

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ること、また原料供給不安定による製品不足の可能性があること、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 アダリムマブ

アダリムマブは、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 マイロターグ

マイロターグ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、マイロターグ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 抗体のみ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、マイロターグは 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

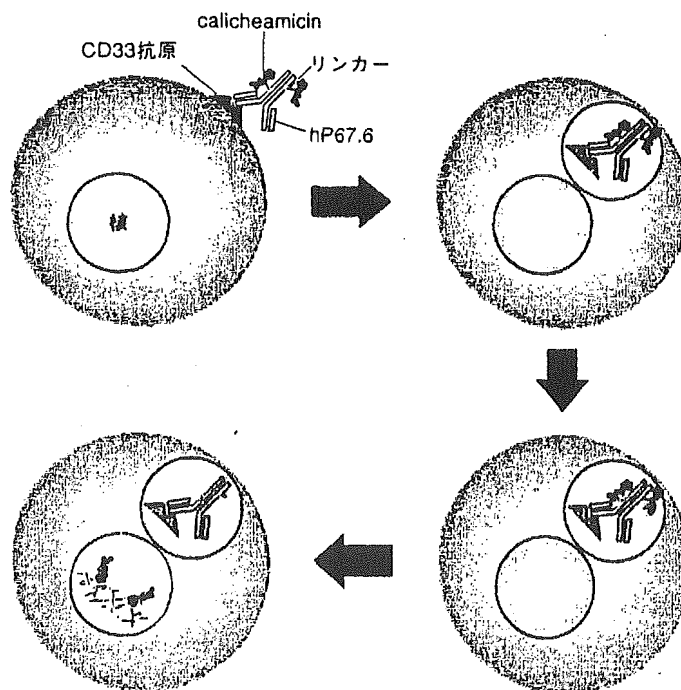


Fig. 24 マイロターグの細胞傷害活性発現機序
(ワイス社より提供)

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

リポゾームを用いれば、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がある。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り、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、様々な企業が太陽菌、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効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法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: あいみっく, **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., Shirashi, 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., Kumagai, 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，トラスツツマブ（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) Scallon, 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., Tomimaga, Y., Sato, T., Watanabe, I., Inagaki, H., Kimata, T., Goto, K., Morozumi, K., Takeda, 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) 冨塚一磨, 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, 冨塚一磨, 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, 冨塚一磨, 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	+	-	+

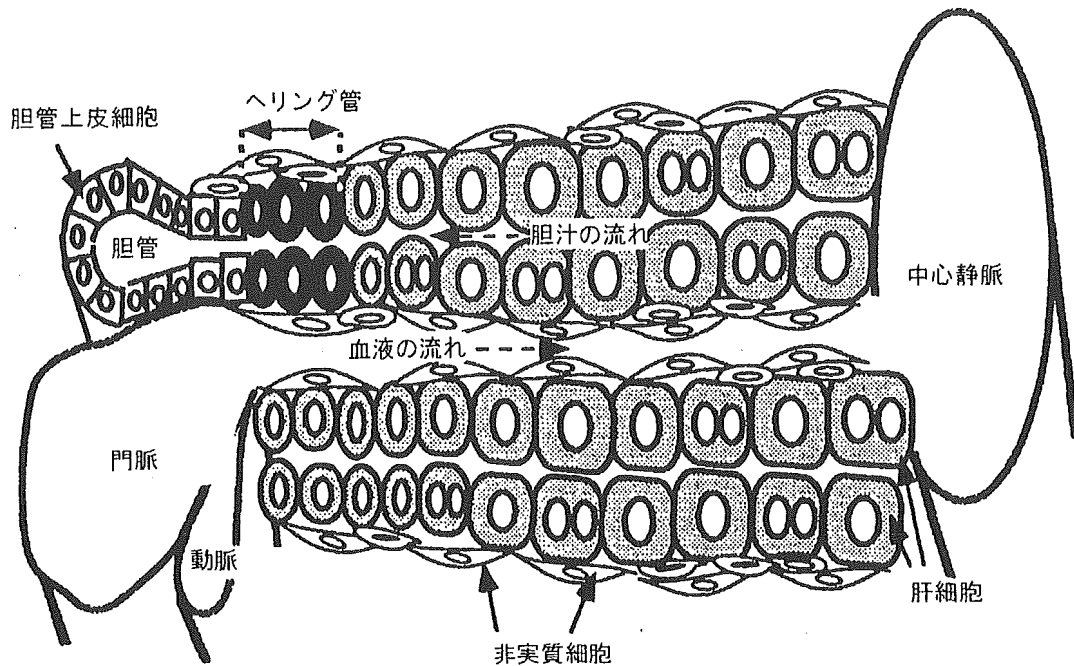


Fig. 1 ラット肝臓の模式図 (文献 144 より許可を得て転載)

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でかつ協調的な発現, 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イウムによる調節

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⁾。三次元コーラ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イウムで 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⁵⁾、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)

欠損の雌ラットに DPPIV 陽性雄ラットの骨髄細胞を移植し、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 11 日目に DPPIV 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 DPPIV 陽性の肝細胞が検出された。最後に、L21-6 陽性 Lewis ラットの肝臓を MHC クラス II 抗原 L21-6 陰性の Brown-Norway ラットに移植した。その結果、肝障害後移植臓器の胆管は L21-6 陽性の細胞を含んでいたことから、胆管上皮の一部は循環骨髄細胞に由来していることが示された。

その後、骨髄細胞が肝細胞に分化することを示す様々な知見が以下のように得られている。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⁶⁵⁾。その結果、少なくとも 6 箇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% 存在することが明らかになり、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。ほぼ同時期に Alison ら⁶⁶⁾ と Thise ら⁶⁷⁾ はヒトにおいて骨髄由来の肝細胞の存在について以下に示す 2 つのアプローチを用いて証明した。まず、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓において、ドナー由来の細胞の存在を Y-染色体に特異的な DNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。次に、男性患者に移植され、その後病気の再発により除去された女性患者の肝臓における Y-染色体陽性細胞を調べた。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。

このような HSC のヒト肝臓への移植率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高い。例えば、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は最大 40% を占める⁶⁷⁾。G-CSF で動員させた CD34 陽性幹細胞を用いた研究では男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓における Y-染色体陽性細胞は 4~7% の割合で肝細胞に分化する⁶⁸⁾。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^{-/-}: 致死的なチロシン血症タイプ I) マウスに致死量のアイソトープを照射後 FAH 野生型である 10^6 個の未分画骨髄細胞を移植すると FAH 疾患が治癒される⁶⁹⁾。その際、造血能を維持するために必要である 2×10^5 個の FAH^{-/-}

骨髄細胞と共に移植する場合においては、わずか 50 個の精製 HSC (c-kit high, Thy low, Lin-, Sca-1⁺) だけで FAH 欠損を治癒できる。Bcl-2 トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞を野生型のレシピエントに移植し肝障害及び増殖を誘導すると、移植した骨髄由来細胞が肝細胞に分化する⁷⁰⁾。ラットにおいて骨髄由来肝幹細胞 “bone marrow-derived hepatocyte stem cell” (BDHSC) の分画が $\beta 2$ -ミクログロブリン陰性、Thy-1 陽性に基づいて同定されているが、BDHSC と胆汁鬱滞性肝細胞を半透明膜で分離して共培養すると、BDHSC 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⁷¹⁾。したがって、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。また、ラット肝実質障害のモデルの 1 つであるアリル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ことも明らかになっている⁷²⁾。

以下のように骨髄から分離した各種細胞が肝細胞へ分化することを示す知見も得られている。Schwartz らは正常ヒト、マウス、ラットの生後未発達の骨髄から multipotent adult progenitor cell (MAPC) を分離し、マトリゲル上で HGF 及び FGF-4 を添加し培養すると、肝細胞に特徴的な表現系、形態及び機能を有する細胞に分化することを明らかにした⁷³⁾。Lee らはヒト骨髄から分離した mesenchymal stem cell (MSC) を HGF, bFGF, ニコチンアミドを含む培地で培養後、オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で培養すると、肝細胞に特徴的な表現系、形態及び機能を有する細胞に分化することを明らかにした⁷⁴⁾。Sato らはヒト骨髄から分離した MSC をアリルアルコールにより障害された肝臓に直接移植すると、肝細胞に特徴的な表現系を有する細胞に分化することを明らかにした⁷⁵⁾。

2.2 造血幹細胞と肝細胞の細胞融合

Terada ら⁷⁶⁾ と Ying ら⁷⁷⁾ は別々に細胞融合の存在を示し、Y 染色体マーカーなどドナー遺伝子の有無に基づいただけでは分化転換を証明したことにならないと指摘した。Terada らは green fluorescence protein (GFP) トランスジェニックマウスの骨髄細胞をインターロイキン含有培地で胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) と混合培養すると、

GFP 陽性 ES 細胞が得られることを示した。この細胞は未分化な ES 細胞のマーカである Oct3/4, UTF-1 がともに陽性であったが、DNA ploidy を調べてみると 4 倍体 XXXY であり、ドナー側とレシピエント側の細胞が細胞融合を起こしていることが判明した。また、Ying らも同様な手法を用いてマウス CNS 細胞と ES 細胞における細胞融合を証明した。これら細胞融合に関する新知見から、次々に報告されてきた造血幹細胞の可塑性に疑問が投げかけられたのである。

その後、HSC から肝細胞の分化過程においても細胞融合の関与が報告された⁷⁸⁻⁸⁰。Wang ら⁷⁸と Vassilopoulos ら⁷⁹は雄の HSC を雌の肝臓に投与後増殖した肝細胞を FISH で解析すると、レシピエントの肝細胞の大部分が Y 染色体をもっていることを明らかにした。Alvarez-Dolado らは Cre-loxP システムを用いてレシピエントの肝細胞の大部分が Y 染色体をもっていることを明らかにした⁸⁰。なお、Cre-loxP システムとは loxP 配列を介してプロモーターと LacZ 遺伝子を導入した骨髓由来細胞を Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニック動物に移植すると、細胞融合により loxP 配列が Cre リコンビナーゼにより除去され LacZ が発

現するという手法である。しかしながら、これらの実験においては HSC の肝細胞への分化を過小評価している可能性もある。なお、HSC のうち肝細胞と融合する細胞は顆粒球-マクロファージ前駆細胞あるいは骨髓由来のマクロファージのような骨髓単核細胞であることも明らかになっている^{81,82}。したがって、移植した HSC のうち骨髓において骨髓単核細胞に分化した細胞が肝細胞と融合すると考えられる。本知見と対照的に、HSC は細胞融合することなく肝細胞へ分化するという報告もある^{75,83-85}。なお、細胞融合も含めた HSC が肝細胞に分化する機構を Fig. 2 において模式的に示す。

2.3 HSC の肝臓への生着に関与する因子

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以下のような因子が候補として考えられている。マウスにおいては Clq 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いる⁸⁶。したがって、障害を受けた肝臓に対して生着する HSC にこの受容体たん白質が発現していると考えられる。胆管/間質細胞は幹細胞遊走因子 “stromal derived factor-1” (SDF-1) を発現し、HSC がその受容体 CXCR4 を発現する⁸⁷。CXCR4

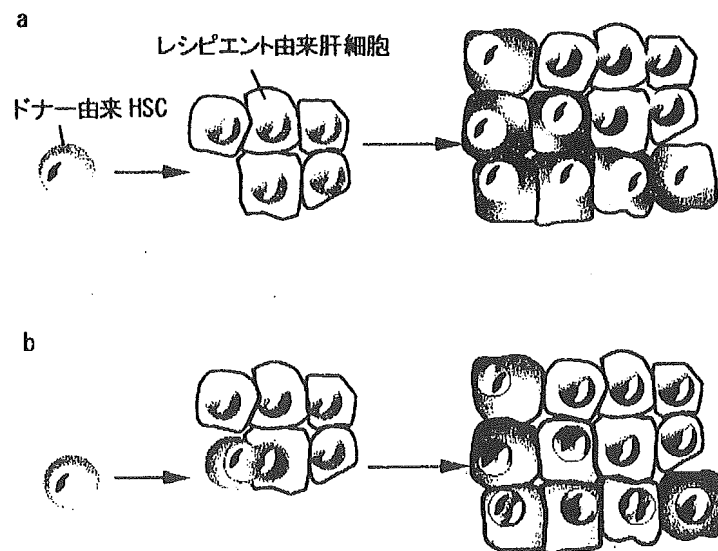


Fig. 2 HSC が肝細胞に分化する機構 a: ドナーの HSC がレシピエントの肝臓の微小環境で直接肝細胞に転換される。b: ドナーの HSC とレシピエントの肝細胞が融合する。(文献 145 を元に作製)

の抗体による中和あるいは SDF-1 の注入により、それぞれ HSC の肝臓へのホーミングが抑制あるいは促進される⁸⁸⁾。また、肝障害に伴い CXCR4 の発現が上昇し、SDF-1 を介した HSC の肝臓へのホーミングが促進される。したがって、SDF-1/CXCR4 システムは HSC の肝臓へのホーミングに重要な役割を果たしていると考えられる。この場合、HSC は CXCR4 を介して SDF-1 の走化性勾配に沿って移動し、肝臓の障害部位に運ばれるのかもしれない。

2.4 HSC の肝細胞への分化に関与する因子

HGF が *in vivo* 及び *in vitro* において HSC の肝細胞への分化を促進することが明らかになっている。ヒト臍帯血及び骨髓由来の精製した HSC を免疫不全マウスに移植後肝障害を起こすと、HSC の肝細胞への誘導が促進される⁸⁹⁾。その際、HGF を投与するとマウス肝臓におけるヒトアルブミン mRNA レベルがより顕著に増加する。ヒト臍帯血由来 HSC の培養において fibroblast growth factor/leukemia inhibitory factor/SCF/HGF の添加によりアルブミン mRNA は発現するが、それらの因子から HGF を除去すると顕著な発現低下がみられる⁹⁰⁾。HGF はラットの骨髓由来 HSC の培養系において肝細胞への誘導を促進する⁹¹⁻⁹⁴⁾。

3. その他の肝幹細胞

3.1 胚性幹細胞

マウス胚性幹 “embryonic stem” (ES) 細胞は *in vitro* において肝細胞へ分化する⁹⁵⁻⁹⁹⁾。また、ES 細胞を脾臓へ移植すると奇形種の形成を伴い肝細胞へ分化する¹⁰⁰⁾。更に、ES 細胞由来肝細胞を肝臓に移植すると、肝細胞分化表現型が維持される^{95,99)}。ヒト ES 細胞を胚様体 (embryoid body) で分化させると、胎児肝で特異的な各種遺伝子を発現する¹⁰¹⁾。更に、アルブミンのプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをヒト ES 細胞にトランスフェクトして同様に分化させると、分離した eGFP 陽性細胞はアルブミンを発現し数週間にわたって増殖し続ける。

ヒト及びマウス ES 細胞を *in vitro* で効率よく分化させる工夫についても以下のような検討がなされている。Shirahashi らはヒト及びマウス ES 細胞をコラーゲンタイプ I でコートしたディッシュにプレーティングし、20% 牛胎児血清、ヒトインスリン、

デキサメタゾンを含む培地で培養すると、肝細胞に特異的な表現系及び機能を有する細胞に効率よく分化することを明らかにした¹⁰²⁾。Hu らはあらかじめ形成されたマウス ES 細胞の胚様体を 0.1% セラチンでコートしたディッシュにプレーティングし、aFGF, TGF, AFP, HGF, オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で培養した¹⁰³⁾。その結果、マウス ES 細胞は肝細胞に特異的な表現系及び機能を有する細胞に効率よく分化し、その比率は培養 21 日後で 33.4% に達する。Teratani らはマウス ES 細胞にアルブミンのプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをトランスフェクトし、セラチンコートしたディッシュにプレーティング後、LIF, レチノイン酸を含む培地、続いて HGF, FGF-1, FGF-4 を含む培地で培養後、コラーゲンコートしたディッシュに移しオンコスタチン M を含む培地で培養すると、eGFP 陽性細胞数が増加することを明らかにした¹⁰⁴⁾。また、eGFP 陽性細胞は肝細胞に特異的な表現系、形態及び機能を有しており、ジニトロソアミンにより肝臓が障害されたマウスに静脈内投与すると、生存率及び肝機能の改善がみられる。Ishii らはマウス ES 細胞に AFP のプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをトランスフェクトし、コラーゲンコートしたディッシュにプレーティング後、LIF, レチノイン酸を含む培地、続いて bFGF, 5 アミノ酸欠如 HGF を含む培地で培養すると、eGFP 陽性細胞が全体の 40% を占めることを明らかにした¹⁰⁵⁾。分離した eGFP 陽性細胞は AFP のような未成熟な肝細胞のマーカーしか発現しないが、Thy-1 陽性細胞を feeder layer として培養すると各種成熟肝細胞のマーカーを発現し、形態及び機能的にも肝細胞の特徴を有する細胞に分化する。Imamura らはマウス ES 細胞から形成された胚葉体をコラーゲンの scaffold に組み込み、オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で三次元培養すると、肝細胞に特異的な表現系及び未成熟な肝細胞の形態を有する細胞に分化することを明らかにした¹⁰⁶⁾。scaffold に組み込まれた状態でその細胞を部分肝切除マウスの肝臓に移植すると、肝細胞に特異的な表現系を示す凝集化した細胞集団を形成する。

特に幹細胞としてヒト ES 細胞を一般的な細胞治療等に用いる場合、以下のような問題点が指摘されてきた。① ES 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。この点については以下のような知見もある。先に述べた Teratani らの報告¹⁰⁴⁾において、マウス ES 細胞から分化した eGFP 陽性細胞は、肝細胞に特異的な表現系、形態及び機能を有し、腫瘍化に関与する c-kit 及び E-ras の発現が消失していることが明らかになっている。eGFP 陽性細胞を更に精製後マウスに移植すると、肝臓に生着し奇形腫は形成されない。Kumashiro らは胚葉体で分化後部分的に解離させサブカルチャーしたマウス ES 細胞において肝細胞の表現系を有する細胞を確認した¹⁰⁷⁾。Percoll gradient, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) 及び Mac-1 抗体を用いた磁気セルソーティングにより未分化 ES 細胞を含むその他の細胞を除くと、未分化 ES 細胞に発現し奇形腫形成の原因と考えられている Oct-3/4 が検出されず、マウスに移植後肝臓に生着し奇形腫を形成しない。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。この点については前述の Kumashiro らにより報告された Percoll gradient 及び各種抗体を用いた磁気セルソーティング¹⁰⁷⁾が有用かもしれない。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。この点に関しては以下のような知見もある。Fair らはマウス ES 細胞を FGF により分化後、第 IX 因子欠損のマウス肝臓に移植すると、レシピエントのマウスにおいて第 IX 因子が検出されることを明らかにした¹⁰⁸⁾。その際、コントロールのマウスは 7 日以内に死亡するのに対し、移植マウスは 38 から 115 日生存する。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。この点に関しては、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 細胞を樹立するなどの方法が理論的に可能である。

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

ミドを加え、EGF や HGF, TGF- α などの増殖因子を添加して培養すると、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^{109,110)}。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。ヒト肝臓にも小型肝細胞の存在が示されている¹¹¹⁾。上記小型肝細胞との異同について明らかではないが、レトロールシン/PH の肝臓において小型肝細胞のコロニーが出現する¹¹²⁾。この小型肝細胞は肝細胞へと分化・増殖し、PH 後 30 日目には肝細胞の 90% を占めるようになる。

3.3 胎児肝臓由来肝幹細胞

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の様々な細胞画分において増殖能の解析が行われた。その結果、c-kit⁻, CD49f⁺, CD29⁺, CD45⁻, TER119⁻ の細胞画分において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¹¹³⁾。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¹¹⁴⁾。したが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、マーカー遺伝子を導入したこの細胞を脾臓内に移植すると、肝臓組織や胆管を形成する¹¹⁴⁾。

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。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, α -平滑筋アクチン, VE-cadherin を発現しない細胞が存在する¹¹⁵⁾。更に、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。

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、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¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾。この細胞は胆管細胞と肝細胞の特徴を共有しており、活性化された齧歯類肝臓の oval cell から由来する

多くのセルラインとよく似ている。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。

3.6 膵臓細胞

膵臓細胞が胎児肝に類似した表現型に分化することが示されている。Krakowskiらはインスリンのプロモーターにより調節されるケラチノサイト増殖因子“keratinocyte growth factor”(KGF)トランスジェニックマウスにおいて機能を有する肝細胞がランゲルハンス島に多数出現することを示した¹²⁰⁾。また、膵外分泌細胞は*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肝細胞に非常に効率良く分化する¹²¹⁾。

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られた細胞はヒトからの高度に分化した肝細胞¹²²⁾、ヒト肝癌セルライン¹²³⁾、動物からの肝細胞¹²⁴⁾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ると共に、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用時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り、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。動物由来の肝細胞の場合、血漿及びアルブミンはヒトと動物では質的に異なるため、動物の肝細胞で産生させてもヒト

の代替はできない。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。したがって、これら3種類の細胞は上記目的を満たすものではない。

一方、ヒト幹細胞は*in vitro*で旺盛に増殖し、肝細胞に分化する。したがって、幹細胞を未分化な表現系のみで十分な量が得られるまで増殖させ、その後、成熟肝細胞の表現型を発現できるように操作することにより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の無限大な供給源として期待されている¹²⁵⁾。Fig.3に肝幹細胞の臨床応用について模式的に示す。

更に、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る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関しては患者自身の肝幹細胞を用いることにより回避できる。

4.2 肝幹細胞を用いた治療戦略

4.2.1 肝幹細胞移植

今後、肝幹細胞移植による肝疾患の治療の有用性を検討する上で、これまでの肝細胞移植による肝疾

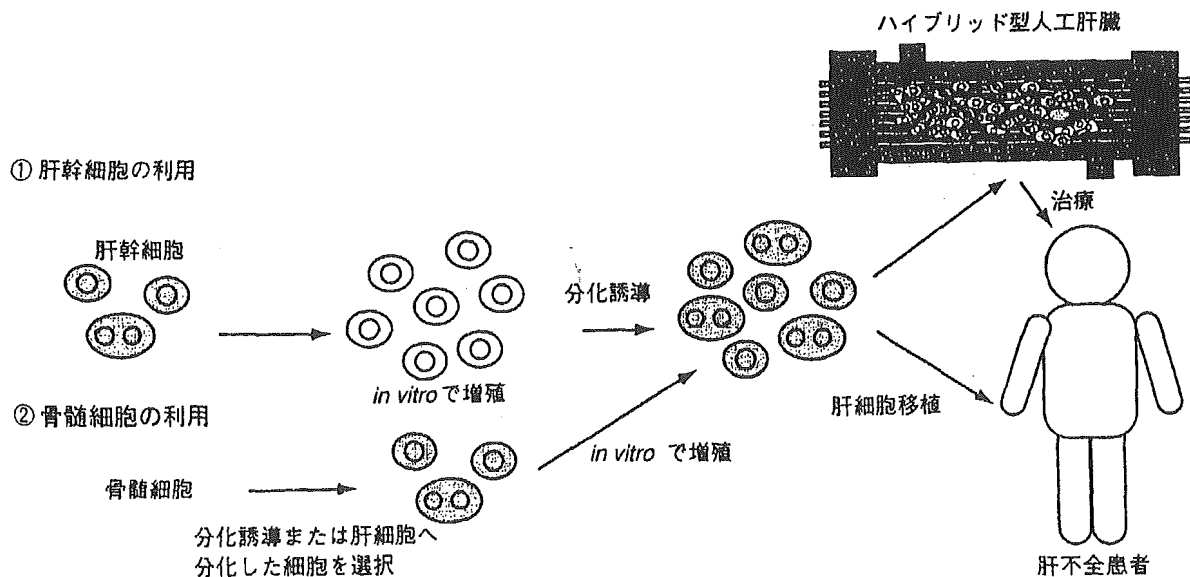


Fig.3 肝幹細胞の臨床応用 (文献146より許可を得て一部改変し転載)

患の治療成績は参考となる。以下に肝細胞移植によるヒト肝疾患の治療例を示す。

劇症肝炎患者7人に胎児性肝細胞の腹腔内移植を行った結果、肝性昏睡からの覚醒がみられ、3例の生存が得られた¹²⁶⁾。急性肝不全患者に対し肝移植までのbridge-useとして脾動脈を介した肝細胞移植が試みられた。その結果、移植後に頭蓋内圧及び血清アンモニア値の低下が認められ、5例中3例において肝移植までのbridge-useに成功した¹²⁷⁾。Crigler Najjar 症候群の患者に対し門脈を介して肝実質の5%に相当する量の分離肝細胞を肝臓に注入すると、血清ビリルビンの減少及び胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられた¹²⁸⁾。1型糖原病の患者に門脈を介して20億個の肝細胞を肝臓に注入するとその病態の特徴である空腹時における低血糖症が改善された¹²⁹⁾。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¹³⁰⁻¹³²⁾。更に、肝細胞移植による肝疾患の治療戦略についての検討も行われている^{131,133)}。なお、実験的急性肝不全動物に対する肝細胞移植の有用性については多数の報告があるが、本稿では割愛する。

このように、少なくとも上記ヒト肝疾患においては肝細胞移植により治療されることが示されたが、その治療成績は必ずしも満足のいくものではない。また、大量の肝細胞が必要とされることが主な原因により、その症例数も少ない。

肝幹細胞は先に述べたように様々な点で肝細胞に比べ優れた特徴を有することから、肝細胞を用いた肝疾患の治療における問題点をブレイクスルーするものと期待されている¹³⁴⁻¹³⁶⁾。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たん白質産生の欠損による肝臓外の疾患である^{132,133)}。内在性の肝臓病としては α 1-アンチトリプシン欠損血症、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。

4.2.2 人工肝臓装置

肝幹細胞は人工肝臓装置において有用かもしれない。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治療に成功した例が多数報告されており¹²⁴⁾、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bridge-useを目的として臨床的に用いることが可能と考えられる。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であり¹³⁷⁾、慢性肝臓病を有する患者において人工肝臓装置へ長期にわたり細胞を補充する必要もある。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可能性もある。

4.2.3 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¹³⁶⁾。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な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。以下に肝細胞ではあるが、その可能性を示唆した最初の例を示す。低密度リポたん白質“low-density lipoprotein” (LDL) 受容体欠損が原因とされる家族性高脂血症患者に患者からの肝細胞にレトロウイルスを用いて正常なヒト LDL 受容体遺伝子を導入後門脈内移植した¹³⁸⁾。その結果、肝生検組織で導入された LDL 受容体遺伝子が観察され、一時的ではあるが LDL コレステロールの有意な低下が認め