

Table 1 認可された抗体医薬

商品名 (抗体名)	企業	日本での 販売元	タイプ (抗原)	適応症	認可 (年)
Repro® (Abciximab)	Centocor社/ Eli Lilly社		キメラ (gp II b III a)	PTCA 後再狭窄	1994
Rituxan® (Rituximab)	IDEC社/Roche 社/Genentech社	全薬工業 (株)	キメラ (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	1997
Zenepax® (Daclizumab)	Roche社		ヒト化 (IL-2R)	腎移植	1997
Remicade® (Avakine)	Centocor社		キメラ (TNF- $\alpha$ )	クローン病 慢性関節リウマチ	1998
Synagis® (Palibizumab)	MedImmune社/ Abott社		ヒト化 (RSV)	RSV 小児感染	1998
Simulect® (Basilicimab)	Novartis社		ヒト化 (IL-2)	腎移植	1998
Herceptin® (Trastuzumab)	Genentech社/ Roche社	日本ロシュ (株)	ヒト化 (HER2)	乳癌	1998
Mylotarg® (Gemtuzumab)	Cellutech社/ AHP社		抗癌剤-コンジュゲート (CD33)	急性骨髄性白血病	2000
Zevalin® (Iritumomab)	IDEC社/ Schering AG社		<sup>90</sup> Y-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002
Bexxar® (Tositumomab)	Coulter社/ SKB社		<sup>131</sup> I-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002

(文献 122 より許可を得て転載)

Table 2 開発中の抗体医薬

段階	数					
	合計	キメラ抗体	ヒト化抗体	完全ヒト抗体	マウス抗体	その他
発売中	11	4	5	0	2	0
申請中	3	0	1	1	1	0
フェーズⅢ	20	1	9	2	8	0
フェーズⅡ	60	7	25	15	4	9
フェーズⅠ	35	5	13	6	6	5
合計	129	17	53	24	21	14

(2003年1月時点) (文献 123 より許可を得て転載)

frame region (FR) をすべてヒト抗体に置き換えたものである<sup>4)</sup> (Fig. 1)。以下に、マウスハイブリドーマ細胞から、遺伝子としてcDNAを用い遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する。

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子(以下マウス抗体遺伝子)のクローニングである。ハイブリド

ーマ細胞よりRNAを抽出し、①cDNAを作製後、ブランクハイブリダイゼーション法あるいはPCR法により抗体遺伝子をクローニングするか、②RNAより直接PCR法により抗体遺伝子をクローニングする方法が用いられている。ハイブリドーマ細胞は、目的の抗体遺伝子以外に、融合パートナーのミエローマ由来の抗体遺伝子、タンパク質に翻訳されない偽抗体遺伝子が含まれていることもある。

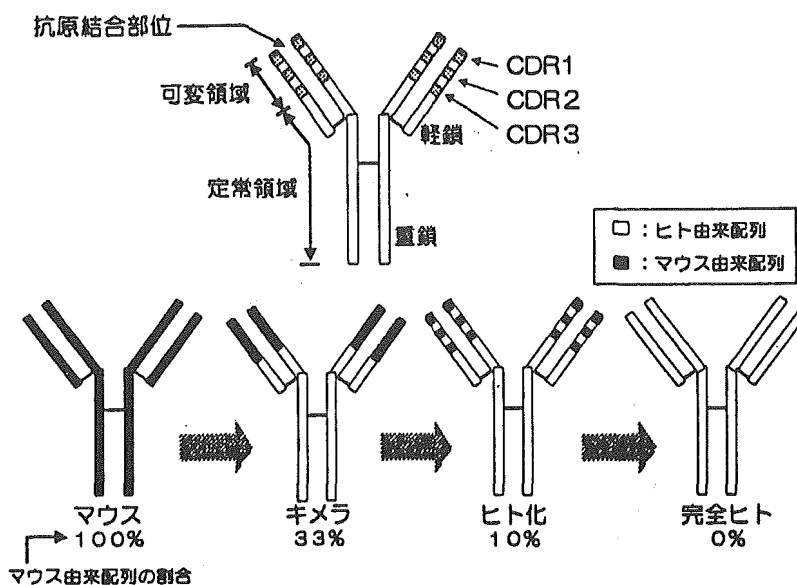


Fig. 1 抗体の構造（上段）及びマウスモノクローナル抗体のヒトに対する抗原性低減技術の進展（下段）  
（文献 124 より許可を得て転載）

したがって、精製したモノクローナル抗体 V 領域のアミノ酸配列を一部決定し、クローニングした抗体遺伝子と一致しているか確認することが重要である。

キメラ抗体は、クローニングしたマウス抗体の variable (V) 領域遺伝子にヒトの C 領域遺伝子を連結し、適当な発現ベクターに挿入して培養細胞で生産する。また、抗体産生ハイブリドーマのマウス Ig C 領域をヒト Ig C 領域に組換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製は以下の複雑なステップからなる。ヒト化抗体作製の第一ステップでは、クローニングしたマウス抗体可変 (V) 領域における抗原との結合に寄与する超可変領域 (CDR) 配列とヒト抗体 V 領域におけるアイソタイプ固有のアミノ酸配列をもつフレームワーク領域 (FR) からなる V 領域をコードする遺伝子を構築する。ヒト化抗体作製における最も重要な点は、CDR を移植するヒト FR 領域のデザインである。マウス抗体の CDR を単純にヒト FR へ移植した抗体では、結合活性の低下、消失がみられる。これはマウス FR 領域中のいくつかのアミノ酸が CDR の高次構造維持に大きな影響を与えており、それらのアミノ酸残基を

CDR とともに移植しなければいけないことを示している。CDR の高次構造に影響を与えるアミノ酸残基がいくつか同定されているが<sup>6)</sup>、その法則は確立されておらず、コンピューターモデリングなどを組み合わせて個々の抗体で試行錯誤しているのが現状である<sup>6)</sup>。また、この方策として目的のマウス抗体 V 領域と最も高いホモロジーを示すヒト抗体 V 領域を選択し、その FR 領域を用いている場合もある。

最終的に、構築された抗体 heavy (H) 鎖及び light (L) 鎖遺伝子が挿入された発現ベクターを動物細胞に導入し、遺伝子組換え抗体を発現する。現在、上市されている抗体の製造細胞で実績があるのは、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞、マウスミエローマ由来の NS0 細胞及び SP2/0 細胞である<sup>7)</sup>。動物細胞が産生に用いられるのは以下の理由による。まず、抗体は H 鎖及び L 鎖各 2 本が複数の S-S 結合を介して結合しており、正確な立体構造の構築には動物細胞での発現が最適である。また、抗体の Fc 領域には N 型糖鎖が結合しており、糖鎖は C<sub>H</sub>2 ドメインの立体構造の維持、後述する複数のエフェクター活性に必須である。したがって、動物細胞で発現しないと糖鎖が付加されないため、抗体のエフェクター活性が損なわれてしまうからで

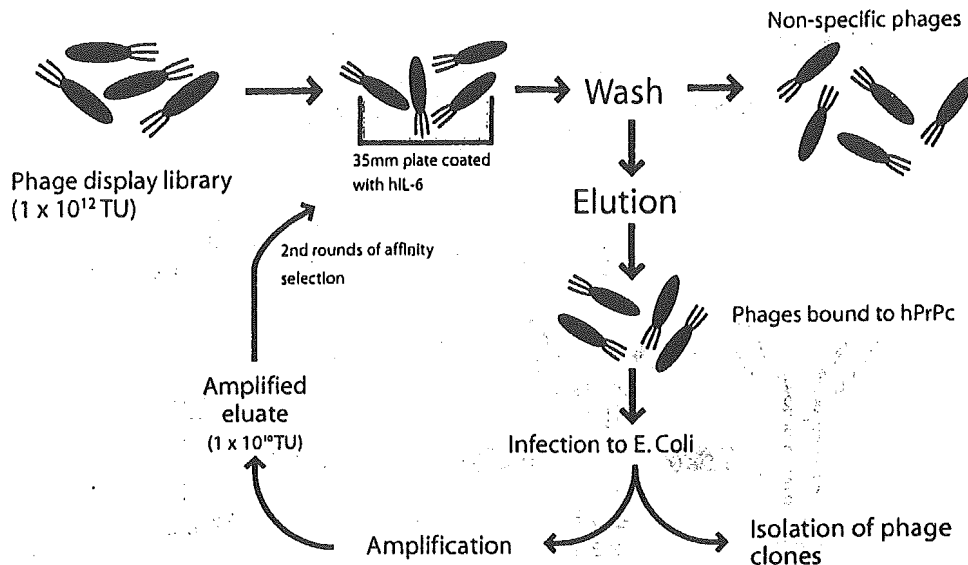


Fig. 2 ファージディスプレイライブラリーを用いたパンニング方法  
(文献 125 より許可を得て転載)

ある。

### 1.2 ファージディスプレイ抗体

ファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一つである M13 や T7 などの繊維状ファージのコートタンパク質 (g3p や g10p など) の N 末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合タンパク質として発現させるシステムである<sup>8)</sup>。一度に  $10^7$  種類以上の多種類の分子種を呈示したライブラリーを構築でき、また粒子ごとに目的の機能や性質をもった分子種を選択できる。その技術を用いて外来遺伝子として抗体の結合部位である 2 つのポリペプチド鎖  $V_H$  と  $V_L$  を短いリンカーで直列につないだ一本鎖 Fv single-chain Fv (scFv) をファージにディスプレイさせたものが抗体ファージライブラリーである<sup>9,10)</sup>。そしてファージライブラリーからパンニングと呼ばれる固相化された抗原分子上で特異的抗体ファージを濃縮する操作を繰り返して特異的抗体ファージをスクリーニングする<sup>11)</sup> (Fig. 2)。それを最終的にファージから切り離したものがファージディスプレイ抗体である。

#### 1.2.1 抗体ファージライブラリーの種類

現在、世界中で様々な抗体ライブラリーが作製・報告されているが、その抗体遺伝子ソースの性質の違いに応じて、以下の 3 つに分類される (Fig. 3)。

##### 1.2.1.1 免疫ライブラリー

感染症回復者や対象抗原をワクチン接種して血中抗体価を上昇させたヒト、自己抗体を保有する患者、担癌患者などのリンパ球を出発材料として RT-PCR により増幅した V 遺伝子より構築したライブラリーである。中和抗体を有する各種感染症に対する抗体の創出に有効と考えられる。

最初から目的抗体遺伝子がライブラリー中に多く含まれていることから、比較的小さなサイズのライブラリーからでもかなり高い確率で特異性、親和性の高いヒト抗体を単離することが可能である。一方、対象抗原によっては、リンパ球ソースの入手方法の点など倫理的な面で問題となることもある。更に対象抗原ごとにあるいは患者ごとにライブラリーを構築しなければならないため、手間がかかるという欠点がある。本法により、ヒト血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) に対するインヒビター抗体を有する患者より FVIII に高い親和性 ( $K_d=10^{-11}M$ ) を有し、FVIII の活性を阻害する scFv クローンが得られている<sup>12)</sup>。

##### 1.2.1.2 ナイーブ/非免疫ライブラリー

正常なヒトが保有する  $V_H$ ,  $V_L$  遺伝子を RT-PCR により分離し、ランダムに組み合わせた抗体可変領域ドメインを提示したライブラリーである。ヒトがもともと生体内に有し、産生している抗体可変領域を組み合わせて作製するため、ヒト抗原に対する治療用のヒト抗体作製に、最もよく利用されて

ライブラリーの種類	合成	ナイーブ	非免疫	immune
使用組織	ヒト組織	末梢血, 骨髄, 扁桃腺などのリンパ球		感染症回復者や対象抗原をワクチン接種したあるいは自己抗体を保有する患者のリンパ球
V遺伝子の由来	再構成されていない V遺伝子断片	IgM mRNA 由来 再構成された V 遺伝子		IgG mRNA 由来 再構成された V 遺伝子
V遺伝子の組成	コントロール可能	← コントロールは困難		→
CDRの由来	合成・混合	← 天然型		→
ライブラリーの構築	←	基本的に1回	→	抗原ごとに作製
得られる抗体の親和性	← ライブラリーのサイズと多様性に依存? →	ライブラリーサイズは小さくても、(10 <sup>6</sup> 程度) 目的の抗原に対して比較的高い親和性を有するクローン分離可能		
特異性	←	ほとんどの抗原	→	主に標的抗原

Fig. 3 合成, ナイーブ, 非免疫, immune 各ライブラリーの比較：ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーの作成法による分類 (文献 126 より許可を得て転載)

いる。通常、正常人の末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球を出発材料とし、複数のドナーを用いることでより多くの多様性を有するライブラリーを構築する。このライブラリーでは用いるドナーがどのような疾病歴、抗体価、遺伝系などのバックグラウンドを有するかなどの選択が難しく、V 遺伝子の組成や由来のコントロールに課題がある。厳密に言えば抗原感作によるクラススイッチが起こっていないという観点から、IgM クラスの mRNA のみを V<sub>H</sub> 遺伝子の増幅に用いているものが特にナイーブライブラリーと呼ばれる<sup>13)</sup>。以下にヒト抗体ライブラリーの構築 (B 細胞を出発材料としたナイーブ/非免疫ライブラリーの場合) 法の概略を示す<sup>14)</sup> (Fig. 4)。

ヒトリンパ球由来 mRNA から、イムノグロブリンの  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$  鎖の C 領域に特異的なプライマーを用いて、V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 ( $\gamma$ ,  $\mu$  鎖由来の V<sub>H</sub> 並びに  $\kappa$ ,  $\lambda$  由来の V<sub>L</sub>) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 ( $\gamma$ ,  $\mu$  鎖由来の V<sub>H</sub> 並びに  $\kappa$ ,  $\lambda$  由来の V<sub>L</sub>) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて合成し、それらリンカー DNA を用いて PCR により連結し、

scFv 遺伝子を作製する。それをファージタンパク質 g3p の N 末端に融合タンパク質遺伝子としてファージミドベクター上で連結させ (Fig. 4)、大腸菌に形質転換後、ヘルパーファージを用いて、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製する。

1.2.1.3 合成ライブラリー

ヒト B 細胞内で実際に抗体産生に用いられている遺伝子を選び、V 遺伝子断片と CDR 3 領域に相当する適当な長さのランダムなアミノ酸配列をもつ合成 DNA を用いて抗体可変領域遺伝子を構築したライブラリーである<sup>15,16)</sup>。最初から機能的な scFv を産生する V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> 遺伝子の組み合わせでライブラリーを構築することができるため、得られる抗体の発現効率や安定性が高いとされる。人工的なランダムオリゴ DNA を用いているため、ゲノム中の抗体遺伝子のみを利用した抗体ライブラリーより高い多様性が得られる。逆に特定の CDR 領域のみの多様性であるため、他の CDR 領域が多様性に寄与するような抗体は得られない。

1.3 トランスジェニックヒト抗体

完全なヒトモノクローナル抗体取得のもう一つの戦略は、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物の利用である。内因性 Ig をノックアウト (KO)

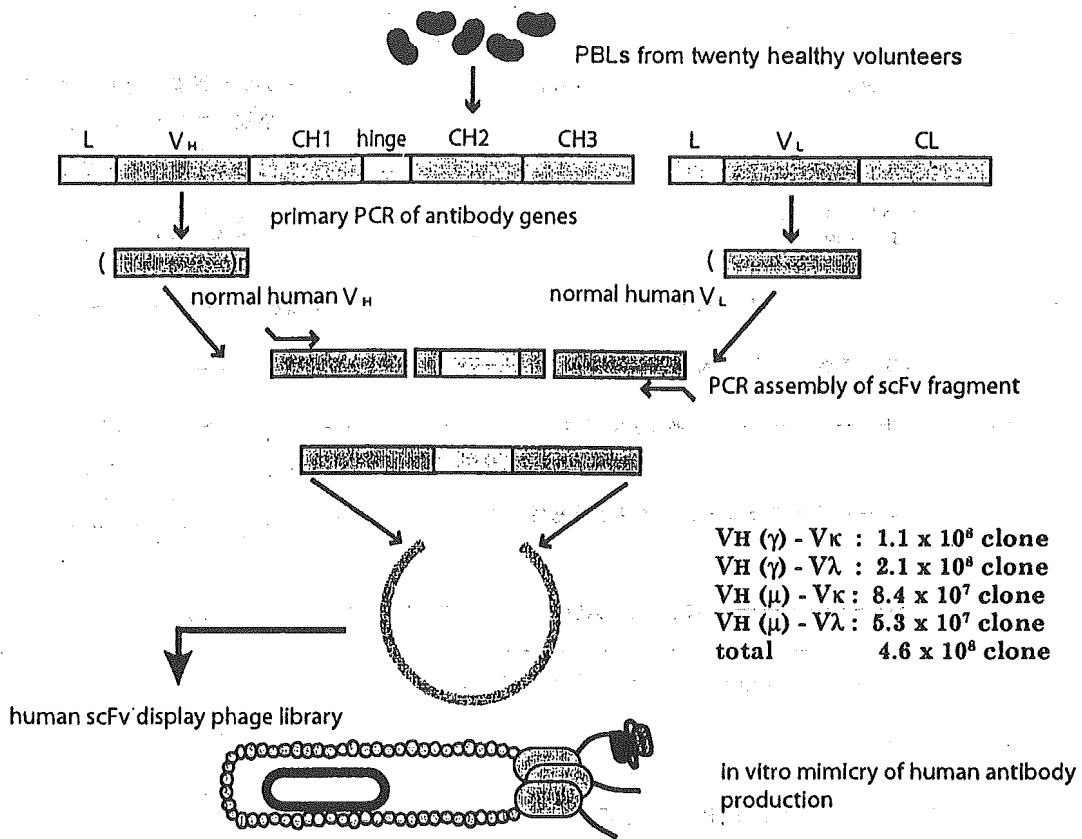


Fig. 4 ナイーブヒト抗体ファージライブラリー構築の概略  
(文献 125 より許可を得て転載)

したマウスに機能的なヒトの Ig 遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生されると考えられる。更に、このマウスを免疫すればヒトモノクローナル抗体を従来のハイブリドーマ法で容易に得ることが可能と考えられる。

1.3.1 ヒト抗体重鎖，軽鎖ミニ遺伝子を導入したヒト抗体産生マウス

ヒト抗体 H 鎖，L 鎖ミニ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとマウス内在性抗体遺伝子を破壊したノックアウトマウスを掛け合わせてヒト抗体産生マウスを作成する<sup>17,18)</sup> (Fig. 5)。抗原を接種

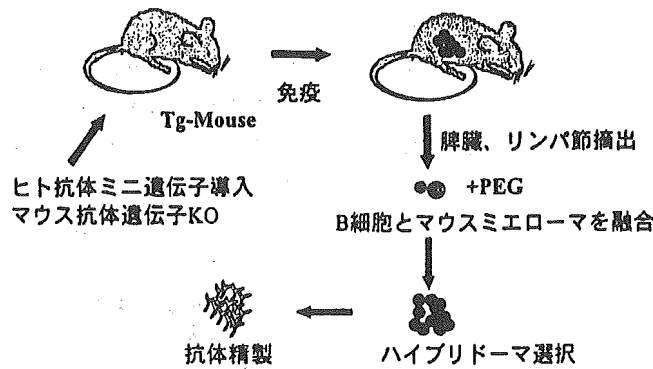


Fig. 5 トランスジェニックヒト抗体技術  
(文献 127 より許可を得て転載)

したヒト抗体産生マウスから通常のハイブリドーマ法によりヒトモノクローナル抗体を作成する。また、抗原を接種したヒト抗体産生マウスの抗体産生細胞を胸腺から分離し、抽出した遺伝子を CHO 細胞に導入しヒト抗体を産生させる技術も開発されている (Fig. 6)。本法により IL-8, EGFR, TNF- $\alpha$ , CD4 などに対するヒト抗体が得られている。しかしながら、本法では用いるベクターにクローン可能な DNA 長は通常数 kb から数百 kb であり、ヒト抗体遺伝子の全長 (H 鎖 1.5 Mb, L 鎖  $\times$  2 Mb, L 鎖  $\lambda$  1 Mb) を入れることはできない。また、ヒト抗体の一部 (IgG の C 領域) はコスミド, BAC (バクテリアの人工染色体), YAC (酵母の人工染色体) にはクローン化できない。

一方、ヒト Ig 遺伝子において例えば、H 鎖の場合、14 番染色体上の約 1Mb にわたってクラスターを形成している約 80 種の V 断片, 約 30 種の D 断片, 6 種の J 断片が様々な組み合わせされた VDJ エクソンが抗原結合部位をコードするが、この過程 (VDJ 組換え) が抗体の多様性に大きな役割を果たしている (Fig. 7)。L 鎖  $\times$  (2 番染色体, 約 2 Mb), L 鎖  $\lambda$  (22 番染色体, 約 1 Mb) 遺伝子についても同様である。したがって、本法ではヒトで観察されるものと同様に多様な抗体レパートリーをマウスで再現するには限界があった。

1.3.2 KM マウス

このような問題を解決するためキリンビール社は以下のようにしてヒト抗体重鎖及び軽鎖  $\kappa$  遺伝子の全種類を導入したヒト抗体産生マウスを作製、ヒト抗体を産生することに成功した<sup>19)</sup> (Fig. 8)。ま

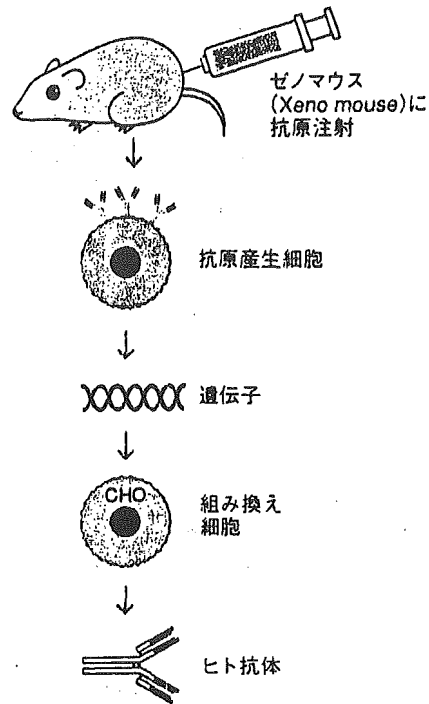


Fig. 6 アブジェニックス社のヒト抗体作製技術 (文献 123 より許可を得て転載)

ず、ヒト-マウスハイブリッド細胞の独立クローンからなるライブラリーをスクリーニングし、Ig 遺伝子を含むヒト染色体自然断片 (human chromosome fragment; hCF) のなかで H 鎖: 14 番染色体由来と L 鎖  $\kappa$ : 2 番染色体由来を選抜する。選択細胞を 48 時間程度コルセミド処理することにより 1~数本の染色体が取り込まれた核膜構造体であるマイクロセルを形成させた。マイクロセルにサイドカラシン B を加えて遠心分離して脱核させ、染色体が 1 つ 1 つ

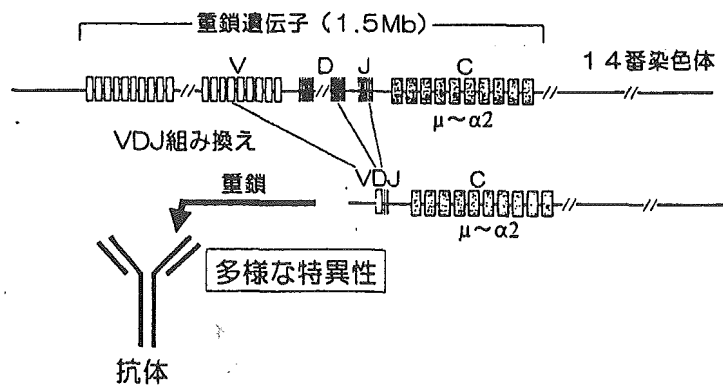


Fig. 7 ヒト抗体重鎖遺伝子の構造と VDJ 組換えによる多様性生成 (文献 124 より許可を得て転載)

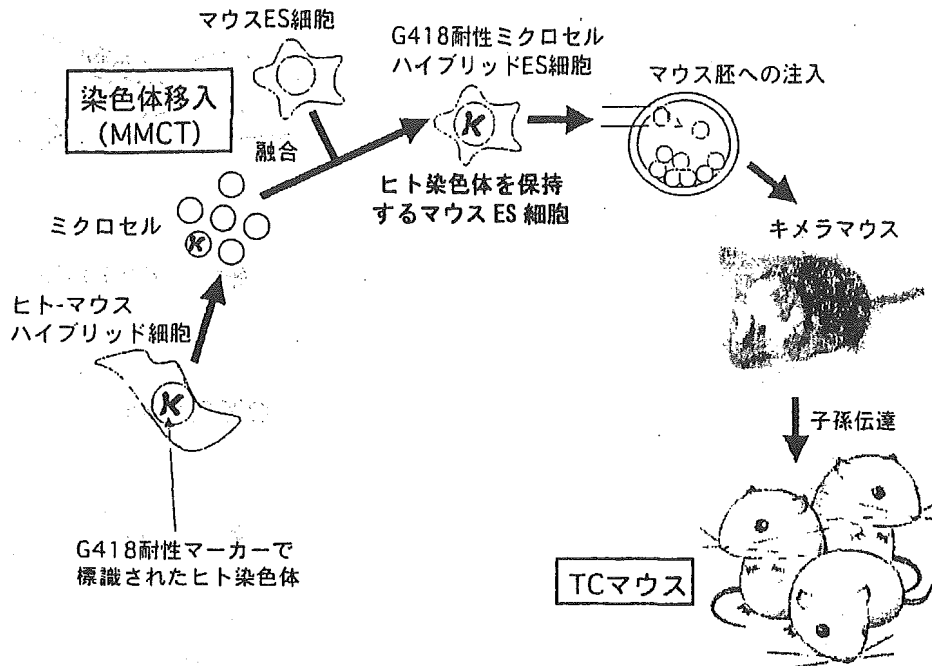


Fig. 8 トランスクロモマウス作成法の概略  
(文献 124 より許可を得て転載)

核膜，細胞膜に包まれたマイクロセルを分離する。単離したマイクロセルと染色体受容細胞（マウス ES 細胞）をポリエチレングリコールで融合する。このような一連の操作はマイクロセル融合法と呼ばれる。融合細胞を 8 細胞期受精卵に注入して，擬似妊娠雌マウスの子宮へ移植する。得られたキメラマウスは ES 細胞由来の体細胞においてヒト染色体断片を保持し，導入したヒト染色体上のヒト遺伝子を組織特異的に発現させることができる。このようにヒト染色体をもつトランスジェニックマウスはトランスクロモマウス (TC マウス) と呼ばれる。更に，ヒト抗体 H 鎖遺伝子を含む 14 番染色体断片を保持する TC マウス，ヒト抗体 L 鎖  $\kappa$  遺伝子を含む 2 番染色体断片を保持する TC マウス，内在性マウス抗体重鎖遺伝子を破壊したマウス (KO マウス)，内在性マウス抗体軽鎖  $\kappa$  KO マウスを交配することにより，4 つの形質をすべて保持するヒト抗体を作るダブル TC/KO マウスが作成された<sup>20)</sup> (Fig. 9)。このヒト抗体産生マウスは，ヒト抗原を免疫することにより抗原特異的なヒト抗体 (IgG) 力価が上昇し，その脾臓から抗原特異的なヒト IgG を産生するハイブリドーマ取得された。しかし，そのハイブリドーマ取得率は，正常マウスの 10%程度

であり，その原因はヒト第 2 染色体の保持率が ES 細胞及び体細胞において低いことによる (Table 3)。

一方，Medarex 社のヒト抗体産生マウス (HuMab) はヒト Ig $\kappa$  鎖遺伝子の 50% を含むが，重鎖遺伝子は 10% 程度しか含まないため，抗原に対する応答性が必ずしもよくないという問題点があった<sup>21)</sup> (Table 3)。ヒト Ig $\kappa$  鎖遺伝子については，一種の可変領域クラスターが倍化した構造のため，一方のクラスター (50%) を含む HuMab マウスにおいても，100% 含む場合と比較して遜色のない  $\kappa$  鎖の多様性が生み出されていると考えられる。更に，HuMab マウスにおいては，Ig $\kappa$  鎖を含む酵母染色体ベクター (Ig $\kappa$ -YAC) がマウス染色体 DNA に挿入されているため，安定に保持される。そこで，ダブル TC/KO マウスの不安定な hCF2 の代わりに Ig $\kappa$ -YAC を導入するという改良がなされた<sup>22,23)</sup>。実際には，ダブル TC/KO マウスをヒト抗体 L 鎖  $\kappa$  領域全域の 50% を含んでいる Medarex 社の HuMab マウスと交配させ，ヒト 14 番染色体断片とヒト軽鎖  $\kappa$  トランスジーンとを保持する KM マウス (Kirin-Medarex マウス，KM マウス<sup>TM</sup>) が作成された (Fig. 10)。作成された KM マウスを用いたハイブリドーマの取得率，得られた抗体の特異性

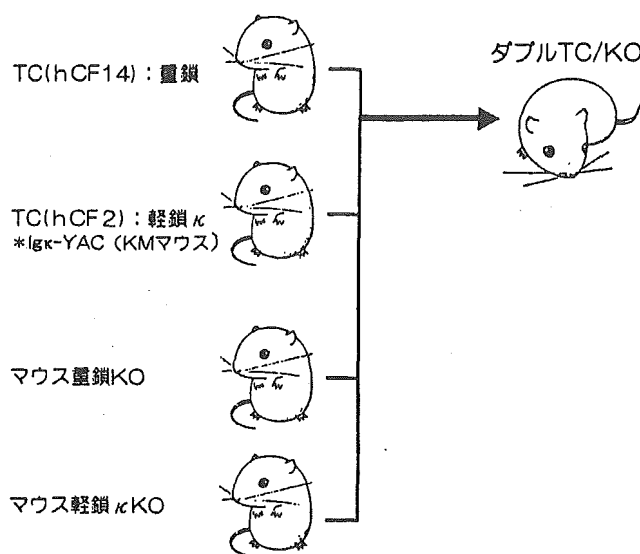


Fig. 9 ヒト抗体産生マウス (ダブル TC/KO) の作製  
(文献 124 より許可を得て転載)

Table 3 ヒト抗体マウスの改良

	KM マウス (Kirin/Medarex 社)	TC マウス (Kirin)	HuMab マウス (Medarex 社)	通常マウス
重鎖遺伝子	ヒト V <sub>H</sub> (81) 全種類	ヒト V <sub>H</sub> (81) 全種類	ヒト V <sub>H</sub> (4)	マウス V <sub>H</sub> 全種類
軽鎖 κ 遺伝子	ヒト V <sub>κ</sub> (38) 全種類	ヒト V <sub>κ</sub> (76) 全種類 × 2	ヒト V <sub>κ</sub> (38) 全種類	マウス V <sub>κ</sub> 全種類
定常領域 サブクラス	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1	マウス定常領域 すべて
安定性	OK	軽鎖 2 番染色体断片が 不安定	OK	OK
ハイブリドーマ 取得効率	よい	ハイブリドーマが不安定なため, 取得効率低下	V <sub>H</sub> が少数のため, 抗原への反応性弱い	よい

(文献 24 より許可を得て転載)

は、通常のマウスを用いた場合と比較して遜色ない結果が得られている (Table 3)。

### 1.3.3 KM マウスの品種改良

#### 1.3.3.1 KM (FcγRIIb-KO) マウス

免疫するヒト抗原によってはアミノ酸配列あるいは立体構造上、マウスのものと非常に近いか、同一である場合、抗体が得られにくいことがある。そのような場合に対処するため、自己抗体を産生する FcγRIIb-KO マウスの形質を入れた KM (FcγRIIb-KO) マウスも作成されている<sup>24,25)</sup>。

IgG の Fc 領域と結合する Fc 受容体である FcγRIIb は immuno tyrosine inhibitory motif (ITIM) を細胞質に持つ膜タンパク質である。過剰な抗原・

抗体複合体の IgG Fc 領域が B 細胞上の活性化シグナルを入れる Fc 受容体 (FcγRI) と同時に抑制性シグナルを入れる FcγRIIb と結合すると、B 細胞への活性化シグナルは遮断され、B 細胞にアポトーシスが誘導され、過剰な抗体産生が抑制される (Fig. 11)。そこで、寛容が打破された FcγRIIb-KO マウスの形質を KM マウスへ導入するため、交配を行い、KM (FcγRIIb-KO) マウスが作製された。このマウスをウシコラーゲンタイプ IV で免疫し、ウシとマウスのコラーゲンに共通のエピトープ (抗原決定部位) に反応するヒト抗体の有無が調べられた。通常の KM マウスではマウスコラーゲンに反応するヒト IgG 抗体は血清中に観察されな



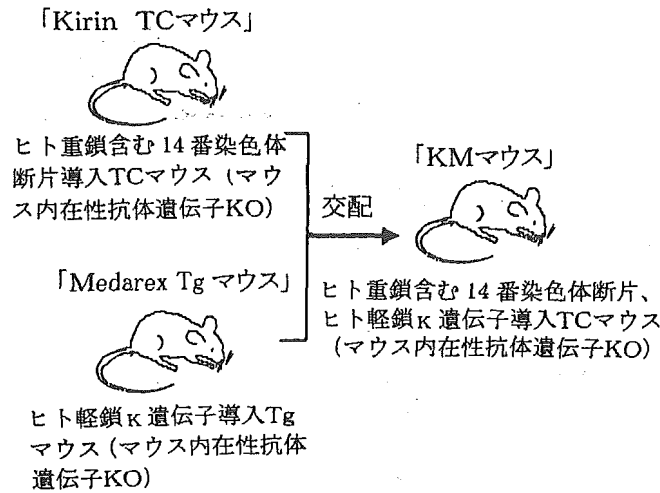


Fig. 10 KM マウスの作製  
(文献 128 より許可を得て転載)

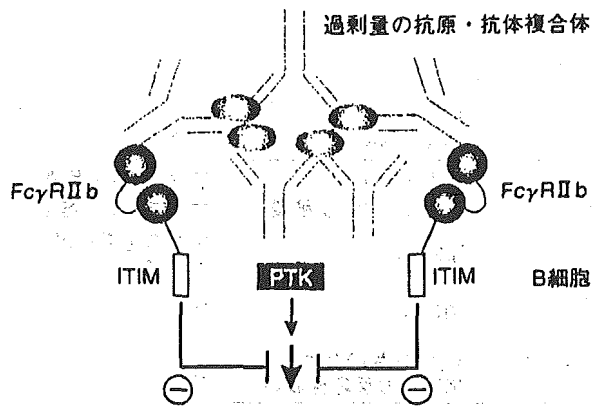


Fig. 11 FcγRIIb の機能  
(文献 24 より許可を得て転載)

かった。一方、KM (FcγRIIb-KO) マウスではマウスコラーゲンに結合する抗体を生産するハイブリドーマが得られた。

#### 1.3.3.2 H-2D 導入 KM マウス

細胞表面の膜タンパク質を認識するモノクローナル抗体を取得する場合には、ヒト組換えマウス細胞を免疫する方法が用いられる。その際マウスに主要組織適合抗原複合体が異なるマウス細胞を注入すると、強い免疫反応が引き起こされる。このような場合には、免疫原となる組換えマウス細胞と KM マウスの遺伝的背景 (バックグラウンド) を一致させることが望ましい。通常の KM マウスは、H-2k (C3H) と H-2b. (C57BL/6) のミックスバックグラウンド

であるが、場合によっては H-2d (Balb/c) のバックグラウンドの入った KM マウスも望まれる。そこで、Balb/c マウスとの交配により、H-2d 形質の入った雑種マウスである KM (H-2d) も作製されている<sup>25)</sup>。

#### 1.3.4 HAC マウス

ヒト 2 番染色体の保持率低下を克服する方法として他のアプローチも試みられている。それは軽鎖遺伝子を安定な 14 番染色体断片上に組み込み、ヒト人工染色体 human artificial chromosome (HAC) を作成する方法である。そこで、テロメア配列を挿入することでヒト染色体を任意の部位で切断する方法を確立し<sup>26)</sup>、更には染色体上に loxP 配列を組み込み、Cre リコンビナーゼを作用させることでヒト 14 番染色体上にヒト 22 番染色体断片を転座させ、ヒト重鎖遺伝子とヒト λ 鎖遺伝子を 1 つの染色体にもつ HAC が作成された<sup>27,28)</sup> (Fig. 12)。実際には、ヒト 14 番染色体由来 hCF20 を保持する DT40 細胞において、相同組換えにより loxP 配列が SC20 上の RNR2 遺伝子座に導入された (DT40/SC20)。この loxP 部位は様々なヒト染色体を転座させるための、いわばクローニングサイトといえる。クローニングするヒト染色体領域としては、ヒト 22 番染色体上の Igλ 鎖遺伝子周辺 10Mb が選ばれた。インタクトな 22 番染色体を保持する DT40 細胞において、ヒトテロメアリピード配列を相同組換えにより LIF 遺伝子座に挿入すると、この部位に新たな

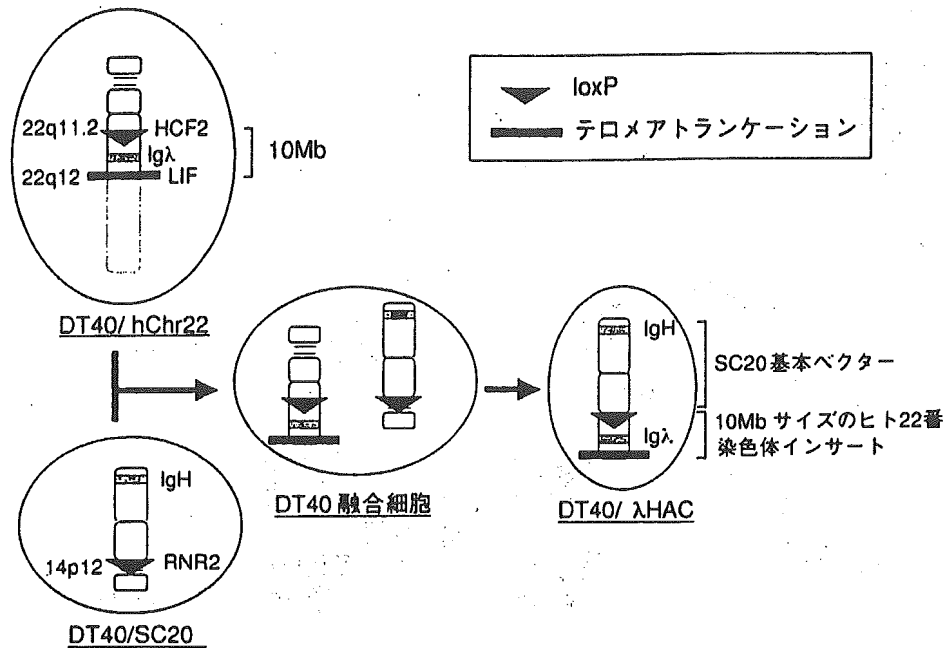


Fig. 12 ヒト人工染色体 (HAC) 構築法の概略  
(文献 124 より許可を得て転載)

テロメアが生成した短い染色体が得られる。続いて loxP 配列を相同組換えにより HCF2 遺伝子座に挿入した (DT40/hChr22)。次に SC20 保持 DT40 細胞と 22 番染色体保持 DT40 細胞とを融合して 2 本のヒト染色体断片を保持する DT40 融合細胞が作製された。この DT40 細胞に Cre 組換え酵素発現ベクターを導入すると、2 種の染色体断片の組換えによる転座が起こる。こうして得られた HAC ( $\lambda$ HAC) は前述の TC マウス作成と同様にしてマウス ES 細胞に導入され、HAC を持つキメラマウスが作成された。同じ染色体断片由来の 10 Mb 領域を含む  $\lambda$ HAC は 1 分裂あたり 99.8% という非常に高い安定性を示した。この安定性は基本ベクター SC20 と同等であり、染色体クローニングにより不安定な hCF 由来の染色体領域を安定化できることが示された。更に、キメラマウス血清においては、ヒト Ig 重鎖、 $\lambda$  鎖タンパク質が共に検出されただけでなく、免疫したキメラマウスから抗原特異的なヒトモノクローナル抗体 (ヒト IgG 及びヒト IgM からなる) を分泌するハイブリドーマも取得されている。

### 1.3.5 HAC ウシ

以下のようにして  $\lambda$ HAC 保持クローンウシ (ヒ

トポリクローナル抗体産生ウシ) も作製されている<sup>29,30)</sup> (Fig. 13)。

$\lambda$ HAC 含有 CHO 細胞から前述のマイクロセル融合法により、 $\lambda$ HAC をウシ繊維芽細胞に導入する。この  $\lambda$ HAC 含有ウシ細胞の核をあらかじめ除核したウシ未受精卵へ核移植し、この再構築胚を発生させ、 $\lambda$ HAC ウシ胎児を作製する。ある程度成長させた後、この胎児から繊維芽細胞を大量に調製し、 $\lambda$ HAC ウシ細胞バンクを作製する。この細胞バンクから再度、未受精卵に核移植する作業を大規模に繰り返す、HAC 保持クローン牛を作製する。

このようにして作製されたクローンウシ胎児において HAC ベクター上のヒト抗体遺伝子の発現を調べた結果、内在性ウシ抗体遺伝子と同調して、脾臓などのリンパ組織特異的にヒト抗体 H 鎖 (IgH)・ $\lambda$ L 鎖 (Ig $\lambda$ ) 遺伝子の発現が確認された。更に、生まれたクローン仔ウシを詳細に調べた結果、 $\lambda$ HAC ベクターは 8 割以上のウシ体細胞 (繊維芽細胞及び末梢血リンパ球) において安定に維持され、末梢血リンパ球においては、多種多様なヒト抗体 H 鎖 (IgH)・ $\lambda$ L 鎖 (Ig $\lambda$ ) 遺伝子が機能的な組換えを起こし、発現していることが明らかになった。

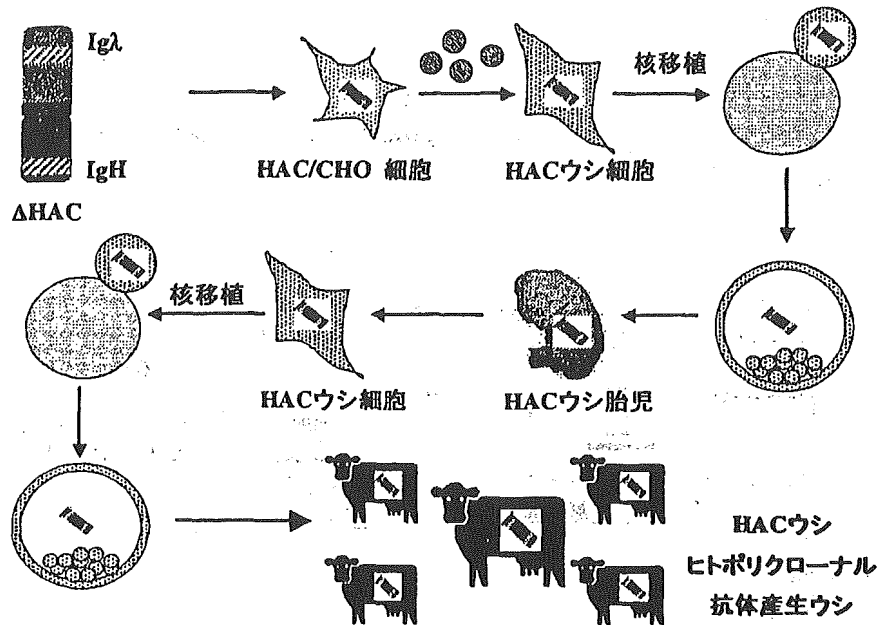


Fig. 13 ヒトポリクローナル抗体産生 (HAC) ウシの作成法  
(文献 129 より許可を得て転載)

#### 1.4 糖鎖改変抗体

この技術は CHO 細胞で抗体を生産する時に、糖鎖にフコースが結合するための触媒として必要な Fut8 という酵素遺伝子をノックアウトして発現させなくすることで、フコースのついてない抗体を作成するものである。協発酵で開発され、バイオワ社のコア技術となっている。

医薬品として開発されている抗体のほとんどは約 150 kDa の IgG 型であり、H 鎖 L 鎖それぞれの二量体より構成され、Fc 部分の C<sub>H</sub>2 領域にアパラギン結合型のコンプレックス型糖鎖を持つ糖タンパク質である。抗体の糖鎖は共通のコア部分をもつが、末端の修飾が異なる 30 種類以上のオリゴ糖の混合物である。彼等と Genetic のグループはこの糖鎖の付け根に付いているフコースがなくなると後述する抗体依存性細胞障害活性 antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性が動物レベルで 100 倍上昇することを見出した<sup>31,32)</sup> (Fig. 14)。糖タンパク質において糖鎖は、フォールディングしたタンパク質の回りをゆるやかに包み込むように修飾していると一般的には考えられている。しかしながら、抗体の Fc 領域に結合している糖鎖は Fc 領域のタンパク質の内部に埋め込まれて存在し<sup>33)</sup>、

Fc レセプターとの結合には直接関与しないが<sup>34)</sup>、Fc 領域のタンパク質の構造には影響を与えていることが推定されている<sup>35,36)</sup>。抗体の Fc 領域に結合している糖鎖からフコース残基を除去すると、エフェクター細胞膜上の Fc レセプタータイプ III a との結合に適するように Fc 領域の立体構造が変化し、その結果として高い ADCC 活性が誘導されると考えられる。

#### 1.5 その他

ヤギや植物にヒト抗体を生産する技術<sup>37,38)</sup>、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術<sup>39)</sup>なども開発されている (Table 4)。

## 2. 抗体医薬品の特徴

### 2.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体、ヒト化抗体においてはマウス由来のアミノ酸配列の減少により、抗原性は著しく減弱し、実用的な抗体医薬品の開発が可能となった。キメラ抗体、ヒト化抗体は現在開発中の抗体の約 50% 強を占めている。しかしながら、依然抗原性の問題は残されている。キメラ抗体においてフレームワークを含む可変領域は、抗原性を残しており、多くの場合投与した患者の 2 割以上に human anti-chimera

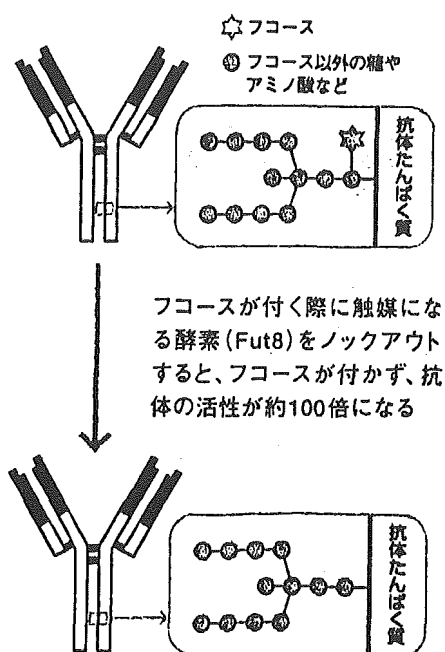


Fig. 14 フコースの低減技術  
(文献 123 より許可を得て転載)

antibody (HACA) が出現する<sup>40,41)</sup>。ヒト化抗体においても、キメラ抗体ほどではないにしろ場合によっては human anti-human antibody (HAHA) が患者に出現する<sup>42~44)</sup>。この HAHA はマウス由来の CDR 配列に対するものであり、C 領域の多型性 (アロタイプ) や糖鎖によるものではない (Fig. 15)。このような HACA 及び HAHA 反応が強く起こる

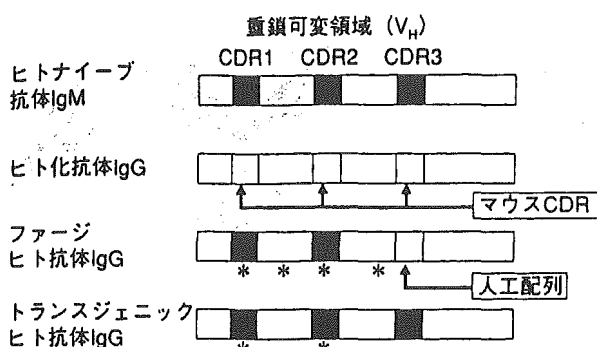


Fig. 15 HAHA の問題  
ヒト由来のナイーブ抗体 IgM 重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) とヒト化抗体, 模式的に点変異箇所 (ポイントミューテーション) を \* で示した。  
(文献 131 より許可を得て転載)

と、投与された抗体医薬品の効果が減弱されるばかりではなく、アナフィラキシーショックが起こる可能性がある。また、ヒト化抗体技術は、それぞれのマウスモノクローナル抗体に対して個別にデザインし、遺伝子組換え体を作成する必要があると共に、そのデザインによってはマウスモノクローナル抗体に比べて親和性が低下する場合がある。

2.2 ファージディスプレイヒト抗体

ファージディスプレイヒト抗体はヒト抗体の V 遺伝子をランダムに組み合わせさせて結合させ、それがそのまま *in vitro* での免疫系を再現するため、免疫学的な自己と非自己の選別過程を経ることがない。

Table 4 抗体医薬の製造技術

システム	抗体の型	回収源
トランスジェニック動物		
マウス	IgG	乳汁
ヤギ	IgG	乳汁
ニワトリ	IgG	卵
植物		
タバコ	sIgA, IgG	葉
メイズ (トウモロコシ)	IgG	種子
大豆	IgG	さや, 種子, 幹, 葉
米	scFv	種子
小麦	scFv	種子

(文献 130 より許可を得て転載)

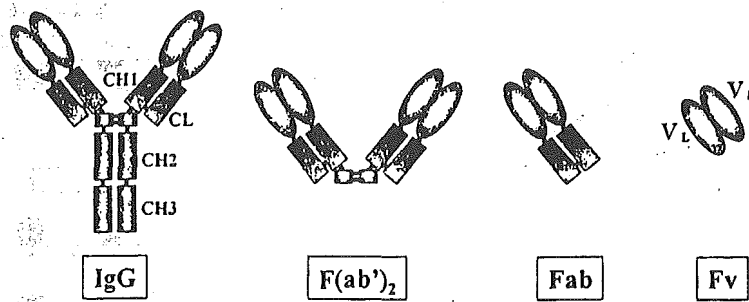


Fig. 16 各種抗体断片

(文献 132 より許可を得て転載)

すなわち、いわゆる免疫学的に禁止クローンとよばれる自己抗体はもちろん、これまで血清抗体中やハイブリドーマ作製では見出すことのできなかった特異性を示す抗体が取得できる可能性がある。抗体は scFv あるいは Fab の形態で得られることから (Fig. 16)、医薬への応用を考えた場合、完全抗体分子型への変換が必要となる場合がある。しかし、scFv の完全抗体への転換は、ADCC 活性などの抗体の Fc エフェクター機能を期待する場合には必須であるが、単にアンタゴニストとしての抗体の機能には、異なる 2 種の scFv において  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインを相互に連結した二量体である Diabody や scFv でも十分である。更にこれらの分子種は、分子量が小さいため組織浸潤性が高く、特に Diabody は体内での安定性が比較的高いといったメリットもある。

得られた抗体はファージ上で g3p や g10p との融合タンパク質として発現していることから、可溶性でかつ機能を有して発現できるとは限らない。特に scFv の場合には、不溶性粒子 (封入体) を形成したり、分泌発現しても scFv 単独で安定な構造を取らず、重合体を形成するなど、また Fab の場合には発現量が極めて少ない場合がある。医薬品への応用に際しては、ADCC などの抗体の Fc エフェクターを期待するなど、より機能を高める必要がある場合、完全抗体分子型への変換が必要となる。scFv から Fab あるいは完全分子型の変換では、70% 以上の確率で同様の特異性をもつ抗体分子が得られ、Kd 値は数倍～数十倍向上することが報告されているが<sup>45)</sup>、報告例は少ない。その原因として宿主発現系も大腸菌から CHO などの動物細胞へと大きく変化することも考えられる。フェーズ III 臨床段階にある

ファージディスプレイ抗体として D2E7 (TNF 抗体) がある。2001 年 12 月に行われた IBC 国際抗体会議で、リウマチ患者への臨床試験結果が発表されたが<sup>46)</sup>、そのなかで免疫抑制剤のメトトレキサートとの併用でも、三人の患者に HAHA の出現が報告された。これは CDR3 の部分に人工の配列を入れていることに加えて、PCR による変異が CDR 以外の部分にも入ることが原因かもしれない (Fig. 15)。また、抗体によっては、Fab 化することにより、活性が消失するものもある。これらの scFv 抗体は、Diabody によって抗体活性が保持されており、単量体では活性が保持できず、Fab 化あるいは完全抗体への変換は困難である。

### 2.3 トランスジェニックヒト抗体

ヒト抗体産生マウスを用いたヒトモノクローナル抗体の利点として、完全なヒト抗体分子が細胞融合法という比較的簡便な方法で得られることが一番の特徴である。目的の抗原で自由自在に強力な免疫をすることができ、目的のクローンに当たる確立は高く、親和性についても十分に高い抗体を選別できることが推定される。細胞融合後に、通常は抗原に結合する抗体を選択するが、適当なアッセイ系があれば、多数のハイブリドマクローンから目的とするクローンを直接選び出すことができる。また、ヒト抗体の特徴として強い結合性が得られやすいということも特徴である。例えば、細胞膜上に存在するレセプターやウイルスなどに存在する、繰り返し構造をもつ抗原に対して強い結合性を得るには抗体が 2 価で結合することが望ましい。抗体の 2 つの部位が同じ抗原分子と反応できると、最初の部位が抗原と結合した場合、抗原分子が非常に近くにきているため、2 番目の部位は最初の部位よりはるかに速く反

応し、見かけの親和力は Fab に比べて、2 価の IgG 分子では  $10^4$  倍になると試算されている。また、ヒトに対して抗原性がより低い可能性もある。トランスジェニックヒト抗体はヒト由来のナイーブ抗体 IgM の V 領域と比べて同様な V 遺伝子の使われ方<sup>19,21)</sup>、同様な CDR 3 領域のヌクレオチドの欠失、挿入の入り方が見られる<sup>21)</sup>。また、トランスジェニックヒト抗体 IgG の体細胞変異は、主に CDR あるいはその境界にみられ (Fig. 15)、アミノ酸レベルでは 0~7 箇所程度 (重鎖 V 領域) である<sup>21)</sup>。したがって、トランスジェニックヒト抗体はマウス-ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、ファージディスプレイヒト抗体に比べてよりヒト由来抗体に似ており、理論上はヒトに対して抗原性がより低いと考えられる。従来型ベクターによる第一世代のヒト抗体産生マウス<sup>18,21)</sup>を用いて作成されたトランスジェニックヒト抗体の幾つかは、現在臨床試験段階 (フェーズ I, II) にある。未だ臨床例数が少ないこともあるが、現在のところ HAHA は報告されていない。本法について、前述したように、次々と技術的改良が加えられ、多様性の高いヒト抗体をより高い作成効率で得られるようになった。

まだ基礎的な段階であるが、今後注目されるのは、ポリクローナルなヒト抗体を産生できる  $\lambda$ HAC 牛である<sup>29,30)</sup>。特に、細菌ウイルス感染症などの治療においてはモノクローナル抗体では限界があるため、ポリクローナル抗体医薬の必要性は高まる可能性がある (Fig. 17)。1 種類のモノクローナル抗体に比べて、ポリクローナル抗体には多種の抗体が含まれるため、1 つの抗原に結合できる抗体の数が多く、

効果が大きくなる。抗原が特定できない場合に多種の抗体を投与すれば、何らかの抗体が抗原に結合する可能性もある。実際多くの病院では、感染症にかかった患者がすぐに何の感染症にかかったかわからない場合が多い。感染源の細菌やウイルスが特定できない場合、多種の抗体を含むポリクローナル抗体のほうが医師には使いやすい。現在は、ヒト血液から分離した  $\gamma$ グロブリン製剤が感染症の治療に使われているが、この製剤は過去の病歴も様々な不特定多数の献血者に由来するため、抗原に結合する力にもばらつきが大きく、総じて効果は低い。したがって、特定の有害な病原菌に対する力価の高いポリクローナル抗体は有用と考えられる。もう一点はウシの場合乳に IgG が分泌されることから、製造に必要なコストを低くできる可能性があることである。HAC 導入ウシでは内在性のウシ抗体遺伝子が圧倒的優位に発現しており、ヒト抗体量はいまだわずかである。そこで、商業化のためにウシ抗体遺伝子を不活化した牛、並びに昨今の状況からウシ海綿状脳症 (BSE) の問題を回避するため、プリオンをノックアウトしたウシも製造されている<sup>47)</sup>。

### 3. 抗体の生理活性機序

抗体は様々な作用機構を介して生理活性を発現する。そこで癌治療に応用されている抗体を例として代表的な作用機序をまとめた。

#### 3.1 腫瘍の生物活性に対する抗体の直接作用

アポトーシス誘導や成長因子に代表されるレセプター/リガンドを介したシグナル伝達に対する抑制作用などを指し、現在臨床に応用されている抗

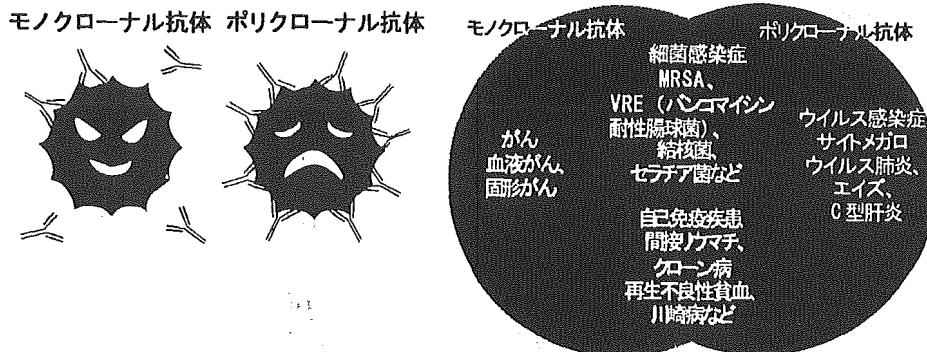


Fig. 17 モノクローナル抗体とポリクローナル抗体における効力の比較  
(文献 123 より許可を得て転載)

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<sup>49)</sup>。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<sup>49)</sup>。

### 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<sup>50,51)</sup>。

## 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<sup>52)</sup>。その後、IDEC-2B8 の可変部領域とヒト IgG1<sub>κ</sub> 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<sup>52)</sup>。

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

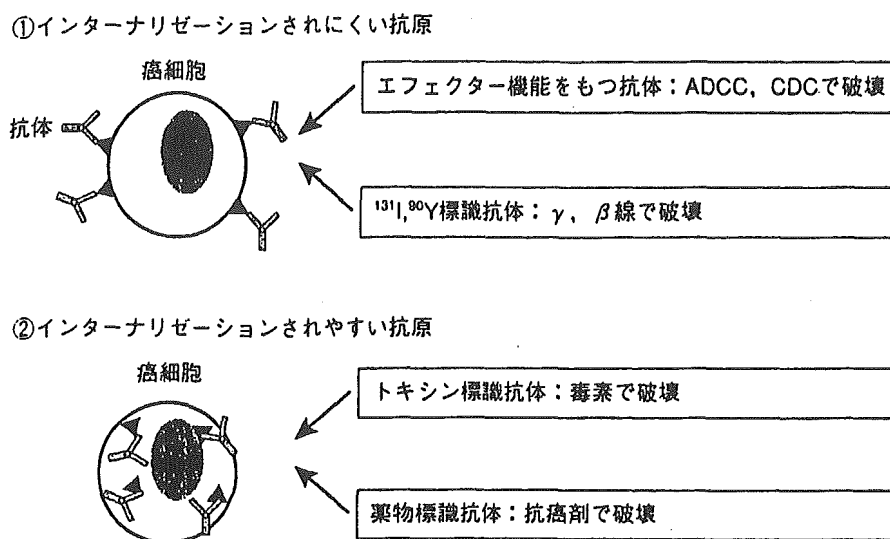


Fig. 18 抗体を用いたミサイル療法  
(文献 122 より許可を得て転載)

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<sup>53)</sup>。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<sup>54)</sup>。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

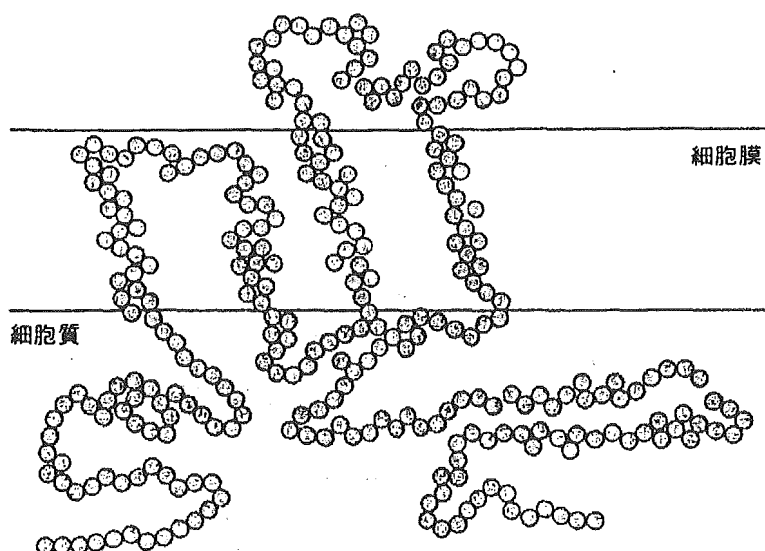


Fig. 19 CD20 抗原の模式図  
(文献 133 より許可を得て転載)



性リンタンパク質であり、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<sup>55)</sup>。

#### 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ツ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<sup>56)</sup>。本剤を再投与した症例の奏効率は、初回より低い、40% 弱で time to progression (TTP) も少し短縮した<sup>57)</sup>。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%)<sup>58)</sup>、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<sup>59)</sup>。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<sup>60)</sup>。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  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) 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<sup>61-65)</sup>。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  $\beta$  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<sup>66)</sup>。したがって、約 95% はヒト IgG1 が残っているので、

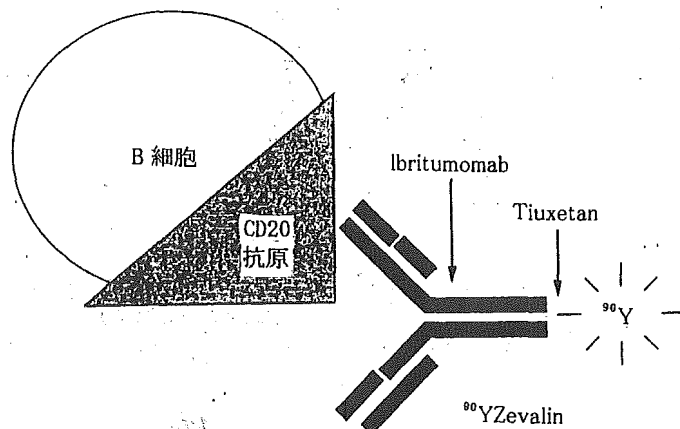


Fig. 20  $^{90}\text{Y}$  を抱合した抗 CD20 放射性元素標識抗体である ibritumomab の模式図

(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<sup>67)</sup>。

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<sup>68-71)</sup>。EGFR ファミリーのうち Erb-1, Erb-3, Erb-4 は New-activating factor (NAF), TGF- $\alpha$ , 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<sup>72)</sup>。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<sup>73,74)</sup>。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<sup>73,75)</sup>。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<sup>76)</sup>。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<sup>77,78)</sup>。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<sup>KIP1</sup> 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<sup>79)</sup>。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<sup>80)</sup>。

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<sup>81)</sup>。第 III 相で、パクリタキセルの

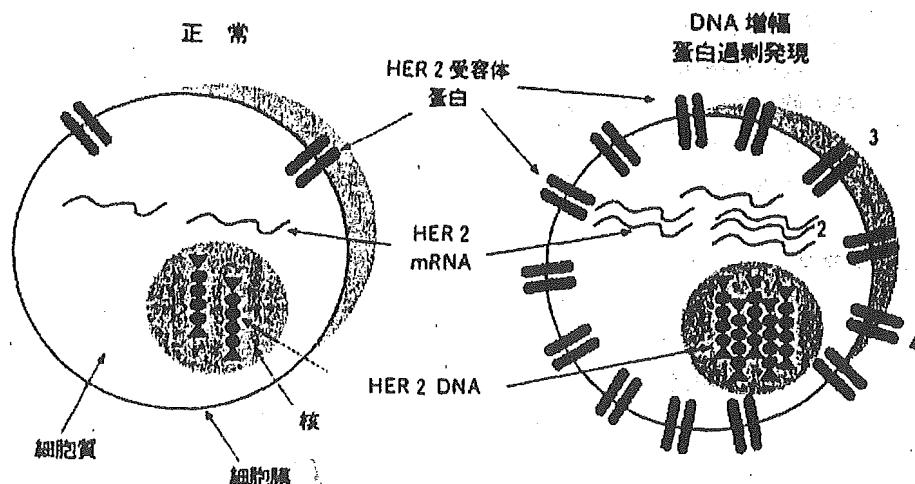


Fig. 21 正常範囲と HER2 過剰発現ガン細胞

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<sup>81)</sup>。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<sup>82)</sup>。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<sup>83)</sup>。

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<sup>84)</sup>、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- $\alpha$ 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- $\alpha$ が中心的な役割を演じていることがわかってきた<sup>85)</sup>。そこで、TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 、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- $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカインやIL-8、MIP-1 $\alpha$ 、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- $\alpha$ がIL-1 $\beta$ 、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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ の関連性が示唆された。また、TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 、膜結合型細胞表面TNF- $\alpha$ のいずれにも結合能を有し、TNF- $\alpha$ 受容体に結合したTNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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<sup>86)</sup>。また、TNF- $\alpha$ 産生細胞の細胞膜上に存在する膜型TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 産生細胞を傷害し、TNF- $\alpha$ の産生自体の低下作

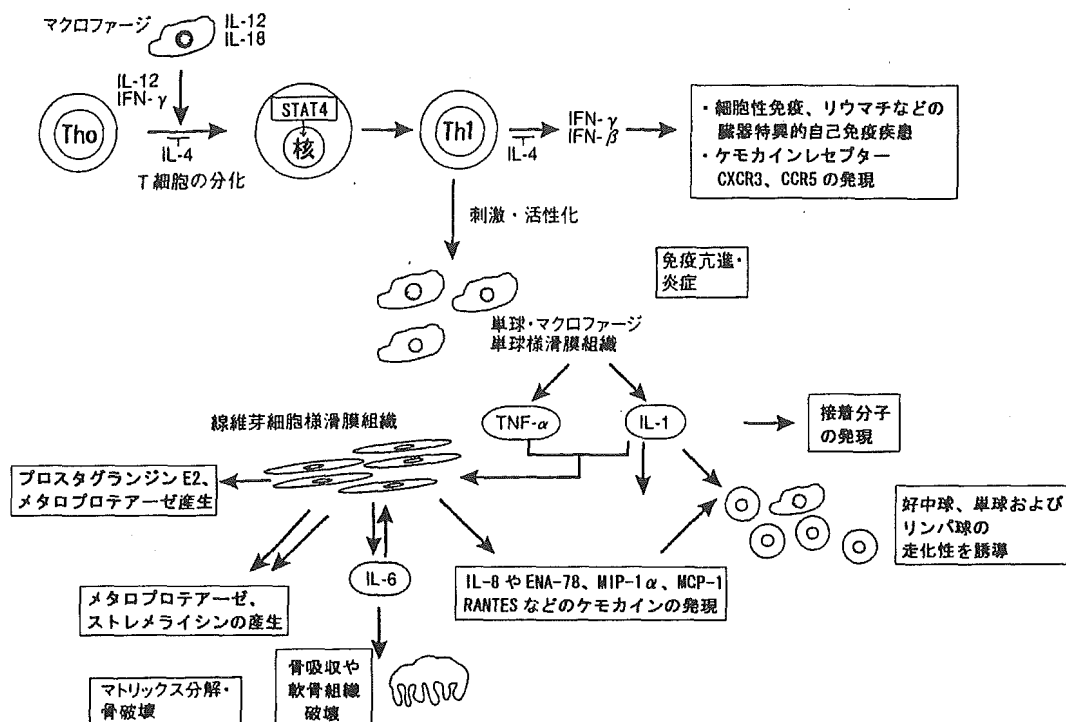


Fig. 22 慢性関節リウマチ発生の機序  
(文献 135 より許可を得て転載)

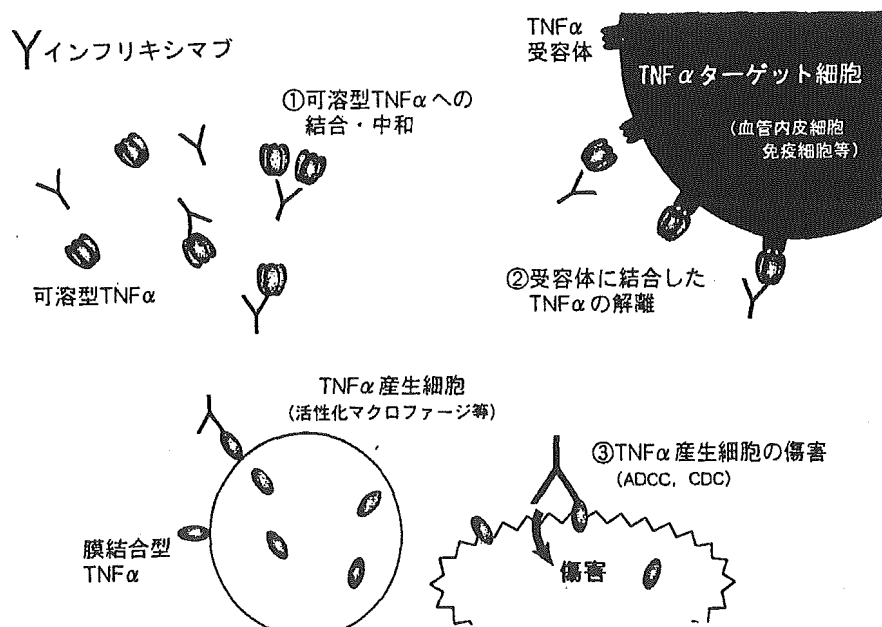


Fig. 23 インフリキシマブの作用機序  
(文献 136 より許可を得て転載)