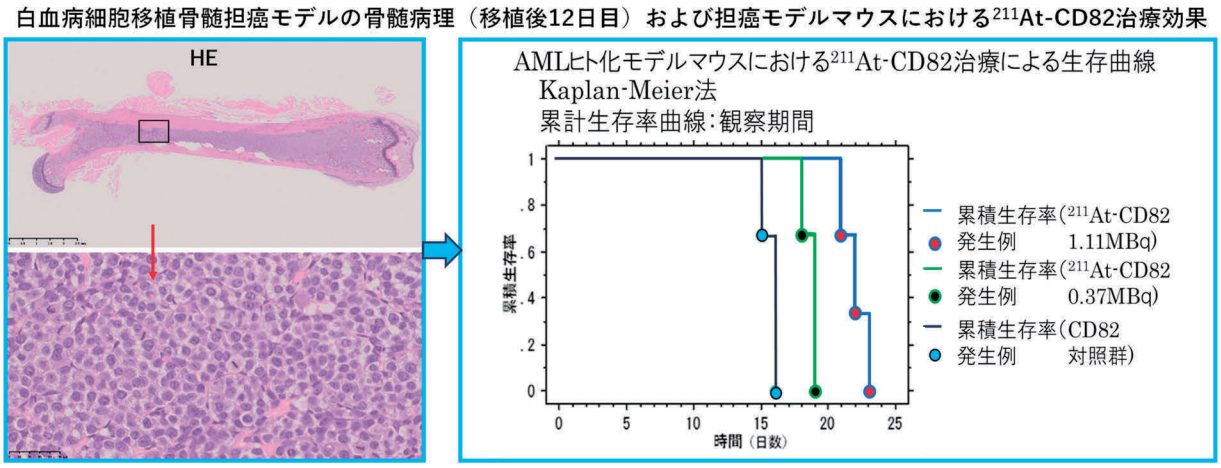
51　白血病の根治を目指した新規放射免疫療法の開発	池添　隆之

【目的】急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia：AML）の長期生存率は未だ5割に届かない。その主な原因は抗がん剤治療後の抵抗性獲得と再発である。すなわち、抗がん剤治療後も骨髄中の微小環境（ニッチ）に留まる白血病幹細胞が治療抵抗性を獲得し、再発に関与しているためと考えられている。我々は白血病幹細胞がCD82抗原を高発現し、抗がん剤への抵抗性獲得やニッチへの接着に中心的な役割を果たしていることを明らかにした。α線はβ線に比べて、線エネルギー付与（LET）が非常に高く、組織内の飛程が非常に短いため、α線放出核種を抗体に搭載してニッチ中の白血病幹細胞に集中させることで、正常組織への副作用を回避しながら、高い治療効果が得られる。そこで本研究ではCD82抗原を標的とした抗体をα線放出核種アスタチン-211（^{211}At）で標識した抗体薬を作製し、白血病幹細胞の根絶を目指す革新的な核医学治療法を開発する。

【方法】白血病幹細胞を標的とした^{211}At標識抗CD82抗体（^{211}At-CD82）の放射免疫療法への応用可能性を確認するため、ヒト白血病細胞皮下・骨髄担癌モデルマウスを作製し、担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82の体内動態を検討した。ヒト白血病細胞皮下担癌モデルマウスに^{211}At-CD82（約0.2 MBq）を投与し、1分、1時間、6時間、12時間及び24時間後に心臓より全採血し、腫瘍および各臓器・組織を摘出し、その放射能（%ID/g）を測定した。さらにヒト白血病細胞皮下・骨髄担癌モデルモデルマウスを用いて、^{211}At-CD82の皮下担癌腫瘍の抗腫瘍効果と骨髄担癌マウスの寿命延長効果を検討した。治療群には^{211}At-CD82（1.11 MBq）を投与し、経時的に腫瘍体積を測定、またはマウスの寿命を観察した。

【結果】AML細胞、AML細胞皮下移植担癌腫瘍組およびAML細胞移植骨髄担癌骨髄腫瘍組織において、CD82の発現が認められた。^{125}I標識抗CD82抗体はAML細胞に発現しているCD82抗原に特異的に結合した。AML細胞皮下移植担癌モデルマウスにおいて、腫瘍組織への^{211}At-CD82集積は時間とともに増加し、24時間に最も高かった（11.3%ID/g）。ヒト化AML細胞骨髄担癌モデルにおいて、腫瘍組織への^{211}At-CD82集積は、移植後12日目の投与群の24時間では35.9%、移植後8日目の投与群の24時間では13.4%であった。AML細胞皮下担癌モデルマウスにおいて、^{211}At-CD82治療により生存有効な抗腫瘍成長効果が認められた。ヒト化急性骨髄性白血病モデルマウスにおいても、^{211}At-CD82治療によりヒト化急性骨髄性白血病モデルマウスの有効な生存延長効果が認められた。白血病幹細胞を標的とした^{211}A標識抗CD82抗体は急性骨髄性白血病の治療薬として有望であると考える。

白血病細胞移植骨髄担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82の抗腫瘍効果



51. 白血病の根治を目指した新規放射免疫療法の開発

池添　隆之

福島県立医科大学 医学部 血液内科学講座

Key words：急性骨髄性白血病，白血病幹細胞，CD82，アスタチン-211，放射免疫療法

緒　言

急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia：AML）の長期生存率は未だ 5 割に届かない。その主な原因は抗がん剤治療後も骨髄中の骨芽細胞や血管内皮細胞などから構成される微小環境（ニッチ）に留まる白血病幹細胞（Leukemia stem cell：LSC）が治療抵抗性を獲得し、再発に関与しているためと考えられている。

我々は、抗がん剤治療後も骨髄に残存する LSC（$CD34^{+}/CD38^{-}$の白血病細胞集団）が正常造血幹細胞と比較して、CD82 抗原を高発現していることを突き止め［1］、CD82 は STAT5 の活性化を介して抗アポトーシス蛋白 Bcl2L12 の発現を誘導し、LSC の治療抵抗性の獲得や生存維持並びにニッチへの接着に中心的な役割を果たしていることを明らかにした［2］。

治療抵抗性又は再発性の AML に対する有効な治療薬として、CD33 抗原を標的とする抗体薬物複合体治療薬 Gemtuzumab ozogamicin（GO）が 2001 年に FDA により承認されたが、期待されていた全生存率の改善が得られなかったため、2011 年には承認が取り消された。その後 GO は、AML を対象とするダウノルビシン及びシタラビンとの併用剤や CD33 陽性の AML を対象とする単剤治療薬として、2017 年に再度承認された［3］が、その効果は限定的で根治を達成するものではない。したがって、既存の治療のみでは治療抵抗性・再発 AML の治癒が困難なため、根治に向けた革新的な治療薬の開発が必要である。

本研究では、骨髄中のニッチに存在する白血病細胞をα線放出核種により選択的に傷害すれば、休眠中の白血病幹細胞を死滅することが可能となり、治療抵抗性又は再発性の急性白血病に対する新たな治療方法となり得るという着想を得た。α線はベータ線と比べて組織内飛程が非常に短く、単位長さ当りの組織に与えるエネルギー（LET）が極めて大きいことが知られている。α線は、この性質に基づき DNA の 2 本鎖を同時に切断することが可能であり、細胞周期等の細胞の状態に依存せず不逆的な殺細胞効果を有する。その一方、組織内飛程が非常に短いため、周囲の正常細胞に対する障害を低く抑えられる利点も備えている。α線放出核種の中でも、アスタチン-211（^{211}At）は中型サイクロトロンで製造でき、理想的な半減期（7.2 時間）を有するため、副作用の制御の面からも有効な治療が期待されている［4］。

そこで本研究では、CD82 抗原を標的とした抗体をα線放出核種^{211}At で標識した抗体薬を作製し、白血病幹細胞の根絶を目指した新規放射免疫療法を開発することを目的とした。

方法、結果および考察

1. AML 細胞・AML 細胞皮下移植担癌組織・AML 細胞骨髄担癌組織における CD82 発現

AML 細胞（U937 細胞株、ATCC CRL-1593.2）、AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスの腫瘍組織および AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの腫瘍組織における CD82 発現レベルについて、Anti-human CD82 マウスモノクローナル抗体（Anti-CD82 抗体[TS82b]-BSA and Azide free (ab59509)、Anti-human mouse mAb、Abcam）を用いた免疫染色にて確認した。その結果、AML 細胞（U937 細胞株）、AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスの腫瘍組織および AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの腫瘍組織において、CD82 の高発現が認められた。

2. AML 細胞へのヨウ素-125（^{125}I）標識抗 CD82 抗体（^{125}I-CD82）の特異的結合

アブカムの Anti-human mouse mAb が AML 細胞に発現している CD82 に特異的結合することを確認するため、*in vitro* 実験を行った。96 穴プレートに AML 培養細胞 U937 1×10^6個を加えた。その後、ヨウ素-125（^{125}I）標識抗 CD82 抗体（^{125}I-CD82）、又は^{125}I-CD82 に 20 倍量の非標識 CD82 を混ぜたものを、96 穴プレートに加え、37℃下で 30 分、1 時間、3 時間インキュベートし、その後遠心し、上澄みを吸い取り、PBS（−）で 2 回洗浄した後、PBS（−）で U937 細胞を回収して、γカウンターでその放射能を測定した。その後、各穴の U937 細胞に結合した^{125}I-CD82 の放射能が添加した放射能の割合（%ID/10^6 cells）を計算した。その結果、U937 細胞への^{125}I-CD82 の取り込みは、時間とともに増加した。また U937 細胞への^{125}-CD82 の取り込みは、非標識 CD82 によって、各時間点で ^{125}I-CD82 の取り込みの 82%まで著明に抑制された。これらの結果より、^{125}I-CD82 は U937 細胞に発現している CD82 に特異的に結合したことが示唆された（図 1）。

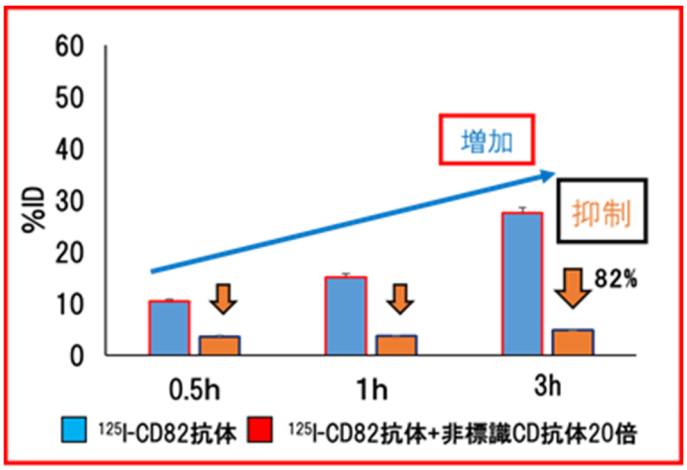


図 1. AML 細胞への^{125}I-CD82 の特異的結合

青色：^{125}I-CD82 集積、赤色：^{125}I-CD82 集積＋非標識 CD82 抗体 20 倍添加。

3. AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスの腫瘍組織への^{125}I-CD82/^{211}At-CD82 の集積比較

AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスの腫瘍組織へ^{125}I-CD82 と^{211}At-CD82 の移行性を検証するため、AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおける^{125}I-CD82 と^{211}At-CD82 の集積を比較した。雄性の BALB/c ヌードマウスの右上背側の皮下に U937 細胞 5×10^6を移植し、移植後 14 日目に U937 細胞皮下移植担癌モデルマウスの尾静脈より^{125}I-CD82 又は^{211}At-CD82 を投与した。^{125}I-CD82 又は^{211}At-CD82 を投与後、1 分、1 時間、6 時間、12 時間および 24 時間に、心臓より全採血し、マウスを安楽死させた。その後、各臓器・組織および腫瘍組織を摘出し、γカウンターを用いて、その放射能を測定した。その後、各臓器・組織および腫瘍組織への単位重量当たりの^{125}I-CD82 又は^{211}At-CD82 の放射能が投与放射能の割合（%ID/g）を計算し、各時間点における腫瘍組織への^{125}I-CD82 と^{211}At-CD82 の集積を比較した。その結果、U937 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 の体内動態は^{125}-CD82 の場合と類似した。U937 細胞皮下移植担癌モデルの腫瘍組織への^{125}I-CD82 と^{211}At-CD82 の集積は、両者とも時間とともに増加した（図 2）。

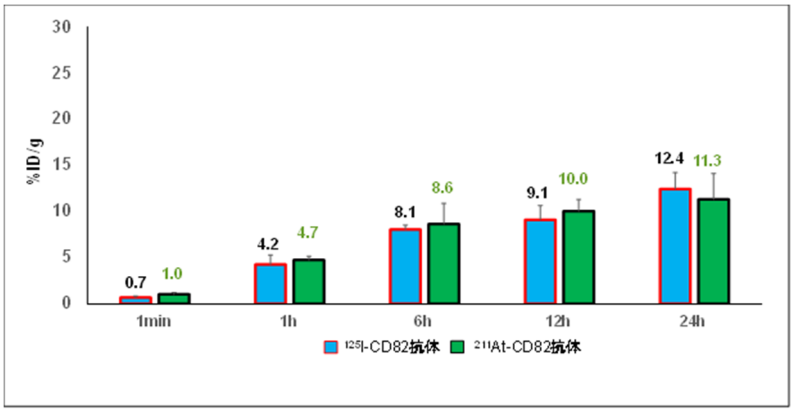


図 2. U937 細胞皮下移植担癌モデルの腫瘍組織への^{125}-CD82 と^{211}At-CD82 の集積比較
青色：^{125}I-CD82 集積、緑色：^{211}At-CD82 集積。

4. AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 の腫瘍生長抑制効果

AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 の腫瘍生長抑制効果を検証するため、U937 細胞 5×10^6を BALB/c ヌードマウスの右上背側の皮下に移植し、AML 細胞皮下移植担癌モデルを作製した。U937 細胞移植後 5 日目に担癌マウスを治療群（n＝3）と対照群（n＝3）に群分けし、腫瘍サイズと体重の測定を行った。腫瘍サイズは、ノギスを用いて、腫瘍の長径（mm）と短径（mm）を測り、以下の式により腫瘍体積を計算した。腫瘍体積（mm^3）＝π／6×長径（mm）×短径（mm）^{2}。治療群には、^{211}At-CD82 1.11 MBq/0.1 ml を、対照群には、CD82 溶液（^{211}At-CD82 の同量抗体溶媒）を尾静脈より投与した。投与日を day 0 とした。その後 2 日ごとに腫瘍サイズの測定を行い、腫瘍体積を計算し、治療群と対照群の比較を行った。Day16 に対照群の腫瘍が大きくなり、皮膚が破れたため、マウスの心臓より全採血し、マウスを安楽死させた。その結果、対照群の腫瘍体積は時間とともに増大したのに対し、^{211}At-CD82 の治療群の腫瘍体積は顕著に抑制された。これらの結果より、AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおいて、^{211}At-CD82 の治療により有効かつ顕著な腫瘍生長抑制効果が認められた（図 3）。

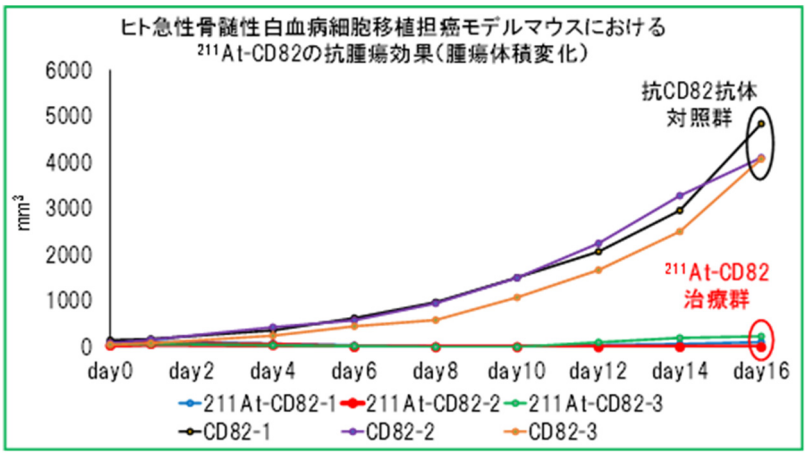


図 3. U937 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 の抗腫瘍効果
上：抗 CD82 抗体投与群（対照群）、下：^{211}At-CD82 抗体投与の腫瘍生長曲線。

5. AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの作製

本研究の最終的な目的は、ヒト化 AML 骨髄担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 治療によるマウスの寿命延長効果を検証することである。U937 細胞を完全免疫不全マウス（NRG マウス）に投与することによりヒト化 AML 骨髄

担癌モデルを作製し、2 日目より経時的に大腿骨の HE 染色と抗 CD82 抗体を用いた免疫染色を行い、U937 細胞の大腿骨への接着・浸潤による大腿骨骨髄の病変を評価した。その結果、U937 細胞移植後、4 日目までには大腿骨骨髄の病変が認められなかった。U937 細胞移植後、8 日目以降は時間とともに大腿骨骨髄の病変が広範囲に広がっていることが認められた。U937 細胞移植後、12 日目には、大腿骨骨髄のほぼ全領域が病変で占められることが確認できた。

6. AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの骨髄組織への^{211}At-CD82 の集積

AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの骨髄組織への^{211}At-CD82 の移行性を検証するため、U937 細胞移植後 8 日目、又は 12 日目にマウスの尾静脈より^{211}At-CD82 を投与した。^{211}At-CD82 の投与後、6 時間と 24 時間に心臓より採血し、マウスを安楽死させた。その後、大腿骨を摘出し、γカウンターを用いて、その放射能を測定した。その後大腿骨への単位重量当たりの^{211}At-CD82 の放射能の投与放射能に対する割合（%ID/g）を計算し、各時間点における大腿骨への^{211}At-CD82 の集積を計算した。骨髄への%ID/g を計算するため、大腿骨への%ID/g については、骨髄重量で補正した。その結果、U937 細胞移植後 12 日目への 6 時間と 24 時間における骨髄への^{211}At-CD82 の集積は重量 39.6%ID/g と 35.9%ID/g であった。一方、U937 細胞移植後 8 日目への 6 時間と 24 時間における骨髄への^{211}At-CD82 の集積は各々各々9.7%ID/g と 13.4%ID/g であった。

7. AML 細胞移植骨髄担癌モデルマウスにおける^{211}At-CD82 治療による寿命延長効果

AML 細胞移植ヒト化骨髄担癌モデルマウスの骨髄組織への^{211}At-CD82 の集積の結果に基づいて、^{211}At-CD82 治療による寿命延長効果には U937 細胞移植後 12 日目の担癌モデルマウスを選択した。U937 細胞移植後、12 日目にヒト化 AML 骨髄担癌マウスを治療群（n＝6）と対照群（n＝3）に群分けした。また治療群は、さらに 0.37 MBq 投与群と 1.11 MBq 投与群に分けた。治療群には、^{211}At-CD82 0.37 MBq/0.1 ml 又は 1.11 MBq/0.1 ml を、対照群には、CD82 溶液（^{211}At-CD82 の同量抗体溶媒）を尾静脈より投与した。投与後、ヒト化 AML 骨髄担癌モデルマウスが死亡するまで一般状態観察と体重測定を行った。その後、Kaplan-Meier 法を用いて、生存率曲線を作製し、統計解析を行った。その結果、U937 移植後 12 日目に治療を開始したところ、対照群は U937 移植後 16 日間まで全部死亡した。治療群では、投与量依存的にヒト化 AML 骨髄担癌モデルマウスの生存が有意に延長された（$p<0.001$）。U937 移植後 12 日目に治療を開始した治療群の大腿骨の骨髄はほぼ腫瘍細胞で占めされたため、1.11 MBq の^{211}At-CD82 治療により生存期間は対照群より 7 日間の延長しか見られなかった。8 日目に治療を開始した治療群の大腿骨の骨髄では、U937 移植後、骨髄の一部の局所が腫瘍細胞で占めされている早期治療により担癌マウスの生存期間がもっと長くなることが期待される（図 4）。

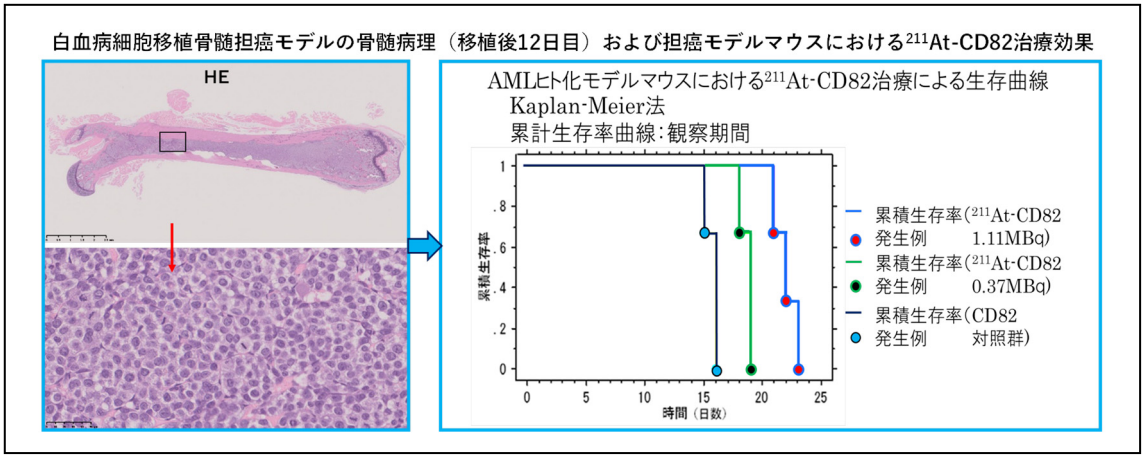


図 4. U937 移植後 12 日目に^{211}At-CD82 治療を開始した生存曲線

左：HE 染色（上）、HE 拡大図（下）。

右：生存曲線、濃青色：対照群、緑色：0.37 MBq 群、明青色：1.11 MBq 群。

8. 新規抗 hCD82 ラットモノクローナル抗体作製

DNA 免疫法により福島県立医科大学のオリジナル抗 hCD82 ラットモノクローナル抗体（FMU-3H10H4）を作製し、FMU-3H10H4 を用いた免疫染色法より急性骨髄性白血病細胞株において、CD82 タンパク質を検出する能力について、対照抗体（抗 hCD82 マウスモノクローナル抗体、ab59509、Abcam）と比較検討した。その結果、FMU-3H10H4 の CD82 タンパク質を検出する能力は対照抗体より強かった。

9. 新規抗 hCD82 ヒトキメラモノクローナル抗体作製

DNA 免疫法により福島県立医科大学のオリジナル抗 hCD82 ヒトキメラモノクローナル抗体を作製し、抗 hCD82 ヒトキメラモノクローナル抗体を用いた免疫染色法より急性骨髄性白血病細胞株において、CD82 タンパク質を検出する能力について、対照抗体（抗 hCD82 マウスモノクローナル抗体、ab59509、: Abcam）およびと FMU-3H10H4 モノクローナル抗体と比較検討した。その結果、抗 hCD82 ヒトキメラモノクローナル抗体の CD82 タンパク質を検出する能力は対照抗体並びに FMU-3H10H4 より強かった（知財関係でデータを省略する）[5]。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福島県立医科大学ふくしま国際医療科学センター先端臨床研究センターの趙松吉と織内昇並びに東京大学アイソトープ総合センターの杉山暁である。

文　献

1） Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. CD82 regulates STAT5/IL-10 and supports survival of acute myelogenous leukemia cells. Int J Cancer. 2013 Jan 1; 134(1):55-64. PMID: 23797738. DOI: 10.1002/ijc.28348

2） Nishioka C, Ikezoe T, Takeuchi A, et al. The novel function of CD82 and its impact on BCL2L12 via AKT/STAT5 signal pathway in acute myelogenous leukemia cells. Leukemia. 2015 Dec;29(12):2296-306. PMID: 26260387. DOI: 10.1038/leu.2015.219

3） Jen EY, Ko CW, Lee JE, et al. FDA Approval: Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2018 Jul 15;24(14):3242-3246. PMID: 29476018. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3179

4） Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. Curr Pharm Des. 2000 Sep;6(14):1433-55. PMID: 10903402. DOI: 10.2174/1381612003399275

5） 発明者：池添隆之、趙松吉、織内昇、鈴木美穂、西嶋剣一、髙橋和弘、鷲山幸信、右近直之、下山彩希（福島県立医科大学）、立花太郎、波田千彰、王彩霞（株式会社細胞工学研究所）。発明名称：α線放出核種で標識された抗 CD82 抗体。出願日：2022 年 7 月 4 日。出願番号：特願 2022-108025。