



医学検査のあゆみ-5

モノクローナル抗体を使った悪性疾患診断に関して

東京大学医学部附属病院 検査部 東 克巳

はじめに

今回、モダンメディアに「医学検査のあゆみ」シリーズが企画された。この企画は「臨床検査ひとくちメモ」シリーズの中から、以前掲載された時代から現在までの変遷、現状に関して紹介するものである。本稿では18年前に狩野恭一先生（前東京大学医科学研究所教授）がご執筆された「モノクローナル抗体は悪性腫瘍の診断にどのように役立ったか」を取りあげることになった（第33巻7号掲載）。

狩野先生が18年前、モノクローナル抗体の紹介と将来の応用について述べられているが、現在、まさにその予言が適中している。モノクローナル抗体は悪性腫瘍の診断に限らず、医学のあらゆる分野で、種々幅広く利用されている。

一方、血液関連部門でも造血器腫瘍の診断や研究におけるツール（道具）の1つとして必須のモノクローナル抗体の開発もフローサイトメトリー（FCM：flow cytometry）なくしてはここまで発展しなかったと思われる。特にヒト造血前駆細胞に対する特異性の高いモノクローナル抗体の開発が積極的に行われ、両者が両輪となってうまく噛み合って造血器腫瘍診断に大いに貢献し、揺るがない臨床的評価を受けるようになってきた。FCMについての原理や新しい技術についての詳細は成書¹⁾や文献²⁻⁵⁾を参照されたい。

モノクローナル抗体の応用については、前述したように現在ではあまりにも広い分野で用いられているので、今回は特に造血器腫瘍におけるモノクローナル抗体の診断および治療などの応用に限定して述べさせていただく。

I. 造血器腫瘍診断におけるモノクローナル抗体の応用

1. 造血器腫瘍細胞診断に使用されるモノクローナル抗体の種類

臨床的に最も広く用いられているのは細胞表面抗原や細胞質内抗原に対する抗体である。その他にも細胞周期やアポトーシスの解析に用いる抗 BrDUモノクローナル抗体、増殖マーカーである PCNA (proliferating cell nuclear antigen) や c-myc など癌遺伝子関連タンパク質に対する抗体、サイトカインに対する抗体など多数ある。

ただし、抗体を選択する場合は、同じ抗原に対する抗体であっても抗体によっては反応性が異なる可能性があるので注意が必要である。この点は、モノクローナル抗体のピットフォールの1つでもある。新しい抗体についての情報は白血球抗原についての書籍やホームページ^{6,7)}の他、抗体を取り扱っている会社にお問い合わせると参考になる。

1) 白血球抗原に対する抗体

(1) CD 分類

造血器細胞の表面には抗原レセプター、細胞接着分子、サイトカインレセプター、補体レセプター、Fcレセプターなど種々の分子が存在し機能を果たしている。これらの分子に対する非常に多くのモノクローナル抗体が作製されており、国際ワークショップ (International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigen) によってこれらを cluster として整理分類し、統一的 CD (cluster of differentiation) 番号がつけられている。2004年の第8回ワークショップでCD番号が339に達した⁸⁾。CD番号は当初、モノクロー

ナル抗体の分類番号として用いられたが、やがて対応する抗原分子についても用いられるようになった。

2) 造血器腫瘍細胞の免疫学的細胞表面抗原検索 (immunophenotyping) の原理

白血病やリンパ腫など造血器腫瘍の分類は、従来、腫瘍細胞の細胞形態分類に主眼がおかれていたが、治療法の開発により治療方針決定や予後推定のために腫瘍細胞の起源まで求められるようになってきている。

細胞表面上には種々の抗原基が発現している。特に血液細胞では造血幹細胞から種々の系統の細胞に分化する際に、細胞分化成熟度に応じた抗原基の種類や発現時期について多くの知見が集積されている。

図1～3に各種造血細胞の分化成熟度に伴う細胞表面抗原基の推移を示した⁹⁾。

これらの情報を用いて細胞の帰属を推測する手法がモノクローナル抗体を応用したフローサイトメトリーの重要な仕事の1つである。FCMによる造血器腫瘍細胞の帰属を推定する原理は、ただ1つの細胞表面抗原を検索することにより細胞の帰属を決定することは困難であるが、いくつかの抗体を用い、すべてが陽性でなくても抗原基が陰性を示すことな

どをも組み合わせて解析し、造血器腫瘍細胞の帰属を推定するものである。

また、ある表面抗原を持った細胞亜群が増加している場合、その細胞集団がクローナルな細胞増殖であることを証明することにより腫瘍性増殖が確定する。FCMはclonalityの存在は推定できる。しかし、厳密には、種々の検索を行い総合的に判断する必要がある。

(1) 分化抗原解析による腫瘍細胞帰属の診断

白血病の病型診断は細胞化学的手法が使用され、例えばペルオキシターゼ反応(POD)を利用してリンパ性白血病か骨髄性白血病かの分類が行われている。しかし、急性白血病分類の1つであるFAB分類のM0はPOD3%以下であり、従来であればリンパ系白血病に分類されていた。現在では細胞表面抗原を検索し、マーカーのCD13もしくはCD33が陽性でCD19、CD20が陰性であれば骨髄性白血病として治療が開始される。M7もM0と同様、POD3%以下であり、表面抗原検索が重要である。すなわち、モノクローナル抗体がなければ正確な白血病病型診断ができないことになる。このように診断直後から行われる緩解導入のための治療薬剤選択にも重要な情報を提供する。

リンパ性白血病や悪性リンパ腫では、骨髄性白

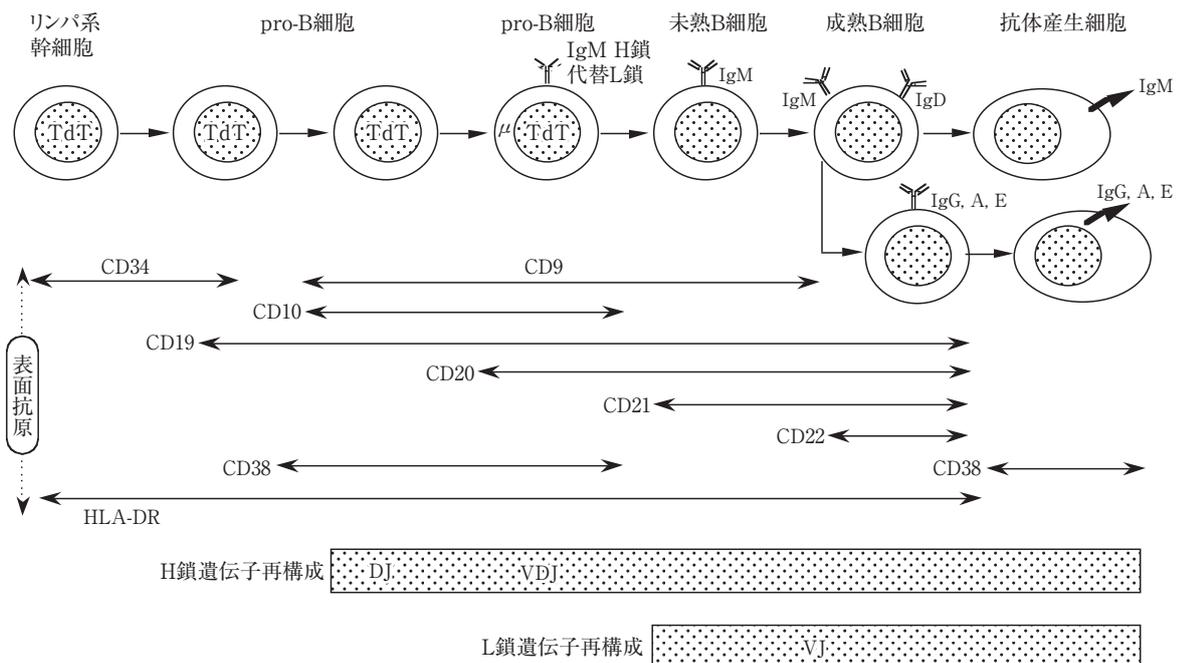


図1 Bリンパ球の分化過程と表面抗原の変化

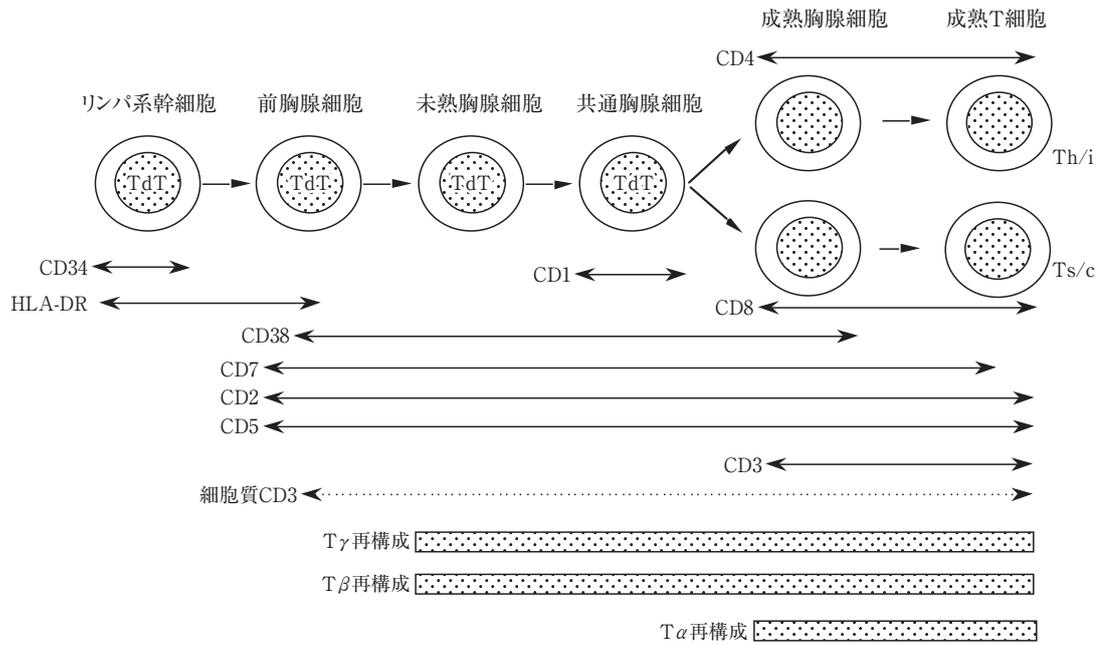


図2 Tリンパ球の分化過程と表面抗原の変化

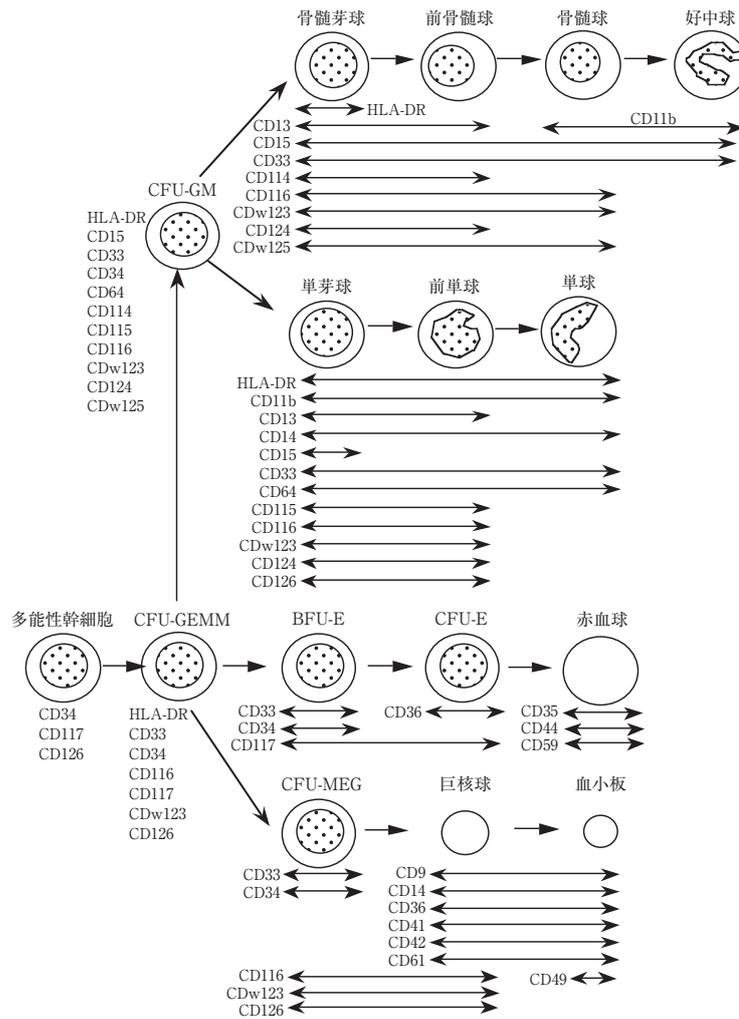


図3 骨髄系細胞の分化過程と表面抗原の変化

血病のように形態学的特徴がそれほど明確でないため細胞表面抗原検索は必須の検査項目となる。

細胞化学的手法と細胞表面抗原検索を組み合わせることで解析評価することにより、高価なモノクローナル抗体の種類をできるだけ少なくし、より正確な細胞系列と細胞の分化段階を決定することができる。

(2) Mixed lineage leukemia

造血器腫瘍細胞では正常な分化段階では発現してこない抗原基や骨髄性白血病でありながらリンパ系の抗原基を発現する場合がある。例えば骨髄性白血病の1個の細胞表面上にCD13やCD33とCD19やCD10の抗原基を発現したり、逆にリンパ性白血病でありながらCD13やCD33の抗原基を発現したりするbiphenotypic leukemiaがある。

例えば腫瘍細胞がCD13, 33陽性とCD10, 19陽性が別々のpopulationで見られるbilineage leukemiaがある。

いずれにしてもこれらmixed lineage leukemiaは細胞表面抗原検索を行わなければ診断がつかない病型である。

(3) Monoclonality の検索

モノクローナル抗体を用いたFCM解析のみでclonalityの検索はなかなか困難であることは前述した。しかし、例えば、成熟B細胞性リンパ腫で細胞表面免疫グロブリン陽性であり、特にimmunoglobuline軽鎖の単一発現(偏り)があればそれだけでclonalityの証明が可能である場合がある。

(4) 微小残存病変(MRD: minimal residual disease) の検出

近年、造血細胞に対する種々の増殖に関与するサイトカインが治療に応用されるようになり、造血器腫瘍に対しても強力な抗癌剤治療が行われるようになった。それにつれ、造血器腫瘍では、微小残存病変の検出が重要な課題となってきている。この検出にもFCMによるモノクローナル抗体の威力が発揮される。腫瘍細胞に対する特異抗原が存在する場合、1万個に1個腫瘍細胞が混入していても確実に検出可能である。

3) 造血器腫瘍細胞解析によく使用される抗体

わが国の日本臨床検査標準協議会(JCCLS)から造血器腫瘍細胞解析のガイドラインが提唱され¹⁰⁾,

それに造血器腫瘍細胞解析に用いられる推奨抗体が提示されているので表1, 2に示す。

造血器腫瘍細胞の免疫学的細胞表面抗原検索用の標準的なパネルはまだこの国もコンセンサスが得られていない。

II. モノクローナル抗体を用いた分子標的治療

前述してきたように、近年、悪性腫瘍は免疫学的手法、分子生物学的手法や遺伝子学的検索が急速に進歩し、腫瘍細胞のキャラクターが解明されつつある。それに伴い、それぞれの腫瘍細胞に応じた、テーラーメイドの理論的な治療法が開発されようとしている。造血器腫瘍分野では、特に腫瘍細胞の進展に関与している特定の分子あるいは腫瘍細胞に特徴的な抗原を発現している分子を標的とした分子標的治療が行われ、すでに、一部の腫瘍において大きな成果をあげているものもある。

分子標的治療の先駆けは、おそらく1988年上海大学より急性前骨髄性白血病(APL: acute promyelocytic leukemia)に対してall-trans retinoic acid(ATRA)が投与され、播種性血管内凝固症候群(DIC: disseminated intravascular coagulation)をさほど増強せず高率に寛解導入されたことであろう¹¹⁾。フランスや日本での追試の結果でも高い寛解率が得られた^{12, 13)}。当初は分化誘導療法として受け入れられていた。ATRAが分子標的治療であることが証明されたのは1990年である。

分子標的薬は細胞内情報伝達系あるいは細胞周期に作用するもの、特定の分子に対する抗体を用いるものなどが開発されている。ここでは抗体を用いるものについて述べる。

1. Rituximab¹⁴⁾

1) rituximab の作用機序

悪性腫瘍の抗体療法は、血液疾患分野では悪性リンパ腫に対する抗CD20抗体で許可された。CD20はB細胞系で細胞表面に発現するが、前駆細胞と形質細胞には発現していない。また、B細胞系腫瘍細胞でCD20が発現している悪性リンパ腫には効果的である。

Rituximabは、マウス/ヒトキメラ型抗CD20抗体で、CD20と結合することで抗体依存性細胞介在

表1 白血病の解析に用いられる抗体

【急性白血病のための抗体】

主に B リンパ球と反応

- CD19: B リンパ球系 ALL のほとんどすべてに発現, 骨髄性白血病でも時に陽性
- CD20: CD19 よりは低頻度
- CD22: 通常発現しているが dim, 細胞質により強く発現
- CD10: B リンパ球系 ALL の多数に発現, T-ALL でも発現例がみられる
- CD79a: B リンパ球系 ALL の大部分に発現, 骨髄性白血病でも発現例がある (例えば M3 など)
- SmIg M, monoclonal immunoglobulin light chain: B リンパ球系 ALL の一部に発現

主に T リンパ球系と反応

- CD2: T-ALL の大部分に発現, 骨髄性急性白血病でも発現例あり
- CD5: T-ALL の大部分に発現しているがしばしば dim
- CD7: T-ALL で最も高頻度に発現, 骨髄性急性白血病の一部にも
- CD3: 発現頻度は高くないが T リンパ球に特異的, 細胞質内 CD3 は T-ALL の最も特異的で sensitive なマーカー
- CD1: しばしば発現, CD4, CD8 を同時に発現することも
- CD71: 大部分で陽性
- CD38: 大部分で陽性

主に骨髄系細胞と反応する抗体

- CD13and/orCD33: 骨髄性白血病のほとんど全例で発現, しばしば ALL (T, B) でも
- CD14: 単球系への分化を示す骨髄性白血病でしばしば陽性, リンパ性白血病の一部でも
- CD15, CD11b: 分化傾向を示す骨髄性白血病で陽性
- CD41, CD61: 巨核芽球性白血病の診断に有用
- Glycophorin: 赤白血病の診断に有用
- CD34: stem cell のマーカー
- HLA-DR: AML, B-ALL のほとんどで陽性, T-ALL, APL ではしばしば陰性
- TdT: ALL (T, B) の大多数で陽性, AML でもしばしば陽性
- AntiMPO, CD65, CD117: 骨髄性白血病で陽性

【慢性リンパ性白血病やリンパ腫のための抗体】

主に B リンパ球と反応

- 細胞表面免疫グロブリン: light chain restriction を示す
- CD19, CD20, CD22, CD37: B-ALL で通常陽性
- CD10: follicular center B cell から発生したリンパ腫や白血病で陽性 B-CLL では陰性
- CD23, CD5, CD20: CLL/SL(small lymphocytic lymphoma) と MCL (mantle cell lymphoma) の鑑別に
- CLL/SL: CD23 +, CD5 +, dimCD20
- MCL: CD23 -, CD5 +, bright CD20
- CD103: hairy cell leukemia で陽性
- CD25 と CD11c: 同時に発現すると hairy cell leukemia に特徴的

主に T リンパ球と反応

- CD3, CD2, CD5: T-CLL の大部分で陽性
- CD8 or CD4: T-CLL の大部分はどちらかが陽性
- CD5: B 細胞性白血病, リンパ腫の一部, 特に B-CLL で陽性
- CD7: T 細胞性腫瘍でしばしば消失
- $\alpha\beta$ TCR: T 細胞性リンパ腫の大半で陽性

主に骨髄系細胞と反応する抗体, その他

- CD11c: B-CLL の一部, 特に hairy cell leukemia で陽性
- CD34: CLL(T,B) では常に陰性
- CD56, CD57: large granular lymphoproliferative disease でしばしば陽性
- CD25, CD30, HLA-DR: transformed lymphocyte 由来のリンパ腫でしばしば陽性
- CD38: 形質細胞性腫瘍でしばしば陽性

表2 白血病タイプニングの推奨パネル

	系統検索パネル	分化段階検索パネル	異常発現マーカー
骨髄系	CD13, CD33, cMPO	CD11c, CD14, CD15, CD64, CD65, CD117	CD10, CD19, CD56
T細胞系	CD2, CD7, cCD3	CD1a, CD4, CD5, CD8, CD25	CD33
B細胞系	CD19, cCD79a	CD10, CD20, CD23, SmIg, cCD22	CD5, CD33
その他	CD34, HLA-DR	CD38, CD41a, CD56, CD61, CD71, Glyco-A	

*c : cytoplasmic, MPO : myeloperoxidase, SmIg : surfacemembrane immunoglobulin, Glyco-A : glycophorin-A

性細胞傷害 (ADCC) および補体依存性細胞傷害 (CDC) により細胞傷害を起こす。

2) rituximab の治療

低悪性度 B 細胞リンパ腫の濾胞性リンパ腫などで良好な奏効率がみられる。しかし, rituximab 単独で使用されることは少なく, 悪性リンパ腫に標準的な CHOP 療法との併用療法, R-CHOP や R-ESHAP が行われている。

また, 最近, 凝固因子に対する抗体産生症例に応用した文献もみられるようになり, 新たな治療も検討されている。

本剤の投与後数日で, 末梢血での腫瘍細胞はみられなくなるようである。また, 本剤はウマで抗体を作製しているため, 異種蛋白投与となり好酸球の増加がみられることがある。

2. Gemtuzumab ozogamicin¹⁵⁾

1) Gemtuzumab ozogamicin の作用機序

Gemtuzumab ozogamicin は前者とは少し趣を変えた薬剤である。いわゆるミサイル療法と呼ばれる。

抗 CD33 抗体に強力な抗癌剤を結合させ, 細胞表面に CD33 を発現している細胞を抹消するものである。したがって, 腫瘍細胞に CD33 が発現していることが条件である。当然, CD33 抗原を発現している正常細胞も抹消されるが, 正常造血幹細胞は, CD34 抗原は発現しているが CD33 は発現していないために抹消されないことを特徴とする。また, 非造血細胞も CD33 を発現していないために抹消されない。

抗 CD33 抗体には calicheamicin が結合しており, 腫瘍細胞表面の CD33 と抗体が結合すると速やかに

細胞内へと侵入し, calicheamicin が分離して細胞傷害を来すメカニズムである。

2) Gemtuzumab ozogamicin の治療

まだ治験の段階であり, 治療成績については報告をまたなければならない。

おわりに

モノクローナル抗体の応用について, 特に造血器腫瘍に限定し, 狭い範囲ではあるが現状を述べさせていただいた。

狩野先生の先見の明は鋭く, 現在, 18 年前に先生が推測されたような状況である。もちろん, このようなモノクローナル抗体の開発には他分野の技術の研究努力があったことはいままでもない。

モノクローナル抗体は確かにエピトープに対し特異的に反応するかもしれないが, 細胞診断に際してはピットフォールが存在することも忘れてはならない。また, 数種類の高価な抗体を使用しないと診断できないことは改良の余地があろう。

理想的なモノクローナル抗体は, 腫瘍細胞に対し特異的にただ 1 つの抗体で診断でき, それが治療に応用できることであろう。すなわち, 真のテーラーメイド治療法の確立に寄与できるようになることと言えよう。

文 献

- 1) 佐々木巧典, 天神美夫監修: 応用サイトメトリー. 医学書院, 東京, 2000.
- 2) 東 克巳, 米山 彰子: 蛍光免疫染色. 「生物試料分析」26: 403-413, 2003.

- 3) 東 克巳：フローサイトメトリー. 日本検査血液学会雑誌 4 : 284-290, 2003.
- 4) 東 克巳, 米山 彰子：フローサイトメトリー (第2回). 日本検査血液学会雑誌 5 : 119-125, 2004.
- 5) 東 克巳：フローサイトメトリー (第3回). 日本検査血液学会雑誌 5 : 405-414, 2004.
- 6) Kishimoto T. ed.: Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigen (Garland Pub, New York) 1997.
- 7) PROW(Protein Reviews On the Web) <http://www.ncbi.nlm.gov/prow/>
- 8) 8th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA8) 2000-2004. E.mail : hlda8.workshop@adelaide.eud.au
- 9) 米山彰子：フローサイトメトリー (細胞表面マーカー). スタンダード検査血液学 : 158-165. 医歯薬出版, 東京, 2003.
- 10) 日本臨床検査標準協議会, 血液検査標準化検討委員会, フローサイトメトリーワーキンググループ：フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P V1.0). 日本臨床検査標準協議会雑誌 18 : 69-107, 2003.
- 11) Huang M.E., Ye Yc, Chen S.R., et al.: Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia . Blood 72 : 567-572, 1988.
- 12) Castaigne S., Chomienne C., Daniel M.T., et al.: All trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. Blood 76 : 1704-1709, 1990.
- 13) Ohno R., Yoshida H., Fukutani H., et al.: Multi-institutional study of all - trans retinoic acid as a differentiation therapy of refractory acute promyelocytic leukemia. Leukemia 7 : 1722-1727, 1993.
- 14) Hainsworth J. D., Litchy S., Burris III H.A., et al.: Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin' s lymphoma. J Clin Oncol 20: 4261-4267, 2002.
- 15) Sievers E.L., Larson R.A., Stadtmauer E.A., et al.: Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. J Clin Oncol 19: 3244-3254, 2001.