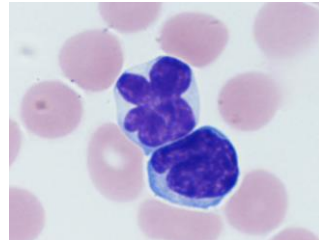


成人T細胞白血病における CCR4発現に関する検討

NHO 大阪南医療センター

柴田 亜砂美、高尾 千寿、土田 幸生、田浦 映恵、
江口 剛、山本 健太、山口 晃史、星田 義彦、前田 裕弘

成人T細胞性白血病 (ATL)



ATLはレトロウイルスであるHTLV-1を原因として成人に発症する末梢性T細胞腫瘍である。

腫瘍細胞の細胞表面形質は、一般に CD4(+),CD25(+)を示す。

主な治療方法として、**化学療法**、**造血幹細胞移植**が行われる。

高齢者に多く、また多臓器への浸潤傾向、薬剤耐性、免疫不全が強いことなどが、他の腫瘍と比べて予後不良な要因とされている。

2012年、ATLの約90%に発現しているといわれているCCR4に対する抗体試薬である新薬 **ポテリジオ**[®]が発売された。

ポテリジオ®

ポテリジオ®は、ATL細胞表面に存在するCCR4に対する抗体試薬であり、CCR4に結合し、ADCC活性によりATL細胞を傷害する。

ポテリジオ®テスト

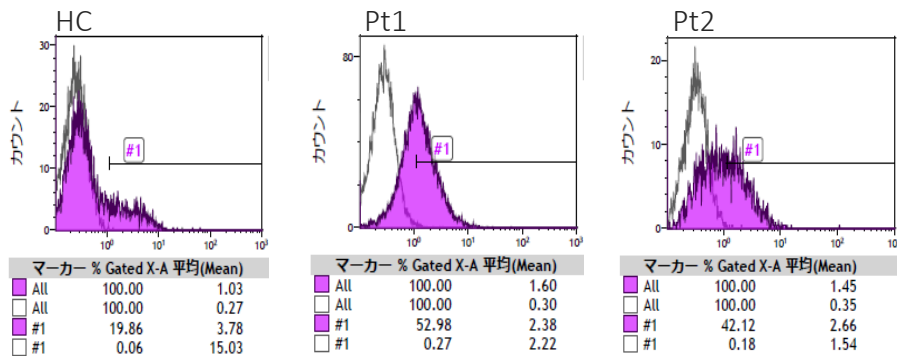
…協和発酵キリン株式会社の「ポテリジオ®点滴静注20mg」
(一般名:モガムリズマブ)のコンパニオン診断薬

再発又は難治性のATL患者においてポテリジオ®の投薬適応を判断するための補助に使用される。

ポテリジオ®投与前に、ポテリジオ®テストを使用して、腫瘍細胞がCCR4を発現しているか否かをあらかじめ検査する。

ポテリジオ®テストの結果

CCR4の発現 (gate: CD4(+)cells)



ポテリジオ®の半減期は長く、血中に残存している場合はポテリジオ®テストによるCCR4の発現の確認ができない。

検討1 : ポテリジオ®テストと1G1

? ポテリジオ®テストのCCR4(Clone : KM2760) と
CCR4(Clone : 1G1)のCCR4 の発現性に
違いはあるか？

- ① ポテリジオ®テスト
 - …協和発酵キリン株式会社の「ポテリジオ®点滴静注20mg」の
コンパニオン診断薬
CCR4 (Clone : KM2760) に対する抗体試薬
- ② CCR4 (Clone : 1G1)
 - …ポテリジオ®テストのCCR4とは別のエピトープに対する
抗体試薬

使用機器, 使用試薬

使用機器

Beckman Coulter社
Navios



使用試薬

ポテリジオ®テスト

(抗体量 μ l)

測定試料名	サンプル	陰性対照
CCR4-FITC (Clone : KM2760)	10	—
陰性Control-FITC	—	10
抗CD4抗体-PC5	3	3
抗CD25抗体-PE	5	5

CCR4(Clone : 1G1)

(抗体量 μ l)

測定試料名	サンプル	陰性対照
CCR4-PE (Clone : 1G1)	10	—
IgG1-PE	—	10
抗CD4抗体-FITC	3	3
抗CD25抗体-PC5	5	5

方法 (ポテリジオ®テストProtocol)

1. 前処理

検体 (EDTA-2K加血) 500 μ lに細胞浮遊液2.5ml添加

↓ 遠心 (1500rpm, 5分, 室温)

上清を吸引除去、再度 細胞浮遊液2.5ml添加

↓ 遠心 (1500rpm, 5分, 室温)

最初の分注量 (500 μ l)が残るように上清を吸引除去

↓

アジ化ナトリウム含有ウサギ血清50 μ l添加

↓ 5分間静置 (冷蔵)

細胞懸濁液

① ポテリジオ®テスト

測定試料名	サンプル	陰性対照	測定試料名	サンプル	陰性対照
細胞懸濁液	55	55	細胞懸濁液	55	55
標識抗体-FITC	10	—	1G1-PE	10	—
陰性Control-FITC	—	10	IgG1-PE	—	10
抗CD4抗体-PC5	3	3	抗CD4抗体-FITC	3	3
抗CD25抗体-PE	5	5	抗CD25抗体-PC5	5	5
細胞浮遊液	27	27	細胞浮遊液	27	27
全量	100	100	全量	100	100

2. 測定試料の調整

サンプル, 陰性対照を表※に従い調整

↓ インキュベート (60分, 静置, 冷蔵)、攪拌

赤血球溶解剤2ml添加後 静置 (10分, 室温)

↓ 遠心 (1500rpm, 5分, 室温)

上清を吸引除去

赤血球溶解剤2ml添加、攪拌

↓ 遠心 (1500rpm, 5分, 室温)

上清を吸引除去

細胞浮遊液4ml添加、攪拌

↓ 遠心 (1500rpm, 5分, 室温)

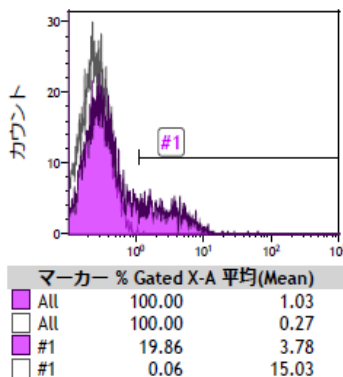
上清を吸引除去

細胞浮遊液0.5ml添加 再浮遊

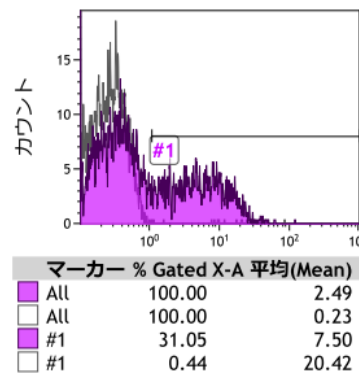
→ FCMで測定

結果 : HC (gate: CD4(+) cells)

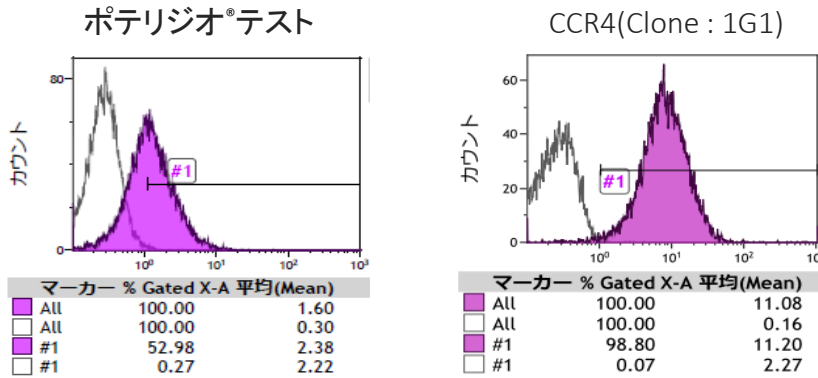
ポテリジオ®テスト



CCR4(Clone : 1G1)



結果 : Pt1 (gate:CD4(+)cells)



→ CCR4(Clone : 1G1)を用いてもATL腫瘍細胞を検出できる。

考察①

? ポテリジオ®テストのCCR4(Clone : KM2760) と
CCR4(Clone : 1G1)のCCR4 の発現性に
違いはあるか？

→ポテリジオ®テスト、CCR4(Clone:1G1)、共にCCR4において
色素の違いはあるものの、同様の発現がみられた。

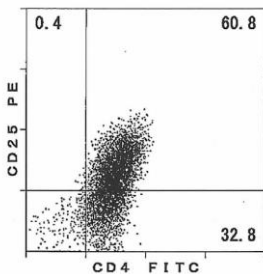
検討2 : CCR4 (Clone:1G1) の有用性

? 血中にポテリジオ®が残存している期間に
腫瘍細胞のCCR4をCCR4 (Clone : 1G1) で確認できるか？

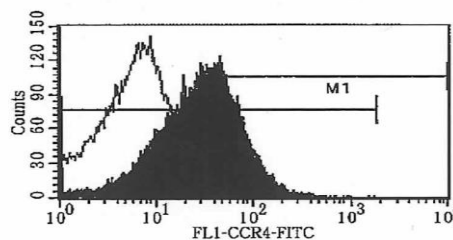
症例 : 67歳,女性,和歌山出身(母が福岡出身)

現病歴 : 2013年1月,急性型ATLと診断され,同年3月より
ポテリジオ®療法開始,4月11日に8コース終了後,
寛解を維持していた。
2014年8月,再発を確認し,ポテリジオ®テストが
陽性であり,9月5日よりポテリジオ®再投与を開始
した。

治療前のポテリジオ®テスト



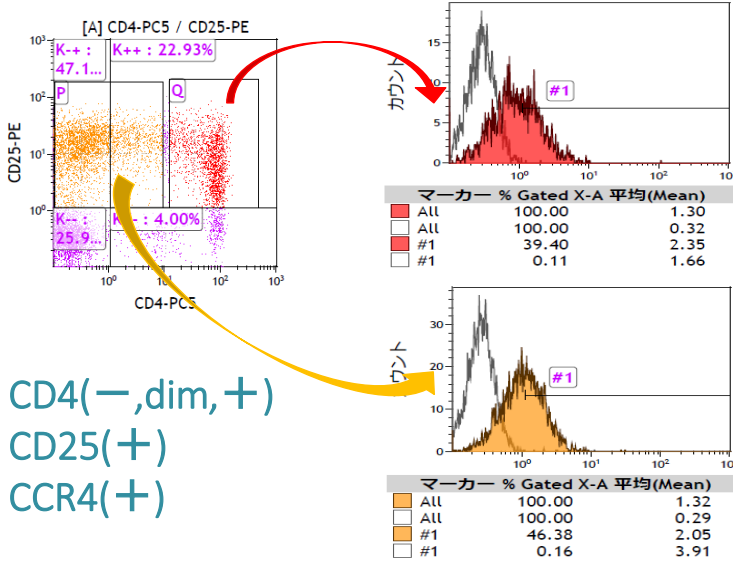
CD4(+),CD25(+)
CCR4(+)



File: 130212-OLLC0011..002
Acquisition Date: 13-Feb-13
Gate: R2 and R1.

Marker	% Gated	Peak Ch
All	100.00	42
M1	51.44	42
M3	99.75	42

再発時のポテリジオ®テスト

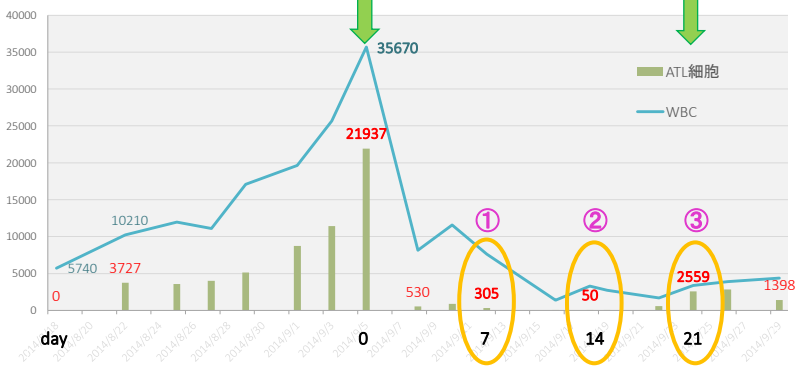
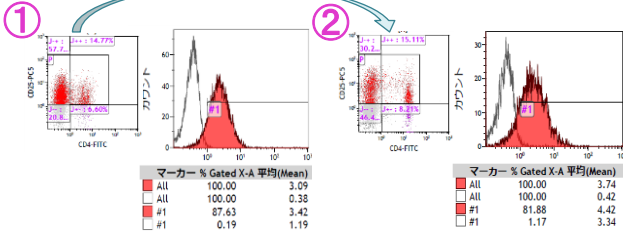


再発から治療

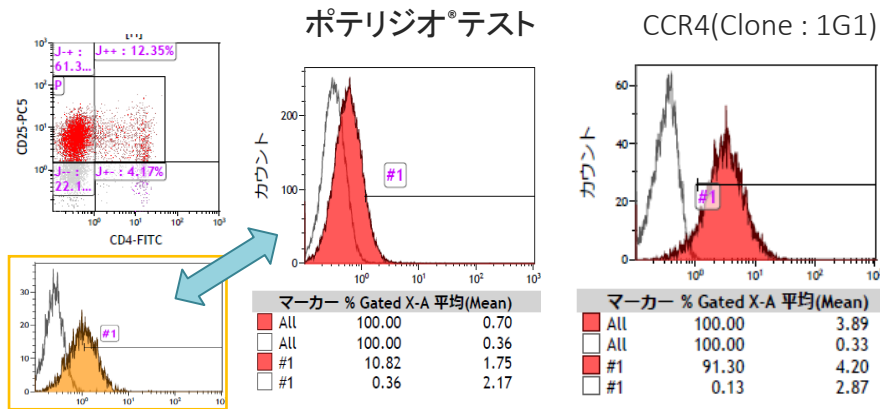
~ 1G1 ~

↓ : ポテリジオ® 投与

CCR4(1G1)陽性細胞の絶対数は減少しているが、残存している。



③ 再増加



CCR4(Clone : 1G1)では腫瘍の残存が確認できるが、
ポテリジオ®テストでは確認できない!!

考察②

? 血中にポテリジオ®が残存している期間に
腫瘍細胞のCCR4をCCR4(Clone : 1G1)で確認できるか?
→ポテリジオ®投与中で、血中に残存している場合でも、
CCR4(Clone : 1G1)では腫瘍細胞の残存が確認できた。



ポテリジオ®治療前にポテリジオ®テストと共にCCR4(Clone : 1G1)の発現を見ていれば、再発が早期で、体内にポテリジオ®が残っている時期(ポテリジオ®テストで再発が判断できないとき)であっても、その時のCCR4(Clone : 1G1)の発現を見れば、再発が確認できるのではないかとと思われる。

検討3：試料の調整,操作手順

? ポテリジオ®テストの操作手順を簡単にできるか?

方法①・・・ポテリジオ®テストの Protocol

方法②・・・院内測定用 Protocol

方法① ポテリジオ®テストProtocol

1.前処理

検体 (EDTA-2K加血) 500 μ lに細胞浮遊液2.5ml添加

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

上清を吸引除去、再度 細胞浮遊液2.5ml添加

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

最初の分注量 (500 μ l)が残るように上清を

↓

アジ化ナトリウム含有

↓ 5分

2.測定試料の調整

検体 調整

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)、静置、冷蔵)、攪拌

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

↓ 遠心 (1500rpm,5分,室温)

①ポテリジオ®テストProtocol (Sample 1G1)

測定試料名	検体名	サンプル	陰性対照
細胞懸濁液	細胞懸濁液	55	55
標識抗体-FITC	1G1-PE	10	-
陰性Control-FITC	IgG1-PE	-	10
抗CD4抗体-PC5	抗CD4抗体-FITC	3	3
抗CD25抗体-PE	抗CD25抗体-PC5	5	5
細胞浮遊液	細胞浮遊液	27	27
全量	全量	100	100

非常に時間がかかる

→ FCMで測定

方法②(院内測定用)

※ ポテリジオ®テスト

測定試料名	サンプル	陰性対照
CCR4-FITC (Clone: KM2760)	5	—
陰性Control-FITC	—	5
抗CD4抗体-PC5	3	3
抗CD25抗体-PE	5	5

※ CCR4(Clone: 1G1)

測定試料名	サンプル	陰性対照
CCR4-PE (Clone: 1G1)	5	—
IgG1-PE	—	5
抗CD4抗体-FITC	3	3
抗CD25抗体-PC5	5	5

1. 測定試料の調整

サンプル,陰性対照を表※に従いそれぞれ調整

↓ (インキュベート,15分,室温)

溶血剤(OptylizeC) 500μl添加、攪拌

↓ (インキュベート,10分,室温)

1 × PBS 500μl添加、攪拌

↓ (インキュベート,8分,室温)

1 × PBS 2.0ml添加、攪拌

↓ 遠心(1500rpm,5分)

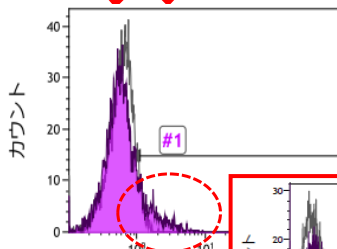
上清を吸引除去

細胞浮遊液0.5ml添加 再浮遊

→ FCMで測定

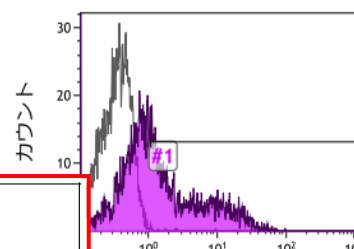
結果: HC (gate: CD4(+)cells)

ポテリジオ®テスト

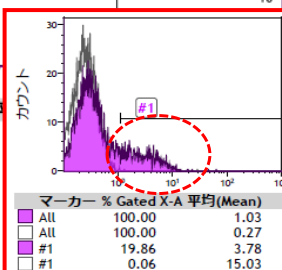


マーカー	% Gated X-A
All	100.00
All	100.00
#1	13.18
#1	3.91
#1	0.06

CCR4(Clone: 1G1)



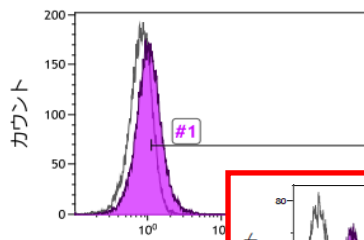
マーカー	% Gated X-A	平均(Mean)
All	100.00	3.66
All	100.00	0.34
#1	48.69	6.90
#1	0.26	2.39



マーカー	% Gated X-A	平均(Mean)
All	100.00	1.03
All	100.00	0.27
#1	19.86	3.78
#1	0.06	15.03

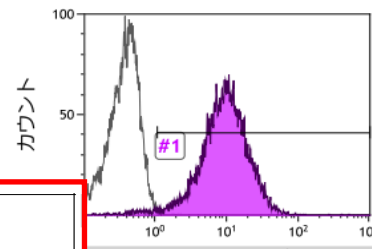
結果 : Pt1 (gate:CD4(+)cells)

ポテリジオ®テスト

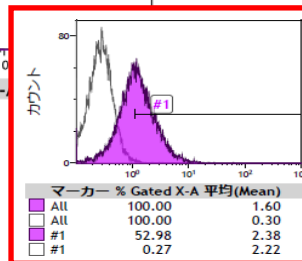


マーカー	% Gated X-A
All	100.00
All	100.00
#1	39.41
#1	14.76

CCR4(Clone : 1G1)



マーカー	% Gated X-A	平均(Mean)
All	100.00	11.96
All	100.00	0.38
#1	97.86	12.21
#1	0.20	1.30



マーカー	% Gated X-A	平均(Mean)
All	100.00	1.50
All	100.00	0.30
#1	52.98	2.38
#1	0.27	2.22

考察③

? ポテリジオ®テストの操作手順を簡単にできるか?

→ 十分に洗浄を行わない方法では、ポテリジオ®テストでは発現がみられなかった。

ポテリジオ®テストの測定は、Protocol通りに行うのが望ましい。

→ CCR4 (Clone : 1G1)は十分な洗浄操作を行わない方法であっても発現がみられた。

健常対照が少し右にシフトするのは洗浄不足が原因だと考えられる。

測定の際は必ず健常対照を置くのが好ましい。

まとめ

今回、我々はポテリジオ®テストと、CCR4に対する別の抗体 CCR4(Clone : 1G1)の比較検討並びに、操作手順においての検討を行った。

CCR4(Clone : 1G1)は、ポテリジオ®血中残存中でも腫瘍細胞を検出可能であると考えられる。

ポテリジオ®テストは測定Protocol通りの測定が望ましい。
CCR4(Clone : 1G1)は十分な洗浄を行わない、簡単な操作でも検出が可能である。