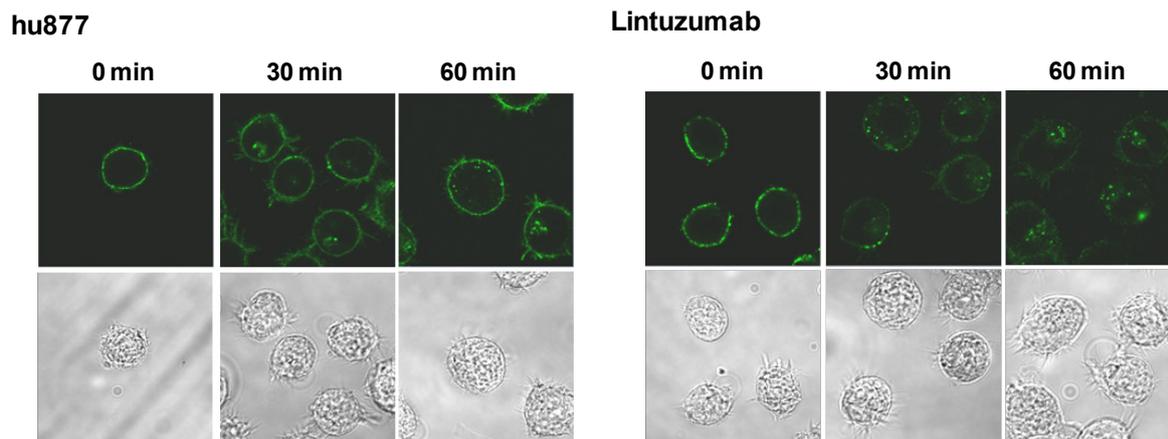


図 15 AML 細胞株における抗 CD33 抗体の内在化

抗 CD33 抗体の AML 細胞株細胞表面からの内在化を免疫蛍光法にて評価した結果を示す。蛍光標識した CD33 抗体を CMK11-5 に加え、氷上にて反応させ、余剰の抗体を取り除いたあと、37°Cにて各時間静置した。その後、細胞を固定化し、蛍光顕微鏡にて観察した。図中の時間は、静置した時間を示す。各抗体について、上部に蛍光画像、下部に微分干渉画像を示した。

考察

CD33 を標的とする抗体医薬品は、1990 年代から研究開発が行われており、Gemtuzumab ozogamicin (GO) [17] や Lintuzumab [8] の臨床での効果から AML 治療における最もバリデートされた標的だと考えられている。しかし、これらの抗体医薬品による治療では AML に対して十分な生存率の改善が認められていない。GO による AML 治療における臨床上的問題点として重篤な肝毒性がある。GO はその物理的な不安定性から付加されたカリキアマイシンが遊離し、非特異的な毒性を誘導する可能性が示唆されており、実際の臨床においても死亡例を含む重篤な肝障害が報告されている [18]。このため、GO は投与回数、使用できる患者の年齢に制限があり十分な治療効果が認められていない。これらに加え、AML 細胞が有する抗がん剤に対する耐性も懸念されており、再発や不応が治療上の問題となっている [19]。一方、本来生体に備わっている免疫機構の一つである ADCC 活性を主作用とする抗体医薬品は、非特異的な毒性による懸念が少ないと考えられている。Lintuzumab は、ADCC 活性を主作用とする抗 CD33 抗体であり、AML 患者を対象とした Phase I 試験において、週 2 回投与で 1 年以上の患者に投与され、重篤な副作用がなく、忍容性が高いことが示されている [9]。これらのことから、より活性の高い ADCC 活性を有する抗 CD33 抗体を創製することにより、臨床での AML 治療の改善が期待できると考えられる。

抗体医薬品の ADCC 活性を含む生物活性は、多くの場合、標的細胞表面上に結合できる抗体量に依存する。癌細胞の抗体治療薬への耐性機構の一つに、標的とする抗原が陰性であることや抗癌剤の長期使用などに起因する変異による表面抗原の発現低下がある。これらの低い抗原発現量は、抗体の表面結合量が低くなることから抗体医薬品の臨床での治療効果を制限していると考えられる。抗 HER2 抗体である Trastuzumab は免疫組織染色により HER2 の発現量が一定以上と認められた患者のみを適応としている。これは臨床試験において HER2 抗原の発現量が低い患者に対して Trastuzumab による生存率の改善効果が不十分だったという知見に基づいている [20]。また、抗 CD20 抗体である Rituximab は、B 細胞性リンパ腫において高い治療効果を示しているものの、CD20 抗原の発現量が他の B 細胞性リンパ腫と比べて低い chronic lymphocytic leukemia (CLL) に対しては、その治療効果は限定的である

[21]。このような低い抗原発現量による活性の低下を回避する手段として、抗体の生物活性を上昇させることが考えられる。我々はこれまでの研究の中で、本研究で用いたデフコースによる ADCC 活性の増強技術により、少ない表面抗原発現量でも ADCC 活性が発現できることを示している [22]。すなわち、ADCC 活性の高い抗体医薬品を創製することにより、抗体治療への耐性の回避や既存治療の効果が不十分な疾患に対しても有効な治療法を提供できると考えられる。本研究においても、CD33 発現が認められた AML 細胞株に対して Lintuzumab は十分な ADCC 活性を示さなかった。これに対して Lintuzumab F(-)、hu877 は、いずれの AML 細胞株に対しても、より高い ADCC 活性を示した。この結果は、AML に対して ADCC 活性増強技術を適応した抗 CD33 抗体を用いることで治療効果を改善できることを示唆している。

抗体の ADCC 活性には、エフェクター細胞である NK 細胞の血球細胞に占める割合や NK 細胞上に発現し抗体結合によって活性化する FcγRIII の遺伝的な多型などが影響することが報告されている [23, 24]。さらに血中に 10 mg/mL 程度内在する IgG が FcγRIII に競合的に結合し ADCC 活性を抑制することが知られている [25]。PBMCs をエフェクター細胞として用いた *in vitro* での ADCC 活性から、臨床での効果を推測するためには、これらの要素を考慮する必要がある。本研究において行った全血中での ADCC 活性評価において、Lintuzumab F(-)、hu877 は Lintuzumab に比較して高い ADCC 活性を示していた。このことから、デフコースにより FcγRIII への結合性を向上させた抗 CD33 抗体が臨床において患者に投与された場合にも、強い ADCC 活性を示すことが期待される。

ADCC 活性は、本来生体に備わっている免疫機構の 1 つであり、ヒトを含む霊長類とマウス、ラットなどの齧歯類を比較すると、多くの点で異なっていることが知られている。このため、抗体の臨床での ADCC 活性を推測するための大きな問題の一つに、適当な動物モデルは存在しないことがある。動物モデルを用いた *in vivo* における試験は、分布や半減期、標的組織への移行性などの薬物動態学的な影響を考慮した上での薬物の作用を確認するために不可欠な試験である。これまで報告されている抗体医薬品の *in vivo* での薬効試験の多くはマウスを用いた担癌モデルを用いてきた。しかしながら、マウスでは、ヒト抗体の ADCC 活性がほぼ認められないことが報告されている [26]。これに

対して、いつかの研究グループにより、ヒト FcγRIII を発現させた免疫ヒト化マウスの作成や、免疫不全マウスにヒトの免疫細胞を生着させ、ヒトの免疫系を再構築する試みも行なわれているが、いまだ研究段階である [27, 28]。こういった状況から、本研究では、ヒト IgG1 でも ADCC 活性が誘導されることが報告されていたラットを用いて担癌モデルを作製し、hu877 の抗腫瘍活性を評価した [16]。本研究の実験からも、ラット PBMCs をエフェクターとした場合に、ヒト PBMCs をエフェクター細胞とした場合と同様に AML 細胞に対して ADCC 活性を示すことが確認された。このことから、ラット担癌モデルにおける Lintuzumab、hu877 の抗腫瘍活性は、臨床で期待できる抗腫瘍活性を反映していると考えられる。

抗体による生物活性は、抗原への結合様式や認識部位の違いによって活性が異なることが知られている。CD20 抗原に対する抗体医薬品である Rituximab や Ofatumumab [29] は、高い ADCC 活性に加えて補体依存的傷害活性 ((complement-dependent cytotoxicity; CDC) 活性) も有する。一方、同じく CD20 抗原に対する抗体医薬品である Obinutuzumab (GA-101) [30] は、CDC 活性は示さないものの、エフェクター細胞を介さない直接的な傷害活性があることが知られている。これらの生物活性の異なる抗 CD20 抗体には、CD20 抗原に対する結合様式や細胞内への抗体の内在化に違いがあることが報告されている [31]。本研究において、hu877 と Lintuzumab には、種交差性の違いがあり、CD33 への結合領域が異なっていることが示めされた。これによって、これらの抗体は同じ CD33 を認識する抗体ではあっても、ADCC 活性などの生物活性について異なるプロファイルを有することが説明されるかもしれない。

我々はこれまでの研究の中で、ADCC 活性が細胞表面抗原密度に依存することを示している [22]。また、HER2 チロシンキナーゼ阻害剤である lapatinib により HER2 の細胞表面への蓄積が起こり、抗 HER2 抗体である Trastuzumab の ADCC 活性が増強することが報告されている [32]。興味深いことに、乳癌に対する大規模臨床試験において、Trastuzumab に lapatinib を併用することにより、病理学的な寛解を示す患者の割合が向上することが示されている [33]。CD33 は抗体結合により速やかな内在化や表面抗原の減少が起こることが報告されている [34]。しなしながら、本研究により創製した hu877 は、内在化や表面抗原の減少が Lintuzumab と比較して限定的な抗体であった。hu877 は、Lintuzumab F(-)と同じ ADCC 活性増強技術を適応した抗

CD33 抗体であるにも関わらず、AML 細胞株に対してより高い ADCC 活性を示した。これらの結果は、抗体医薬品の標的として CD33 の様な内在化を認める抗原を選択する場合、内在化や表面抗原の減少に着目した抗体の選択が有用な方法となり得ることを示唆している。

本研究での検討の結果により、高 ADCC 活性型抗 CD33 抗体が AML に対して有用な治療薬となる可能性が示された。さらに、本研究において創出された新規抗 CD33 抗体 hu877 は、より高い抗腫瘍活性により、Lintuzumab よりも高い臨床効果を期待できる AML に対する抗体医薬品となる可能性が強く示唆された。一方、hu877 は、Lintuzumab に対して、AML 細胞株に対するより高い ADCC 活性、種交差性や細胞表面抗原に対する作用などの異なる性質を有していたものの、ヌードラット担癌モデルにおける抗腫瘍活性や AML 患者由来骨髓細胞に対する ADCC 活性について、同じ高 ADCC 活性型抗体である Lintuzumab F(-)と技術上の問題により比較した結果を取得できなかった。このことから、hu877 の抗 CD33 抗体としての Lintuzumab に対する優位性については、今後検討すべき課題だと考えられる。

引用文献

1. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Wierda W, Faderl S, Garcia-Manero G, et al. Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years. *Cancer* 2008; 113: 1933-1952.
2. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51: 364-369.
3. Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; 10; 30(8): 837-842.
4. Nose M., Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 6632-6636.
5. Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, Yamano K, Nakano R, Inoue M, et al. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94: 680-688.
6. Jilani I, Estey E, Huh Y, Joe Y, Manshour T, Yared M, et al. Differences in CD33 Intensity Between Various Myeloid Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 560-566
7. Hauswirth AW, Florian S, Printz D, Sotlar K, Krauth MT, Fritsch G, et al. Expression of the target receptor CD33 in CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺ AML stem cells. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 73-82.
8. Caron PC, Co MS, Bull MK, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Biological and immunological features of humanized M195 (anti-CD33) monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1992; 52: 6761-6767.
9. Raza A, Jurcic JG, Roboz GJ, Maris M, Stephenson JJ, Wood BL, et al. Complete remissions observed in acute myeloid leukemia following prolonged exposure to

- lintuzumab: a phase 1 trial. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1336-1344.
10. Sekeres MA, Lancet JE, Wood BL, Grove LE, Sandalic L, Sievers EL, et al. Randomized, phase 2b study of low-dose cytarabine and lintuzumab versus low-dose cytarabine and placebo in older adults with untreated acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2013; 98(1): 119-128.
 11. Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K, Hanai N. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol.* 2000; 37(17): 1035-1046.
 12. Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, et al. Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 18: 97(2): 722-727.
 13. Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, et al. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2011; 1: 17(21): 6733-6741.
 14. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321: 522-525.
 15. Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, Yamano K, Nakano R, Inoue M, et al. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94: 680-688.
 16. Song ES, Young K, Sears DW. Rat and human natural killers exhibit contrasting immunoglobulin G subclass specificities in antibody-dependent cellular cytotoxicity reflecting differences in their Fc receptors (Fc gamma R). *J Leukoc Biol* 1990; 48(6): 524-530.
 17. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, et al. Approval summary:

- gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1490-1496.
18. Löwenberg B, Beck J, Graux C, van Putten W, Schouten HC, Verdonck LF, et al. Gemtuzumab ozogamicin as postremission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. *Blood* 2010; 115: 2586-2591.
19. Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, Michelutti A, Gozzetti A, Calistri E, et al. The role of MDR-related proteins in the prognosis of adult acute myeloid leukaemia (AML) with normal karyotype. *Hematol Oncol* 2007; 25: 38-43.
20. Nahta R, Esteva FJ. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* 2007; 26: 3637-3643.
21. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51: 364-369.
22. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, et al. Enhanced Natural Killer Cell Binding and Activation by Low-Fucose IgG1 Antibody Results in Potent Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Induction at Lower Antigen Density. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2327-2336.
23. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002; 99: 754-758.
24. Ozaki S, Kosaka M, Wakahara Y, Ozaki Y, Tsuchiya M, Koishihara Y, et al. Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells. *Blood* 1999; 93: 3922-3930.
25. Preithner S, Elm S, Lippold S, Locher M, Wolf A, da Silva AJ, et al. High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G.

- Mol Immunol 2006; 43: 1183-1193.
26. Bergman I, Basse PH, Barmada MA, Griffin JA, Cheung NK. Comparison of *in vitro* antibody-targeted cytotoxicity using mouse, rat and human effectors. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 259-266.
 27. Ito A, Ishida T, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Sato F, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1195-1206.
 28. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells *in vitro* and controls tumor expansion *in vivo* via low-affinity activating Fcgamma receptors. *Cancer Res* 2007; 67: 8882-8890.
 29. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2004; 104(6): 1793-1800.
 30. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 2010; 115(22): 4393-4402.
 31. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, et al. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab *in vitro* and in xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(10): 2031-2042.
 32. Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* 2009; 28(6): 803-814.

33. Carey LA, Berry DA, Cirrincione CT, Barry WT, Pitcher BN, Harris LN, et al. Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J Clin Oncol* 2016; 34(6): 542-549.
34. van Der Velden VH, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, et al. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 2001; 97(10): 3197-3204.

投稿論文

Takuya Murakami, Tomoaki Nakagawa, Tomonori Tawara, Tsuguo Kubota, Uichi Nishiyama, Masao Asada, Miki Murai, Sayaka Hori-Inada, Yukiko Shimizu, Yoshimasa Inagaki, Mitsuo Satoh, Kenya Shitara, Tomoyuki Tahara, Rinpei Niwa

Novel Non-Internalizing Humanized Anti-CD33 Antibody with Enhanced Anti-Tumor Activity for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia Research* 2016, *in preparation*

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導を賜りました、九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野黒瀬等教授に深く感謝いたします。また、日頃よりご指導、ご助言をいただきました、同分野仲矢道雄准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、協和発酵キリン株式会社の方々にご指導、ご助言いただきました。本研究ならびに日頃よりご指導いただきました丹羽倫平主任研究員に厚く感謝いたします。また、日頃よりご指導、ご助言ならびに試料の提供にご協力いただきました、中川知明主任研究員、俵知紀主任研究員、久保田麗夫研究員、堀紗也香研究員、西山宇一研究員に厚く感謝いたします。

最後に、日々陰ながら支えてくれ、ときに励ましてくれた家族に深く感謝いたします。