

200401199A

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

国際的動向を踏まえた  
医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成17 (2005) 年 4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究..... 1  
早 川 堯 夫

## II. 分担研究報告

1. バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方..... 76  
—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—  
川 西 徹  
(資料)  
1. ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to  
Changes in Their Manufacturing Process 16·Nov·04  
2. ICH Q5E Step4 翻訳：生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起原由来  
医薬品)の製造工程の変更に伴う同等性/同質性評価 (ICH Q5E Step4 翻訳)  
3. Scientific COnsiderations Related to Developing Follow-on Protein Products,  
Public Workshop, September 14-15, 2004 Agenda  
4. FDA/DIA Scientific Workshop on Follow-on Protein Pharmaceuticals,  
February 14-16, 2005 Agenda
2. 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討.....114  
川 崎 ナ ナ
3. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究.....131  
—肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望—  
新 見 伸 吾
4. 異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための試験法や基準についての.....150  
国際動向の研究  
山 口 照 英
5. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究.....176  
—腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus) を用いた癌治療について—  
内 田 恵 理 子

6. リスク管理に基づく製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する.....	196
国際動向調査研究	
檜山 行雄	
(資料)	
イ. ICH Q9 'Quality Risk Management' – an industry view	
ロ. Quality Risk Management – an EU regulator's perspective	
ハ. ICH Draft Q9 Quality Risk Management Draft No.6.0, March 1, 2005	
ニ. Quality Regulation under Revised Pharmaceutical Affair Law	
ホ. Guidance for Industry PAT–A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance	
ヘ. PAT–A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance (Dr. Watts)	
ト. PAT–A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance (Dr. Ali Afnan)	
7. 医薬品等の品質・安全性評価.....	279
豊島 聡	
8. 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化.....	289
武田 寧	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	298
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

## 国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所・副所長

新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査すると共に、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する以下の研究を行った。

1) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保のための同等性/同質性評価の国際的動向を検討した。ICH-Q5E「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）の製造工程の変更にとまなう同等性/同質性評価」国際調和ガイドラインが2004年11月にステップ4に達した。ガイドラインの国際調和までの経過、ステップ2からステップ4への合意に至るまでの論点及びICH-Q5Eガイドライン後に残された課題とQ5Eの適用対象から除外した後発品の同等性/同質性評価の問題点を明らかにした。

2) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法に関する研究として、リニアイオントラップMSと高分解能MSのハイブリッド型MSを利用した改良型糖鎖プロファイリング法を開発した。モデル糖鎖を用いて、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードによる精密質量測定及びデータ依存的多段階MS測定によって、従来法より多くの糖鎖構造情報が得られることを実証した。本分析法は、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する微量糖タンパク質の糖鎖解析に応用できることが示唆された。

3) 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と問題点を検討した。肝幹細胞の由来や肝細胞への分化誘導法についてのこれまでの研究の進展を明らかにすると共に、肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の可能性と今後の展望、検討課題を明らかにした。

4) 細胞・組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向の研究の一環として、欧州医薬品庁（EMA）の異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための留意事項等について検討した。異種細胞治療薬の安全性確保上最も重要な点は、感染性因子の伝播を如何に防止、あるいは潜在的な感染を含めて検出するかである。本文書には、異種細胞治療薬の基礎から前臨床開発、臨床開発、さらには市販後を含めたサーベイランスの広範囲の事項について、基本的考え方が述べられており、我が国での異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための指針作成に非常に有用な情報を与えるものであることを明らかにした。

5) 遺伝子治療用医薬品の品質、安全性確保に関する国際的動向の研究の一環として、腫瘍溶解性ウイルス（oncolytic virus）について検討した。臨床試験の初期段階にある腫瘍溶解性ウイルスについて、治療に用いられるウイルスと癌細胞標的化の方法、欧米及び日本での開発状況を明らかにすると共に、今後、腫瘍溶解性ウイルスが実用化されるための安全性、有効性の課題を明らかにした。

6) リスク管理に基づく製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際的動向を検討した。ICHの品質リスク管理（Q9）ガイドラインは2005年3月に専門家会議における合意（STEP 2）が達成された。一方、製品開発及び製造工程の近代化をめざすProcess Analytical Technology（PAT）に関しては米国食品医薬品局からの最終ガイダンスが発行された。Q9のステップ2に至るまでの議論及びPATの最終ガイダンスの概観と国内外における議論の概要、将来の課題を明らかにした。

7) 医薬品等の品質、安全性評価に関する研究として、米国が2002年以来実施している医薬品品質に関わる規制・制度の改革を公表された2通の文書を基に分析した。米国はリスクベースの規制に大きく方針転換すると共に米国規制当局の品質システムも変更を計画している。この流れは最近のICHの化学薬品ガイドラインにも反映され、今後の国際的な規制の枠組みもリスクベースのものとなることが強く想定される事を明らかにした。

8) 医薬品品質評価の基準となる日本薬局方の国際化について検討した。薬局方検討会議による薬局方国際調和の最近の動向、調和の現状と課題を明らかにするとともに、薬局方国際調和の結果を反映した日本薬局方の国際化推進のために考慮すべき事項を明らかにした。

## 分担研究者

- 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部長
- 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部長
- 檜山 行雄 国立医薬品食品衛生研究所  
薬品部 第3室長
- 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第1室長
- 新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第3室長
- 内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部 第1室長
- 豊島 聡 医薬品医療機器総合機構  
理事
- 武田 寧 日本公定書協会 専務理事

## 協力研究者

- 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第2室長
- 伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部
- 永田龍二 国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部 主任研究官
- 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部長

## A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテクノロジー等の先端技術をより高度に応用した医薬品の開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開が我が国においても急速に進んでいる。また、これらの新医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、品質、安全性を確保した製品を恒常的に提供する上で不可欠な品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著しい外国での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究を行うものである。今年度は以下の項目について研究を行った。

- 1) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—
- 2) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法に関する研究
- 3) 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望
- 4) 異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のため

の試験法や基準についての国際的動向の研究

5) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus) を用いた癌治療について—

6) リスク管理に基づく製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際的動向

7) 医薬品等の品質・安全性評価

8) 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化

## B. 研究方法

### B. 1 バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—

バイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価に関連する公表論文、米国 FDA の関連文書、EU CPMP の関連文書、米国製薬工業協会 (PhRMA) の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国、および欧州の関連情報、また遺伝子組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見、さらに ICH 文書の関連部分等を参考に、製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価、とりわけ製造工程の変更内容からどのような評価法が適切かについて調査した。

### B. 2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

#### 1) モデル標準糖鎖の調製

市販の糖鎖 Man7/D1、Man7/D3、asialo-triantennary (Tri) (Oxford Glycosystems)、trisialylated triantennary (TriNA<sub>3</sub>)、tetrasialylated tetraantennary (TetraNA<sub>4</sub>) (Dionex Corporation)、に 0.25M NaBH<sub>4</sub>、200 μl を加え、室温で 2 時間反応させて還元した後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Spelco) を用いて脱塩した。

#### 2) ラット脳膜画分の調製

ラット脳 (生後 3 週齢、湿重量約 1.4 g、日本エスエルシーより購入) 1 匹分当たり冷アセトン 40 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて氷冷しながら 1 分間均質化した。遠心分離後 (3000rpm、室温、10 分)、上清を除去し、再度、冷アセトン 30 ml を加え同じ操作を繰り返した。遠心後、クロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v) 40 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて 1 分間均質化後、室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3000rpm、室温、10 分)、上清を除去し、再度、クロロホルム/メタノール混液 40 ml を加え、10 秒間均質化後、室温で 30 分放置した。遠心分離後、沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム、1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.4 (均質化用緩衝液) 30 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて 10 秒間均質化を行った。ラット脳 2 匹分をまとめて遠心分離し (10,000×g、4°C、20 分)、再度沈殿に均

質化用緩衝液を加え(ラット脳、2匹分に対し20 ml)、ポリトロン(1000 rpm)を用いて20秒間均質化後、10% Triton X-114を含む均質化用緩衝液5 mlを加え、4°Cで一晩攪拌し、膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離し(10,000×g、4°C、20分)、上清を37°Cで10分間放置した後、遠心分離し(3000 rpm、30°C、5分)、Triton X-114相と水相に分離した。得られたTriton X-114相に均質化用緩衝液を等容量加え洗浄し、再び37°Cで10分間放置後、遠心分離した(3000 rpm、30°C、5分)。得られたTriton X-114相に冷アセトン(4倍容量加え、-15°Cで一晩放置後、遠心分離し(3000 rpm、4°C、30分)、膜画分を得た。

### 3) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の調製

得られた膜画分(ラット脳2匹分)を50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 に懸濁し、PIPLC (Molecular Probe) 1 unitを加え、37°Cで約18時間消化した。50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 と全溶液の1/4倍容の10% Triton X-114を加え(最終Triton X-114濃度、2%)、0°Cに冷却後、よく攪拌した。反応溶液を37°Cに保温後、遠心分離し(3000 rpm、30°C、5分)、Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114相を除いた後、水相に10% Triton X-114・トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を1/4倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを4倍容加え、-15°Cで一晩放置後、遠心分離し(3000 rpm、4°C、60分)、可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を得た。

### 4) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の SDS-PAGE

可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を2-メルカプトエタノール及びヨードアセトアミドを用いて、還元カルボキシアミドメチル化後、12.5%泳動ゲル(80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDSを含む泳動用緩衝液中20 mAで泳動させた。分離された GPI アンカー型タンパク質は、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen)を用いて検出した。

### 5) GPI アンカー型タンパク質の同定

SDS-PAGEで分離された GPI アンカー型タンパク質の主なバンドを切り取り、約1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルで脱色し、さらに50%アセトニトリルを用いて脱水後、乾燥ゲル片に0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0、50 µl及びトリプシン(質量分析用グレード、Trypsin Gold、Promega) 1 µgを加え、37°Cで一晩ゲル内タンパク質の消化を行った。50%アセトニトリル及び5%トリフルオロ酢酸水溶液(抽出溶液) 300 µlを加え、30分間断続的に超音波照射し、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度、抽出を行った後、抽出液をすべて回収し、減圧濃縮遠心エバポレーター(Speed Vac、Thermo Electron)を用いて濃縮した。そして、以下の条件で、得られたペプチドの LC/MS/MS 分析を行った。データ依存的に得られた MS/MS スペクトルを用いて、検索エンジン Mascot (MatrixScience) 及びデータベース MSDB によりタンパク質同定を行った。

### HPLC :

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)  
カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製、0.2×50 mm、3µ)  
溶離液 A: 0.01%ギ酸を含む2%アセトニトリル水溶液  
溶離液 B: 0.01%ギ酸を含む90%アセトニトリル水溶液  
グラジエントプログラム:  
B液: 5~65% (0~20分)  
流速: 2 µl/min

### MS、MS/MS :

装置: Qstar Pulsar i (Applied Biosystem 社)  
イオン化: nano-ESI  
測定モード: ポジティブイオンモード  
スプレー電圧: 2500V  
スキャン範囲 (m/z):  
Q/Tof-MS: 400-2,000  
MS/MS: 100-2,000  
コリジョンエネルギー: 50-80 eV

### 6) 還元化遊離糖鎖の調製 (Thy-1 のゲル内 PNGase F 消化、遊離糖鎖の抽出、遊離糖鎖の還元)

SDS-PAGE ゲルより Thy-1 を含むバンドを切り取り、約1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片を50%アセトニトリルで脱水した後、50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、及び PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 3 unitを加え、37°Cで一晩消化した。消化後、水300 µlを加え、30分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計3回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、凍結乾燥した。0.25M NaBH<sub>4</sub>、200 µlを加え、室温で2時間反応させた後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Spelco)を用いて還元化糖鎖を精製した。

### 7) 糖鎖の解析、LC/MS/MS

以下の条件で調製した還元化糖鎖の LC/MS/MS 分析を行った。

### HPLC :

装置: Magic 2002 (Michrom BioResource 社)  
カラム: MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製、0.2×50 mm、3µ)  
溶離液 A: 2%アセトニトリルを含む5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)  
溶離液 B: 80%アセトニトリルを含む5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)  
グラジエントプログラム:  
B液: 5~30% (0~60分)  
流速: 2 µl/min

### Liner ITMS-FT ICRMS :

装置: Finnigan LTQ FT™ (Thermo Electron 社)

イオン化：nanoESI  
キャピラリー温度：200℃  
キャピラリー電圧：2.0 kV  
スキャン範囲 (m/z)：700-2,000  
衝突エネルギー：35%  
測定方法：

- ① Full MS scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS<sup>2</sup> (positive ion mode)
- ③ Full MS scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS<sup>2</sup>(negative ion mode)
- ⑤ Data-dependent MS<sup>3</sup>(negative ion mode)
- ⑥ Data-dependent MS<sup>4</sup>(negative ion mode)
- ⑦ Data-dependent MS<sup>5</sup>(negative ion mode)
- ⑧ Data-dependent MS<sup>6</sup>(negative ion mode)

## 8) 略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸

### B. 3 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望

肝幹細胞の由来、肝細胞への分化誘導に関する最近の知見及び肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の現状と展望について、参考文献<sup>(4-17)</sup>を中心に調査した。

### B. 4 異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための試験法や基準についての国際的動向の研究

EMAの「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」<sup>(18)</sup>を中心に調査研究を行った。また、関連する各種基準やガイドライン等<sup>(19-21)</sup>についても調査研究を行い、我が国やFDAとの規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

### B. 5 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—Oncolytic virus (腫瘍溶解性ウイルス)を用いた癌治療について—

腫瘍溶解性ウイルスに関する総説<sup>(22-24)</sup>を中心に、論文、学会発表資料、ウェブ公開資料等を調査し、腫瘍溶解性ウイルスに関する研究の現状と問題点について検討した。

### B. 6 リスク管理に基づく製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際的動向

医薬品規制国際調和会議 (ICH) の品質リスク管理 (Q9) の議論の進捗および Process Analytical Technology (PAT)の進展について検討した。

### B. 7 医薬品等の品質・安全性評価

FDAが2002年8月以降公表した下記の報告書を調査の対象とした。

- ・ The Food and Drug Administration's Strategic Action Plan: Protecting and Advancing America's Health: Responding to New Challenges and Opportunities, August 2003  
➤ <http://www.fda.gov/oc/mcclellan/strategic.h>

tml

- ・ Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century - A Risk-Based Approach: Final Report - Fall 2004  
➤ [http://www.fda.gov/cder/gmp/gmp2004/GMP\\_finalreport2004.htm#\\_Toc84065736](http://www.fda.gov/cder/gmp/gmp2004/GMP_finalreport2004.htm#_Toc84065736)

さらにFDA当局者のICH横浜会合(2004年11月、横浜)におけるFDAの品質規制に係わる方針に関する講演も参考とした。

B. 8 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化  
薬局方検討会議 (Pharmacopoeial Discussion Group, PDG) による薬局方国際調和の最新動向及び日本薬局方のPDGへの対応を調査、整理した。

## C. 研究結果及び考察

### C. 1 バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—

バイオ医薬品は開発に通常10年単位の時間を必要とする。一方、分子生物学、生化学、タンパク質化学、分析化学、細胞生物学領域の技術革新は目覚しく、バイオ医薬品の製造技術においても医薬品開発期間中に様々な新技術が開発、導入される。したがって一度設定した製造方法についても、規制当局から承認を受け市販された後、(あるいは開発期間中においても)製造方法の変更が望まれることが少なくない。しかしながら、製造承認あるいは輸入承認は、当初の製造方法によって製造された製品に関して得られたデータに基づいて評価した結果であり、製造方法の変更後の医薬品の有効性および安全性について保証するものではなく、新しい製法による製品の有効性、安全性を保証する検討が必要と考えられる。とはいえ、製造方法の変更を行った製品の有効性および安全性を評価するために、新薬と同様のデータを求めることは、優れた薬の安定的供給を図る意味からも、また社会的な資源の節約という意味からも合理的とはいえない。また、製造方法の変更はしばしば医薬品の品質の改善に結びつき、安全性の観点からも好ましいケースが少なくないが、変更の際、その影響を評価する上で重要でないデータを求めることは、好ましい製造方法の変更を妨げる要因にもなりうる。そこで現在、これら医薬品の製法変更時の評価法について、検討が求められている。

バイオテクノロジー医薬品のほとんどは有効成分である目的物質において本質的に分子多様性 heterogeneity があり、同一性の定義は難しい。また製造技術が多様であるため、それに応じた不純物、混入物の解析が必要となる。したがって、製造工程の変更が医薬品の安全性、有効性に及ぼす影響を評価するためには、上記の視点から合理的に評価する必要がある。

本項では以上のような現状を踏まえ、この分野の国際的動向を調査し、我が国におけるバイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更の評価法を定めるための基礎資料を提供するために行った。今年度は、ICH-Q5E「生物医薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の製造工程の変更にとりもなう同等性/

同質性評価」国際調和ガイドラインが2004年11月ステップ4に達したことをうけて、ステップ2からステップ4の間になされた変更について概説するとともに、国際調和ガイドライン後において残された課題についてまとめる。

### C.1.1 ICH-Q5E バイオ医薬品の製造方法変更の際の同等性/同質性評価ガイドラインの国際調和までの経過

ICHにおけるバイオ医薬品の同等性/同質性評価ガイドラインについては、2002年2月のブラッセル会議においてコンセプトペーパーが認められ、ICHにおいて正式テーマとして採用された。しかしFDAの体制が十分ではないという理由により、公式な第一回専門家会議が開かれたのは翌年2月の舞浜会議であった。その後ブラッセル(7月)、ワシントン(9月)での専門家会議を経て、大阪で開かれたICH6(12月)でステップ2に達した。その後、各極でパブリックコメントを集めるとともに、2004年6月のワシントンでの専門家会議で、非臨床、臨床の専門家の意見を集約、追加し、2005年11月、横浜で開催された専門家会議でステップ4に達した。ステップ4文書は川西添付資料1の通りである。マーカ一部分がステップ2からステップ4への変更部分である。さらに川西添付資料2はその翻訳である。

昨年度の報告書で、ステップ2に至る過程までの論点をまとめた。そこで、以下にステップ2からステップ4までの論点、変更点をまとめる。

### C.1.2 ICH-Q5E ガイドラインのステップ2からステップ4への合意に至るまでの論点

バイオ医薬品の同等性/同質性評価においては、「まず製品の品質特性の比較を行い、その結果から同等/同質であるか否かについて結論が下せない場合、非臨床、臨床データによる検討を行い、結論を下す」という同等性/同質性評価作業の基本原則については、国際間で合意が得られており、ステップ2文書作成までは、品質分野の専門家によって品質分野のガイドラインとして作成された。その間、ICH運営委員会よりステップ4文書作成までに間に非臨床、臨床の専門家から意見を聞いた上でステップ4文書を完成させるよう、指示が出されたため、ステップ2文書に対するパブリックコメントを集めるのと併行して、非臨床、臨床の専門家からの意見の集約が行われた。以下にステップ4文書における主要な変更点について、(1)主として品質関連部分に関する変更、(2)非臨床、臨床分野の専門家の意見による変更、の2つに大別して記す。

#### (1) 品質関連部分に関する変更

1) 本ガイドラインの適用範囲(ステップ4文書の1.3)

ステップ2文書では、①物質面ではQ6B:規格および試験法ガイドラインの適用範囲と同様、②製造業者は、単一の製造販売業者、ただし製造委託を結び、製造方法に関して十分な情報がえられる業者を含む、③製造工程変更のタイミングとしては、開発段階および

製造販売承認後の変更、とされていた。しかし、3つの条件が“かつ”なのか、“または”なのか明確にすべきとする意見が出され、ステップ4に至る過程で、上記3つのすべてにあてはまる製造工程変更という脚注が追加された。

2) 品質特性の検討結果に関する場合分け(ステップ4文書の1.4)

ステップ2文書では、「品質が同等/同質」という表現と、「製品が同等/同質」という表現との混同など、品質特性の検討結果に関する5つの場合分けの記述が必ずしも明快ではないという指摘がなされた。そこで5つの場合分けの表現を統一した。

3) 製造工程変更の際に品質特性の比較を行うべき製品段階(ステップ4文書の2.1)

同等性/同質性の比較は、変更された製造工程段階の製品の比較ではなく、同等性/同質性評価を行うにもっとも適した製品段階の製品(例えば原薬の製造工程を変更した場合でも、原薬と製剤の両方について比較検討することが妥当な場合もある)の比較検討を行うべきであることを、明確に表現した。

4) 製造工程変更後の製品の特性を評価する上で、比較対照となるロット(ステップ4文書の2.2.2)

製造工程変更にあたって同等性/同質性の検討を行うにあたって、比較の基準として、“主たる臨床試験(pivotal clinical test)で用いたロット”の広範かつ綿密な特性解析が重要であることを明記した。

5) 製造工程変更後の製品から検出された新規不純物および汚染物質(ステップ4文書の2.2.2)

ステップ2文書では、製造工程変更後の製品から新たな不純物が検出された場合、その特性を明らかにすべき、とされていたが、そのようなケースにはまずは不純物を同定することが重要であるので、ステップ4文書では、「可能な限り同定し、特性を明らかにする」とした。また新規汚染物質が検出された場合は、品質、安全性、有効性に影響を及ぼす可能性があるかどうか評価するよう明記した。

6) 製造工程変更後の製品の安定性評価(ステップ4文書の2.2.4)

ステップ2文書では「製造工程変更後の製品については、実保存時間安定性試験が適当」とされていたが、必ずしもあらゆるケースにおいて実保存時間安定性試験が必要ということではないので、「適宜実保存時間安定性試験を開始すべき」と表現を変更した。

#### (2) 非臨床、臨床分野の専門家の意見による変更

1) Q5Eガイドラインの性格について(ステップ4文書の1.1)

本文書は、製造工程変更時の同等性/同質性評価に用いる個別の品質解析、非臨床試験・臨床試験の方法についてまで言及するものではないことを明記した。さらに本文書は、同等性/同質性評価について、品質面からの観点を中心に記述したものであると明記した。

2) 品質において同等といえなくとも、製造工程変更が妥当と判断されるケース(ステップ4文書の1.2脚注)

製造工程変更後に品質特性が同等/同質とはいえな



いケースもあるが、品質、安全性、有効性の観点からより好ましいと判断できるケースもありうる。そのようなケースは、製造工程変更前後の製品は同等/同質とはいえないが、製造工程変更は妥当と判断される場合もありうる。注に付け加えられた。

3) 非臨床試験及び臨床試験に関する留意事項 (ステップ4文書の2.5)

この項全体を再構成し、以下のような項目別にまとめた。

2.5.1 非臨床試験及び臨床試験を計画する際考慮すべき要素

- ・品質に関する知見
- ・製品の種類・特性と知見のレベル
- ・製品に関する既存の非臨床及び臨床データ、臨床使用関連事項、医薬品の種類別

2.5.2 試験の種類

### C.1.3 ICH-Q5E ガイドライン後に残された課題

#### (1) 品質に関わる問題

本文書はバイオ医薬品の製造工程が変更された際の変更前後の製品の同等性/同質性評価法に関する基本的な考え方を示したものであり、特定製品の製造工程変更、あるいは同等性評価に際しての具体的な方法を説明したものではない。したがって、ガイドラインの国際調和作業の過程においても、主に欧州製薬業界から、製造方法変更の種類に応じたデンジョンツリー方式のような同等性/同質性評価作業に関する具体的な記述をするよう、度重なる要求が出された。しかし、(1) 実際の同等性/同質性評価作業は製造工程変更の種類、製品の違いによって異なり、一般化は困難、(2) 欧州の同等性/同質性評価ガイドラインに示されているように、製造工程変更の影響を事前に予測することはできないのでデンジョンツリー方式のような記述は困難、という捉え方が3局の規制当局の共通する認識であったため、本文書は評価作業の原則のみにとどめた。また米国FDAにおいては、同等性/同質性評価の実施とリンクした同等性/同質性評価プロトコル制度の整備を進めているが、この制度は欧州や日本の審査体制では採用は困難である。したがって、同等性/同質性評価作業の詳細についての調和ガイドラインの作成は困難と考えられた。

しかし、品質特性の評価のみで結論がでるケースの場合でも、物質や製法変更をカテゴライズし、個々のケースに関するガイドの作成は、本ガイドラインに従う評価作業を効率的に進める上で望まれるところであろう。この点に関しては、目的物質別の考え方を平成14年度総合報告書に提案したが、わが国におけるモデルになると考えられる。

#### (2) 非臨床、臨床試験を交えた同等性/同質性評価に関わる問題

本ガイドラインは、上に記したようにバイオ医薬品の品質分野の専門家グループによってステップ2文書が作成され、パブリックコメントを集める過程と併行して非臨床、臨床の専門家の参画を得て非臨床、臨床

の立場からのコメントを取り入れ、ステップ4文書を完成させた。その中で、品質特性の比較検討は同等性/同質性評価作業に必要不可欠という認識については、非臨床、臨床の専門家も同意したものの、非臨床、臨床試験による相当な検討が必要な場合も少なくないという認識を示す専門家もいた。筆者が承認審査等で経験している例においても、品質特性の比較がまず重要であるものの、それでは結論を下すには十分ではなく、実験動物あるいはヒトにおける血中動態の比較データが必要と思われる例は少なくない。また適切な臨床マーカーがある場合には、PD試験あるいはPK/PD試験による検討が必要と考えられるケースもある。後者のケースは特に培養工程の変更により糖タンパク質の糖鎖プロファイルに明らかな変化が現れた場合に多い。したがって、もっと踏み込んだQ and Aの作成が近々に求められるものと思われる。

以上の議論はQ5Eの適用範囲から除外された後発品を対象として、同等性/同質性を論じる場合には、必須な課題となって浮かび上がる。Q5Eの議論においては、欧米の規制当局からバイオジェネリックを適用対象から外すように強い要望が出され、同等性/同質性評価を科学としてみれば何ら違いがないことを主張する日本と鋭く対立した。欧米のこの主張は、特に欧州の同等性/同質性ガイドラインが後発品をも適用範囲としているという事実から考えると極めて不思議なことであった。しかし当時、欧州の規制当局内部ではバイオジェネリック第一号の申請を扱っており、その行方が極めて政治性を帯びたものとなっていたことが判明した。今、当時の欧州の主張の背景を理解することはできる。欧州では同等性/同質性ガイドラインの適用範囲として、いわゆる“second manufacturer (後発業者)”が、先発業者の製品と同等/同質を主張して製品を申請した場合、即ちバイオジェネリックもあげており、同等性/同質性評価において非臨床、臨床データが重要なものとなるケースを扱う必要が生じた。そのため、ガイドライン本体と別に、非臨床、臨床に関する補遺を作成したことは、平成14年度川西分担研究報告書に記した通りである。

### C.1.4 バイオジェネリック

#### (1) バイオジェネリック登場の可能性

バイオ医薬品は1982年に米国でヒトインスリンを第一号として認可され、引き続き数多くの製品が認可されている。2001年からは特許切れ製品がでてきており、現在その数が増えつつある(表1)。タンパク質性医薬品の場合、化学薬品のように構造が判れば容易に製造可能という訳ではないので、ジェネリックが続々登場するということになるとは思えない。しかしながら、主として欧米のジェネリックメーカー、あるいはアジア諸国の製薬企業を中心に、バイオジェネリック開発の機運は高まっている。その理由としては、上にも触れたように特許切れの製品が出てきているということがあげられるが、それ以外にもバイオ医薬品の価格は通常高く、先進国における医療費高騰の折、国民経済的にもジェネリック医薬品の活用が議論されていることも大きな要因である。我が国においては、今現

在、具体的な申請の動きはないが、いくつかの製薬企業がその期を伺っているようである。世界的にみると、ヒト成長ホルモンは少なくとも9業者、エリスロポエチンは11、インターフェロンは10、インスリンは少なくとも5業者が後発品の開発を計画しているという情報もある。

実際に申請までに至っているケースとしては、欧州では一昨年サンド社がヒト成長ホルモン製剤の後発品であるオムニトロープの後発品の申請を行い、EMEA（欧州医薬品審査庁）の科学委員会であるCPMPが承認を勧告したにもかかわらず欧州委員会が認めなかったという複雑な動きがあり、今現在も承認の検討が続いているようである。さらにインスリン、エリスロポエチン、長期的には承認切れの抗体医薬も申請予定があるといわれている。

サンド社からは米国FDAへもオムニトロープの申請がなされており、昨年9月までに審査の作業は終了したといわれている。しかし、承認の決定にまではいたっておらず、FDAではまず後発バイオ医薬品（米国ではFollow-on-biologicalsと称する）についてのガイダンスを作成しているようである。そのために、すでに2回にわたって後発品に関する公聴会を兼ねたシンポジウムが開催された。昨年9月の第一回のシンポジウム（川西添付資料3）では、後発メーカーからの主張が行われるとともに、バイオ医薬品の先発メーカーから構成されるBioのメンバーからは、タンパク質性医薬品には略式審査はあり得ないという趣旨の強力なプレゼンテーションが行われており、意見の統一がとれず、ガイダンス作成スケジュールには遅れが生じているようである。しかしながら、第2回のシンポジウムのプログラム（川西添付資料4）で見る限りは、非臨床、臨床データに関して踏み込んだプレゼンテーションがあり、非臨床、臨床を含めたガイダンスを作成しようとする方向にあると思われる。

## （2）バイオジェネリックの同等性／同質性評価

タンパク質性医薬品の場合、化学薬品の後発品のように生物学的同等性以外には非臨床、臨床データは不要というケースは極めてまれと考えられる。インスリンのような単純タンパク質の場合であって、既に構造と活性の関係が詳細に検討され、かつ不純物に至るまで安全性、有効性への影響が品質特性解析で推し量れる場合は、化学薬品のジェネリックと同等の扱いが可能な製品もあろう。しかし、単純タンパク質の場合でさえ、理化学的試験及び生物活性データから臨床効果の予測ができ、さらに類縁物質や不純物のヒトへの影響まで予測可能と考えられる物質は極めて少ない。したがって、とりわけ先発メーカーのように製品の開発データの蓄積のない後発メーカーが、非臨床、臨床データなしに同等性／同質性を示すことは極めて困難なことになる。とはいえ、新薬と同等の非臨床、臨床試験が必要かといえ、必ずしもそうとは思えない。適切な臨床代行メーカーがあるような物質の場合は、このメーカーを指標としてPK/PD試験により同等性評価が可能なケースもありえよう。また製品によっては、規模を下げた臨床試験で同等という結論を下してよい

ものもあろう。

一方、目的物質が糖タンパク質のような製品の場合は、構造的に同一の製品はありえない。そのような場合、新薬に近い臨床データが求められるのは当然と考えられる。また、トランスジェニック動物によって製造されたタンパク質性医薬品のような場合、組換え培養細胞によって製造された先発品との同質性／同等性が主張されようと、目的タンパク質の製造環境が全く違うこと、不純物、混入物質等における配慮が相当に異なること等から判断すると、新薬として扱うことが合理的であろう。またハイブリドーマによって製造される抗体医薬の場合は、例え同一抗原を用いて製造されたとしても、後発メーカーによって製造される抗体は、新薬としての扱いとなるだろう。

欧米におけるバイオジェネリックの同等性／同質性評価における議論の中心は、一つは抗原性の評価であり、もう一つはヒトにおけるPK試験、PD試験、PK/PD試験における同等性評価法、さらには臨床試験における有効性に関する同等性評価法にある。この点については、とりわけわが国においては、議論が遅れている。以上の特に臨床データに関する考え方の整理が今後望まれることである。この点については、国際動向の詳細、およびわが国におけるあり方について来年度まとめる予定である。

## C. 2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

バイオテクノロジー応用技術や再生医学の進歩に伴い、様々なバイオ医薬品や細胞治療用医薬品の開発が進んでいる。バイオ医薬品の本質や細胞治療用医薬品が発現するタンパク質の多くは糖タンパク質である。糖タンパク質の糖鎖部分は、活性等に影響を及ぼすだけでなく、糖鎖抗原として有効性や安全性にも影響を及ぼすことから、糖タンパク質関連医薬品においては、糖鎖部分の恒常性を確保することが重要であると考えられている。しかし、糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法の影響を大きく受けることから、糖タンパク質性医薬品や細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価、及び、昨今の国際的重要課題の一つである製造方法変更時における同等性／同質性評価において、最終産物の糖鎖の恒常性を評価することが必須となっている。そのため、糖タンパク質の糖鎖部分の構造を簡便・迅速に解析する技術の開発が国際的にも強く望まれている。

我々は、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いて、糖タンパク質の糖鎖解析法の開発を行ってきた。これまでに、グラファイトカーボンカラムを用いたLC(GCC-LC)によって糖鎖を分離し、オンラインESI-MSを用いて構造を解析する糖鎖プロファイリング法を開発し、糖タンパク質関連医薬品の特性解析、及び同等性／同質性評価に活用することを検討してきた。昨年度は、安定同位体標識法を取り入れた定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖試験法としての可能性を示した。現在、さらに糖鎖プロファイリング法の改良と、有用性の拡大を目指しているところである。

質量分析計の技術革新は目覚ましく、高度な機器が次々と開発されている。特に近年紹介されたリニアイオントラップ質量分析計とフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計のハイブリッド型質量分析計 (liner ITMS/FT ICRMS) は、高分解能MS測定とデータ依存的な多段階MSの同時分析が可能な機器として注目を集めている。糖鎖解析分野においても、高分解能MSによって正確な単糖組成情報が得られること、また、リニアイオントラップMSを用いたポジティブ及びネガティブ両イオンモードによる多段階MS (MS<sup>n</sup>) によって、糖鎖配列情報が得られる可能性が高いことから、liner ITMS/FT ICRMSは、糖鎖構造解析の強力なツールとして期待されている。

そこで今年度は、liner ITMS/FT ICRMSを用いて、高分解能MS及び測定による、高精密かつよりインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法の開発を検討した。まず、市販の高マンノース型糖鎖、及びシアル酸結合及び非結合複合型糖鎖を糖タンパク質性医薬品のモデル糖鎖として用いて、糖鎖プロファイリングのための条件設定を行った。さらに、細胞組織発現糖タンパク質のモデルとしてラット脳 GPI アンカー型膜タンパク質 Thy-1 を選び、細胞治療用医薬品の特性・品質評価における改良型糖鎖プロファイリング法の可能性を探った。

### C.2.1 モデル糖鎖の GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS

GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMSを用い、研究方法 B.2 の 7) に準じて、中性及び酸性モデル糖鎖 (Man7/D1、Man7/D3、Tri、TriNA<sub>3</sub>、TetraNA<sub>4</sub>、図 1) の一斉分析を行った。図 2A 及び 2B は、FT ICRMS full MS scan で得られた糖鎖プロファイルの 2 次元 (2D、溶出時間対  $m/z$ 、ポジティブ及びネガティブイオンモード) 及び 3 次元 (3D) 表示である。FT ICRMS によって得られた精密質量を基に算出された単糖組成から、15、17、24、33、及び 35 分に溶出された主なピークは、それぞれ、Man7/D1、Man7/D3、TriNA<sub>3</sub> と TetraNA<sub>4</sub> の混合物、TetraNA<sub>4</sub> であることが分かった。

ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける各糖鎖の検出強度を比較すると、中性糖鎖である Man7/D1 及び Man7/D3 はポジティブイオンモードで検出され、ネガティブイオンモードではわずかに検出されるのみであることが分かった。また、酸性糖鎖である TriNA<sub>3</sub> 及び TetraNA<sub>4</sub> は、主要な異性体はポジティブ及びネガティブ両イオンモードで検出されるが、微量の異性体は、ネガティブイオンモードでのみ検出されることが確認された。以上のことから多様な糖鎖を分析する場合、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで分析することが重要であることが明らかとなった。

糖鎖配列は、ポジティブ及びネガティブイオンモードで検出されたイオンの自動的 MS<sup>n</sup> 分析結果を用いて解析した。解析例として図 3A 及び B に、ポジティブイオンモードによる Man7/D1 及び Man7/D3 の MS/MS スペクトルを示す。 $m/z$  457<sup>+</sup> 及び 913<sup>+</sup>、並びに  $m/z$  619<sup>+</sup> 及び 1237<sup>+</sup> は、Man7/D1 のコア構造の  $\alpha$ 1-6 及び  $\alpha$ 1-3 結合 Man 糖鎖が主に解裂することによ

て生じた Man<sub>5</sub>GlcNAcGlcNAcol(Y<sub>3</sub>) 及び Man<sub>5</sub>GlcNAcGlcNAcol(Y<sub>3p</sub>) である。また、 $m/z$  538<sup>+</sup> 及び 1075<sup>+</sup> のイオンは、Man7/D3 の  $\alpha$ 1-6 及び  $\alpha$ 1-3 結合 Man 糖鎖が主に解裂することによって生じた Man<sub>4</sub>GlcNAcGlcNAcol(Y<sub>3</sub>) イオンである。図 3A では、 $m/z$  619<sup>+</sup> 及び 1237<sup>+</sup>、並びに  $m/z$  456<sup>+</sup> 及び 913<sup>+</sup> の相対強度が高く、図 3B では、 $m/z$  538<sup>+</sup> 及び 1075<sup>+</sup> の相対強度が高いことが分かる。これらの結果から、15 分及び 17 分に検出された Man7 は、それぞれ Man7/D1 及び Man7/D3 であると推定できた。このように、MS/MS 分析において、構造に由来する特徴的なフラグメントイオンの強度を比較することによって、異性体を識別できることが分かった。

シアル糖鎖の配列解析にはネガティブイオンモードにおける MS<sup>n</sup> が役立つことが分かった。TetraNA<sub>4</sub> の MS<sup>n</sup> スペクトルを、図 4A (MS<sup>2</sup> スペクトル、ポジティブイオンモード) 及び図 4B (MS<sup>4</sup> スペクトル、ネガティブイオンモード) に示す。ポジティブイオンモードでは、糖鎖に特徴的な B イオン、 $m/z$  454 (B<sub>2x</sub><sup>+</sup>)、657 (B<sub>3x</sub><sup>+</sup>)、1475 (B<sub>4x</sub><sup>+</sup>)、1658 (B<sub>6x</sub><sup>+</sup>)、B/Y イオン、 $m/z$  366 (Man-GlcNAc<sup>+</sup>、Gal-GlcNAc<sup>+</sup>、GlcNAc-Man<sup>+</sup>)、527 (GlcNAc-Man-Man<sup>+</sup>、Gal-GlcNAc-Man<sup>+</sup>、Man-Man-GlcNAc<sup>+</sup>)、819 (B<sub>5</sub>/Y<sub>3x</sub><sup>2+</sup>)、1513 (B<sub>6</sub>/Y<sub>3x</sub><sup>2+</sup>)、1432 (B<sub>6</sub>/Y<sub>5x</sub><sup>2+</sup>)、1330 (B<sub>6</sub>/Y<sub>4x</sub><sup>2+</sup>)、並びに 81<sup>2+</sup> (Gal、Man)、101<sup>2+</sup> (GlcNAc) 及び 146<sup>2+</sup> (NeuAc) 間隔の Y イオンが検出された。これに対してネガティブイオンモードの MS<sup>2</sup> 及び MS<sup>3</sup> ではシアル酸が解離した Y イオンが選択的に検出され、シアル酸の結合数や分子種などの確認に役立つことが分かった。テトラシアル糖鎖の MS<sup>4</sup> では TetraNA<sub>2</sub> に由来する B 及び Y イオンに加え、 $m/z$  470 (C<sub>2x</sub><sup>-</sup>)、1322 (Z<sub>6x</sub><sup>2-</sup>、[Y<sub>6x</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>)、1241 (Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>、[Y<sub>5x</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>) 及び 1057 (Y<sub>5x</sub>/Z<sub>4x</sub><sup>2-</sup>、Y<sub>4x</sub>/Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>、Y<sub>4x</sub>/Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>、Y<sub>5x</sub>/Z<sub>4x</sub><sup>2-</sup>、[Y<sub>4x/5x</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>、[Y<sub>4x/5x</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>) などの C 及び Z イオンや、内部解裂イオン及び環解裂イオンと推定されるイオン等、構造解析に有用なフラグメントイオンが検出され、多くの構造情報が得られることが分かった。

同様に、Tri 及び TriNA<sub>3</sub> の分析においても、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードにおける MS<sup>n</sup> 測定によって、糖鎖解析に有用なフラグメントイオンを検出することができた。

以上のように、LinerITMS-FTICRMS を用いることによって、従来法より精密かつインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。また、この糖鎖プロファイリング法を用いた場合、単糖組成を正確に算出できること、ポジティブ及びネガティブイオンモードの切り替えによる連続自動的 MS<sup>n</sup> 測定によって、一方のイオン化モードではイオン化しにくい糖鎖を見落とすことなく検出し、糖鎖の配列情報が得られることが確認された。そこでつぎに、本分析法を細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の解析に応用することを目的として、ラット脳由来糖タンパク質を用いて、本分析法の有用性を検証した。

### C.2.2 GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS による SDS-PAGE

## で分離された Thy-1 の糖鎖プロファイリング

一般的にある特定のタンパク質は、モノクローナル抗体等を用いたアフィニティークロマトグラフィーを含む数段階の過程を経て精製される。しかし、細胞治療用医薬品においては、目的タンパク質の抗体の入手が困難である場合や、目的タンパク質が極めて微量である場合など、アフィニティー精製が難しいケースが生じることが予想される。そこで、どのような微量タンパク質にも対応できる迅速精製法として、2次元電気泳動が期待されている。本研究では、可溶性 GPI アンカー型タンパク質を細胞発現糖タンパク質のモデルとして、ラット脳より簡単な分画と SDS-PAGE によって分離した後、プロテオミクスの方法を用いて目的タンパク質と同一タンパク質を回収し、糖鎖分析に用いることを検討した。

図5に示すように、SDS-PAGEの結果、ゲル上には複数のタンパク質のバンドが検出された。各バンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化によって得られたペプチドを LC/MS/MS 分析し、タンパク質検索を行った。その結果、20-25 kDa のバンドが目的の Thy-1 と同一とされた。Thy-1 のバンドからゲル内 PNGase F 消化により N-結合型糖鎖を遊離させた後、NaBH<sub>4</sub> で還元し、還元化糖鎖とした。そして、liner ITMS-FT ICRMS を用いて、Thy-1 由来糖鎖のプロファイリングを行った。

図6は、ポジティブ(赤色表示)及びネガティブ(青色表示)イオンモードにおける FT ICRMS full MS scan で得られた糖鎖プロファイルの 2D 表示を重ね合わせたものである。この図から、多種類の N-結合型糖鎖が Thy-1 に結合していることが明らかとなった。また、FT ICRMS によって得られた精密質量より、これらの糖鎖の単糖組成を決定することができた。例えば、モノシアロ糖鎖 a (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub>、理論分子量: 2095.76) と、ジフコシル糖鎖 b (dHex<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub>、理論分子量: 2096.78) のように、NeuAc 1 分子を持つ糖鎖と Fuc 2 分子を持つ糖鎖の場合、分子量差はわずか 1 Da であり、これらの糖鎖が多価イオンで検出されたとき、両者の識別は難しいとされてきた。しかし、高精密かつ高分解能測定が可能である FT ICRMS を用いた場合、図6の挿入図に示すように、これら 2 分子は明確に識別され、容易に単糖組成を決定することができた。その結果、Thy-1 に結合する糖鎖の単糖組成は NeuAc<sub>0-3</sub>dHex<sub>0-3</sub>Hex<sub>3-8</sub>HexNAc<sub>1-5</sub>HexNAcol<sub>1</sub> と決定された。

Thy-1 由来糖鎖の分析においても、ポジティブ、またはネガティブイオンモードのいずれか一方によってのみ検出される糖鎖の存在が確認された。例えば、Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 762<sup>2+</sup>) 及び Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 822<sup>2+</sup>) は、ポジティブイオンモードでのみ検出され、シアル酸を含む NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 1440<sup>2</sup>)、dHex<sub>1</sub>NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 1387<sup>2</sup>) 及び dHex<sub>2</sub>NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 1542<sup>2</sup>) は、ネガティブイオンモードでのみ検出された。これらの結果は、両イオンモードの切り換えによる連

続分析が有用であることを示すものである。

本分析法を用いた糖鎖プロファイリングの結果、ラット脳 Thy-1 には、ハイマンノース型糖鎖(Man5、Man6、Man7 及び Man8)、NeuAc 0-3 分子及び Fuc 0-3 分子を含む多数の複合型及び混成型糖鎖が結合していることが分かった。

## C.2.3 GCC-LC/liner ITMS による Thy-1 の糖鎖配列解析

データ依存的 MS/MS スペクトルから、Thy-1 糖鎖の配列を決定した。図7に、結合位置の異なる 2 分子の Fuc を持つ糖鎖の解析例を、図8に、結合位置の異なる 2 分子の NeuAc を持つ糖鎖の解析例を示す。

図7Aは、ポジティブイオンモードで測定されたフコースを 2 分子有する 2 本鎖型糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 887.37<sup>2+</sup>、24 分) のプロダクトイオンスペクトルである。2つの Fuc の結合可能位置として、非還元末端側 GlcNAc とトリマンノシルコア構造の還元末端側 GlcNAc が候補として考えられた。図7Aでは *m/z* 350 (Fuc-GlcNAc<sup>+</sup>、B<sub>2α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>)、370 (Fuc-GlcNAcol<sup>+</sup>、Y<sub>1α</sub><sup>+</sup>) 及び 512 (Gal-(Fuc-)GlcNAc<sup>+</sup>、B<sub>2α</sub><sup>+</sup>) が検出されていることから、2分子の Fuc は、非還元末端側の GlcNAc とトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった。

Fuc 以外のその他の特徴として、*m/z* 1553 (Z<sub>3γ</sub><sup>+</sup>、[Y<sub>3γ</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) 及び 1570 (Y<sub>3γ</sub><sup>+</sup>) が検出されていることが挙げられる。これらのイオンは、非還元末端側に未置換の HexNAc が結合していることを示唆している。また、*m/z* 938.03 (Y<sub>3α/3β</sub><sup>+</sup>) が検出されたことから、この未置換の HexNAc は、トリマンノシルコア構造の Man 分子に β1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。これらの結果から、還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub> は、図7A中の図に示すような構造であると推定された。

図7Bは、Fuc 2 分子が結合する還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAcol<sub>1</sub> (*m/z* 1069.93<sup>2+</sup>、9 分) のプロダクトイオンスペクトルである。フラグメントイオン、*m/z* 512 (Gal-(Fuc-)GlcNAc<sup>+</sup>、Fuc-Gal-GlcNAc<sup>+</sup>、B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>、B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>)、及び 1915 (B<sub>6</sub><sup>+</sup>) が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc には結合していないことが分かった。また、*m/z* 350 (B<sub>3α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>)、*m/z* 658 (B<sub>3α</sub><sup>+</sup>)、及び *m/z* 1408 (Y<sub>3β/4α</sub><sup>+</sup>) を検出したことから、Fuc 2 分子は、非還元末端側の Gal-GlcNAc 構造に Lewis b/y 構造 (Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc) の様に結合していることが示唆された。さらに、*m/z* 1936 (Y<sub>4α</sub><sup>+</sup>) から非還元末端側に未置換の HexNAc が存在することが示唆され、*m/z* 877 (B<sub>4α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>、B<sub>4α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>)、及び *m/z* 1610 (Y<sub>3β</sub><sup>+</sup>) から、この未置換の HexNAc は、部分構造 Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc の結合するトリマンノシルコア構造の Man に、3 本鎖構造の 1 分岐構造として結合していることが分かった。これらのことから、還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAcol<sub>1</sub> は、図7B中の図に示すような構造であると推定された。

同様に、NeuAc の結合位置をフラグメントイオンか

ら決定することができた。図 8A にジシアロ還元化糖鎖 NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAcol<sub>1</sub> ( $m/z$  1084.92<sup>2+</sup>, 30 分)のプロダクトイオンスペクトルを示す。 $m/z$  453 ( $B_{2x}^+$ )、及び 657 ( $B_{3x}/Y_{5x}^+$ ,  $B_{3x}/Y_{6x}^+$ )と共に、フラグメントイオン、 $m/z$  495 ( $B_{3x}/Y_{6x}^+$ )、948 ( $B_{3x}^+$ )及び 1110 ( $B_{4x}^+$ )が検出されたことから、この糖鎖は、部分構造 NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-を持つことが分かった。さらに、 $m/z$  1799 ( $B_6^+$ )、 $m/z$  370 ( $Y_{1x}^+$ )、及び  $m/z$  1059 ( $Y_{3x}^+$ ,  $Y_{4x/4p}^+$ )が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが明らかとなった(図 8A 中の図)。

図 8B にジシアロ還元化糖鎖 NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAcol<sub>1</sub> ( $m/z$  1186.52<sup>2+</sup>, 42 分)のプロダクトイオンスペクトルを示す。 $m/z$  454 ( $B_{2x}^+$ )、657 ( $B_{3x}^+$ )、及び 819 ( $B_{4x}^+$ )は検出されたが、フラグメントイオン  $m/z$  495 (NeuAc-GlcNAc<sup>+</sup>)、948 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc<sup>+</sup>)、及び 1110 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-Man<sup>+</sup>)は検出されなかったことから、NeuAc 2 分子は、共に 2 本鎖型糖鎖の非還元末端側の Gal に結合していることが示唆された。また、 $m/z$  370 ( $Y_{1x}^+$ )及び 1059 ( $Y_{4x/4p}^+$ )が検出されたことから、Fuc 1 分子は、トリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった(図 8B 中の図)。

以上のように、FTICRMS によって得られた精密質量と、liner ITMS のポジティブ及びネガティブ両イオンモード測定によって得られたプロダクトイオンスペクトルをもとに、Thy-1 に結合する多数の N-結合型糖鎖を明らかにすることができた。ラット脳 Thy-1 の N-結合型糖鎖の構造は、アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質の精製、糖鎖のゲルろ過クロマトグラフィー、エキソグリコシダーゼ消化、及びメチル化分析等によって解析され、bisecting GlcNAc や Lewis a/x 構造を持つシアロ及びアシアロ複合型糖鎖糖鎖、高マンノース型糖鎖(M5, M6)、及びシアロ混成型糖鎖と報告されている。今回、SDS-PAGE による簡単な精製と一度の分析で、Thy-1 には報告されている構造より多様な糖鎖が結合していることを明らかにすることができた。このように、GCC-LC/liner ITMS-FTICRMS を用いた改良型糖鎖プロファイリングは、電気泳動で分離された微量糖タンパク質の糖鎖解析にも役立つことが確認され、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の糖鎖解析にも応用可能であることが示唆された。

### C. 3 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより、それらの細胞が有する機能を利用することによる再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年 4 万人ともいわれ、そのうち 60 歳以下の肝移植適応患者は年間 3,500~5,000 人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。一方、摘出されたドナー肝の約 50%が何らかの理由で肝移植

に用いられず棄却されている。劇症肝炎の年間発症率は約 2,500 例と推定されるが、重大な基礎疾患がなく肝移植の対象となる患者は年間 100 例程度と概算されている。最近、全肝移植までの橋渡しや、肝不全の際の代謝補助や、ある代謝疾患のための全肝移植に置き換わる方法として肝細胞移植が有効であるといわれている。また、宿主の肝細胞死の割合が高い特別な状況においては、移植肝細胞が増殖して置き換わることも期待される。しかし、臓器移植同様、肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかであり、ヒト肝細胞の培養、増殖、凍結保存技術の開発は大きな課題である。そこで急性肝不全や代謝性肝疾患に対して肝細胞移植や人工肝を利用した治療が肝移植に代わる方法として試されている。これらの方法に加え、より高度な肝機能を発揮させるため、組織工学的手法を用いて正常肝に類似した組織を体内あるいは体外で構築し、これを利用することも考えられている。

このような観点において最近注目されているのが肝幹細胞である。肝幹細胞は細胞治療において以下の様な利点を有する。①肝臓に自然に備わっている組織修復のシステムをそのまま模倣できる。②分化の方向性や増殖能がすでに決定されているので腫瘍化の危険性が低い。③増殖能が成熟肝細胞に比べ極めて高い。④正常細胞と同等の機能発現が期待できる。⑤対象者自身の細胞の利用が可能である。

肝幹細胞の存在については半世紀にわたり論争が行われていた。Wilson らは世界で最初に肝幹細胞を仮定した。彼らの仮説は肝臓が肝臓毒により重篤な障害を受けた時、肝臓が再生できるという事実に基づいている。それは広範囲における肝臓疾患が起きると存在する肝細胞は分裂増殖できないため、新しい肝細胞が肝幹細胞より派生するはずであるというものであった。この仮説を強く支持する知見が広範囲における肝臓の発癌研究から得られた。Fausto らは化学発癌物質を動物に投与すると初期の段階において細胞質が乏しく、卵型の核を有する小型の肝細胞が増殖することを明らかにした。その後肝幹細胞に関する研究は大きく進展し、動物及びヒトにおいて肝幹細胞の存在が確認された。その中で代表的なものは肝臓のヘリング管、門脈、胆道系の分岐に位置すると考えられている oval cell と骨髄由来細胞である。本項においては、肝幹細胞に関する最近の知見、及び肝幹細胞を用いた細胞治療などの臨床応用における現状と今後の展望を紹介する。

#### C. 3.1 oval cell

oval cell はエチオニン、2-アセチルアミノフルオレン “2-acetylaminofluorene” (2-AAF)、3-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンなどを用いて肝化学発癌過程を研究中にグリソン鞘周囲に増殖する楕円形(oval)の核をもつ小型の細胞として見出されたことから、この名称が付けられた。oval cell は、肝細胞毒による肝障害、広範囲な肝細胞壊死などによる成熟肝細胞の増殖の著しい阻害及び遅延のような病態が肝臓に起こった時に出現し、小葉内胆管につながった肝細胞索及び胆管を形成する。同様に重篤な実質障害が起きたヒト肝臓病で胆管の増殖がみられる。また、ヒト肝臓の小葉内胆

管においても肝細胞の分化がおきることから、重篤な障害の肝実質で再生する小胆管細胞が新しい肝細胞の幹細胞として機能すると考えられようになった。その考えはstem cell factor “SCF”とその受容体であるc-kit、Bcl-2、cytokeratin (CK) 14を含む幹細胞に特徴的と考えられるマーカーをoval cellが発現するという事実により支持される。oval cellは1種類の細胞ではなく、表現型が異なるヘテロな細胞集団の総称である。oval cellsは乏しい細胞質と卵型の核を有する小型細胞である。それらはコロニーを形成して肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化する能力を有すると考えられている。

### C.3.1.1 oval cellの活性化

動物モデルにおいてoval cellを誘導するうえで最も重要なポイントは肝実質が障害を受けており、その再生能力は肝毒性物質により消失していることである。これら化学物質は小葉内胆管において増殖を最初に誘導する点については同じであるが、その後の肝細胞への分化の程度は大きく異なる。モデル系としてはラットにおけるフラン投与、マウスにおけるディピン投与、2-AAF投与 2/3部分肝切除 “partial hepatectomy” (PH) などがある。また、コリン欠乏エチオニン “choline-deficient ethionine” (CDE)含有食も胆管の増殖を誘導する。他方、アリルアルコールによる門脈周囲の壊死により胆管細胞は増殖するが、胆管構造を形成せず、小型肝細胞に早期に分化する。

このようなアリルアルコールによる胆管細胞の増殖とその他の要因による肝細胞管の増殖を区別することは重要である。増殖は慢性的な肝実質障害において共通に起こり、ハムスターにおいては $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネイト投与により誘導される。その際、胆細管が拡張し、肝細胞索の管腔形成に関与すると考えられている。ヒト肝臓疾患においても、肝細胞小管の増殖に伴い肝細胞索の管腔形成が起きると考えられている。また、増殖の要因が異なると胆管/肝細胞の表現型が発現する場合もある。oval cellの増殖はp21<sup>CIP1/WAF1</sup>トランスジェニックマウス及びLong-Evans Cinnamon (LEC)ラットの肝臓においてもみられる。

oval cell 活性化の典型的なモデルは改変Solt-Farber法であり、ラットに2-AAFを投与後、2/3部分肝切除する。phase 1代謝酵素により2-AAFは毒性を有し増殖を抑制するN-水酸化誘導体に代謝される。胆管細胞及びoval cellは肝細胞と比べるとphase 1のレベルは低く、phase 2のレベルは高い。従って、oval cellは肝細胞と異なり、発癌物質の毒性効果に抵抗性である。上記モデルにおいて、肝細胞よりむしろoval cellが2/3PH後増殖する。詳細な検討によると、<sup>3</sup>Hチミンで標識された細胆管がPH後4時間でみられ、増殖は24時間で起こる。この場合、メチレンジアニリンで胆管系を障害すると、oval cellの増殖が阻害されることから、oval cellが胆管由来であるという可能性が強く示唆される。

oval cellの増殖と2/3PHによる門脈内胆管の増殖は以下のように区別できる。2/3PHによる門脈内胆管の増殖は小葉サイズの肥大化により活性化される可能性がある。oval cellと他の胆管の増殖においては明らか

に形態及び表現型が異なっている。oval cellは胆管領域から放射状に出現し、折れ曲がり分岐した小管として肝実質の中へ深く浸入し、肝細胞のタンパク質を発現する。一方、胆管の結紮により胆汁が滞留し胆管細胞の増殖がおき、その増殖は門脈周囲に限定されるという特徴がある。さらに、2-AAFにより誘導されるoval cellと異なり、増殖性胆管は肝細胞に分化しない。また、アルファフェトプロテイン “alpha-fetoprotein” (AFP)、アルブミンの発現は誘導されず、肝臓において高発現している転写因子を発現しない。成熟ラット肝臓の胆汁うっ滞によってもAFP、SCF、c-kitのような従来のoval cellのマーカーは胆管において発現が誘導されない。しかし、幼若ラットの胆管結紮ではこれらマーカーの発現が上昇する。従って初期の新生児の胆管上皮は成熟時におけるよりも強い可能性を有していることが示される。

改変Solt-Farber法により誘導されるoval cellの初期における増殖反応は小葉胆管に限局されており、小葉胆管においてのみ腫瘍胎児糖タンパク質AFPの発現が起こる。従って、小葉胆管が肝細胞系統へ分化すると考えられる。小葉胆管は肝実質に浸入する際、胆管のCKsだけでなく間葉の中間フィラメントであるビメンチンも発現する。CKsとビメンチンの共発現は多くの癌においてもみられる。これらの発現により上皮系癌細胞が強い浸潤能と転移表現型を獲得すると考えられており、運動能亢進はoval cellの特性でもある。最終的に、胆管oval cellは肝実質に深く進展して胆管の特徴を失い小型肝細胞に分化する。その際、CKsとビメンチンの発現は停止する。

なお、表2にoval cell、肝細胞、胆管上皮細胞に特徴的なマーカーをまとめて示している。

### C.3.1.2 成人ヒト肝臓におけるoval cell

成人ヒト肝臓におけるoval cellの存在部位については統一した見解は得られていない。形態学的な研究によると障害を受けたヒト肝臓において小型肝細胞が存在し、その細胞は門脈、胆管中あるいは胆管周囲に位置していると考えられる。ラットoval cellに特異的なOV-6、c-kit、CD34のようなマーカーを用いた解析から、肝芽腫、肝細胞癌、肝硬変の肝臓においてoval cellが同定された。さらに、二重免疫染色法を用いた解析から、これらの細胞の中には肝細胞と胆管の表現型を共発現するものも見つかっている。しかしながら、oval cellの出現から分化までは複雑なプロセスから成り立っている。従って、これらの研究結果は分化のある特定の時間におけるプロセスのみ示しており、全体を反映していない可能性がある。

### C.3.1.3 oval cellの由来

以上の知見からoval cellの由来は図9に示す肝臓断片のなかで門脈周囲の肝細胞と末端小胆管の間に位置するヘリング管、門脈路、胆道系の枝分かれ部分であるとの可能性が主流を占めている。

### C.3.1.4 oval cellの分離精製

oval cellのマーカーとしてThy-1に着目し、抗

Thy-1FITC 標識抗体とフローサイトメーターによるソーティング(FACS)を用い、95~97%の純度のThy-1+oval cellが得られている。これは今までに報告されている最高の純度である。Thy-1に加えて、これらの細胞は他の oval cell のマーカーである AFP、CK-19、GGT、OC2 及び OV-6 も発現する。

### C. 3. 1. 5 移植した oval cell の肝臓における分化

oval cell を皮下に移植すると、強く凝集し未分化な腫瘍を形成する。他方、肝臓に移植した細胞は悪性の表現系を消失するかあるいは分化する。“Long-Evans Cinnamon” (LEC)ラットから分離した oval cell を LEC/Nagase アルブミン欠損ラットの肝臓に移植するとアルブミンを産生する肝細胞に分化する。遺伝的に改変(レトロウイルスで  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入)した分離 oval cell を *in vivo* に導入すると、肝細胞として機能する。しかしながら、oval cell を肝臓に移植すると胆管癌及び肝癌が生じ、それを遺伝的に改変して移植すると正常肝細胞に分化するという報告もある。

### C. 3. 1. 6 oval cell の分化及び増殖に影響を与える因子

oval cell の増殖に関与する増殖因子は通常の肝再生に関与するものと同じである。しかし、oval cell の増殖分化が起こるには、促進及び抑制に働く増殖因子の精巧でかつ協調的な発現が必要である。その際、増殖因子の発現する時期及び場所も重要となる。また、増殖因子は細胞-細胞、さらには細胞-細胞外マトリックス“extracellular matrix” (ECM)の相互作用にも影響を与える。

#### (1) ノックアウトマウスを用いた解析

Knight らは oval cell の増殖時において腫瘍壊死因子“tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ ) の産生が促進され、oval cell の増殖はタイプ 1 型受容体のノックアウトマウスにおいて顕著に抑制され、タイプ 2 型受容体のノックアウトマウスでは変わらないことを明らかにした。従って、TNF- $\alpha$  タイプ 1 のシグナル伝達が oval cell の自己再生及び増殖において重要な役割を担っていると考えられる。

#### (2) 培養レベルにおける液性因子による調節

副甲状腺ホルモン関連ペプチド“parathyroid hormone related peptide” (PTHrP)は肝臓を含む様々なヒト組織の増殖及び分化に重要であると考えられている。ヒトにおいて、PTHrP は胆管癌だけでなく胆汁うっ滞に伴い増殖する胆管及び再生肝において増殖する胆管に発現する。上皮増殖因子“epidermal growth factor” (EGF)のような増殖因子は培養胆管細胞において短時間で PTHrP を誘導することから、PTHrP はオートクラインの様式で胆管の増殖を促進するのかもしれない。

また、oval cell の分化と増殖は上皮と間質細胞の増殖の場合と同様に様々な増殖因子により協調的に制御されている。その 1 つは類洞周囲細胞において ECM 産

生を促進する TGF- $\beta$  の増殖性胆管における発現である。TGF- $\beta$  は胆管周囲の Ito 細胞でも発現し、オートクライン/パラクラインで作用し、*in vitro* において肝細胞系統の分化に関与する。Ito 細胞は TGF- $\alpha$ 、aFGF、肝細胞増殖因子“hepatocyte growth factor” (HGF)、stem cell factor (SCF)も発現する。oval cell は HGF 以外これら全ての増殖因子及びその受容体を発現する。しかしながら、oval cell はこれらの因子が外から供給されない状態でもオートクラインにより分化できる可能性もある。この可能性は胎児性の oval cell と同等と考えられている培養肝芽細胞は増殖因子のない状態で増殖及び移動できることから支持される。

HGF、SCF、EGF、肝促進因子“hepatocyte stimulating factor” (HSS)は以下に示すような異なった機構で oval cell の増殖を促進する。HGF は *in vitro* において各種胆管上皮細胞の遊走と伸展を促進することから、遊走因子と最初に呼ばれていた。また、HGF は *in vitro* においてヒト胆管上皮細胞及び肝細胞の強力な増殖促進因子であり、特に胎児の組織発達において強力な形態形成因子でもある。従って oval cell の挙動に影響を与える可能性が強い。HGF は oval cell の増殖時において産生が促進され、oval cell の分岐管腔形成は HGF 及び“transforming growth factor- $\alpha$ ” (TGF- $\alpha$ ) により促進される。HGF 及び TGF- $\alpha$  は上皮組織発達過程において胆管形態形成をパラクラインあるいはオートクラインにより促進する。SCF も oval cell の増殖時において発現し、パラクライン及びオートクラインにより oval cell の生存、増殖、運動性を促進する。oval cell を HGF、SCF 共添加で培養すると、増殖が促進される。oval cell の増殖因子である EGF は DNA 合成及び mRNA への転写を促進し、早期に S 期へ移行させることにより細胞周期が短くなる。一方、TGF- $\beta$  は oval cell のアポトーシスを誘導する。興味深いことに、EGF と TGF- $\beta$  共添加で培養すると増殖及びアポトーシスは誘導されないが、細胞遊走及び分化に特徴的な形態が誘導される。また、TGF- $\beta$  は胎児由来肝幹細胞の未発達な胆管への組み込みを誘導する。さらに、HSS は EGF 受容体発現とシグナル伝達を促進することにより、細胞増殖を促進する。2-AAF/PH モデルにおいて、胆管 oval cell で aFGF mRNA が発現する時期は肝細胞へ分化する時期と一致する。

#### (3) feeder layer 及びコンディションメディウムによる調節

肝幹細胞は肝細胞や胆管細胞に分化するだけでなく、例えば腸管上皮細胞のような他の組織の細胞にも分化する。従って、肝幹細胞を細胞治療に用いるならば分化誘導する必要がある。分化を阻害するには通常 feeder layer, コンディションメディウム“conditioned medium” (CM)、分化阻害活性“differentiation inhibitory activity” (DIA)を用いる。feeder layer には初代マウス胚性繊維芽細胞“primary mouse embryonic fibroblasts” (PMET)、バッファローラット肝細胞“buffalo rat liver cell” (BRL)、マウス胚性繊維芽細胞ライン“mouse embryonic fibroblastic lines” (STO)が含まれる。その中で PMET は容易に手に入れ

ることができ、分化の阻害作用が強いため広く用いられている。Feeder layer は FGF を分泌することにより肝幹細胞の増殖を促進し、分化抑制因子である LIF を生成することにより oval cell の分化を抑制する。STO は肝幹細胞の自己複製に必須である微小環境を供給する。肝細胞の CM は分泌された増殖因子を含むため、oval cell の増殖を促進し、DIA を介して分化を抑制する。CM には以下のような利点がある。(1) Feeder layer の干渉を防ぐことにより、高度に精製した oval cell が得られる。(2) 肝幹細胞はマイトマイシン C の影響から回避される。(3) 因子の影響が feeder layer ほど複雑ではない。

#### (4) 薬剤による調節

ブチル酸ナトリウムは DNA 合成を抑制し、肝幹細胞の分化を誘導する。DMSO は非実質細胞の増殖及び繊維芽細胞の過剰増殖を抑制し、肝幹細胞を肝細胞に誘導する。培地に DMSO を添加すると、oval cells が肥大化し、細胞質に富む細胞となる。分化した細胞は集合後クラスターを形成し、肝臓プレート様構造に組み込まれる。DMSO はサイクリン 1 と 18 の発現を促進するとともにサイクリン B1 と D の発現を抑制し、細胞周期の停止を誘導する。免疫組織化学的及びフローサイトメーターを用いた解析によると、分化した細胞のみがアルブミン陽性で CK19 と CK7 は陰性である。この細胞は 2 週間高いレベルでアルブミンを持続的に分泌する。従って、oval cell は DMSO により形態学的及び機能的に成熟肝細胞へ分化する。DMSO による肝幹細胞の分化誘導には Wnt $\beta$ -カテニン系及びファイブロネクチンとラミニンの細胞受容体の発現低下が関与している。

#### (5) 細胞外マトリックスによる調節

ヒト肝臓において増殖性胆管は筋繊維芽細胞と類洞周囲の伊東細胞から構成される活性化された間葉細胞に囲まれている。肝障害に伴い、ヒトの Ito 細胞はデスミンと平滑筋アクチンを発現する筋繊維芽細胞様表現系を示すようになる。同様に、活性化された Ito 細胞は四塩化炭素により障害されたラット肝臓及び oval cell により活性化されたラット肝臓において出現する。

Ito 細胞は 2-AAF/PH モデルにおいて最初に増殖し、その挙動は oval cell と一致する。両細胞は高密度な網様構造の中で重なりあって存在する。肝再生時において Ito 細胞はラット及びヒトの ECM を供給する上で重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、Ito 細胞は ECM に特異的なマトリックスメタロプロテアーゼ "matrix metalloprotease" (MMP) を分泌する。MMP が分泌され肝実質における ECM が分解されると、Ito 細胞が障害を受けた肝実質を移動するための輸送路ができ、oval cell の浸潤が開始されやすくなる。その結果、胆管の増殖、移動、形態形成が促進される。このような反応は Ito 細胞により産生される HGF により促進される。2/3PH 後、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子の早期における上昇に伴い、肝臓 ECM の大規模な再構成が起こる。ヒトの肝再生時において、胆管プレートから移動する未発達な胆管細胞が

MMP を発現することから、oval cell も MMP を発現し ECM を分解する可能性が考えられる。Ito 細胞も再生している肝細胞のクラスターを移動する場合、ラミニンを生成する。その際、肝細胞は内皮細胞の増殖を刺激し、類洞内皮の脈管構造を再構成する。増殖性胆管上皮のなかで Ito 細胞は oval cell が肝細胞に分化後小葉の脈管構造を回復させるだけでなく、肝再生の初期において oval cell の移動を促進させる。

Ito 細胞は細胞移動の初期において oval cell を肝細胞環境から隔離し、肝実質微小環境により誘導される未熟な肝細胞の分化を阻止する。培養 oval cell を同系のラットの肝実質に移植すると肝臓プレート中に素早く生着し、充分成熟した肝細胞の特徴を獲得する。この知見は悪性に形質転換した oval 様細胞の癌化が肝臓微小環境により減少するという知見と一致する。oval cell と間質を構成する要素を緊密に接触させると、門脈間充織に胆管上皮を埋め込んだのと同様な状態が再現される。この接触は分化において重要である。それにより oval cell における胆管様表現型の発現は再生の初期段階において保持され、後期においてはその発現が消失し肝細胞に分化する。oval cell の増殖時に起こる顕著な組織再編成及び遺伝子発現の変化はマトリックスと細胞内接着における変化により影響される可能性が高い。この可能性は肝細胞を ECM タンパク質未添加で培養すると、初期の段階でより未熟な表現系へ分化することから支持される。なお、このような未熟な表現型への分化は ECM タンパク質の添加により抑制される。例えば、肝細胞をタイプ IV コラーゲンと接触するとアルブミン合成は維持されるが、ラミニンに変えると AFP を発現するより未熟な表現型を発現するようになる。このような肝細胞をタイプ IV コラーゲンと接触した場合における肝細胞様表現型の発現は in vivo において限局された肝細胞プレートにおける発現とよく似ている。これに関連し、マトリゲルで肝幹細胞を培養すると胆管上皮細胞に分化誘導され、胆管様構造を形成することも知られている。

### C.3.2 骨髄由来細胞

oval cell の細胞表面マーカーを探索している過程で、そのマーカーは c-kit, CD34, Thy-1 など骨髄の血液幹細胞の表面抗原と共通であることがわかってきた。その後の研究により、骨髄由来の細胞が肝細胞や胆管上皮細胞に分化することが報告された。

#### C.3.2.1 骨髄由来細胞の肝細胞への分化

成熟組織において、局所に存在する幹細胞は同じ細胞系列にのみ分化すると考えられていた。しかしながら、成熟造血幹細胞 "hematopoietic stem cell" (HSC) は他の細胞系列への分化能が極めて高い。分離 HSC は骨格、心筋、内皮及び神経細胞、肺、肝細胞のような上皮を含む全ての組織に分化する。ラットにおいて oval cell/肝細胞は循環骨髄細胞に由来することが最初に証明された。Peterson らは致死量の放射線を照射し、その後 oval cell を活性化するために 2-AAF 及び四塩化炭素により肝臓に障害を与えた雌レシピエントラットに雄骨髄細胞を移植し、その後の運命を調べた。



肝障害後9日目にY染色体陽性のoval cellが検出され、oval cellが肝細胞に分化する13日目にY染色体陽性の肝細胞が検出された。その後、骨髄細胞の肝臓移植に関する知見が全肝臓移植モデルにおいても以下のように得られた。MHCクラスII抗原L21-6陰性のBrown NorwayラットをドナーとしL21-6陽性Lewisラットをレシピエントとして移植を行った。その後の解析を行った結果、移植臓器の胆管はL21-6陰性と陽性の細胞を含んでいた。この知見から胆管上皮の一部は循環骨髄細胞に由来しており、その他はレシピエント由来であることが示された。

移植された骨髄細胞のその後の運命を調べるため、マウスにおいて同様な性ミスマッチ骨髄移植のアプローチがTheiseらにより行われた。その結果、6ヶ月後までは雌の骨髄に由来する肝細胞が雄の正常肝の1-2%存在すること明らかになった。この知見から障害を受けていない正常時の肝再生においても骨髄の寄与が示唆された。この場合、200個のCD34<sup>+</sup>、lin<sup>-</sup>骨髄細胞を用いた場合における肝移植の程度は2,000個の未分画骨髄細胞と同様であったことから、移植した骨髄の中に骨髄に由来しない肝幹細胞が含まれていた可能性は低い。ほぼ同時期に、AlisonらとThiseらはヒトにおいて骨髄由来の肝細胞の存在を示した。それを証明するためには2つのアプローチが用いられた。1つは男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓についてin situハイブリダイゼーションにより、ドナー由来の細胞をY染色体に特異的なDNAプローブにより調べた。2番目に、病気の再発により除去された女性患者の肝臓を移植された男性患者におけるY陽性細胞を調べた。その結果、両方の場合でY染色体陽性肝細胞が検出された。一般的に、ヒト肝臓へのHSCの肝移植の程度は場合によって大きく異なり、肝障害の重症度が高いほど移植の程度は高い。肝臓移植後C型肝炎を再発したレシピエントの肝臓において、肝細胞及び胆管上皮細胞の締める割合は最大40%であった。G-CSFで動員させたCD34<sup>+</sup>幹細胞を用いたその後の研究で男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓においてY染色体陽性細胞は4-7%の割合で肝細胞に分化することも示された。このように、HSCが他の細胞系統に分化するという根拠は男性ドナーから移植を受けた女性レシピエントにおいてY染色体陽性を確認することである。ところが、肝臓のような他の細胞系統への骨髄細胞の分化は既に分化した細胞と骨髄細胞が融合したにすぎないという考えを支持する結果も最近得られている。その結果からは、一方の細胞は他の細胞と融合することが可能であり、その結果得られた4倍対の雑種はレシピエントの表現型を持つことが示唆されている。GFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞をES細胞と混合すると、10<sup>6</sup>個の骨髄細胞当たり2-11個の雑種クローンという非常に少ない割合でES細胞と融合する。その後、これら雑種細胞はES細胞の分化に特徴的な多くの表現型を持つようになる。しかしながら、ハイブリッドの細胞形成頻度はSca<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>分画を用いてもこれ以上増加しない。従って、HSCが肝細胞と融合するとは考えにくい。HSCが肝臓移植に関与する主な骨髄分画であることを考えると、このような低

レベルの融合では代謝肝障害モデルにおいて骨髄由来細胞が広範囲にコロニーを形成している場合、その形成に融合細胞が関与している可能性は低い。また、100,000個のCNS細胞当たり1個という非常に低い頻度の融合がマウスCNS細胞とES細胞の間で報告されている。この場合、得られた融合細胞を未分化胚芽細胞に注入した場合、複数の細胞系統に分化し、肝臓に注入した場合が最も顕著である。従って、ある細胞が他の系統の細胞から分化した細胞であるとするならば、細胞融合による可能性を回避するためにその細胞の遺伝子型を調べる必要があるかもしれない。しかしながら、細胞融合が起きたとしても組織のほとんどは本来倍数体細胞を多数有しており、本稿で扱っている骨髄細胞の肝細胞への分化が融合による可能性は低い。

これに関連し、以下のように男の子を出産した母親の上皮組織を調べた知見は興味深い。分娩前において甲状腺炎の悪化が場合によっては起こるが、それは胎盤から獲得された胎児細胞によるものであり、その細胞は自己免疫疾患と考えられる免疫異常疾患を引き起こす。特筆すべきことは、完全に分化しX及びY染色体両方を有する甲状腺胞状細胞のクラスターを有する女性患者がいることである。もちろん、他方向に分化した細胞は移植ではなく胎児に由来する。しかしながら、胞状細胞はXXXYではない。従って細胞融合はこの現象に関与していない。同様に、女性レシピエントにおいて表皮、肝臓及び腸管細胞に分化した男性ドナーの末梢血球幹細胞の核型をFISHにより調べた結果、1つのX染色体及び1つのY染色体のみ存在することが明らかになった。

障害を受けている肝臓機能の増加を目的とする場合、あるいは単一遺伝子疾患における正常遺伝子及び抗炎症性サイトカインのような治療用遺伝子の運搬を目的する場合、骨髄は極めて有用となる可能性がある。従って、骨髄細胞の機能を調べることは重要である。倍数体の形成は肝細胞の分化と増殖において重要な特徴であることから、肝細胞の倍数体についてY染色体検出の技術を用いて調べることが重要となっている。雌のマウス全身に致死量の放射線を照射後、雄の骨髄を移植すると雌において雄HSC由来の二倍体及び多倍体肝細胞が同定された。また、男性ドナーから骨髄を移植された女性及び女性から同所性肝移植を受けた男性の肝臓生検内において二倍体及び多倍体型のY染色体陽性の肝細胞が同定された。さらに、Y染色体陽性肝細胞は分裂を繰り返しているクローンにおいて頻繁に観察されることから、移植片が生着後、肝臓においてそれに由来する細胞の分裂が示唆された。これらの知見から、骨髄由来肝細胞はマウス及びヒトにおいて多数倍を形成し、正常肝細胞として機能するとともに肝再生にも寄与することも示された。さらに、マウスにおいて以下のように骨髄細胞が代謝性肝臓疾患を治療できることが示された。チロシン同化経路において重要な酵素であるFumarylacetoacetate hydrolase欠損(FAH<sup>-/-</sup>:致死的なチロシン血症タイプ1)はFAH野生型である10<sup>6</sup>個の未分画骨髄細胞により治療できることが生化学的な解析により明らかになった。さらに、2×10<sup>6</sup>個のFAH<sup>-/-</sup>先天性成人雌骨髄細胞により造血が

維持される場合、わずか50個の精製HSC (c-kit high, Thy low, Lin-, Sca-1+)を肝に移植生着するとFAH欠損を治癒できる。骨髄由来細胞が機能を発現することは、雄 dipeptidyl peptidase IV陽性 (DPPIV+)の骨髄が移植された放射線照射 DPPIV-雌ラットで示されている。この場合、胆管表面において DPPIV+肝細胞クラスターの出現が観察される。

ラット肝実質障害のモデルの1つであるアルリアルコール誘導胆管障害において、胆管周囲の増殖性細胞は造血由来である可能性が高い。また、ラットにおいて骨髄由来肝幹細胞“bone marrow-derived hepatocyte stem cell” (BDHSCs)の分画がβ2-ミクログロブリン陰性、Thy-1陽性に基ついで同定されている。BDHSCsと胆汁うっ滞性肝細胞を半透明膜で分離して共培養すると、BDHSCsは肝細胞に分化し、肝細胞と同様な効率でアンモニアを尿素に代謝する。このようなBDHSCsから肝細胞への分化は正常な肝細胞との共培養ではおきない。従って、肝臓の障害は骨髄由来細胞において生着だけでなく、肝臓への分化にも必要と思われる。

### C. 3. 2. 2 HSCの肝臓への生着へ関与する因子

肝臓の障害はHSCが肝臓に生着するうえで刺激になると考えられるが、その促進因子については現在不明である。マウスにおいてはC1q受容体のマウスホモログであるAA4分子がHSCの胎児肝へのホーミングに関与しており、障害を受けた肝臓に対して生着するHSCにこの受容体タンパク質が発現しているものと考えられる。その他、胆管/間質細胞が幹細胞遊走因子“stromal derived factor-1” (SDF-1)を発現し、HSCがその受容体CXCR4を発現する。最近の研究によると、SDF-1が肝臓で生産されて障害を受けた組織に遊離され、その受容体であるCXCR-4陽性骨髄幹細胞は走化性勾配に沿って障害部位に運ばれることも明らかになっている。

### C. 3. 2. 3 HSCの肝細胞への分化に関与する因子

HGFはHSCの肝細胞系への分化を誘導することがin vitroで示されており、骨髄細胞はHGFの受容体が発現している。生体においては肝臓に存在する星細胞がHGFを産生することから、HSCの分化誘導を促進すると考えられる。

## C. 3. 3 その他の肝幹細胞

### C. 3. 3. 1 胚性幹細胞

マウス胚性幹“embryonic stem” (ES)細胞は成熟肝細胞へ分化することが示されている。この場合、肝細胞の分化を誘導するための条件及び分化を調べるマーカーは他の肝幹細胞とは異なっている。また、ES細胞はin vivoにおいても肝細胞へ分化可能であり、細胞を脾臓へ移植すると奇形腫が形成される。さらに、ES細胞由来肝細胞を肝臓に移植すると、肝細胞分化表現型を維持する。しかしながら、特にヒトES細胞は肝幹細胞としてだけでなく他の幹細胞としても細胞治療等に用いる場合、以下のような問題点がある。①ES細胞そのものは移植により奇形腫を形成するが、分化誘

導した細胞でも高いテロメラーゼ活性が保持されていれば腫瘍化の危険性がある。②目的の細胞に分化する細胞のみを選択し、他の細胞に分化する細胞を除去する必要がある、選択した細胞が他の細胞に分化しないという安全性の保証も必要である。③分化した細胞が形態や一部の機能だけでなく、本来の細胞機能を発現するかどうか未知数である。④自家移植を除き免疫学的に拒絶反応を制御する必要がある。特に④に関しては、骨髄移植のようにHLA適合移植を行うか、対象者の体細胞核を移植したES細胞を樹立する方法が理論的には可能であるが、ES細胞の移植細胞ソースとしての魅力を大きく損なうものである。

### C. 3. 3. 2 小型肝細胞

成熟ラットの肝細胞を分離し、無血清DMEMを基本とした培地にビタミンの一種であるニコチンアミドを10mM加え、EGFやHGF、TGF-αなどの増殖因子を添加して培養すると、5~6日目から小型という以外形態的にはまわりの肝細胞と区別がつかない細胞のコロニーが検出されるようになる。この細胞はアルブミン陽性、トランスフェリン陽性、AFP陰性、CK8陽性、CK18陽性など、成熟肝細胞とほぼ同様の表現型をもち、超微細構造的にも肝細胞としての特徴をもっていることから、小型肝細胞と名付けられた。この細胞は増殖能力が非常に旺盛で、1個の細胞が10日間に30個以上に増殖する。小型肝細胞はクローンとして増殖しコロニーがある程度の大きさになると、その一部は大型化・成熟し、中には2核をもつ細胞も出現してくる。しかしながら、コロニーを形成する全ての細胞が成熟化することではなく、小型肝細胞も必ず存在しており、肝幹細胞の特徴をもっているようである。また、この細胞は継代培養も可能である。最近、ヒトの肝臓にもラットと同様に小型肝細胞が存在していることが報告された。

上記小型肝細胞との異同について明らかではないが、レトロロシン/PHの肝臓においては、小型肝細胞のコロニーが出現する。この小型肝細胞は肝細胞へと分化・増殖し、肝部分切除後30日目には肝細胞の90%を占めるようになる。この小型細胞はsmall hepatocyte-like progenitor cellと名付けられている。

### C. 3. 3. 3 胎児肝臓由来肝幹細胞

肝幹細胞の解析系としてin vitroにおけるコロニー形成能を指標として、FACSで分離したマウス胎仔肝臓における様々な細胞画分で増殖能の解析が行われた。その結果、c-kit、CD49f、CD29<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>の細胞画分に、増殖能の高い細胞が高頻度に存在することが明らかになった。この細胞の多分化能について1個の同細胞から派生したコロニーを用いて分化マーカーの発現を検討した結果、肝細胞マーカーと胆管細胞マーカーを発現した細胞の存在が確認された。従ってこの細胞は肝細胞と胆管細胞に分化可能であることが明らかになった。また、この細胞にマーカー遺伝子を導入後脾臓内に移植した結果、肝臓組織や胆管を形成することが明らかになった。

#### C.3.3.4 非実質細胞由来肝幹細胞

成熟ラット肝臓より分離した非実質細胞を低張処理すると、凝集する細胞画分と凝集しない細胞画分に分かれる。その中で凝集しない細胞画分の中に AFP、E-cadherin, アルブミンを発現するが、CK19、 $\alpha$ -平滑筋アクチン、VE-cadherin を発現しない細胞が検出された。さらに、この細胞は培養すると形態的にも機能的にも肝細胞に分化する。

#### C.3.3.5 肝上皮細胞

正常及び発癌物質投与ラットから分離したほとんどの細胞は初代培養においてまもなく死亡し、“liver epithelial cells” (LEC)あるいは“rat liver epithelials” (RLE)細胞と呼ばれる小型の非実質上皮細胞がコロニーとして急速に増殖し、培養細胞において優勢を占める。この細胞は胆管細胞と肝細胞の特徴を共有しており、活性化されたげっ歯類肝臓の oval cell から由来する多くのセルラインとよく似ている。またこれらの細胞は肝臓に分化する。しかし、この細胞の由来や肝臓における存在場所などは不明である。

#### C.3.3.6 膵臓細胞

膵臓と肝臓の間で細胞が出入りすることはないが、膵臓細胞が胎児肝に類似した表現型に分化するということが明らかである。これは Krakowski らによる *in vivo* の実験により示された。彼らはインスリンのプロモーターにより調節される“keratinocyte growth factor” (KGF) を作製した。その結果6ヶ月以内に機能を有する肝細胞がランゲルハウス島に多数出現した。*in vitro* においてデキサメタゾンとオンコスタチン M の組み合わせにより膵外分泌細胞が肝細胞という異なった細胞系統に非常に効率良く分化した。この実験においてプロモデオキウリジン標識を行った結果、膵外分泌細胞の多くはこの過程において増殖しないことが示された。この分化誘導は転写因子である C/EBP $\beta$  の誘導によるものであることが明らかになった。C/EBP $\beta$  は脂肪酸アシル CoA の産生を促進することが知られているが、HNF4 $\alpha$  と結合し、HNF4 $\alpha$  の核への移行を起こす。核に移行された HNF4 $\alpha$  は初期の肝細胞分化に特徴的な AFP 及びトランスレチンのような遺伝子を活性化させる。なお、オンコスタチン M は胎児肝の造血細胞において産生される生理的な肝細胞誘導因子である。

#### C.3.4 肝幹細胞の臨床応用の可能性と将来の展望

今日まで人工肝臓や幹細胞移植に用いる細胞はヒトからの高度に分化した肝細胞、ヒト肝癌セルライン、動物からの肝細胞が主であった。しかし、成人肝細胞を得ることは事実上困難であり、たとえ得られたとしても大量調製ができず必要に応じてすぐに調製することは困難なため、その使用は限られたものであった。一方、胎児肝や小児肝は倫理上の問題がある。ヒト肝癌セルラインはウイルス感染や発癌のリスクがある。動物からの肝細胞はヒト血漿やアルブミン合成の代用はできない。また、種の間で酵素活性が異なり、ウイルス感染のリスクもある。異種組織の免疫拒絶に加え

て異種性移植の倫理上の問題もある。従って、これら3種類の細胞は要求を満たすものではない。しかしながら、ヒト幹細胞は *in vitro* で広範囲に増殖し、肝細胞に分化する。従って、幹細胞を未分化な表現系のまま増殖後十分な量が得られたら、成熟肝細胞の表現型を発現できるように操作し大量の肝細胞を得ることが可能である。このように、肝幹細胞は肝臓疾患の細胞治療、人工肝臓装置、遺伝子治療の担体として必要な肝細胞を無限大に供給することが可能である。図10に肝幹細胞の臨床応用について模式的に示している。

肝幹細胞は成熟肝細胞に比べて以下のような利点がある。(1) 肝幹細胞の提供者の範囲を広げることができる。(2) 移植細胞の容量を少なくできる。(3) 高い増殖能と凍結保存が可能なことから操作が容易である。(4) 肝幹細胞移植は同所性肝移植という利点がある。(5) 移植などにおいて問題となる免疫抑制について、患者自身の肝幹細胞を用いることにより回避できる。(6) 長期間にわたり1つの病気について治療を行える。病気の発症機構について正確な機構を知る必要がない。

#### C.3.4.1 今後の検討課題

肝幹細胞を臨床治療に用いるためには、以下の様な検討課題が残されている。

(1) ヒト肝幹細胞の分離と精製：動物からの肝幹細胞は分離されているが、ヒトから肝幹細胞を分離精製することは困難である。密度勾配遠心及びエリクトリエーション遠心がげっ歯類から oval cell を分離するうえでは有効な方法である。しかしながら、この方法がヒト肝幹細胞の分離に適しているかどうかについては今後検討する必要がある。

(2) 肝幹細胞分化誘導機構の解明：この解明は肝幹細胞を誘導し、解剖学的に肝臓と同等な構造と機能を持つ小葉及び肝臓様組織を形成させることを目的としている。分化誘導機構を明らかにするためには、肝幹細胞の分化及び肝幹細胞と他の細胞の相互作用が自由に操作できるような新しい培養系を構築する必要がある。このような培養系が構築できれば、それを用いて人工肝臓の構築と *ex vivo* 肝臓組織の形成も可能となる。

(3) 肝細胞セルラインの確立：マウスの肝幹細胞と比較すると、ヒト肝幹細胞は培養において増殖が遅く短時間で容易に分化し、その後増殖能を消失する。このように増殖能が低いことから、ヒト肝幹細胞セルラインを増殖させ確立することは現在困難である。この点に関し以下のようなアプローチが試みられている。レトロウイルスにより SV40T 抗原遺伝子を導入すると肝幹細胞が不死化する。この細胞は無限大に *in vitro* で増殖し、アルブミン、CK7、CK19 及び内臓性テロメラーゼを発現する。門脈を介してこの細胞を肝臓に移植すると、腫瘍を形成することなく肝実質に生着する。移植3週間後、この細胞はアルブミンを発現し CK19 を発現しないことから、肝幹細胞は肝細胞に分化したと考えられる。p53 ノックアウトマウスからの肝臓を用いたセルラインの確立も試みられている。p53 が発現しないと細胞は通常の限界を超えて細胞周期が進行し、不死化する。この点に着目し、p53 のノックアウトにより不死化された肝幹細胞セルラインが確立

された。このセルラインは分化の機構を研究するうえでは有用であるが、癌原性の潜在的なリスクがある。また、テロメラーゼ活性を高発現することによりヒト胎児肝細胞を無限大に複製することも可能となっている。このように肝幹細胞セルラインに確立に向けて多くの努力がなされているが、安全でかつ十分な機能を有するものは得られていない。

(4) 肝幹細胞の移植とその臨床適応：これは治療効果の評価と移植の安全性を確かめることを目的としている。その場合、疾患に関連する、ある特定の遺伝子が欠損しているマウスあるいはイヌが肝幹細胞移植を行う上で有用かもしれない。

(5) 肝幹細胞、正常肝細胞、肝癌細胞における遺伝子発現の違いの比較：このような違いが明らかとなれば肝癌の発生機序の解明とその治療に役立つと考えられる。

### C.3.4.2 肝幹細胞を用いた治療戦略

#### (1) 肝細胞移植

肝細胞移植は人工肝臓装置を用いた移植への橋渡し、あるいは全肝臓移植に代わる細胞治療として用いられている。肝幹細胞を用いた細胞治療として臨床的に有用と思われる疾患は原発性肝臓病、肝臓における異常な遺伝子発現あるいはタンパク質産生の欠損による肝臓外の疾患である。内在性の肝臓病としては $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠損血色素症、高脂血症、ポルフィン症、1型チロシン血症、ウイルソン病（銅の蓄積）などの遺伝子異常があげられる。肝臓に起因する肝臓外の病気としては1型 Crigler-Najjar 症候群（ビリルビン抱合活性の欠如）のような代謝欠損、家族性高コレステロール症、家族性アミロイド性多発性神経障害（シュウ酸症）、第IX因子欠損（血友病A）のような凝固欠損などがある。このような患者を対象とした肝細胞移植は比較的少数の報告しかない。肝幹細胞ではないが、肝実質の5%に相当する量の分離肝細胞を Crigler Najjar 症候群の患者に対し門脈を介して肝臓に注入すると、血清ビリルビンの中程度の減少及び胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられる。また、可逆的に不死化した肝細胞にビリルビン-UDP-glucuronosyl transferase (BUGT) 遺伝子を導入後、Gunn ラット (Crigler Najjar 症候群のモデル) に移植すると、胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられる。さらに後天性の肝臓病、特に肝臓毒あるいはウイルス障害による急性肝臓障害について胎児及び成人肝細胞を用いた臨床実験も限定的ではあるが行われている。今後、肝幹細胞の移植効率と治療効果との関係及び治療に適している肝幹細胞の種類についても検討する必要がある。

#### (2) 人工肝臓装置

人工肝臓装置は急性肝臓障害の患者の延命及び移植への橋渡しを目的として臨床的に用いることが可能かもしれない。しかしながら、人工肝臓装置が代謝をはじめとする各種機能を十分に維持するためには大量の細胞が必要となる。一方、人工肝臓装置は急性肝炎の患者に有益であるかもしれない。例えば、ラットにおいて可逆的に不死化した肝細胞を正常肝臓容積の約

5%に相当する量脾臓内に投与すると90%肝切除で短期間は生存する。なお、この切除によりラットは急性肝不全により通常死亡する。また、多くの急性肝不全モデルにおいて異種肝細胞を人工肝臓装置として用いて成功した例もある。一方、慢性肝臓病を有する患者において人工肝臓装置を使用する場合には長期にわたり細胞を補充する必要がある。この場合、肝幹細胞は培養において高い増殖能を長期にわたって保持できることから、肝細胞の大量調製に有用と考えられる。また、人工装置に幹細胞を直接注入すると、患者の血液中に循環しているケモカイン及びサイトカインにより肝幹細胞が肝細胞へより効率よく分化誘導されるかもしれない。会社によっては慢性肝炎の患者から肝幹細胞を分離培養後人工肝臓装置に注入し、肝臓病が治癒するまでの橋渡しとして肝臓の機能を維持することが可能かどうか検討を行っているところもある。

#### (3) 遺伝子治療

肝幹細胞は遺伝子治療の担体として用いることが可能かもしれない。ここで述べる遺伝子治療とは遺伝的に改変を加えた肝幹細胞を直接患者に移植し、各種肝臓病を治癒することを指している。遺伝的な改変とは例えば遺伝的代謝異常のような遺伝子変異を正常に戻すことである。現在、遺伝子治療の問題の1つは、遺伝子改変を加えた成熟肝細胞は増殖及び継代培養が困難という点である。高い増殖能を持つ肝幹細胞は遺伝的改変を加えても継代培養が可能であり、遺伝子治療の大きな障壁を克服できる新しい戦略となりうる。例えば、遺伝的代謝異常において欠損酵素遺伝子を肝臓特異的なアルブミンのプロモーターについで肝幹細胞に遺伝子導入し、この遺伝子導入肝幹細胞を肝臓に移植すると、細胞は安定な集団として肝臓に生着し欠損酵素を生理的なレベルで長期間産生することが可能である。

また、以下の様に非遺伝病の治療にも用いることができる。例えば肝硬変のラットモデル（ジメチルニトロソアミンによる誘導）において骨格筋に HGF 遺伝子を導入すると、肝硬変において病的に顕著な特徴が軽減される。一方、HGF は多くの細胞において増殖因子として作用することから、他の組織に対する影響も懸念される。この点、HGF 遺伝子を導入した骨髄由来肝幹細胞は障害肝を標的として運ばれ、肝臓においてより高濃度の HGF を発現できる。以下に B 型肝炎の遺伝子治療への応用について述べる。現在、世界において3億5千万のヒトが慢性 B 型肝炎に感染しているが、このウイルスは除去できないため持続的な肝細胞破壊がおき、肝硬変及び肝癌を生じる。臨床的には持続的な B 型肝炎感染の治療に IFN- $\alpha$  が用いられており、30%の確率でウイルスが除去される。しかしながら、毒性が強いためその使用量が制限され、低用量でしか用いることができない。このような問題点を克服する試みとして、IFN- $\alpha$  を *ex vivo* で導入した肝幹細胞特に骨髄由来肝幹細胞を肝臓に移植し、遺伝子導入された IFN- $\alpha$  が肝臓で局所的に産生されるならば、副作用を軽減した状態で病態を改善できる。