

体の多くは何らかのアポトーシス効果が確認されている。

3.2 抗イデオタイプ反応を利用した腫瘍関連抗原に対する宿主免疫への感作

イデオタイプとは B 細胞クローンが産生する Ig に発現するクローン特異的抗原性の総称である。腫瘍の治療の立場からは既に 1980 年の当初より、Miller や Levy らによる B 細胞リンパ腫においてリンパ腫表面の免疫グロブリンに対する抗イデオタイプ (Id) 抗体は最も腫瘍特異性の高い治療法として脚光を浴びた。抗体療法による最初の寛解例が、濾胞性リンパ腫に対するマウス抗 Id 抗体で 1981 年に報告されている。現在 B 細胞性腫瘍を産生する患者さん自身の抗 Id タンパク質をワクチンとして投与し、患者に Id 特異的な免疫反応を惹起させ寛解を維持する治療法の開発が進んでいる。

CDC 活性とは、抗体が細胞膜表面上の抗原決定基に特異的に結合して、補体の介助のもとで、その細胞に傷害を与えることを指す。近年、腫瘍細胞表面における補体制御因子 (CD55, CD59) の発現状態や、シグナル伝達にかかわるタンパク質群が集積する、糖脂質とコレステロールに富む細胞膜ドメイン構造である raft に対する標的抗原の集積性が CDC 効果に重要な役割を担っていることが報告され、再び注目を集めている。

3.3 ADCC 活性

IgG, IgE, IgA クラスの抗体の Fc 領域はそれぞれに特異的な Fc 受容体に結合し、Fc 受容体を持つ細胞を活性化したり、抗体の細胞間トランスポートに働く。特に、IgG クラス抗体が T 細胞、NK 細胞、好中球、マクロファージ上の Fc 受容体を介して、これらエフェクター細胞を活性化し、抗体の可変領域が結合した細胞を殺すことを ADCC とよぶ。現在、ADCC は抗体の腫瘍細胞傷害性で最も重要視されている。

抗体の Fc 部分における糖鎖 (フコース) の ADCC 活性における重要性については前述したとおりである。また、患者の免疫グロブリン Fc に対するレセプターサブファミリー (FcγRIIa) 遺伝子多型によりエフェクター細胞と抗 CD20 キメラ抗体の結合親和性に大差がみられ治療効果と ADCC に密接な関係があることが報告された⁴⁹⁾。エフェクター機能の重要性については、Fc レセプターのノックアウト

マウスを用いた研究より、エフェクター機能の一つである ADCC が抗腫瘍効果のキーとなるメカニズムであることが明らかになった⁴⁹⁾。

3.4 抗体と毒素あるいはアイソトープとの conjugate による細胞殺傷作用 (ミサイル療法)

ガン治療の開発過程で考案された手法である。ガンに特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体にガン細胞を殺す抗ガン剤、毒素及びアイソトープを結合させて投与し、抗体がミサイルのようにガン細胞を集中的に攻撃し、ガンに特異的かつ効果的に治療する。細胞膜上分子と結合後インターナリゼーション (細胞内取り込み) されやすい抗体は毒素や抗癌剤を標識し、immunotoxin 療法に用いることができる (Fig. 18)。反対にインターナリゼーションされにくい抗体は、強力な放射化合物を radio-immunoconjugate として用いることができる。なお、インターナリゼーションされにくい抗原の代表であるガングリオシドに対するヒト化抗体の抗腫瘍活性が調べられているが、CDC 及び ADCC 活性による強い抗癌作用が観察されている^{50,51)}。

4. 抗体療法の現状

現在、ヒト型抗体のいくつかは欧米に続き日本でも認可され、その有用性が確立されつつある。また、欧米を中心として様々な腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体やその改変体の臨床試験が進行中であり、その結果が期待される。以下に、欧米で認可され、一部は日本でも認可された代表的な抗体医薬品を紹介する。

4.1 リツキシマブ

1991 年米国 IDEC 社は B リンパ球表面の分化抗原 CD20 に対するマウス型モノクローナル抗体 (IDEC-2B8) を作製した⁵²⁾。その後、IDEC-2B8 の可変部領域とヒト IgG1κ の C 領域とをマウス-ヒトキメラ型 CD20 モノクローナル抗体として遺伝子組換えで合成したのがリツキシマブである⁵²⁾。

1993 年 B 型細胞性非ホジキンリンパ腫治療薬の治療を開始し、1997 年米国 FDA の承認、1998 年欧州医薬品審査庁の承認を得た。現在 57 箇国で承認されている。日本では 1998 年希少疾病医薬品の指定を受け、2001 年 6 月「CD20 陽性の低悪性度又は濾胞性 B 型細胞性非ホジキンリンパ腫」と「マ

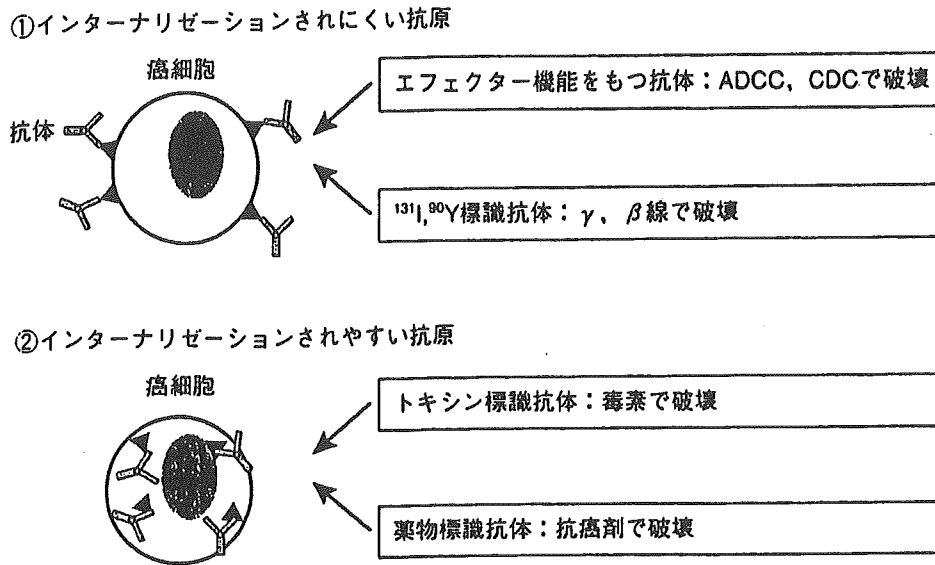


Fig. 18 抗体を用いたミサイル療法
(文献 122 より許可を得て転載)

ントル細胞リンパ腫」の治療薬として承認され、発売となった。

4.1.1 作用機序

悪性リンパ腫は、リンパ節もしくは臓器に腫瘤を形成し、組織学的にはホジキン病と非ホジキンリンパ腫 (NHL) に分類される。頻度は、ホジキン病が 10%、NHL が 90% で、NHL は 50~60 歳代に多い。NHL の発症メカニズムとしては、抗原刺激によって増殖した B 細胞が、何らかの要因によって癌化

して、B 細胞癌になると考えられている。癌化要因として、染色体の転座による Bcl-2 (細胞死誘導抑制) の活性化が挙げられる。

CD20 は Ca チャンネルとして B 細胞の活性化や分化、増殖にかかわっている⁵³⁾。また、様々なチロシンキナーゼと結合しており、細胞内のタンパク質のリン酸化による細胞増殖を調整する経路への関与が考えられている⁵⁴⁾。CD20 は正常 B 細胞及び B 細胞腫瘍の細胞膜に発現している約 35kDa の親水

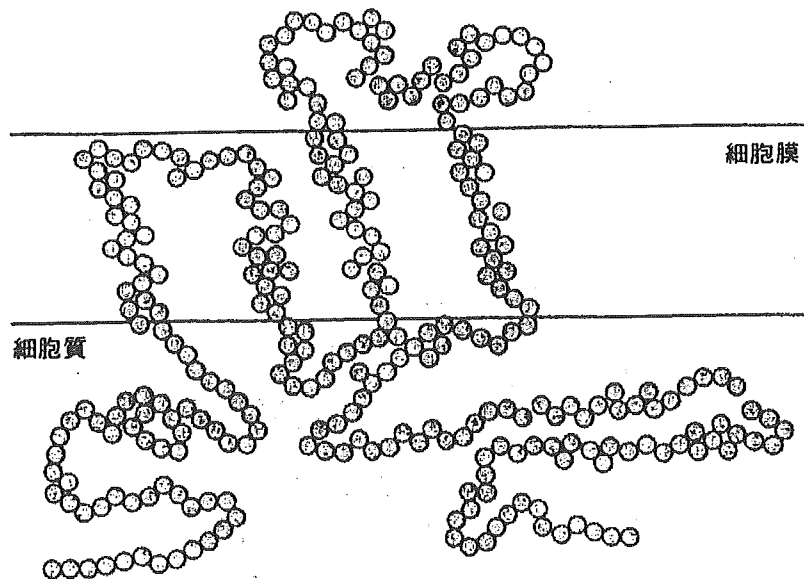


Fig. 19 CD20 抗原の模式図
(文献 133 より許可を得て転載)

性リタンパク質であり、多数の細胞膜貫通ドメインを有する (Fig. 19)。静止期の B 細胞に比べ、活性化された B 細胞では発現量が約 4 倍に増加する。リツキシマブの作用機序として CD20 に結合し、シグナルを入れることにより、これらの経路の阻害作用による細胞周期の停止や Bcl-2 活性の抑制によるアポトーシスの誘導の他、CDC, ADCC を介した経路が考えられている⁵⁵⁾。

4.1.2 腫瘍抑制効果

日本国内における臨床試験において、低悪性度又は濾胞性 B 型細胞性リンパ腫とマントル細胞リンパ腫への単独投与の結果は、奏効率は各々 60.7% と 46.2% と良好な結果である⁵⁶⁾。本剤を再投与した症例の奏効率は、初回より低いが、40% 弱で time to progression (TTP) も少し短縮した⁵⁷⁾。海外における臨床試験において Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Predonisone (CHOP) 療法との併用では、低悪性度及び濾胞性 B 細胞リンパ腫を対象とした第 II 相試験で奏効率 95% (完全寛解 55%)⁵⁸⁾、進行期中悪性度 B 細胞リンパ腫でも、奏効率 94% (完全寛解 61%) と高い有効性を示した⁵⁹⁾。現在、CHOP 単独 vs CHOP+リツキシマブ併用の複数の第 III 相試験が進行中であり、奏効率、event-free survival, overall survival いずれも優位に併用群が良好であるとの結果も得られている⁶⁰⁾。この最終結果によっては、近い将来 NHL の標準的治療が、現在の CHOP 療法から CHOP+リツキシ

マブ併用療法に変更される可能性もある。また、リツキシマブは悪性リンパ腫のみならず、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA), 全身性エリテマトーデス (SLE) などの疾患に対しても臨床試験が行われている。

4.1.3 副作用

初回投与時を中心に点滴中の発熱・悪寒・気管支攣縮などのアナフィラキシー様症状がみられることが多いが、一般に軽微である。

4.1.4 その他

前述のミサイル療法として、抗 CD20 抗体にアイソトープ (それぞれ ^{90}Y , ^{131}I) を結合させた薬剤である ibritumomab, tositumomab (国内未発売) も開発されている⁶¹⁻⁶⁵⁾。抗 CD20 抗体により、これらのアイソトープが腫瘍細胞に集中的に運ばれ、近傍に β 線による抗腫瘍効果をもたらすことが示されている (Fig. 20)。

4.2 トラスツズマブ

この抗体の開発は 1990 年に HER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) 受容体の細胞外領域に親和性を持つマウスモノクローナル抗体 (4D5) 作成が発端となっている。その後、4D5 の抗原結合部位 (約 5%) のアミノ酸配列を、ヒト IgG1 骨格の抗原結合部位に遺伝子組換えで置き換えたヒト化モノクローナル抗体がトラスツズマブであり、アメリカの Genetech 社により開発された⁶⁶⁾。したがって、約 95% はヒト IgG1 が残っているので、

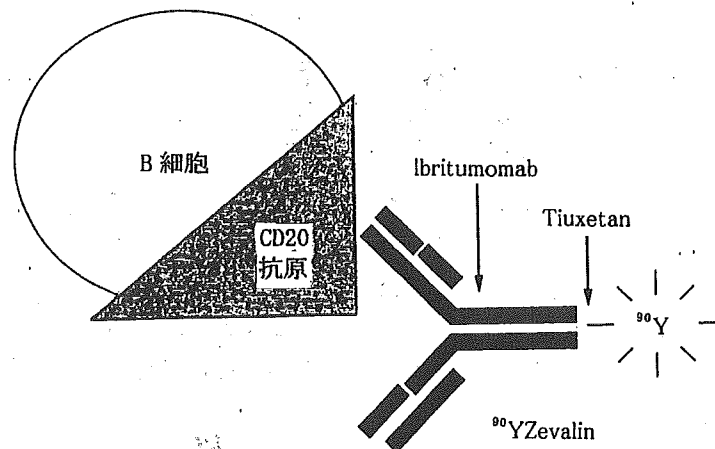


Fig. 20 ^{90}Y を抱合した抗 CD20 放射性元素標識抗体である ibritumomab の模式図

(文献 133 より許可を得て転載)

抗原特異性を保ちながら抗体自体の抗原性を低下させ半減期の延長を意図しているのが本剤の特徴である。1992年より臨床治験を開始して、1998年に米国FDAで乳癌治療薬として認可された。日本では、オーファンドラッグ（希少疾病医薬品）指定を1999年に取り、2001年発売され、抗癌剤との併用で抗癌剤単独の成績と比べて優れた成績をあげており、従来の抗癌剤との併用投与がなされている⁶⁷⁾。

4.2.1 作用機序

Her2 遺伝子は細胞質側にチロシンキナーゼ活性領域を有する膜貫通型タンパク質 (MW: 180 kDa) であり, epidermal growth factor receptor (EGFR), ErbB-3, ErbB-4 とともに EGFR ファミリーを形成する。乳癌, 卵巣癌, 子宮癌など様々な癌において約 30% に Her2 遺伝子の増幅, あるいは mRNA 及びタンパクの発現を認め (Fig. 21), 乳癌患者では Her2/neu 遺伝子の増幅あるいはタンパクの過剰発現を認める患者の予後は不良であると報告されている⁶⁸⁻⁷¹⁾。EGFR ファミリーのうち ErbB-1, ErbB-3, ErbB-4 は New-activating factor (NAF), TGF- α , amphiregulin (AR) などのリガンドと結合してヘテロないしホモ二量体を形成し, ErbB-2 の活性化を促進することが知られている⁷²⁾。Her2 自身には特異的なリガンドは存在せず, その活性化機序として, ①過剰発現, ②ホモ二量体の形成, ③他の ErbB ファミリーとヘテロ二量体を形成し,

それらが複合して多量体化する, などの機構が明らかにされている^{73,74)}。Her2 の活性化によって誘導される細胞内シグナル伝達に関しては, これまでに Grb-2-Shc を介して下流の Ras-Raf-MEK1/2-ERK 経路の活性化を促進すること, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt 経路の活性化を誘導することが知られている^{73,75)}。トラスツズマブは, Her2 に結合して Her2 のダウンレギュレーションを引き起こし, PI3k-Akt-RSK に代表される生存シグナル経路が抑制され, 抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされている⁷⁶⁾。また, トラスツズマブは, Ras-Raf-MEK1/2-ERK に代表される細胞増殖シグナル伝達を阻害し, 細胞増殖抑制に作用することが報告されている^{77,78)}。NK 細胞や単球を作用細胞として ADCC, CDC 活性により癌細胞を殺す活性をもつ。これにより効率的に癌細胞を除去できる。また, *in vitro* の検討ではトラスツズマブ処理により CDKI である p27^{KIP1} と Rb 関連タンパクである p130 の発現を誘導し, S 期細胞を減少させるとの報告がある⁷⁹⁾。最近, Her2 ヒト化抗体が癌の周囲にできる血管新生も阻害することが明らかにされた⁸⁰⁾。

4.2.2 腫瘍抑制効果

海外における治験第II相では, 単独使用で11.6%の腫瘍抑制効果を示し, シスプラチン併用では24.3%に上昇した⁸¹⁾。第III相で, パクリタキセルの

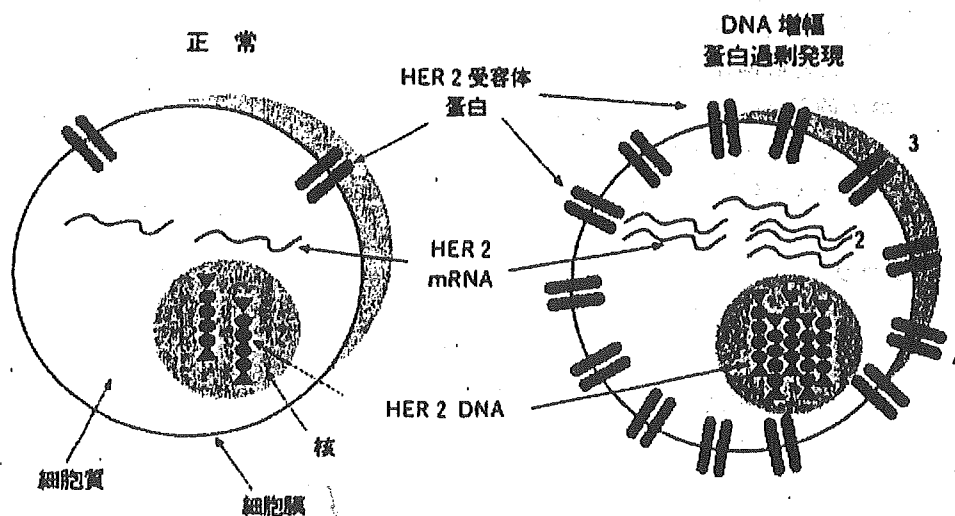


Fig. 21 正常範囲と HER2 過剰発現ガン細胞

1: ↑ gene copy number 2: ↑ mRNA transcription 3: ↑ cell surface receptor expression 4: ↑ release of receptor extracellular domain (文献 134 より許可を得て転載)

併用で41.3%，アントラサイクロン/シクロホスファミド併用で55.9%とそれぞれ抗腫瘍効果が上昇した⁸¹⁾。3種類の効果判定方法で比較したところ、パクリタキセル単独やアントラサイクリンとシクロホスファミドに対しトラスツズマブとの併用と比較すると、本抗体の併用により病勢進行までの期間は、それぞれ2.4倍及び1.3倍以上延長した⁸²⁾。奏効期間では、同様に期間延長効果が2.3倍及び1.4倍以上であった。生存期間と生存率では、1年生存率は1.2倍及び1.1倍であり、生存期間は両者とも1.2倍延長した。また、他の海外における治験第II相においてタキソールとの併用療法で35人中3人が完全寛解、26人が部分寛解で、83%に効果があった⁸³⁾。

なお、トラスツズマブはErbB-2の過剰発現がみられる症例においてのみ有効であり、抗体投与前に責任癌遺伝子であるErbB-2のプロファイリングを行い、治療適応を決定している。

4.2.3 副作用

①うっ血性心不全が発症し、その多くは一般的な心不全に対する治療に反応しているが、死亡例も報告されている。②投与中や投与開始後24時間にinfusion reaction (発熱、悪寒、嘔気、嘔吐、疼痛、頭痛、咳、めまい、発疹、無気力などの反応)が約40%に起きるが⁸⁴⁾、程度は軽度～中等度のものが多い。また、制癌剤との併用により白血球の減少、貧血、下痢、感染などの発現頻度が増加する傾向にあった。特にアントラサイクロン/シクロホスファミドとの併用でそれらの発現頻度が高いが、単独投与でも認められている。更に最近、トラスツズマブ投与に伴う有害事象として、呼吸困難、低血圧、喘鳴、気管支攣縮、頻脈、酸素飽和度の低下、呼吸窮迫が報告された。まれではあるが、死亡例もでており、特に肺転移による安静時呼吸困難を認める患者では注意が必要である。

4.3 インフリキシマブ

インフリキシマブは米国セントコア社により開発された遺伝子組換え型抗TNF- α マウス-ヒトキメラ抗体(cA2)であり、マウス由来25% (抗原認識領域)とヒト由来75% (定常部領域)から構成されている。近年、RAやクローン病などの慢性炎症疾患の炎症病変形成において、TNF- α が中心的な役割を演じていることがわかってきた⁸⁵⁾。そこで、TNF- α の作用を阻害する治療戦略が考えられるよ

うになった(抗TNF- α 療法)。1998年インフリキシマブは米国でクローン病とRA治療薬としてFDAにより承認され、現在欧米など50箇国以上で承認されている。わが国においては2002年クローン病治療薬として承認され、2003年RAについても効能・効果が追加承認された。

4.3.1 作用機序

クローン病は小腸、大腸を中心に原因不明の炎症が持続し、腸管の潰瘍から始まり、狭窄・膿瘍、瘻孔をきたす疾患である。炎症に関与する物質にはTNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8など十数種類が知られている。

また、RAは関節組織での滑膜細胞の異常増殖や滑液の貯留を伴い、最終的には関節における骨破壊を引き起こす関節炎である。その病態形成には、単球・マクロファージや滑膜組織から分泌されたIL-1、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインやIL-8、MIP-1 α 、RANTESのようなケモカイン、プロテアーゼなどが関与している (Fig. 22)。

近年、炎症組織でマクロファージなどから産生されるTNF- α がIL-1 β 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインを産生して「急性期免疫カスケード」を惹起することから、TNF- α を抑えることで下流のサイトカインを抑制できることが明らかになった。

一方、臨床的にはクローン病患者の便中TNF- α の量と疾患活動性が相関しているという報告や腸管局所においてTNF- α を含めた炎症性サイトカインの産生が亢進している等の報告から、クローン病とTNF- α の関連性が示唆された。また、TNF- α はRAを引き起こす炎症性サイトカインのなかで上流に位置すると考えられている。

インフリキシマブは可溶性のTNF- α 、膜結合型細胞表面TNF- α のいずれにも結合能を有し、TNF- α 受容体に結合したTNF- α にも結合することが確認されている (Fig. 23)。したがって可溶性TNF- α の中和による血管内皮細胞の接着分子 (E-selectin, VCAM-1, ICAM-1) 発現のdown-regulateによる、炎症病変形成抑制が考えられる⁸⁶⁾。また、TNF- α 産生細胞の細胞膜上に存在する膜型TNF- α 分子への作用による炎症性サイトカイン産生を抑制する機序も考えられている。またこれら以外にADCC活性及びCDC活性などにより、TNF- α 産生細胞を傷害し、TNF- α の産生自体の低下作

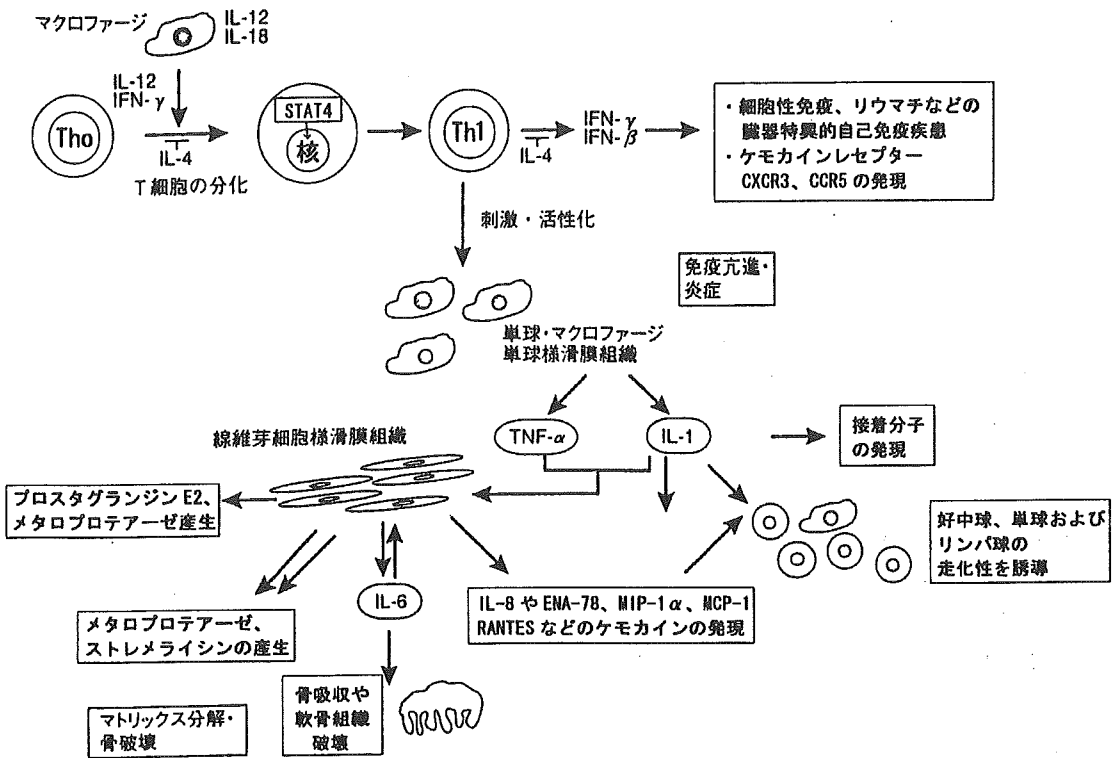


Fig. 22 慢性関節リウマチ発生の機序
(文献 135 より許可を得て転載)

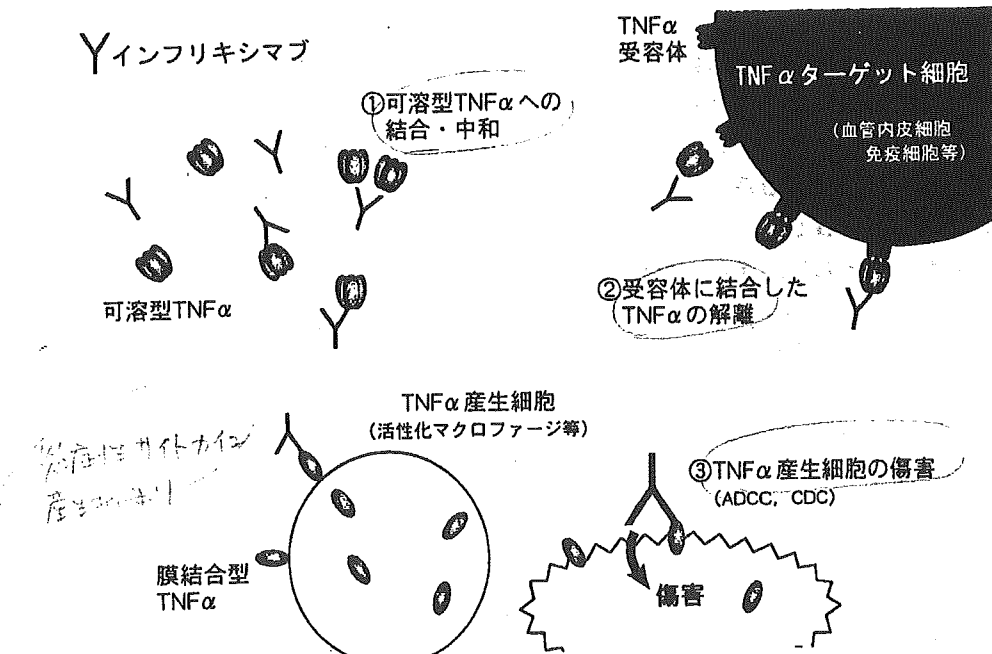


Fig. 23 インフリキシマブの作用機序
(文献 136 より許可を得て転載)

用も考えられる⁸⁷⁾。

4.3.2 治療効果

4.3.2.1 クロウン病への治療効果

クロウン病の三つの評価項目 (CDAI, IBDQ, CRP) で、本剤とプラセボを比較した⁸⁸⁾。①クロウン病活性指数 (CDAI) では、有意の差でプラセボを凌駕したが、量の増加や投与期間による大きな差はあまりなかった。②炎症の指数 (IBDQ) でも、有意の差で効果を示した。③C-反応性タンパク (CRP) でも、充分の効果を示すが、後では少し「戻り現象」が見られた。クロウン病の瘻孔数と瘻孔の閉鎖数で比較しても、充分の効果が得られた。

4.3.2.2 RA への単独治療効果

前化学療法として1~2レジメン施行後に再燃した Her2 過剰発現を認める転移性乳癌患者を対象とした臨床第二相試験において、抗腫瘍効果は完全寛解 (CR) 4%, 部分寛解 (PR) 12%, 奏効率は15%であった。奏効期間の中央値は9.1箇月、生存期間の中央値は13箇月であった⁸⁴⁾。欧州で抗リウマチ薬に抵抗性の難治性慢性関節リウマチを対象とし、単回投与が行われた。インフリキシマブ投与群はプラセボ投与群と比較して Paulus 基準 20%改善率等に関して非常に速やかで有意な改善が認められた^{89,90)}。投与翌日より朝のこわばりと関節痛が軽減し、一週後には CRP の低下と腫脹関節数の減少がみられた。しかし、効果は一過性で、四週後には赤沈、CRP が上昇し、八週目には自覚症状も投与前と同等か、それ以上に悪化する例もみられた。反復投与においては、臨床効果は投与毎に認められ、その効果の減弱は見られなかった⁹¹⁾。また、重篤な副作用も観察されなかったが、再燃までの効果持続時間が、回を重ねる度に短くなっていた。これは反復投与によって生成された抗キメラ抗体によって生成されたキメラ型抗 TNF- α 抗体活性が減弱し、その血中からの消失も早まったためと考えられる。

4.3.4 メトトレキサート併用療法

メトトレキサート (MTX) 療法で効果不十分な症例を対象に、インフリキシマブの併用効果を見る臨床試験が欧米で行われた^{92,93)}。臨床効果の判定にはアメリカリウマチ学会の基準 ACR20%改善率が用いられ、MTX 単独のプラセボ群に比べインフリキシマブ併用群では有意な改善率の向上を示した。日本における臨床試験においても、ほぼ同等な効果

が報告されている⁹⁴⁾。また、1年間後の X 線所見による骨破壊の進行阻止効果でも、ほとんど骨破壊が進行しないことが確認された⁹³⁾。このような効果は MTX による免疫抑制効果によって、中和抗体の産生が抑制されたと解釈されている^{92,93)}。

4.3.5 副作用

投与後1~2時間で起こる急性反応には搔痒感、蕁麻疹などの皮膚症状、胸痛、呼吸困難などの心肺症状があり、それぞれ1%程度ほど報告されている。しかしながら、急性反応の多くは軽微な頭痛・発熱などであり、大部分は投与速度を遅らせるか、投与を一時的に中断することにより、あるいは、抗ヒスタミン薬投与により軽快・回復するため、管理可能であるとされている⁹⁵⁾。2~4年後の再投与反応は、より重篤で、10%ほどに発熱、筋肉痛、関節痛などが出現したと報告されている。これ以外に、重篤な感染症、自己抗体の誘導や SLE 様症状の出現、悪性腫瘍/リンパ増殖性疾患、カリニ肺炎、真菌症などの細胞内寄生感染症が報告されている。特に結核は肺外結核などの重症型も多く、一般人口の6倍程度の発生頻度とされる⁹⁶⁾。これは新たな結核の感染ではなく、既感染、不顕性感染の再活性化による可能性が高い。その理由としては、TNF- α が肉芽腫形成に重要であることが明らかにされていることから、TNF- α 活性を中和することで結核菌の封じ込みができなくなることが結核症の多発に関係していると思われる⁹⁷⁾。既往歴のある患者への投与には注意を要する。

4.4 バシリキシマブ

1986年英国ロイヤルフリーホスピタルにおいて活性化 T 細胞に発現する IL-2 レセプター α 鎖 (CD25) に対するモノクローナル抗体 (RFT-5) 分泌細胞株が樹立された。その後、ノバルティスファーマ社は遺伝子組換え技術を応用して抗体の可変部位のみにマウス由来の抗体を使用しそれ以外の抗体の基本部分はヒト由来としたマウス-ヒトキメラ型 CD25 モノクローナル抗体を作成した。1998年米国及び欧州にて急性免疫拒絶剤として承認された。日本においては2002年承認された。

4.4.1 作用機序

IL-2 は T 細胞及び B 細胞の細胞傷害性を増強し、LAK 細胞を誘導する。腎移植時における免疫拒絶には IL-2 によるこれら細胞の活性化が関与してい

る。バシリキシマブはIL-2レセプター α 鎖に特異的に結合し、IL-2のIL-2レセプターへの結合を阻止し、シグナル伝達をブロックする。実際、2回投与(0, 4日)のみで、IL-2レセプターの発現率を1箇月以上3%以下にブロックする⁹⁸⁾。その結果、免疫細胞の活性化が抑制され、急性拒絶反応の発現率が低下する。

4.4.2 急性拒絶反応抑制効果

成人腎移植患者を対象とし、シクロスポリン及びステロイドに加え、本剤又はプラセボを投与した二重盲検試験において、移植後0~6箇月間に急性拒絶反応(死亡、腎機能廃絶を含む)が認められなかった患者の割合(無発現率)は、本剤投与群で有意に高く($P < 0.01$, Kaplan-Meier (K-M)法推定量の差)、また移植12箇月でも同様に本剤投与群が有意に高かった($P < 0.01$, K-M推定量の差)^{99~101)}。成人腎移植患者を対象とし、シクロスポリン及びステロイド及びアザチオプリンに加え、本剤又はプラセボを投与した二重盲検試験において、移植後6箇月までに急性拒絶反応が認められなかった患者の割合(無発現率)は、本剤投与群で有意に高かった($P < 0.02$, K-M推定量の差)¹⁰²⁾。

4.4.3 副作用

国内臨床試験における主な副作用は、発熱、サイトメガロウイルス感染、鼻咽頭炎であった。外国における第III相臨床試験(シクロスポリン及び副腎皮質ホルモン剤に加え本剤又はプラセボを投与した二重盲検試験)において認められた主な副作用は、尿路感染、ウイルス感染、単純疱疹、肺炎、高カリウム、便秘、発熱であった。

4.5 パリビズマブ

米国メディムューン社で開発された抗RSウイルスポリクローナル抗体RSV-IGIVは、RSウイルスRespiratory Syncytial Virus (RSV)感染による重篤な下気道疾患の予防効果が認められ、1996年に米国FDAより承認を取得した。なお、RSVとはパラミクソウイルス科に属するRNAウイルスで、主に1歳未満の乳児における肺炎や細気管支炎等の下気道疾患の主要な原因ウイルスである。しかしながら、血液製剤であるため感染病原体による汚染の可能性があり、また原料供給不安定による製品不足の可能性があり、点滴静注のため輸液量が多くなること等の問題点があり、使用においては

種々の制限があることが指摘されていた。そこでメディムューン社ではこれらの問題点を解決するため、新しい抗体の開発に着手し、その結果開発されたのが、マウス抗RSウイルスモノクローナル抗体のCDR¹⁰³⁾、並びにヒトIgG1C領域及びFR領域^{104~106)}からなる抗RSヒト化モノクローナル抗体シナジス(一般名:パリビズマブ)である。米国において「RSV感染がハイリスクとなる患児におけるRSVによる重症な下気道疾患の予防」を適応症として1998年に承認された。これまでに、米国及び欧州を含む46箇国で承認を取得し、日本においては2002年に承認された。

4.5.1 作用機序

シナジスはRSVのFタンパクの抗原部位A領域に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。本剤はRSVが宿主細胞に侵入する際に重要な役割を果たすFタンパクに結合してウイルスの感染力を中和し、ウイルスの複製及び増殖を抑制する¹⁰⁷⁾。

4.5.2 RSV感染予防効果

シナジスは海外で実施された第III相二重盲検比較試験において、ハイリスク患児(早産児、気管支異形成症(BPD)を有する児)のRSV感染による入院率をプラセボ群に比べて有意に低下させることが認められた¹⁰⁸⁾。

4.5.3 副作用

海外の第II相及び第III相臨床試験では、主な副作用として注射部位反応、発熱、神経過敏等が認められたが、多くは軽度であり、本剤投与群とプラセボ群との副作用発現率はほぼ同等であった。国内における早産又はBPDの新生児、乳児及び幼児を対象にした第I/II相試験においては、副作用は認められなかった。

4.6 アグリムマブ

アグリムマブは、アボット社により開発されたファージディスプレイライブラリー法を用いて作られた完全ヒト型TNF- α モノクローナル抗体である。抗体クラスはIgG1である^{109,110)}。具体的には、ヒト型抗TNF- α モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをCHO細胞に遺伝子導入し、無血清培地で培養することにより本抗体を得ている。RAに対して2002年12月に米国で認可された。現在、わが国では臨床第II相試験

が行われている。作用機序、効能、副作用については抗ヒト TNF- α ヒト化抗体であるインフリキシマブと同様である^{111,112)}。しかし、本抗体が完全ヒト型であり、しかも皮下注射であることから、インフリキシマブと比較すると、アナフィラキシーをはじめとする投与時反応 (infusion reaction) が起こる頻度はきわめて低い。

4.7 マイロターゲット

マイロターゲットはセロテック社により開発されたヒト化抗 CD33 抗体 (IgG4, κ) に N-acetyl-gamma calicheamicin demethyl hydrazide (Nac- γ calicheamicin DMH) をリンカーを介して結合させた抗体療法剤である。2000 年に米国において急性骨髄性リンパ性白血病を適応症として認可された。現在日本では承認申請中である。

4.7.1 作用機序

CD33 抗原は 67 kDa の糖タンパク質である。シアル酸依存性の接着タンパク質としての機能を有していると考えられるが、詳細な機能は解明されていない。顆粒球系、単球系と巨核球前駆細胞に発現を認めるが、正常な多機能性幹細胞、リンパ系細胞及び非造血組織には発現が認められない。AML 症

例の 90% 以上に発現しており、発現量は 10,000~20,000 コピー/細胞である。また、CD33 には、抗体が結合すると速やかに細胞内にインターナライズされるという特徴がある^{113~115)}。ヒト化抗 CD33 抗体に結合させる calicheamicin は米国 Lederle 社により土壌菌である *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* から単離された抗腫瘍性抗生物質である。したがって、マイロターゲットの抗体部分が白血病細胞の CD33 と結合すると、細胞内に取り込まれ、白血病細胞のライソゾームの消化酵素によって抗癌効果を持った calicheamicin 部分が遊離される (Fig. 24)。その際 calicheamicin は活性なラジカル体となって DNA と結合し、これを切断し、ADCC 活性を発揮する。また、ヒト化抗 CD33 抗体においても細胞傷害作用が認められ、それは CDC や ADCC 活性によることが明らかになっている¹¹⁶⁾。

4.7.2 急性白血病治療効果

CD33 陽性急性骨髄性白血病の初回再燃症例について、マイロターゲットは 2 回投与され、2 回目投与の後 28 日間経過観察が行われた¹¹⁷⁾。なお、投与前に副作用を軽減する目的でアセトアミノフェンとジフェンヒドラミンが内服された。末梢血から白血病細

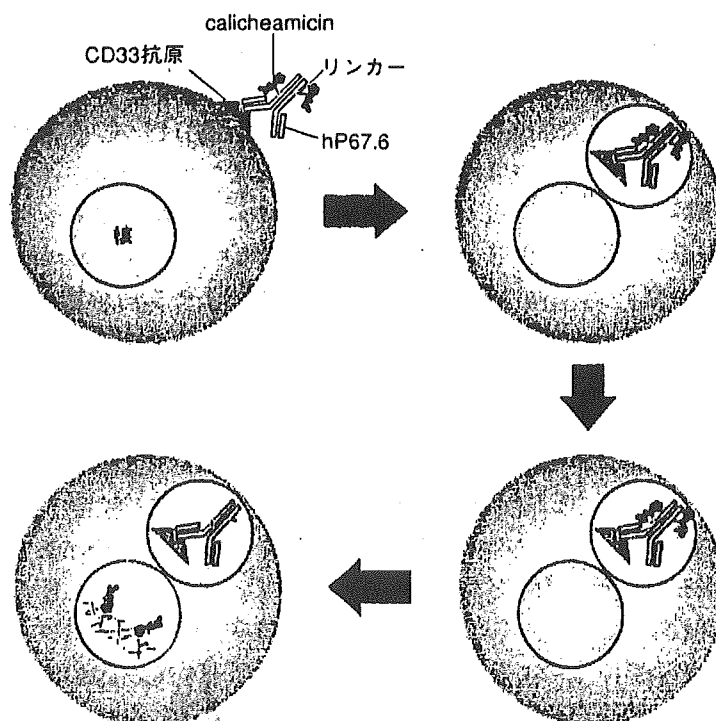


Fig. 24 マイロターゲットの細胞傷害活性発現機序 (ワイス社より提供)

胞（プラスト）が消失する完全寛解したのは約30%で、再燃までの平均期間は60日であった。平均生存期間は5.9箇月で、約40%は臨床試験の期間中生存した。

4.7.3 副作用

急性の副作用として悪寒、発熱、吐気、頭痛、血圧低下、血圧上昇、低酸素血症、呼吸困難、血糖上昇が発症した。骨髄抑制としてGrade 3-4の好中球減少、Grade 3-4の血小板減少、Grade 3-4の貧血が発症した。日和見感染を含めてGrade 3-4の感染症が発症した。また、口内炎や胃炎、Grade 3-4の出血が発症した。肝機能障害も認められたが、多くの場合一過性で回復した。

5. 抗体医薬品の今後の課題

以上述べてきたように、抗体療法は大きな発展をとげ、幾つかについては承認され、開発中のものは多数存在する。しかしながら、今後克服すべき点として以下のような問題が残されている。

5.1 組織移行

抗体は静脈内投与後の血中半減期が通常1~2週間と長く、持続性薬剤として使える利点がある。しかし、抗体は分子量10万を超える巨大タンパク質であるため、血中から組織への移行性が非常に悪い。これが患者に大量投与しなければいけない原因となっている。その解決策としてファージディスプレイなどの方法を用いて分子のサイズを小さくし、移行性を増大することが考えられ現在盛んに試みがなされている。しかしながら、低分子化により、エフェクター機能は失われ、抗体本来の長所である長い血中半減期やシンプルな代謝・排出の機構は失われる可能性がある。両者の特徴をどのように両立させていくか、ケースバイケースの対応も含め今後検討していく必要がある。

5.2 細胞内移行

現状の抗体医薬の標的分子は、血清中の可溶性タンパク質若しくは細胞表面のタンパク質である。しかし、ゲノム解析によって明らかになっている疾患関連標的遺伝子産物には、むしろシグナル伝達タンパク質や転写因子など、細胞内タンパク質が多く含まれる。その意味では細胞内抗体も、新しい抗体医薬品の開発領域として今後重要になってくると考えられる。遺伝子治療に使われるウイルスベクターや

リポソームを用いれば、細胞内タンパク質に対する抗体遺伝子あるいは抗体そのものを細胞内に送り込み、関連する遺伝子を機能的にノックアウトすることでガンやエイズなどの感染症の治療にも応用できる。

5.3 他の治療法と併用

前述のように、いくつかの抗体の臨床的有用性が確実に確かめられつつある。今後の大きな臨床的課題は、抗体と他の治療法との併用において、抗体利用の効果を最も高めうる治療法の開発であり、またそれによって特に癌患者においては生存率及び生存期間が本当に改善されるのかを検証することである。

5.4 抗原分子の機能性

キメラ抗体やヒト化抗体の臨床試験が欧米を中心として進むにつれて、認識する抗原の重要性がクローズアップされてきた。癌治療を例にとると、抗原それ自身が癌細胞の増殖に関与する機能性分子（HER2, EGF-R, VEGF など）と機能を持たない分子（17-1A, CEA, CD52, CD33, CD20 など）に分類される。抗体医薬の歴史を振り返ると非機能性分子から機能性分子にトレンドが移りつつあるのがわかる。これは抗HER-2抗体や抗EGFレセプター抗体などの機能性分子を認識する抗体の治療効果が注目されていることと密接に関連している。レセプターとリガンドの結合を阻害する抗体は、レセプターが伝えるシグナルを阻害し、結果的に癌細胞の増殖を抑制する効果が期待できる。前述したように、抗機能性分子抗体と抗癌剤化学療法において、顕著な相乗効果が出ているものもある。しかし、このような機能性分子が正常細胞でも重要な働きをしている場合は副作用にもつながるので注意が必要である。例えば正常血管内皮細胞に働く成長因子の場合は、出血などの副作用の危険性がある。やや注目度が落ちた非機能性抗原ではあるが、昨今のゲノムプロジェクトとポストゲノム研究から見出される新規遺伝子に非機能性抗原が多く含まれている。これらを抗体医薬の標的としてどう役立てるかも今後の課題になるであろう。

5.5 作用機序の解明

前述した抗体医薬品においてはその作用機序がかなり明らかになっているが、その詳細な作用機序が不明の抗体も多い。抗体の作用機序としてはCDC及びADCC活性などの可能性が示唆されているが、

当然のことながら、抗体ごとで作用機序が異なることも考えられる。更に、抗体がこのような宿主の免疫機序によって細胞傷害性を発揮する可能性とともに、標的細胞表面分子に抗体が結合した結果、標的分子の下流に存在している分子群の機能的変化が起これ、その結果、癌細胞においては細胞周期の変化、増殖の変化、またアポトーシスなどが誘導される可能性も示唆されている。このような点は今後更なる新しい抗体を模索するうえで考慮すべき点である。

5.6 第二世代の抗体医薬品の開発

第二世代の抗体医薬品として抗体自身に変化や修飾を加え治療効果を高めた抗体があげられる。前述のように、抗 CD20 抗体に放射性分子を、抗 CD33 抗体に抗癌剤をコンジュゲートしたものは第二世代抗体といえる。前者については放射性分子の取り扱いに難点がある。後者については、同様の発想で、これに続いた複数の薬剤コンジュゲート抗体の臨床試験も進められているが、問題点としては抗体の単独療法に比べて強い副作用の懸念があることである。今後の課題としては薬剤の選択と抗体と薬剤を結合するリンカーの設計がポイントとなるであろう。新しい流れとしては、抗体のもつエフェクター機能を高めるためにマクロファージ、NK 細胞、T 細胞などを活性化するサイトカインやケモカインを結合させた融合抗体が注目されている。実際、IL-2、IL-12、GM-CSF、TNF、などとの融合抗体が研究されている¹¹⁸⁻¹²¹⁾。抗体単独に比べ、少量で効果が得られることが期待されるが、投与量を増やしたときの副作用や血中半減期などにも注意して開発する必要があるだろう。

5.7 コスト

経済面の観点では抗体の生産をより安価にすることも重要な課題である。一般に抗体医薬品の投与量は数 mg~数百 mg にまで及んでいる。そして年間使用にかかるコストは膨大なものとなっている。細胞株の改変など工夫がなされているが、現在の細胞培養系で大幅なコストダウンを図ることは限界にきているといっても過言ではない。このような問題点を解決するため、前述のように HAC 牛、ヤギや植物にヒト抗体を生産する技術^{37,38)}、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術³⁹⁾なども開発されている (Table 4)。そのほか、様々な企業が大腸菌、酵母、タバコやトウモロコシなど植物を利用した抗

体産生技術を開発している。今後適応すべき抗体の種類を見極めて応用を図ることが重要である。また、植物や動物を生産系として用いる場合は安全性、信頼性の観点に留意して可否を判断することはいうまでもない。

5.8 トランスレーショナルリサーチ

現在臨床応用がなされている抗体医薬の成功には抗体改良、*in vitro* あるいは動物実験という莫大な基礎研究の取り組みが不可欠であった。一方では基礎研究で興味深い研究であっても、ヒトへの応用を通じて治療に応用できなければ、あくまで基礎研究で終わってしまう。臨床応用につながるシーズを基礎研究から得て、それを臨床応用につなげるトランスレーショナルリサーチが特に抗体治療薬の開発には不可欠であり、今後そのあり方を模索していく必要がある。

おわりに

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体作成技術が開発された後四半世紀を経た現在、遺伝子工学的手法の発展により、ようやくモノクローナル抗体を用いた抗体療法の有用性は確立しつつある。特にガンにおいては抗体療法がきわめて有用な治療の一つとして確立されることは間違いないと考えられる。

ヒトゲノム配列がすべて明らかになり、新規な遺伝子の機能が続々と解明される時代になり、抗体のターゲットとなる遺伝子も急速に増加しつつある。また、抗体医薬の標的として既知の抗原も含めより有効性の高い治療のターゲットとなりうるものを見つけ出す手法として、マイクロアレイなどを用いた遺伝子発現プロファイルの解析やプロテオーム解析などが発展してきており、従来に比べより大規模に網羅することが可能となっている。今後更に進化するであろう免疫学、分子生物学、遺伝子工学的手法を用いた創薬研究により、標的細胞に対する高い生物学的活性と特異性を持つ治療薬としての抗体が得られることを期待する。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品医療技術リスク評価研究事業 (H 15-リスク-039) として実施されたものである。

文 献

- 1) 子安重夫：免疫学はおもしろい，羊土社刊，1997.
- 2) Kohler, G., Milstein.: *Nature*, **256**(5517), 495-497 (1975).
- 3) Morrison, S. L., Oi, V. T.: Chimeric immunoglobulin genes, "Immunoglobulin genes", Honjo, T. *et al.*, p.260 Academic Press, London (1989).
- 4) Roguska, M. A., Pederson, J. T., Keddy, C. A., Henry, A. H., Searle, S. J., Lambert, J. M., Goldmacher, V. S., Blattler, W. A., Rees, A. R., Guild, B. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**(3), 969-973 (1994).
- 5) Foote, J., Winter, G.: *J. Mol. Biol.*, **224**(2), 487-499 (1992).
- 6) Martin, A. C., Cheetham, J. C., Rees, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**(23), 9268-9272 (1989).
- 7) Chu, L., Robinson D. K.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**(2), 180-187 (2001).
- 8) Smith, G. P.: *Science*, **228**(4705), 1315-1317 (1985).
- 9) Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R.: *Ann. Rev. Immunol.*, **12**, 433-455 (1994).
- 10) Burton, D. R., Barbas, C. F. 3rd.: *Adv. Immunol.*, **57**, 191-280 (1994).
- 11) Hoogenboom, H. R., Chames, P.: *Immunol. Today*, **21**(8), 371-378 (2000).
- 12) Arai, M., Imai, T., Yuguchi, M., Nakashima, T.: *Thromb. Haemost.*, **82**, 238a (1999).
- 13) Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G.: *J. Mol. Biol.*, **222**(3), 581-597 (1991).
- 14) Hashiguchi, S., Nakashima, T., Nitani, A., Yoshihara, T., Yoshinaga, K., Ito, Y., Maeda, Y., Sugimura, K.: *J. Biochem.*, **133**(1), 43-49 (2003).
- 15) Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J. *et al.*: *EMBO J.*, **13**(14), 3245-3260 (1990).
- 16) Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., Virnekas, B.: *J. Mol. Biol.*, **296**(1), 57-86 (2000).
- 17) Bruggemann, M., Neuberger, M. S.: *Immunol. Today*, **17**(8), 391-397 (1996).
- 18) Fishwild, D. M., O'Donnel, S. L., Bengoechea, T., Hudson, D. V., Harding, F., Bernhard, S. L., Jones, D., Kay, R. M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Lonberg, N.: *Nat. Biotechnol.*, **14**(7), 845-851 (1996).
- 19) Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., Ishida, I.: *Nature Genet.*, **16**(2), 133-143 (1997).
- 20) Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(2), 722-727 (2000).
- 21) Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C.M., Abderahim, H., Kirschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. H., Fukushima, A., Hales, J. F., Klapholz, S., Finer, M. H., Davis, C.G., Zsebo, K. M., Jakobovits, A.: *Nature Genet.*, **15**(2), 146-156 (1997).
- 22) Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., Umehashi, M., Maeda, H., Nozaki, C., Halk, E., Lonberg, N.: *Cloning Stem Cells*, **4**(1), 91-102 (2002).
- 23) Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Kuroiwa, Y.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **19**, 73-82 (2002).
- 24) 石田 功：実験医学，**20**(6)，846-851 (2002).
- 25) Ishida, I.: 12th Annual International Conference on Antibody Engineering. 2001 (San Diego)
- 26) Kuroiwa, Y., Shinohara, T., Notsu, T., Tomizuka, K., Yoshida, H., Takeda, S., Oshimura, M., Ishida, I.: *Nucleic Acids Res.*, **26**(14), 3447-3448 (1998).
- 27) Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Shinohara, T., Kazuki, Y., Yoshida, H., Ohguma, A., Yamamoto, T., Tanaka, S., Oshimura, M., Ishida, I.: *Nat. Biotechnol.*, **18**(10), 1086-1090 (2000).
- 28) Kuroiwa, Y., Yoshida, H., Ohshima, T., Shinohara, T., Ohguma, A., Kazuki, Y., Oshimura, M., Ishida, I., Tomizuka, K.: *Gene Ther.*, **9**(11), 708-712 (2002).
- 29) Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Choi, Y. J., Naeem, R., Tomizuka, K., Sullivan, E. J., Knott, J. G., Duteau, A., Goldsby, R. A.,

- Osborne, B. A., Ishida, I., Robl, J. M.: *Nat. Biotechnol.*, **20**(9), 889-894 (2002).
- 30) Robl, J. M., Kasinathan, P., Sullivan, E., Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Ishida, I.: *Therigenology*, **59**(1), 107-113 (2003).
- 31) Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K.: *J. Biol. Chem.*, **278**(5), 3466-3473 (2002).
- 32) Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., Presta, L. G.: *J. Biol. Chem.*, **277**(30), 26733-26740 (2002).
- 33) Deisenhofer, J.: *Biochemistry*, **20**(9), 2361-2370 (1981).
- 34) Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Sun, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **276**(19), 16469-16477 (2001).
- 35) Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., McPherson, A.: *Biochemistry*, **36**(7), 1581-1597 (1997).
- 36) Harris, L. J., Skaletsky, E., McPherson, A.: *J. Mol. Biol.*, **275**(5), 861-872 (1998).
- 37) Pollock, D. P., Kutzko, J. P., Birck-Wilson, E., Williams, J. L., Echelard, Y., Meade, H. M.: *J. Immunol. Methods*, **231**(1-2), 147-157 (1999).
- 38) Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K.: *Nature*, **342**(6245), 76-78 (1989).
- 39) Mohammed, S. M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K. R., Wildeman, A. G., Bonselaar, J., Etches, R. J.: *Immunotechnology*, **4**(2), 115-125 (1998).
- 40) Tchong, J. E., Kereiakes, D. J., Lincoff, A. M., George, B. S., Kleiman, N. S., Sane, D. C., Cines, D. B., Jordan, R. E., Mascelli, M. A., Langrall, M. A., Damaraju, L., Schantz, A., Efron, M. B., Braden, G. A.: *Circulation*, **104**(8), 870-875 (2001).
- 41) Remicade (infliximab). Prescribing Information. Physician's Desk Reference. (1999).
- 42) Stack, W. A., Mann, S. D., Roy, A. J., Heath, P., Sopwith, M., Freeman, J., Holmes, G., Long, R., Forbes, A., Kamm, M. A.: *Lancet*, **349**(9051), 521-524 (1997).
- 43) 尾崎修治, 柴田泰伸, 原 朋子, 小阪昌明: 分子細胞治療, **1**(3), 279-285 (2002).
- 44) Ritter, G., Cohen, L. S., Williams, C. Jr., Richards, E. C., Old, L. J., Welt, S.: *Cancer Res.*, **61**(18), 6851-6859 (2001).
- 45) Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X. Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J.: *J. Immunol. Methods*, **254**(1-2), 67-84 (2001).
- 46) Glover, R. D.: 12th Annual International Conference on Antibody Engineering. San Diego, (2001).
- 47) Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Matsushita, H., Sathiyaselan, J., Sullivan, E. J., Kakitani, M., Tomizuka, K., Ishida, I., Robl, J. M.: *Nat. Genet.*, **36**(7), 775-780 (2004).
- 48) Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H.: *Blood*, **99**(3), 754-758 (2002).
- 49) Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V.: *Nat. Med.*, **6**(4), 443-446 (2000).
- 50) Nakamura, K., Tanaka, Y., Fujino, I., Hirayama, N., Shitara, K., Hanai, N.: *Mol. Immunol.*, **37**(17), 1035-1046 (2000).
- 51) Nakamura, K., Tanaka, Y., Shitara, K., Hanai, N.: *Cancer Immunol. Immunother.*, **50**(5), 275-284 (2001).
- 52) Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., Anderson, D. R.: *Blood*, **83**(2), 435-445 (1994).
- 53) Tedder, T. F., Engel, P.: *Immunol. Today*, **15**(9), 450-454 (1994).
- 54) Deans, J. P., Schieven, G. L., Shu, G. L., Valentine, M. A., Gilliland, L. A., Aruffo, A., Clark, E. A., Ledbetter, J. A.: *J. Immunol.*, **151**(9), 4494-4504 (1993).
- 55) Vose, J. M.: *Semin. Hematol.*, **36**(4 Suppl 6), 15-20 (1999).
- 56) 柴田徹一：あいみつく, **22**, 27 (2001).
- 57) Igarashi, T., Ohtsu, T., Fujii, H., Sasaki, Y., Morishima, Y., Ogura, M., Kagami, Y., Kinoshita, T., Kasai, M., Kiyama, Y., Kobayashi, Y., Tobinai, K; IDEC-C28B Study Group.: *Int. J. Hematol.*, **73**(2), 213-221 (2001).
- 58) Czuczman, M. S., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A. F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., Varns, C.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(1), 268-276

- (1999).
- 59) Vose, J M., Link, B K., Grossbard, M. L., Czuczman, M., Grillo-Lopez, A., Gilman, P., Lowe, A., Kunkel, L A., Fisher, R. I.: *J. Clin. Oncol.*, **19**(2), 389-397 (2001).
- 60) Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., Gisselbrecht, C.: *N. Engl. J. Med.*, **346**(4), 235-242 (2002).
- 61) Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Milik, A. W., Ross, C. W., Moon, S. D., Crawford, S. M., Burgess, J. M., Petry, N. A., Butchko, G. M. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **329**(7), 459-465 (1993).
- 62) Knox, S. J., Goris, M. L., Trisler, K., Negrin, R., Davis, T., Liles, T. M., Grillo-Lopez, A., Chinn, P., Varns, C., Ning, S. C., Fowler, S., Deb, N., Becker, M., Marquez, C., Levy, R.: *Clin. Cancer Res.*, **2**(3), 457-470 (1996).
- 63) Witzig, T. E., White, C. A., Wiseman, G. A., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Raubitschek, A., Janakiraman, N., Gutheil, J., Schilder, R. J., Spies, S., Silverman, D. H., Parker, E., Grillo-Lopez, A. J.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(12), 3793-3803 (1999).
- 64) Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Fenner, M. C., Ross, C. W., Milik, A. W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S. D., Wahl, R. L.: *J. Clin. Oncol.*, **14**(7), 1974-1981 (1996).
- 65) Vose, J. M., Wahl, R. L., Saleh, M., Rohatiner, A. Z., Knox, S. J., Radford, J. A., Zelenetz, A. D., Tidmarsh, G. F., Stagg, R. J., Kaminski, M. S.: *J. Clin. Oncol.*, **18**(6), 1316-1323 (2000).
- 66) Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., Shepard, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(10), 4285-4289 (1992).
- 67) Shak, S.: *Semin. Oncol.*, **26**(4 Suppl 12), 71-77 (1999).
- 68) King, C. R., Kraus, M. H., Aaronson, S. A.: *Science*, **229**(4717), 974-976 (1985).
- 69) Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L.: *Science*, **235**(4785), 177-182 (1987).
- 70) Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., *et al.*: *Science*, **244**(4905), 707-712 (1989).
- 71) Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Tanaka, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Shiraiishi, M., Toyoshima, K., Yamamoto, T., Terada, M., *et al.*: *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**(4), 327-332 (1990).
- 72) Yarden, Y., Sliwkowski, M. X.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**(2), 127-137 (2001).
- 73) Sundaresan, S., Penuel, E., Sliwkowski, M. X., *Curr. Oncol. Rep.*, **1**(1), 16-22 (1999).
- 74) Brennan, P. J., Kumagai, T., Berezov, A., Murali, R., Greene, M. I., Kumogai, T.: *Oncogene*, **19**(53), 6093-6101 (2000).
- 75) Dankort, D., Maslikowski, B., Warner, N., Kanno, N., Wang, Z., Moran, M. F., Oshima, R.G., Cardiff, R. D., Muller, W. J.: *Mol. Cell. Biol.*, **21**(5), 1540-1551 (2001).
- 76) Cuello, M., Ettenberg, S. A., Clark, A. S.: Keane, M. M., Posner, R. H., Nau, M. M., Dennis, P. A., Lipkowitz, S.: *Cancer Res.*, **61**(12), 4892-4900 (2001).
- 77) Keshmouni, V. G., Mattingly, R. R., Reddy, K. B.: *J. Biol. Chem.*, **277**(25), 22558-22565 (2002).
- 78) Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C.L.: *Cancer Res.*, **62**(14), 4132-4141 (2002).
- 79) Baselga, J., Albanell, J.: *Ann. Oncol.*, **12**(Suppl 1) S35-41 (2001).
- 80) Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso E., Fukumura, D., Jain, R. K.: *Nature*, **416**(6878), 279-280 (2002).
- 81) 医薬品インタビューフォーム：抗Her2ヒト化モノクローナル抗体、抗悪性腫瘍剤ハーセプチン（注射用）150，トラスツヅマブ（遺伝子組換え）製剤，2001年6月（日本ロシュ株式会社）p.13.
- 82) Slamon, D. J., Leyland-Johnes, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L.: *N. Engl. J. Med.*, **344**(11), 783-792 (2001).
- 83) Seidman, A. D., Fornier, M. N., Esteva, F. J., Tan, L., Kaptain, S., Bach, A., Panageas, K. S., Arroyo, C., Valero, V., Currie, V., Gilewski, T., Theodoulou, M., Moynahan, M. E., Moasser, M., Sklarin, N., Dickler, M., D'Andrea, G., Cristofanilli, M., Rivera, E., Hortobagyi, G. N., Norton, L., Hudis, C. A.:

- J. Clin. Oncol.*, **19**(10), 2587-2595 (2001).
- 84) Cobleigh, M.A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D. J.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(9), 2639-2648 (1999).
- 85) Choy, E. H., Panayi, G. S.: *N. Eng. J. Med.*, **344**(12), 907-916 (2001).
- 86) Nakada, M. T., Tam, S. H., Woulfe, D. S., Casper, K. A., Swerlick, R. A., Ghrayeb, J.: *Cell Adhes. Commun.*, **5**(6), 491-503 (1998).
- 87) Scallan, B. J., Moore, M. A., Trinh, H., Knight, D. M., Ghrayeb, J.: *Cytokine*, **7**(3), 251-259 (1995).
- 88) Tragan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D. H., Braalman, T., DeWoody, L. L., Schaible, T. F., Rutgeerts, P. J.: *N. Engl. J. Med.*, **337**(15), 1029-1035 (1997).
- 89) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Katsikis, P., Brennan, F. M., Walker, J., Bijl, H., Ghrayeb, J., et al.: *Arthritis. Rheum.*, **36**(12), 1681-1690 (1993).
- 90) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., Leeb, B., Breedveld, F. C., Macfarlane, J. D., Bijl, H., et al.: *Lancet*, **344**(8930), 1105-1110 (1994).
- 91) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., Woody, J. N.: *Lancet*, **344**(8930), 1125-1127 (1994).
- 92) Mani, R., St Clair, E. W., Breedveld, F., Furst D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., Lipsky, P.: *Lancet*, **354**(9194), 1932-1939 (1999).
- 93) Lipsky, P. E., van der Heijde, D. M., St Clair, E. W., Furst, D. E., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Smolen, J. S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G. R., Maini, R. N.; Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group.: *N. Engl. J. Med.*, **343**(22), 1594-1602 (2000).
- 94) 第45回日本リウマチ学会特集. 日経メディカル別冊, **8**, 1 (2001).
- 95) Sandborn, W. J., Hanauer, S. B.: *Am. J. Gastroenterol.*, **97**(12), 2962-2972 (2002).
- 96) Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., Braun, M. M.: *N. Eng. J. Med.*, **345**(15), 1098-1104 (2001).
- 97) Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R., Vinh, D. C.: *Lancet Infect. Dis.*, **3**(3), 148-155 (2003).
- 98) Haba, T., Uchida, K., Katayama, A., Tominaga, Y., Sato, T., Watanabe, I., Inagaki, H., Kimata, T., Goto, K., Morozumi, K., Take-da, A., Takahara, S., Takahashi, K., Oshima, S.: *Transplant. Proc.*, **33**(7-8), 3174-3175 (2001).
- 99) Nashan, B., Moore, R., Amlot, P., Schmidt, A. G., Abeywickrama, K., Soullidou, J. P.: *Lancet*, **350**(9086), 1193-1198 (1997).
- 100) Kahan, B. D., Rajagopalan, P. R., Hall, M.: *Transplantation*, **67**(2), 276-284 (1999).
- 101) Onrust, S. V., Wiseman, L. R.: *Drugs*, **57**(2), 207-213 (1999).
- 102) Ponticelli, C., Yussim, A., Cambi, V., Legendre, C., Rizzo, G., Salavadori, M., Kahn, D., Kashi, H., Salmela, K., Fricke, L., Heemann, U., Garcia-Martinez, J., Lechler, R., Prestele, H., Girault, D.; Simulect Phase IV Study Group.: *Transplantation*, **72**(7), 1261-1267 (2001).
- 103) Beeler, J. A., van Wyke Coelingh K.: *J. Virol.*, **63**(7), 2941-2950 (1989).
- 104) Press, E. M., Hogg, N. M.: *Biochem. J.*, **117**(4), 641-660 (1970).
- 105) Takahashi, N., Noma, T., Honjo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**(16), 5194-5198 (1984).
- 106) Bently, D. L., Rabbits, T. H.: *Nature*, **288**(5792), 730-733 (1980).
- 107) Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A., Hemming, V. G., Pfarr, D. S., Wang, S. C., Domitzer, M., O'Grady, J., Koenig, S., Tamura, J. K., Woods, R., Bansal, G., Couchenour, D., Tsao, E., Hall, W. C., Young, J. F.: *J. Infect. Dis.*, **176**(5), 1215-1224 (1997).
- 108) The Impact-RSV Study Group.: *Pediatrics*, **102**, 531-537 (1998).
- 109) Kempeni, J.: *Ann. Rheum. Dis.*, **58**(Suppl 1), 170-172 (1999).
- 110) Barrera, P., Joosten, L. A., den Broeder, A. A., van de Putte, L. B., van Riel, P. L., van den Berg, W. B.: *Ann. Rheum. Dis.*, **60**(6), 660-669 (2001).
- 111) Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D.

- E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Birbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A., Chartash, E. K.: *Arthritis Rheum.*, **48**(1), 35-45 (2003).
- 112) den Broeder, A. A., Joosten, L. A., Saxne, T., Heinegard, D., Fenner, H., Miltenburg, A. M., Frasa, W. L., van Tits, L. J., Buurman, W. A., van Riel, P. L., van de Putte, L. B., Barrera, P.: *Ann. Rheum. Dis.*, **61**(4), 311-318 (2002).
- 113) Freeman, S. D., Kelm, S., Barber E. K., Crocker, P. R.: *Blood*, **85**(8), 2005-2012 (1995).
- 114) Wagner, J. E., Collins, D., Fuller, S., Schain, L. R., Berson, A. E., Almici, C., Hall, M. A., Chen, K. E., Okarma, T. B., Lebkowski, J. S.: *Blood*, **86**(2), 512-523 (1995).
- 115) van der Jagt, R. H., Badger, C. C., Appelbaum, F. R., Press, O. W., Matthews, D. C., Eary, J. F., Krohn, K. A., Bernstein, I. D.: *Cancer Res.*, **52**(1), 89-94 (1992).
- 116) Caron, P. C., Co, M. S., Bull, M. K., Avdalovic, N. M., Queen, C., Scheinberg, D. A.: *Cancer Res.*, **52**(24), 6761-6767 (1992).
- 117) Sievers, E. L., Larson, R. A., Stadtmauer, E. A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J. M., Sherman, M. L., Berger, M. S., Eten, C. B., Loken, M. R., van Dongen, J. J., Bernstein, I. D., Appelbaum, F. R.; Mylotarg Study Group.: *J. Clin. Oncol.*, **19**(13), 3244-3254 (2001).
- 118) Penichet, M. L., Morrison, S. L.: *J. Immunol. Methods*, **248**(1-2), 91-101 (2001).
- 119) Helguera, G., Morrison, S. L., Penichet, M. L.: *Clin. Immunol.*, **105**(3), 233-246 (2002).
- 120) Rook, A. H., Mc Ginnis, K. S., Richardson, S. K., Budgin, J. B., Wysocka, M., Benoit, B. M., Hopkins, J. M., Vittorio, C. C.: *Dermatol. Ther.*, **16**(4), 331-336 (2003).
- 121) Nissim, A., Gofur, Y., Vessillier, S., Adams, G., Chernajovsky, Y.: *Trends Mol. Med.*, **10**(6), 269-274 (2004).
- 122) 花井陳夫：BIO ベンチャー, **2**, 37-43 (2002).
- 123) 小崎丈太郎, 久保田 文：日経ビジネス, **05**, 36-53 (2003).
- 124) 富塚一磨, 黒岩義巳, 石田 功：BIO INDUSTRY, **20**, 43-51 (2003).
- 125) 伊東祐二, 田中孝一, 橋口周平, 杉村和久：BIO INDUSTRY, **20**, 34-42 (2003).
- 126) 中島敏博：BIO ベンチャー, **2**, 59-66 (2002).
- 127) 石田 功：バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 296-301 (2002).
- 128) 石田 功：日病薬誌, **38**, 1121-1124 (2002).
- 129) 黒岩義巳, 富塚一磨, 石田 功：バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 39-40 (2003).
- 130) 土屋政幸：BIO ベンチャー, **2**, 81-88 (2002).
- 131) 石田 功, 富塚一磨, 吉田 均：BIO ベンチャー, **2**, 44-50 (2002).
- 132) 浅野竜太郎, 津本浩平, 熊谷 泉：BIO INDUSTRY, **20**, 6-14 (2003).
- 133) 飛内賢正：最新医学, **56**, 609-618 (2001).
- 134) 渡辺 亨, 勝俣範之, 藤原康弘, 向井博文, 松本光史, 安藤正志, 清水千佳子, 西條長宏：癌治療と宿主, **14**, 2002-2007 (2002).
- 135) 吉崎和幸, 奥畑聡子, 中原英子, 荻原圭佑, 西本憲弘：BIO ベンチャー, **2**, 67-74 (2002).
- 136) 湊健二郎：医薬ジャーナル, **40**, 295-301 (2004).

肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 日向 昌司*, 野間 誠司**,
川西 徹*, 早川 堯夫***

(受付:平成17年6月13日, 受理:平成17年9月30日)

State of Research about Hepatic Stem Cell and Perspective of its Application to Cell Therapy for Hepatic Disease

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*, Masashi HYUGA*,
Seiji NOMA**, Toru KAWANISHI*, Takao HAYAKAWA***

はじめに

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。すなわち, 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おり, 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。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。

肝細胞移植に関連して, 最近, 有効であるといわれているのは, 全肝移植までのbridge-use, 肝不全の際の代謝補助, 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の肝細胞移植である。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。

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ような利点を有する。①分化の方向性や増殖能が既に決定されているので腫瘍化の危険性が低い。②増殖能が成熟肝細胞に比べ極めて高い。③正常細胞

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4 共同ビル4階 (〒103-0001)

The Japan Health Sciences Foundation, Kyodo Bldg. 4F, 13-4 Nihonbashi, Kodenma-cho, Chuo-ku,
Tokyo 103-0001, Japan

*** 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

と同等の機能発現が期待できる。④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¹⁾。彼らの仮説は、肝臓が肝臓毒により重篤な障害を受けた際に肝臓が再生できるという事実に基づいており、既存の細胞はそのような条件において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多岐にわた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²⁾。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 oval cell と骨髄由来細胞である。本稿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について概説する。

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。Oval cell の名前の由来はこの特徴的な形態による。Oval cell は肝細胞毒による肝障害及び広範囲な肝細胞壊死などにより成熟肝細胞の増殖の著しい阻害及び遅延などの病態が生じた場合において肝臓に出現し、小葉内胆管につながる肝細胞索及び胆管を形成する。また、ヒト肝臓の胆管においても肝細胞への分化がおきることから、重篤な障害の肝臓で再生する oval cell が新しい肝細胞の幹細胞として機能すると考えられるようになった。上記のように oval cell は肝細胞だけでなく胆管上皮細胞にも分化するが、本稿においては肝細胞への分化を中心に概説する。

1.1 Oval cell から肝細胞への分化

Oval cell から肝細胞への分化を誘導する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 “partial hepatect-

omy” (PH) するというものである。2-AAF は phase 1 代謝酵素により毒性及び増殖抑制作用を有する N-水酸化誘導体に代謝される³⁾。Oval cell は肝細胞と比べると phase 1 代謝酵素のレベルは低い phase 2 代謝酵素のレベルは高いという特徴を有する⁴⁾。したがって、oval cell は発癌物質の毒性効果に抵抗性である⁵⁾。その結果、上記モデルにおいては肝細胞よりむしろ oval cell が 2/3 PH 後増殖する。詳細な検討によると、小葉内胆管が ³H チミジンにより PH 後 4 時間で標識され⁶⁾、増殖は 24 時間で起こる⁶⁻⁸⁾。その後、oval cell は小葉内胆管領域から放射状に出現して肝実質の中へ深く浸入し^{9,10)}、小型肝細胞へ分化する¹¹⁾。その際、小葉内胆管においてのみ腫瘍胎児糖たん白質 “ α -feto-protein” (AFP) が発現し¹²⁾、メチレンジアニリンで小葉内胆管を障害すると oval cell の増殖が阻害される¹³⁾。

その他の oval cell から肝細胞への分化へのモデル系としてはフラン投与^{14,15)}、ディピン投与¹⁶⁾、2-AAF 投与/四塩化炭素投与¹⁷⁾などが知られている。

なお、Table 1 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す。

1.2 Oval cell の由来

先に述べた改変 Solt-Farber 法における知見並びに他のモデル系における同様な解析結果などから、oval cell の由来は Fig. 1 に示す肝臓断片のなかで門脈周囲の肝細胞と末端小葉内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現在においては主流を占めている¹⁸⁻²⁰⁾。

1.3 成人ヒト肝臓における oval cell

形態学的な解析により障害を受けたヒト肝臓にお

Table 1 Oval cell, 肝細胞, 胆管上皮細胞のマーカー

マーカー	Oval cell	肝細胞	胆管上皮細胞
CK7	+	-	+
CK19	+	-	+
Albumin	±	+	-
CYP1A ₂	-	+	-
AFP	+	-	-
CK8	+	+	+
CK18	+	+	+
OV-6	+	-	+

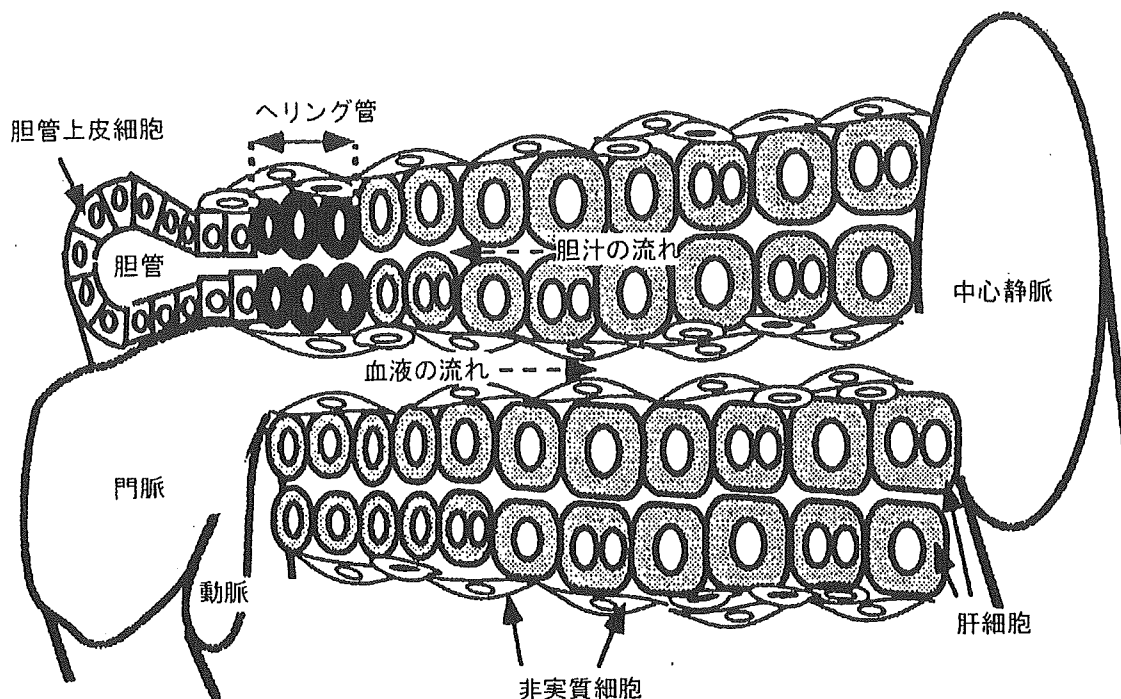


Fig. 1 ラット肝臓の模式図 (文献144より許可を得て転載)

いて小型肝細胞の存在が確認され²¹⁾, また, 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により肝芽腫²²⁾, 肝細胞癌²³⁾, 肝硬変の肝臓²⁴⁻²⁶⁾において oval cell が同定された。更に, 二重免疫染色法を用いた解析によりこれらの細胞において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^{24,26)}。

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) を用いてラット肝臓から 95~97% という高純度で Thy-1 陽性 oval cell が得られている²⁷⁾。この細胞には他の oval cell のマーカーである AFP, CK-19, GGT, OC2 及び OV-6 も発現する。

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が, 肝臓に移植すると悪性の表現系を消失し肝細胞に分化する^{28,29)}。"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³⁰⁾。

1.6 Oval cell を含む肝幹細胞の分化及び増殖に影響を与える因子

通常の肝再生に関与する増殖因子は oval cell の増殖・分化も調節する。その調節には, 促進及び抑制に働く増殖因子の精巧かつ協調的な発現, 発現する時期及び場所が重要となる。また, Ito 細胞との接触, マトリックスメタロプロテアーゼによる肝実質細胞外マトリックス "extracellular matrix" (ECM) の分解も oval cell の増殖・分化に影響を及ぼす。

1.6.1 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アルファ "tumor necrosis factor- α " (TNF- α) の産生が促進され, oval cell の増殖はタイプ 1 受容体のノックアウトマウスにおいて顕著に抑制されることを明らかにした³¹⁾。したがって, TNF- α タイプ 1 のシグナル伝達は oval cell の増殖において重要な役割を果たしていると考えられる。

1.6.2 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) は胆管癌³²⁾だけでなく胆汁鬱滞並びに肝再生に伴い増殖する胆管³³⁾において発現する。上皮増殖因子 "epidermal growth factor" (EGF) のような増殖因子は培養胆

管細胞において早期に PTHrP を誘導する³⁴⁾。したがって、PTHrP はオートクラインの様式で oval cell の増殖を促進する可能性が考えられる。

肝細胞増殖因子 “hepatocyte growth factor” (HGF)、幹細胞因子 “stem cell factor” (SCF)、EGF も以下に示すように oval cell の増殖を促進する。HGF は oval cell の増殖時において産生が促進され³⁵⁾、oval cell の増殖を *in vitro*³⁶⁾ 及び *in vivo*^{37,38)} において促進する。SCF も oval cell の増殖時において発現し³⁹⁾、oval cell の出現を促進する⁴⁰⁾。EGF は *in vivo*³⁷⁾ 及び *in vitro*⁴¹⁾ において、TGF- α は *in vitro*⁴¹⁾ において oval cell の増殖を促進する。一方、トランスフォーミング増殖因子ベータ “transforming growth factor- β ” (TGF- β) は増殖性胆管及び胆管周囲の Ito 細胞において発現し⁴²⁻⁴⁴⁾、*in vitro* において EGF 共存下で oval cell の遊走を促進させる⁴¹⁾。また、TGF- β は rat liver epithelial cell の肝細胞への分化を促進する⁴³⁾。Oval cell は HGF を除くこれらすべての増殖因子^{45,46)} 及びその受容体^{6,39,47)} を発現する。一方、oval cell と同等と考えられている胎児性の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⁴⁸⁾。したがって、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増殖・分化できる可能性もある。

1.6.3 feeder layer 及びコンディショニングメディウムによる調節

増殖因子存在下において線維芽細胞の feeder layer を用いることにより、oval cell は未分化の状態を高増殖能を 3 ヶ月以上維持される⁴⁹⁾。三次元コラーゲンゲルと線維芽細胞の feeder layer を用いることにより、oval cell を肝細胞に分化できる⁵⁰⁾。オンコスタチン M 強発現 293T 細胞のコンディショニングメディウムで oval cell を培養すると増殖が抑制され、肝細胞への分化が促進される⁵¹⁾。

1.6.4 薬剤による調節

ブチル酸ナトリウムは oval cell の DNA 合成を抑制し、分化を誘導する⁵²⁾。線維芽細胞を feeder layer として用いた oval cell の培養系において、DMSO は線維芽細胞の過剰増殖を抑制し、oval cell を肝細胞に誘導する⁵⁰⁾。DMSO により oval cell は肥大化し、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。

1.6.5 Ito 細胞による調節

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 Ito 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^{53,54)}。Ito 細胞は 2-AAF/PH モデルにおいて最初に増殖し⁶⁾、oval cell が肝実質に浸入する初期の段階においてその挙動を共にし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^{44,55,56)}。したがって、Ito 細胞は oval cell を肝実質微小環境から隔離することにより、oval cell の未熟な肝細胞への分化を阻止すると考えられる。

1.6.6 マトリックスメタロプロテアーゼによる調節

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) を分泌し、障害を受けた肝実質 ECM の分解を亢進する。その結果、oval cell が肝実質に浸入しやすくなると考えられる。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⁵⁷⁾。したがって、oval cell も MMP を発現し ECM を分解する可能性が考えられる。

2. 骨髄由来細胞

Oval cell の細胞表面マーカーを探索する過程で、そのマーカーは c-kit, CD34, Thy-1, flt-3 受容体など骨髄の血液幹細胞の表面抗原と共通であることが示された^{27,39,58,59)}。その後の研究から、骨髄由来の細胞が肝細胞に分化することが以下のように示された。

2.1 骨髄由来細胞の肝細胞への分化

成熟造血幹細胞 “hematopoietic stem cell” (HSC) は同じ細胞系列にしか分化しないと従来考えられていたが、骨格筋^{60,61)}、腎臓⁶²⁾、脳⁶³⁾ を含む様々な組織の細胞に分化することが最近示された。更に、ラットにおいても循環骨髄細胞は肝細胞に分化することが Peterson らによる以下に示す実験から証明された⁶⁴⁾。最初に、致死量の放射線を照射後 2-AAF 及び四塩化炭素により肝臓に障害を与えた雌ラットに雄骨髄細胞を移植し、その後の骨髄細胞の運命が調べられた。その結果、肝障害後 9 日目に Y-染色体陽性の肝幹細胞が検出され、肝幹細胞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。次に、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)