

モノクローナル抗体による多発性骨髄腫の免疫療法

小 阪 昌 明, 尾 崎 修 治

徳島大学医学部第一内科学教室

(平成11年3月8日受付)

はじめに

多発性骨髄腫は数多くの化学療法 regimen の開発にもかかわらず、現在おな治癒させることが困難な造血器悪性腫瘍のひとつである。

化学療法が導入される1970年以前に経験した症例の median survival はわずか17か月であったのに対し、R. Alexanian (1969) や G. Costa (1973) が melphalan と prednisolone による MP 療法の有用性を報告^{1,2)}し、われわれも1970年以降の15年間に主として MP 療法を中心とする化学療法を骨髄腫患者に行い、median survival は3.5年に延長した³⁾。しかし、その後 VCAP, VAD, MCNU-VMP, インターフェロンなど、多くの多剤併用療法が開発され、これらを導入することで response rate を向上させることできたにもかかわらず、実質的な survival の延長はもたせていない^{4,5)}。

化学療法剤の投与を dose-escalate し、造血幹細胞移植を併用した myeloablative 療法によっても、急性骨髄性白血病で5年生生存率70%と著明な効果が得られたのに対し、骨髄腫症例は一時的な完全寛解が得られるのみで、早期再発を免れることが出来ていない。1998年のASH(Miami Beach, FL)における1,000例を越えるB. Barlogieら(Univ. Arkansas)の報告でも移植後5年までに次々と再発し、cure plateau は形成されていない。しかもこの治療法は dose-escalate した化学療法や放射線療法のため患者に極めて強い toxicity を与えることになり、高齢者に多い骨髄腫症例では移植対象になる患者におのずから限界がある。二次性 MDS や白血病の合併も多い⁶⁾。

このような状況下にわれわれは新しくモノクローナル抗体を用いた免疫療法の開発に取り組んだ。ヒト骨髄腫細胞に特異的に高発現している HM1.24 抗原を見出し、ヒト形質細胞腫や骨髄腫の動物モデルを用いて、モノクローナル抗体 anti-HM1.24 抗体が骨髄腫治療に有用であ

ることを明らかにした。

1. ヒト骨髄腫細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体

われわれの研究室で樹立された EBNA-骨髄腫細胞株 KPC-32(CD38⁺, 71⁻で、IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α および IFN γ 非産生, IL-6 非依存性) を BALB/c マウスに反復免疫し、免疫脾細胞とマウス骨髄腫細胞株 SP 2/0 を細胞融合させた。得られた hybridoma の産生 Ig を免疫原の KPC-32 でスクリーニング後、flow cytometry を用いて種々の細胞株や各種のヒト細胞と反応性を検討した。最終的に選択されたクローンを pristane で前処置した BALB/c マウス腹腔内に移植し、腹水を採取後、protein A-affinity chromatography で単クローン性抗体(MoAb)を純化した。得られた抗体 anti-HM1.24 (IgG 2a \cdot κ) の反応性を検討したところ、終末分化した B 細胞、すなわち形質細胞~骨髄腫細胞にきわめて高い特異性が認められた。さちに多発性骨髄腫 38 例、形質細胞性白血病 5 例、原発性マクログロブリン血症 8 例、B 細胞性非ホジキンリンパ腫 15 例、preB 細胞性急性リンパ性白血病 4 例、T 細胞性リンパ性白血病 5 例、急性骨髄性白血病 6 例、慢性骨髄性白血病 4 例について、それぞれの腫瘍細胞と反応性を検討し、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、原発性マクログロブリン血症とのみ特異的に反応することが確認された。

また、¹²⁵I をラベルした anti-HM1.24 を用いて骨髄腫細胞株 RPMI8226 への binding assay を行い、affinity constant (K_a) が $9.2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ と高いこと (binding site は 88,440 分子/cell)、および免疫沈降法により認識する抗原が還元下で 29-33kD、非還元下で 56-62kD の糖蛋白であることを明らかにした⁷⁾。

2. ヒト形質細胞腫および多発性骨髄腫の動物モデル

ヒト形質細胞腫の動物モデルはヒト骨髄腫細胞株 RPMI8226 (5×10^6 /マウス) を C.B-17 SCID マウスの背部皮下に xenograft することによって、ヒト多発性骨髄腫モデルはヒト骨髄腫細胞株 ARH-77 (5×10^6 /マウス) を同マウスに経静脈的に xenograft することによって、それぞれ作製した。

形成された RPMI 8226腫瘍は筋層を含む周囲組織に浸潤し、核小体の明らかな円形核と豊富な細胞質を持った形質細胞からなる腫瘤で、分裂像も散見され、ヒト形質細胞腫に compatible な組織像であった。しかし肺、肝、心、脾、腎、消化管、骨髄など、他臓器に転移は見られなかった。また ARH-77を移植した多発性骨髄腫の動物モデルでは平均40日で血中にヒトの M 蛋白が検出できるようになり、横断性脊髄傷害による下肢の麻痺、多発性の骨破壊、高 Ca 血症などをきたし、ヒトの骨髄腫にきわめて近い病態を呈した。組織学的にも椎体の骨髄は腫瘍細胞に置換され、骨梁を破壊して脊髄神経を圧迫していた。

3. 動物モデルにおける anti-HM1.24抗体の抗腫瘍 in vivo 効果

RPMI 8226-SCID のモデルにおいて、コントロール抗体 (anti-HM1.24と同じクラス、タイプに属し、抗体活性を持たないもの) 投与群では移植後平均22日で腫瘤を形成し、次第に増大して、平均93日で腫瘍サイズは $10,000\mu\text{l}$ に達し、cachexia 状態になって死亡した。これに対し、腫瘍形成の22日以後 anti-HM1.24抗体を $100\mu\text{g}$ /マウス/週1回投与した群では腫瘍サイズの増大は遅れ、平均160日まで生存した。さらに anti-HM1.24抗体を同量週2回投与すると、増大しはじめていた腫瘍は35日頃より縮小し、全マウスが死亡しなかった。なお同抗体の $\text{F(ab}')_2$ の投与ではコントロール抗体投与群と差を認めなかった。

ARH-77-SCID マウスでは、移植した腫瘍細胞が骨髄を中心とした全身に播種されるので、抗腫瘍効果は腫瘍細胞が産生する M 成分 (IgG \cdot κ) の血中濃度でモニターすることができる。コントロール抗体投与群のマウスで40日以内に M 成分が $250\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ に達し、 53 ± 21 日以内に死亡するのに対し、血中の M 成分が $6 \pm 7\mu\text{g}/\text{ml}$

に達する、腫瘍細胞移植後15日目以降 $100\mu\text{g}/\text{dose}$ 、週一回、anti-HM1.24抗体を投与すると、M 成分の増加は投与日数の経過とともに測定不能な血中レベルにまで減少し、観察180日まで一匹を除いて死亡しなかった。これらの成績は anti-HM1.24抗体が骨髄腫細胞に対し、明らかな抗腫瘍効果を発揮していることを示している。抗腫瘍効果が形質細胞モデルより多発性骨髄腫モデルでより顕著であったのは抗体の移行や effector 細胞到達の効率によるものと推測される^{8,9)}。

4. anti-HM1.24抗体の in vitro 抗腫瘍効果

各種骨髄細胞株を用いて anti-HM1.24抗体の腫瘍細胞増殖と分化に及ぼす作用を検討したが、腫瘍細胞の³Hサイミジン取り込みや Ig 産生には全く影響を及ぼさなかった。また細胞表面に結合した抗体の細胞内への internalization も観察されなかった。

baby rabbit complement を用いた補体依存性細胞傷害活性 (CDC) は補体の用量依存性に観察された。また SCID マウスの脾細胞を effector cell とする antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) も antiHM1.24抗体 $0.1\sim 1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で明らかな細胞傷害活性が認められた。

5. anti-HM1.24抗体のヒト型化

マウスの anti-HM1.24抗体をヒトに投与すると、抗原性を発揮して human anti-mouse antibody (HAMA) が産生されるために血中濃度が維持できないばかりか、反復投与を不可能にするので、ヒトに投与するためにはヒト型化が必須である。pharmaceutical industry の協力を得て本抗体のヒト型化にすでに成功しており、興味深いことはヒトの末梢血単核細胞を effector cell として用いる限り、マウス抗体では ADCC 活性が見られず、ヒト型化することによって ADCC 活性が観察されることである (Fig. 1)。すなわちマウス抗体はヒトのリンパ球 (主としてNK細胞) の Fc receptor に bind して cytotoxicity を発揮できないことを示している¹⁰⁾。また大量生産のための哺乳類細胞へのヒト型化抗体遺伝子の transfectant も作製され、前臨床試験に入りつつある。骨髄腫治療薬としてヒトに投与するためには一回投与量が10数~数100mgになると想定され、サイトカインが μg 単位の投与量で効果を発揮するのに対し、大量生産の安

定した master cell の確立が必須になる。21世紀の初頭には臨床投与が可能になるものと考えられる。

おわりに

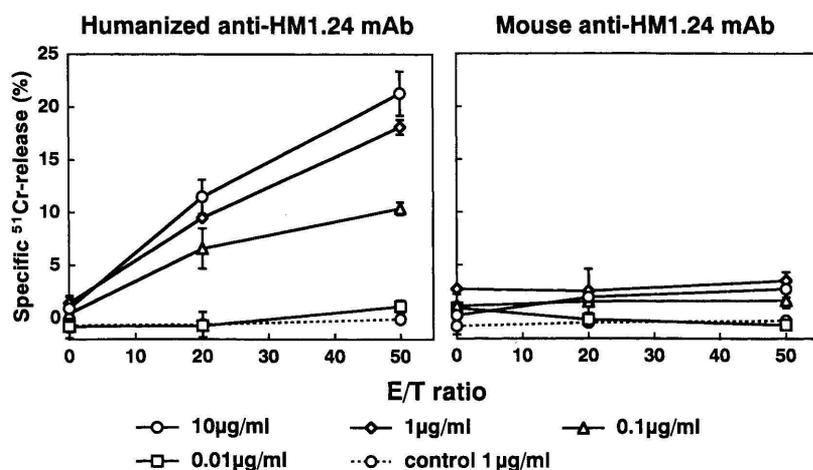
腫瘍細胞に特異的な分子を標的にする抗体を用いた分子標的療法 (molecule target therapy) は抗癌剤の toxicity を免れ、腫瘍細胞のみを標的にする理想的な抗腫瘍療法になりつつある^{11,12)}。骨髄腫細胞に発現している分子のうち免疫療法の標的として研究段階にあるものを Table 1 に示した。すでに濾胞性リンパ腫や慢性リンパ性白血病を対象とした抗CD20のchimeric antibody

(Rituximab, 米国 IDEC 社, 米国 Genentech 社) ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 蛋白 (Her 2) を過剰発現した乳ガン患者を対象としたヒト型化抗 Her 2 抗体 (Herceptin, 米国 Genentech 社) など, 現在抗癌作用を目的にしたものでも10指に余るものが開発されつつある。クローン病や慢性関節リウマチを対象とした抗 TNF 抗体は臨床試験に入っている。血小板凝集を阻止する目的で作られたモノクローナル抗体 Reopro (Centocor 社) は経皮経管冠動脈血管再建術 (PTCA) 後の血管再狭窄予防薬として欧米で臨床使用され (Lilly 社), 前年度比で40~50%増の成長をしているという。抗体を用いた免疫療法は, 今後悪性腫瘍や自己免疫疾患などの主要な選択肢のひとつになるものと期待されている。

文 献

- 1) Alexanian, R.: Treatment for multiple myeloma. JAMA, 208 : 1680-1685, 1969
- 2) Costa, G.: Melphalan and prednisone: an effective combination for the treatment of multiple myeloma. Am. J. Med., 54 : 179-187, 1973
- 3) 小坂昌明, 岡川和人, 井石安比古: 骨髄腫・マクログロブリン血症。現代医療, 21 : 2353-2364, 1989
- 4) Myeloma Trialists' Collaborative Group: Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: An overview of

Fig. 1. ADCC activities of anti-HM1.24 mAb against ARH77 cells by human PBMC



ヒト末梢血単核細胞を effector として用いる場合 (骨髄腫患者に治療を目的として in vivo 投与する場合), マウス型抗体は ADCC 活性を発揮せず (右図), ヒト型化することによって 0.1~10µg/ml の濃度で腫瘍細胞に対する ADCC を発揮する (左図)。

Table 1. Potential Targets for Immunotherapy of Multiple Myeloma

Ag	function	mAb
HM1.24	type 2 transmembrane glycoprotein	humanized
CD38	ADP-ribosyl cyclase	chimeric, humanized
CD54	ICAM-1, Ig superfamily	immunotoxin
CD40	TNF-R superfamily	murine
CD20	Ca ⁺⁺ channel	chimeric, humanized
CD138	syndecan 1, adhesion molecule	murine
CD126	IL-6R	humanized

6,633 patients from 27 randomized trials. J. Clin. Oncol., 16 : 3832-3842, 1998

- 5) Mandelli, F., Avvisati, G., Amadori, S., Boccadoro, M., et al.: Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2 b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. N. Engl. J. Med., 322 : 1430-1434, 1990
- 6) Drach, J., Ayers, D., Govindarajan, R., Sawyer, J., et al.: MDS-associated cytogenetic abnormalities in both hematopoietic and neoplastic cells after autotransplants in 868 patients with multiple myeloma. (abst). Blood, 92 (suppl. 97a) : 1998
- 7) Goto, T., Kennel, S.J., Abe, M., Takishita, M., et al.: A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. Blood, 84 : 1922-1930, 1994

- 8) 小阪昌明, 尾崎修治: ヒト形質細胞腫モデルと抗ヒト骨髄腫抗体の抗体の抗腫瘍効果. 臨床血液, 38 : 275-280, 1997
- 9) Ozaki, S., Kosaka, M., Wakatsuki, S., Abe, M., et al.: Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. Blood, 90 : 3179-3186, 1997
- 10) Ozaki, S., Kosaka, M., Wakahara, Y., Ozaki, Y., et al.: Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells. Blood, 93 : in press, 1999
- 11) Mulatani, P.S., and Grossbard, M.L.: Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. J. Clin. Oncol., 16 : 3691-3710, 1998
- 12) Maloney, T. J., Donovan, K., and Hamblin, T. J.: Antibody therapy for treatment of multiple myeloma. Sem. Hematol., 36 (suppl. 3) : 30-33, 1999

Immunotherapy of multiple myeloma with monoclonal antibody

Masaaki Kosaka and, Shuji Ozaki

First Department of Internal Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima

SUMMARY

Multiple myeloma is so far an incurable malignancy because of marked resistance of tumor cell to conventional chemotherapeutic agents even if myeloablative treatment has been applied with hematopoietic stem cell transplantation. The challenge remains to develop less toxic, but more effective, targeted therapies. We have generated a monoclonal antibody (mAb), which detects a human plasma cell specific antigen, HM 1.24, to develop a new immunotherapy for multiple myeloma. This mAb has been shown to inhibit the proliferation of human myeloma cells implanted into severe combined immunodeficiency mice by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC). Subsequently, for the clinical application to treatment of myeloma patients, the murine mAb was humanized through genetic engineering methods to ameliorate the host humoral response and to mediate ADCC against myeloma cells in the presence of human effector cells, CD 16⁺ NK cells. Using the humanized anti-HM 1.24 mAb, but not the murine mAb, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from myeloma patients exhibited ADCC activity as efficiently as those of healthy donors. These results promise that humanized anti-HM 1.24 has potential as a new therapeutic strategy in refractory multiple myeloma.

Key words : multiple myeloma , immunotherapy , monoclonal antibody , HM 1.24, molecule target therapy