

氏 名 (本籍) 大 津 智 子

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2 4 5 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 59 年 3 月 27 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Detection of Drug Resistance in Human
Hematologic Malignancy by Monoclonal
Antibodies.

(モノクローナル抗体による造血器腫瘍における
薬剤耐性細胞の検出)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 金 丸 龍 之 介

教 授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【目 的】

本研究では、多剤耐性 (multidrug resistance : MDR) に関連するP糖蛋白 (P-gp) に対するモノクローナル抗体 (MoAb) ; MRK16と, doxorubicin (ADM) 耐性に関連する85kilodaltonの蛋白 (p85) に対するMoAb ; MRK20を用い, 以下の事を目的に実験を行った。

- I) MoAbを使用する際の至適条件を設定する。
- II) 造血器腫瘍由来培養細胞における反応性と薬剤感受性度との関連を調べ, MoAbによるin vitroにおける耐性細胞検出の特異性を調べる。
- III) 両MoAbの臨床検体における耐性細胞検出の有用性について検討する。

【材料及び方法】

1) 両MoAbは, 鶴尾等により, MDR細胞-K562/ADMをBALB/Cマウスに免疫する事により得られたもので, 本研究にはintact typeのMoAbを供与して頂き, F(ab')₂成分への分離はペプシン処理により行った。2) 培養細胞として, 40種のヒト造血器腫瘍由来培養株 (T細胞株8種, 非T・非B細胞株5種, B細胞株10種, 骨髓系細胞株17種) を使用した。3) MoAbとの反応性は, フローサイトメトリー (by SpectrumIII) を用いて, 間接蛍光抗体法により判定した。4) 各種培養株 (19種) のin vitroにおける薬剤感受性度は, 主な抗癌剤10種を対象に増殖抑制法で測定し, K562に対する相対耐性度を算定し, 相対耐性度が2以上のものを耐性細胞とした。5) 培養細胞におけるmdr-1遺伝子の発現は, Maniatis等の方法に従って行った。6) 臨床検体からの腫瘍細胞の分離調整は, 末梢血・骨髓液ではFicoll-Conray法により, リンパ節・固形腫瘍組織では, RPMI-1640培地中でのハサミによる細切に引き続くメッシュろ過により細胞浮遊液を得た。

【結果及び考察】

I) MoAbの至適条件

両MoAbとの反応性をintact型とF(ab')₂型で比較検討したところ, Fc γ -receptor (Fc γ -R) を強く発現している各種培養株において, intact型では, 馬IgGによるblocking法でもブロック不可能なFc γ -Rを介した偽陽性の反応が出る事が判明し, 以後の実験はすべてF(ab')₂型抗体を用いた。また力価検定により, MoAbの至適濃度を設定した。

II) MoAbによるin vitroでの抗癌剤耐性細胞検出の特異性

MoAbとの反応性と、in vitro薬剤感受性度との関連より培養株は以下の4群に分類できた。MRK16・MRK20陽性の1群は4株で、抗癌剤ADM, VCR, MXT, VP-16, BLMに交差耐性を示し、*mdr-1* 遺伝子の増幅も認められ、典型的なMDR細胞株と考えられる。両MoAbは陰性であるが、交差耐性のパターンが1群と同様のものを2群とし、ATL-1K (ATL由来) が属した。本群での耐性機序は、両MoAbでは検出不可能なP-gp関連多剤耐性か、または、P-gp以外の多剤耐性機序が関与している可能性がある。MRK20のみ陽性の3群には3株属し、VCRに感受性であるが、ADM, VP-16, MXT, BLMに耐性を示し、最近報告されているいわゆる“atypical 1 MDR” と類似の交差耐性のパターンを示した。残りの培養株は両MoAb陰性で、いずれの抗癌剤にも感受性で、4群とした。以上より、MRK16はP-gp関連MDR細胞を検出し、MRK20は新しいタイプの多剤耐性細胞を検出する事が示された。

III) 両MoAbの臨床検体への応用

まず、両MoAbと正常末梢白血球との反応性を検討したところ、MRK16は正常白血球とは全く反応しなかったが、MRK20は単球と強く反応したため、MRK16のみを臨床応用した。白血病・リンパ腫由来の198臨床検体にMRK16を反応させたところ、治療前の98検体はすべて陰性であったが、再発時や不応期に採取した100検体中9検体で反応陽性であり、これらの症例は全例その後の化学療法に反応しなかった。今回の研究では、臨床における耐性細胞の早期発見は不可能であったが、臨床においても確かにP-gp関連MDR細胞が存在し、またそれらのMRK16による検出の可能性が示された。

【結 語】

造血器腫瘍における耐性細胞検出について、MoAb ; MRK16, MRK20での基礎的検討とMRK16の臨床応用の可能性を報告した。今後は、MoAbの感度の上昇や、複数の抗体使用等により耐性細胞を早期に検出し、Ca拮抗剤等のMDR克服剤併用による治療成績向上をめざす必要があると思われた。

審査結果の要旨

著者は多剤耐性に関する2種類の抗体、すなわちP-蛋白にたいするモノクロナール抗体MRK16とdoxorubicin (ADM) 耐性に関連する85kDa蛋白に対する抗体MRK20を使用し、薬剤耐性細胞の検出が可能かどうかを研究した。造血器腫瘍である40種の白血病、リンパ腫培養株にたいするモノクロナール抗体の反応を調べさらに19株について各種抗癌剤のin vitro 薬剤感受性度の関連を検索した。その結果抗体の反応性とin vitro 感受性度からみて培養株は4グループに分類された。グループ1は4株であり、ADM, mitoxantron (MXT), etoposide (VP-16), vincristine (VCR) に耐性で、MRK16,20に反応した。グループ2は1株だけであり、上記4剤に耐性であるが、MRK16,20に反応しないものである。グループ3は3株でADM, MXT, VP-16に耐性で、VCRに感受性があるが、MRK16には反応せずMRK20に反応した。グループ4はいずれの抗癌剤にも感受性があり、モノクロナール抗体も反応しなかった。MRK16はADM, MXT, VP-16に交差耐性を示す新しいP-糖蛋白に関与する多剤耐性を検出しMRK20は単球と反応したためMRK16を臨床応用を行った。白血病、リンパ腫由来の198検体にMRK16を反応させると、治療前98検体すべて陰性であったが、再発時や不応期に採取した検体では100検体中9検体で陽性であった。結論としてはモノクロナール抗体MRK16が薬剤耐性細胞検出に有用である。

本研究では抗癌剤多剤耐性に関連するP糖蛋白にたいするモノクロナール抗体作成の試みに努力がはらわれており、そのなかからMRK16が多剤耐性細胞の検出の可能性を示唆したものであり、今後臨床応用への手がかりをえたもので学位論文に価する。