

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、プラー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。従って、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 IgG 領域をヒト IgG C 領域に組換えす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) から成る 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、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。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) 鎖および 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 細胞および SP2/0 細胞である。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 鎖および 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_H2 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。従って、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ある。

C.3.1.1.2 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。一度に 10⁷ 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。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。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。

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。

(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。さら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。

(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_H 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。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。

ヒトリンパ球由来 mRNA から、イムグロブリンの γ 、 μ 、 κ 、 λ 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 (γ 、 μ 鎖由来の V_H ならびに κ 、 λ 由来の V_L) 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 (γ 、 μ 鎖由来の V_H ならびに κ 、 λ 由来の V_L) 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、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。

(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 CDR3 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。最初から機能的な scFv を産生する V_H と V_L 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。

C.3.1.1.3 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) したマウスに機能的なヒト 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。さらに、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) 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。抗原を接種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。本法により IL-8、EGFR、TNF- α 、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 1.5Mb、L 鎖 κ 2Mb、L 鎖 λ 1Mb) 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) にはクローニングできない。

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 断片が様々に組み合わせられた 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。L 鎖 κ (2 番染色体、約 2Mb)、L 鎖 λ (22 番染色体、約 1Mb) 遺伝子についても同様である。従って、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。

(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および軽鎖 κ 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。まず、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 κ : 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トカラシン 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。さらに、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 κ 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 κ 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。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クローンが取得された。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 細胞および体細胞において低いことによる (Table 10)。

一方、Medarex 社のヒト抗体産生マウス (HuMab) はヒト Ig κ 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 (Table 10)。ヒト Ig κ 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 κ 鎖の多様性が生み出されていると考えられる。さらに、HuMab マウスにおいては、Ig κ 鎖を含む酵母染色体ベクター (Ig κ -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 κ -YAC を導入するという改良がなされた。実際には、ダブル TC/KO マウスをヒト抗体 L 鎖 κ 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 κ 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™) が作成された。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 10)。

(3) KM マウスの品種改良

1) KM (Fc γ R II b-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が、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 Fc γ R II b-KO マウスの形質を入れた KM (Fc γ R II b-KO) マウスも作成されている。

IgG の Fc 領域と結合する Fc 受容体である Fc γ R II b 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 (Fc γ RI) と同時に抑制性シグナルを入れる Fc γ R II b 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。そこで、寛容が打破された Fc γ R II b-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 (Fc γ R II b-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かった。一方、KM (Fc γ R II b-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。

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、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。

(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、さらには染色体上に 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。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 Ig λ 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ト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 (λ 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 10Mb 領域を含む λ 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。さらに、キメラマウス血清においては、ヒト Ig 重鎖、 λ 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 およびヒト Ig λ からなる) を分泌するハイブリドーマも取得されている。

(5) HAC ウシ

以下のようにして λ 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。

λ HAC 含有 CHO 細胞から前述のミクロセル融合法により、 λ HAC をウシ繊維芽細胞に導入する。この λ 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、 λ 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、 λ 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し、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) ・ λ L 鎖 (Ig λ) 遺伝子の発現が確認された。さらに、生まれたクローン仔ウ

シを詳細に調べた結果、 λ HAC ベクターは 8 割以上のウシ体細胞(繊維芽細胞および末梢血リンパ球)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)・ λ L 鎖(Ig λ) 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。

C.3.1.1.4 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。協和発酵で開発され、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 150kDa 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_H2 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。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、Fc レセプターとの結合には直接関与しないが、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。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 IIIa 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。

C.3.1.1.5 その他

ヤギや植物にヒト抗体を生産する技術、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術なども開発されている (Table 11)。

C.3.1.2 抗体医薬品の特徴

(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 antibody (HACA) が出現する。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。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。このような HACA および HAHA 反応が強くと起こると、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) 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。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つ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、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 および 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。さら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、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ヒト抗体として D2E7 (TNF 抗体)がある。2001 年 12 月に行われた IBC 国際抗体会議で、リウマチ患者へ臨床試験結果が発表されたが、そのなかで免疫抑制剤のメ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。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、Fab 化あるいは完全抗体への変換は困難である。

(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、同様なCDR3領域のヌクレオチドの欠失、挿入の入り方が見られる。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、アミノ酸レベルでは0~7ヶ所程度(重鎖V領域)である。従って、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λHAC牛である。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。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γ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。従って、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。

C.3.1.3 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。

(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。

(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すでに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) 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 (Fc γ R II a) 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。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。

(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、毒素およ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。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 radioimmunoconjugate 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 および ADCC 活性による強い抗癌作用が観察されている。

C.3.1.4 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、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。

C.3.1.4.1 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。その後、IDEC-2B8 の可変部領域とヒト IgG1 κ 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。

1993 年 B 型細胞性非ホジキンリンパ腫治療薬の治験を開始し、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 カ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「マントル細胞リンパ腫」の治療薬に承認され、発売となった。

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ノンホジキンリンパ腫 (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。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。CD20 は正常 B 細胞および B 細胞腫瘍の細胞膜に発現している約 35kDa の親水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。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。

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。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。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、低悪性度および濾胞性 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%)、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。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。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。

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) 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 ⁹⁰Y、¹³¹I) 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。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。

C.3.1.4.2 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。従って、約 95%はヒト IgG1 が残っているので、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。

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:180kDa)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 およびタンパクの発現を認め、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。EGFR ファミリーのうち Erb-1、Erb-3、Erb-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。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。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。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。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。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。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。

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。第Ⅲ相で、パクリタキセルの併用で 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。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 倍および 1.3 倍以上延長した。奏

効期間では、同様に期間延長効果が 2.3 倍および 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 倍および 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。

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。

3)副作用

①うつ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、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。さらに最近、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、とく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。

C.3.1.4.3 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。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 カ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。

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。

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。従って可溶性 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。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 活性および 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用も考えられる。

2)治療効果

(1)クローン病への治療効果

クローン病の 3 つの評価項目 (CDAI、IBDQ、CRP) で、本剤とプラセボを比較した。①クローン病活性指数 (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。クロー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。

(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 か月、生存期間の中央値は 13 か月であった。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。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。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。

(3)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みる臨床試験が欧米で行われた。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。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。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。

3)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。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。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。既往歴のある患者への投与には注意を要する。

C.3.1.4.4 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 年米国およ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。

1)作用機序

IL-2 は T 細胞および 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 ヶ月以上 3% 以下にブロックする。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。

2)急性拒絶反応抑制効果

成人腎移植患者を対象とし、シクロスポリンおよ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 ヶ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、本剤投与群と有意に高く（ $P < 0.01$ 、Kaplan-Meier (K-M)法）推定量の差）、また移植 12 ヶ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）。成人腎移植患者を対象とし、シクロスポリンおよびステロイドおよ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 ヶ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、本剤投与群と有意に高かった（ $P < 0.02$ 、K-M 法）推定量の差）。

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（シクロスポリンおよ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。

C.3.1.4.5 パリビズマブ

米国メデイム社で開発された抗 RS ウイルスボリクローナル抗体 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。そこでメデイム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 CDR、ならびにヒト IgG1C 領域および FR 領域からなる抗 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、米国および欧州を含む 46 ヶ国で承認を取得し、日本においては 2002 年に承認された。

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、ウイルスの複製および増殖を抑制する。

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。

3)副作用

海外の第Ⅱ相および第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。国内における早産または BPD の新生児、乳児およ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。

C.3.1.4.6 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。具体的には、ヒト型抗 TNF- α モノクローナル抗体の H 鎖および 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。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。

C.3.1.4.7 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- γ 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。

1)作用機序

CD33 抗原は 67kDa 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、リンパ系細胞およ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。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。従って、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。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。

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。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 ヶ月で、約 40%は臨床試験の期間中生存した。

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 Grade3-4 の好中球減少、Grade3-4 の血小板減少、Grade3-4 の貧血が発症した。日和見感染を含めて Grade3-4 の感染症が発症した。また、口内炎や胃炎、Grade3-4 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。

C.3.1.5 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り、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。

(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。

(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も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。

(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および生存期間が本

当に改善されるのかを検証することである。

(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、顕著な相乗的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) 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 および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。さらに、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さらなる新しい抗体を模索するうえで考慮すべき点である。

(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 細胞などを活性化させ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。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。

(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 にまでおよんでいる。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、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術なども開発されている (Table 11)。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。

(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が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。

C.3.2 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより、それらの細胞が有する機能を利用することによる再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年4万人ともいわれ、そのうち60歳以下の肝移植適応患者は年間3,500～5,000人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。即ち、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様な利点を有する。①分化の方向性や増殖能がすでに決定されているので腫瘍化の危険性が低い。②増殖能が成熟肝細胞に比べ極めて高い。③正常細胞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。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。その後肝幹細胞に関する研究は大きく進展し、動物およ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。本研究においては肝幹細胞に関する最近の知見、およ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調査および研究を行なった。

C.3.2.1 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およ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およ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および胆管を形成する。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ようになった。上記の様に 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。

C.3.2.1.1 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 hepatectomy” (PH)するといふものである。2-AAF は phase1 代謝酵素により毒性および増殖抑制作用を有する N-水酸化誘導体に代謝される。Oval cell は肝細胞と比べると phase1 代謝酵素のレベルは低いが phase2 代謝酵素のレベルは高いという特徴を有する。従って、oval cell は発癌物質の毒性効果に抵抗性である。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 2/3PH 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、増殖は 24 時間で起こる。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、小型肝細胞へ分化する。その際、小葉内胆管においてのみ腫瘍胎児糖タンパク質 AFP が発現し、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。

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、ディピン投与、2-AAF 投与/四塩化炭素投与などが知られている。

なお、Table 12 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。

C.3.2.1.2 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。

C.3.2.1.3 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いて小型肝細胞の存在が確認され、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、肝細胞癌、肝硬変の肝臓において oval cell が同定された。さらに、二重免疫染色法を用いた解析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。

C.3.2.1.4 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。この細胞には他の oval cell のマーカーである AFP、CK-19、GGT、OC2 および OV-6 も発現する。

C.3.2.1.5 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。“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。

C.3.2.1.6 Oval cell を含む肝幹細胞の分化および増殖

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、促進および抑制に働く増殖因子の精巧でかつ協調的な発現、発現する時期およ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・分化に影響をおよぼす。

(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。従って、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。

(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)は胆管癌だけでなく胆汁鬱滞並びに肝再生に伴い増殖する胆管において発現する。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。従って、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、oval cell の増殖を *in vitro* および *in vivo* において促進する。SCF も oval cell の増殖時において発現し、oval cell の出現を促進する。EGF は *in vivo* および *in vitro* において、TGF- α は *in vitro* 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)は増殖性胆管および胆管周囲の Ito 細胞において発現し、*in vitro* において EGF 共存下で oval cell の遊走を促進させる。また、TGF- β は rat liver epithelial cell の肝細胞への分化を促進する。Oval cell は HGF を除くこれら全ての増殖因子およびその受容体を発現する。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および移動できる。従って、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。

(3) Feeder layer およびコンディションメディアムによる調節

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。三次元コラーゲンゲルと繊維芽細胞の feeder layer を用いることにより、oval cell を肝細胞に分化できる。オンコスタチン M 強発現 293T 細胞のコンディションメディアムで 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。

(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。繊維芽細胞を feeder layer として用いた oval cell の培養系において、DMSO は繊維芽細胞の過剰増殖を抑制し、oval cell を肝細胞に誘導する。DMSO により oval cells 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。

(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。Ito 細胞は 2-AAF/PH モデルにおいて最初に増殖し、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。従って、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。

(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。従って、oval cell も MMP を発現し ECM を分解する可能性が考えられる。

C.3.2.2 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。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様に示された。

(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、腎臓、脳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。さらに、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。最初に、致死量の放射線を照射後 2-AAF およ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。その結果、少なくとも 6ヶ月後までは雌の骨髄に由来する肝細胞が雄の正常肝の 1-2% 存在することが明らかになり、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 らと Theise ら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-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および胆管上皮細胞は最大 40% を占める。G-CSF で動員させた CD34⁺ 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。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 1) 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 10⁶ 個の未分画骨髄細胞を移植すると FAH 疾患が治癒される。その際、造血能を維持するために必要である 2×10⁵ 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およ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。ラットにおいて骨髄由来肝幹細胞 "bone marrow-derived hepatocyte stem cell" (BDHSCs) の分画が β 2-ミクログロブリン陰性、Thy-1 陽性に基ついて同定されているが、BDHSCs 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、BDHSCs は肝細胞に分化し肝細胞と同様な効率でアンモニアを尿素に代謝する。従って、肝臓の障害は骨髄由来細胞において生着だけでなく、肝臓への分化にも必要と思われる。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。

以下の様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 cells (MAPCs) を分離し、マトリゲル上で HGF および FGF-4 を添加し培養すると、

肝細胞に特徴的な表現系、形態および機能を有する細胞に分化することを明らかにした。Leeらはヒト骨髄から分離した mesenchymal stem cells (MSCs)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、形態および機能を有する細胞に分化することを明らかにした。Sato らはヒト骨髄から分離した mesenchymal stem cells (MSCs)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。

(2) 造血幹細胞と肝細胞の細胞融合

Terada らと Ying ら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 細胞のマーカーである 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見聞から、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。Wang らと Vassilopoulos らは雄の 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。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髄由来細胞を 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髄由来のマクロファージのような骨髄単核細胞であることも明らかになっている。従って、移植した HSC のうち骨髄において骨髄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。

(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 C1q 受容体のマウスホモログである AA4 分子が HSC の胎児肝へのホーミングに関与している。従って、障害

を受けた肝臓に対して生着する HSC にこの受容体タンパク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。CXCR4 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。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。従って、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。

(4) HSC の肝細胞への分化に関与する因子

HGF が *in vivo* および *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。ヒト臍帯血および骨髄由来の精製した 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。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。HGF はラットの骨髄由来 HSC の培養系において肝細胞への誘導を促進する。

C.3.2.3 その他の肝幹細胞

(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。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。さらに、ES 細胞由来肝細胞を肝臓に移植すると、肝細胞分化表現型が維持される。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。さらに、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。

ヒトおよびマウス 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様な検討がなされている。Shirahashi らはヒトおよびマウス 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およ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。Hu らは予め形成されたマウス ES 細胞の胚様体を 0.1%ゼ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。その結果、マウス ES 細胞は肝細胞に特異的な表現系およ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、ゼ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。また、eGFP 陽性細胞は肝細胞に特異的な表現系、形態およ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、生存率および肝機能の改善がみられる。Ishii らはマウス ES 細胞に α -フェトプロテイ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、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。分離した eGFP 陽性細胞は α -フェトプロテイン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、形態およ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および未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。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。①ES 細胞そのものは移植により奇形腫を形成するが、分化誘導した細胞でも高いテロメラーゼ活性が保持されていれば腫瘍化の危険性がある。この点については以下の様な知見もある。先に述べた Teratani らの報告において、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、形態および機能を有し、腫瘍化に関与する c-kit および Eras の発現が消失していることが明らかになっている。eGFP 陽性細胞をさら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。Percoll gradient、platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) および 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り、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 および各種抗体を用いた磁気セルソーティング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様な知見もある。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。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。

(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。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。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。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) 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⁻、CD49⁺、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。この細胞の多分化能について 1 個の同細胞から派生したコロニーを用いて分化マーカーの発現を検討した結果、肝細胞マーカーと胆管細胞マーカーを発現した細胞の存在が確認された。従ってこの細胞は肝細胞と胆管細胞に分化可能であることが明らかになった。また、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。

(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。さらに、この細胞は培養すると形態的にも機能的にも肝細胞に分化する。

(5) 肝上皮細胞

正常およ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。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。

(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。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。

C.3.2.4 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、ヒト肝臓セルライン、動物からの肝細胞が主であった。しかし、成人肝細胞を得ることは事実上困難であると共に、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、ヒト肝臓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、血漿およ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。従って、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。従って、幹細胞を未分化な表現系のままに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。

さらに、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。

C.3.2.4.1 肝幹細胞を用いた治療戦略

(1) 肝幹細胞移植

今後、肝幹細胞移植による肝臓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臓疾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臓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。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、移植後に頭蓋内圧およ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。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および胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられた。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。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およ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。さらに、肝細胞移植による肝臓疾患の治療戦略についての検討も行われている。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臓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、肝細胞を用いた肝臓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。肝幹細胞を用いた細胞治療として臨床的に有用と思われる疾患は原発性肝臓病、肝臓における異常な遺伝子発現あるいはタンパク質産生の欠損による肝臓外の疾患である。内在性の肝臓病としては α 1-アンチトリプシン欠損血色素症、高脂血症、ポルフィン症、1型チロシン血症、ウイルソン病（銅の蓄積）などの遺伝子異常があげられる。肝臓に起因する肝臓外の病気としては1型 Crigler-Najjar 症候群（ビリルビン抱合活性の欠如）のような代謝欠損、家族性高コレステロール症、家族性アミロイド性多発性神経障害（シュウ酸症）、第IX因子欠損（血友病 A）のような凝固欠損などがある。

(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、人工肝臓装置は急性肝臓障害の患者の延命および移植への 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、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することから、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およ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。

(3) 遺伝子治療

肝幹細胞は遺伝子治療の担体として用いることが可能かもしれない。ここで述べる遺伝子治療とは遺伝的に改変を加えた肝幹細胞を直接患者に移植し、各種肝臓病を治癒することを指している。遺伝的な改変とは例えば遺伝的代謝異常のような遺伝子変異を正常に戻すことである。現在、遺伝子治療の問題の1つは、遺伝子改変を加えた成熟肝細胞は増殖およ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。低密度リポタンパク質 (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。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られた。

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

C.3.2.4.2 今後の検討課題

肝幹細胞を臨床治療に用いるためには、以下の様な検討課題が残されている。

(1) ヒト肝幹細胞の分離・精製法の確立：肝幹細胞を臨床応用する際、その有効性および安全性を確保する点から均一な集団として分離・精製することが必須である。現状では動物からの肝幹細胞はかなり高純度で

分離・精製されているが、ヒト肝幹細胞を分離・精製する方法は確立していない。

(2) 肝幹細胞を効率よく分化・増殖させる条件の確立：マウスの肝幹細胞と比較すると、ヒト肝幹細胞は培養において増殖が遅い一方で、短時間で容易に分化し、その後増殖能を消失する。従って、ヒト肝幹細胞を肝細胞に誘導後移植する場合、予め幹細胞の表現系を維持した状態で充分量まで増殖させ、その後肝細胞に分化させる必要がある。前述したように主に動物由来の肝幹細胞において様々な因子が分化・増殖を誘導することが明らかになっているが、ヒト肝幹細胞を臨床応用に用いるという観点に基づいた増殖・分化の検討は十分ではない。また、生体において肝幹細胞が肝細胞に分化するには重篤な肝障害を起こす必要があり、その場合においても例えば HSC が肝細胞に分化する割合は極めて低い。

(3) 肝細胞セルラインの確立：(2)で述べた理由から、ヒト肝幹細胞のセルラインを増殖させ確立することは現在困難である。しかしこの点に関し、以下のようなアプローチが試みられている。レトロウイルスにより SV40T 抗原遺伝子を導入すると肝幹細胞が不死化する。この細胞は無限大に *in vitro* で増殖し、アルブミン、CK7、CK19 および内在性テロメラーゼを発現する。門脈を介してこの細胞を肝臓に移植すると、腫瘍を形成することなく肝実質に生着し肝細胞に分化する。p53 が発現しないと細胞は通常の限界を超えて細胞周期が進行し不死化することに着目し、p53 のノックアウトにより不死化された肝幹細胞セルラインが確立された。しかしながら、このセルラインには癌原性の潜在的なリスクがある。肝幹細胞ではないがヒト胎児肝細胞においてテロメラーゼ活性を高発現させることにより肝細胞の表現系を消失することなく無限大に複製させることも可能となっている。このように肝幹細胞セルラインの確立に向けて多くの努力がなされているが、安全でかつ充分な機能を有するものは得られていない。

C.3.3 血管新生療法の現状と展望

血管系は我々の体の中で最も大きな組織で、角膜と軟骨など一部の組織を除き、全ての組織に存在する。そのため、多くの組織における血管の損傷は、様々な疾患の原因となっている。実際、心臓や脳の大動脈あるいは中動脈におけるアテローム性動脈硬化症による閉塞が生じることで脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。これらの疾患はいずれも血管の機能が失われ虚血となることで発症するもので、先進国に共通する致命的な疾患のひとつとして、その治療法の開発が重要な課題となっている。

虚血性疾患のひとつである虚血心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率および死亡率が高く、米国の場合その患者数は 1,000 万人以上、世界全体では数億人にも達する。

虚血心臓病の症状は、心筋の損傷がない労作性狭心症から、左心室において可逆的および非可逆的な障害のある心筋虚血の段階、非可逆的な心筋障害の段階、うつ血性心不全に至る壊死まで幅広い。その進

行速度は主として動脈硬化性プラークの成長あるいは一過性の破裂に依存している。このような症状が進行すると慢性的な安定狭心症あるいは心筋梗塞を含む急性冠動脈症候群になり、心外膜冠動脈において血流が障害される。その結果、冠動脈血液により酸素が必要量供給されない場合、心臓組織が虚血になり、冠動脈のかん流が心筋の酸素要求性に対応できなくなる。虚血組織に対して血液の供給を回復は、冠動脈かん流を改善させる必要がある。その戦略として従来から用いられてきた治療法は、冠動脈バイパスあるいは冠動脈血管形成術のような外科的に、障害が起きた心筋に対する血流が物理的に回復させる方法、硝酸やβ-ブロッカーのような薬物を投与することで心筋の酸素要求性を低下させ、かん流の供給/需要のバランスを回復させる方法などである。

しかし、従来の治療法では、改善されない症例は少なくなく、増加の一途である。また、侵襲的な治療法では効果的な再血管形成が期待できない、いわゆる選択肢のない末期の冠動脈疾患の患者の存在も無視できない。これらの患者は一般的に高齢で、びまん性冠動脈疾患、末梢小血管、高コレステロールレベル、糖尿病などの合併症を有していることが特徴で、このような状態では生体に本来備わっている虚血に対する血管新生および動脈形成能そのものが低下している。したがって、このような状態の患者は、従来の血管再生術による治療が困難となる。今後、高齢化に伴いこのような症例が増加することが危惧される。

虚血性疾患の原因となる冠動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの、鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては、成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。65才以上では1,000人あたり10人の症例の発症率であることから、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合、大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていないものの、放置しても血管は再形成されないため、治療は必須である。鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人(165%の増加)と年々増加しており問題となっている。

このような疾患に対して、血管新生療法は、既存の血管から新しい血管を再生させ、罹患した動脈の機能を再建することが部分的ではあるが可能で、動物モデルおよび前臨床試験では血管新生療法による血管の成長促進(血管新生)は標的器官のかん流と機能の改善において効果的であることが示唆されている。しかしながら、血管新生の詳細なプロセスの解明、臨床において有効な血管新生療法の確立は、今後の課題として残されている。

本研究では、これまで試みられてきた血管新生療法として、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスについての最近の知見について調査および研究を行なった。

C.3.3.1 血管新生(neovascularization)の生理的な概念

血管発生(vasculogenesis)、狭義の血管新生(angiogenesis)、動脈新生(arteriogenesis)は理論的に異なったプロセスであり、これらのプロセスを経て、広義の血管新生(neovascularization)が起きる。なお発生学の観点からは、広義の血管新生(neovascularization)は血管発生と狭義の血管新生(angiogenesis)に大別される。なお、本稿においては、特にことわらない限り、血管新生という言葉はangiogenesisを指す。

血管発生とはEPC(endothelial progenitor cell、内皮前駆細胞)からのin situにおける血管形成のプロセスである。また、血管は既存の血管から発芽するか、あるいはトータルとして血管新生に分類されるプロセスである。内皮および造血細胞は、共通の幹細胞である血管芽細胞に由来する。卵黄嚢において、血管芽細胞は細胞集合体あるいは血島を形成し、その中で中心部に位置する造血幹細胞は血球系に、辺縁部に位置するEPCは内皮細胞にそれぞれ分化する。EPCおよび血管芽細胞が末梢血から分離され、EPCが活発な血管新生部位の中に見出されるまでは、これら細胞は胎児の発達のみに関与すると考えられていた。その程度については不明であるが、血管発生は狭義の血管新生と共に、成人組織における血管新生に寄与すると考えられている。また、組織虚血によりEPCが新生血管へ強制動員され、取り込まれるという知見がある。EPCと造血幹細胞の表面マーカーは例えばFlk-1、Tie-2、c-Kit、Sca-1、CD133、CD34のように同じものが多く、マーカーにより単純にEPCを規定することはできない。EPCはVE-カドヘリンそしてAC133も発現する。AC133はEPCに特異的に発現するオープンセプターであり、EPCsが成熟内皮細胞に分化するとその発現は消失する。造血幹細胞に加えて、EPCの由来はサイドポピュレーションの細胞(CD34⁻、c-kit⁺、Sca-1⁺)および多能性成人幹細胞あるいはMAPC(CD34⁻、CD45⁻、c-Kit⁻、GlyA⁻)のような骨髄由来幹/前駆細胞である。なお、EPCの分化における組織特異的シグナルは不明である。

血管新生とは、内皮細胞の活性化、細胞外マトリックスの分解、増殖、遊走さらには周皮細胞そして平滑筋細胞の強制動員に依存した新しい血管壁の安定化のプロセスによる後毛細血管静脈からの新しい毛細血管の発芽を指している。血管新生の促進は生理学および病態生理学的条件下において低酸素状態あるいは虚血により起こる。転写活性化因子であるHIF-1(hypoxia-inducible factor 1)は、恒常的に発現するHIF-1βサブユニットと酸素により調節されるHIF-1αサブユニットのヘテロダイマーである。HIF-1αは低酸素により起きる血管新生の促進において中心的な役割を果たしている。HIF-1αはVEGF、Flt-1、neuropilin-1、Ang-1(angiopoietin-1)、Ang-2、PDGF、PlGF(placental growth factor)のような各種血管新生メディエーターの発現を調節する。さらに、HIF-1αのAng-1およびAng-2に対する作用は細胞により異なり、活性化因子あるいは抑制因子として作用し、内皮細胞の増殖あるいは内皮細胞-平滑筋細胞の相互作用を

調節する。HIF-1 α の活性化は TNF- α 、IL-1、PR39 のような炎症性サイトカインにより誘導される。

内皮細胞の遊走および増殖は毛細血管の管腔形成に必要であるが、これらの作用は PA/プラスミン系のプロテアーゼ、MMP、ヘパリナーゼにより調節される。プラスミノゲンは様々な場所に存在する血漿タンパク質であるが、プラスミノゲン活性化因子である u-PA および t-PA によりプラスミンに転換される。プラスミンは特定の MMP (matrix metalloprotease) の活性化を介して、ファイブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンのような細胞外マトリックスタンパク質を分解する。また、その分解は TIMP (tissue inhibitor of metalloprotease) および PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) により阻害される。

新しい血管の成熟には、PDGF、TGF- β 、Ang-1 による未熟な内皮細胞ネットワークの安定化が関与していると考えられている。また、その安定化のプロセスには、周皮細胞/平滑筋細胞の増殖および分化の促進、内皮管への強制動員および内皮細胞の再プログラミングが含まれる。この期間において、その後の運命、すなわち動脈あるいは静脈のどちらに分化するかは決定、さらにはその発達も決まる場合がある。著しく障害された動脈が再形成されるためには血管が外側へ向かってリモデリングされる過程が必須である。そのプロセスは、側副の形成あるいは動脈形成とは必ずしも同一ではないものの、基本的な機構は類似していると考えられている。一方では、内皮前駆細胞が血管新生と動脈形成の両方に関与するとも言われている。

動脈形成は成熟のプロセス、あるいは恐らく側副導管の de novo の成長を指している。動脈形成の促進には、閉塞した動脈に近接した部位における剪断応力の増加、およびその後起きる血液由来の単核球細胞の蓄積が重要であると考えられている。また、動脈形成の促進因子には CXC ケモカイン、FGF、PDGF、VEGF など数多くの増殖因子が関与している。動脈形成の重要な点は、血管新生と同様に、側副の発達がコンダクタンス血管において de novo で起きるか、あるいは既存の血管が再構成され肥大するかである。既存の側副の広さが種間において大きく異なること、関与するその他の因子について解明が不十分であるため、このようなプロセスが実際に起きているかどうかについてはよくわかっていない。げっ歯類の後肢虚血モデルでは明らかに既存血管が再構成される。既存の側副の数および成長は遺伝的な因子に影響され、種内および種間で変動すると考えられる。

血管新生の開始についてはよくわかっているが、その後、効率的良く動静脈のネットワークが形成されるプロセスについてはよくわかってはいない。例えば、血管新生がシステマティックに起こり、その結果、動脈および静脈が形成される、分子および血流力学的機構に関する研究はまだ始まったばかりである。動脈-静脈を規定する因子に関する知見は、ゼブラフィッシュの研究がほとんどである。血液循環が始まる前の段階で、VEGF、Notch-Jagged、Ephrin が動脈-静脈を規定すると考えられる。

C.3.3.2 血管成長の機構

血管の成長は最終到達点、最初の刺激および組織に依存し異なった機構で起きる。発生期の胚において、冠状動脈は脈管形成により形成される。その過程において、方向および近位および遠位動脈の口径までもが血流の無い状態で決定される。成人においても血管は同様な機構で成長するが、組織の環境が異なる場合、そこで得られたデータを心筋にあてはめる場合は注意する必要がある。成人心筋において動脈の再構成は主に血流および血管壁に対する剪断応力の変化により生じる。動脈の直径は血流の速度により決まる。その関係が正常な状態から逸脱すると血管は成長あるいは退縮する。側副血管は血管壁が薄い微小血管吻合を形成し、その血管吻合は全て冠状動脈とつながる。一旦冠状動脈内で狭窄が形成されるか、主要な動脈で急性梗塞が起きると、血流は最も楽な道を取り、側副動脈を介して周辺へとその方向を変える。そして、血流、静水圧、側副の血管壁に対する剪断応力が急速に増加し、内皮の活性化および血管増殖因子のアップレギュレーションが起きる。これら増殖因子により血管が増殖および再構成されると、その血管は肥大し中膜それ自体に成長する。その時、生物学的な機能を有する側路が形成され、コンダクタンス血管において血流の低下が代償される。側副形成は数週間から数ヶ月で完了する。そして、急速に成長し直径が増加するが、側副のコンダクタンスは側副により置換される冠状動脈の値には達さない。

心筋は通常循環血液から酸素を最大で 70% を取り出すことができ、心筋の機能は好氣的代謝にも強く影響を受ける。静止期における既存の側副が即時に膨張すると、組織に流れる血流を必要量の半分まで置換できる。血流が完全に枯渇している領域は回復過程で壊死を起こすと同時に繊維性瘢痕組織を形成する。一方、血流が十分ではないがある組織では生きている冬眠心筋はパワーセーブモードに変わる。組織の損傷の程度、心臓機能の回復そしてさらに患者の生存は血流が早期に回復するかどうかによって依存している。側副血管の成長は正常な有酸素心筋において閉塞部位の近位で起こる。一般的な学説によると有酸素組織は血管新生刺激に対しては恐らく反応しないと考えられている。最終目標が心筋における血管新生を誘導することである場合、有酸素組織でも効力のある増殖因子そして健康な組織に対して十分な遺伝子導入効率がある遺伝子と治療ベクターを用いることは一番重要である。側副血管の成長は内皮の変化、平滑筋の増殖および結合組織の再構成が組み合わさって起きるので、用いる増殖因子は内皮細胞から平滑筋細胞さらには繊維芽細胞まで直接的あるいは間接的に影響をおよぼすものを用いる必要がある。

血管新生、毛細血管の増殖と肥大は虚血に対して生体が反応することにより起きる。心筋梗塞後に形成される瘢痕は生きているが、冬眠の心筋に囲まれている。新血管のネットワークは数日以内に形成され、危険にさらされている組織に栄養を与える。血管新生は内皮細胞の増殖と遊走である。内皮細胞は既存の毛細血管から広がり、血管を発芽させる。新しく形成された血

管は週皮細胞にコートされるまでの間は退縮しやすい。このような可塑性のある時期である中間段階では血管ネットワークが整備され、組織の代謝要求に応じることができるようになる必要がある。過剰に毛細血管ネットワークが成長すると、局所の組織かん流が増加するが、閉塞血管領域の血流を代償し、心臓の機能を維持するためには、虚血領域の上流からもっと大きな血管が成長する必要がある。虚血域において血管新生が起きると、毛細血管床の局所における抵抗性が低下し、同じ圧力で動脈上流における血流が増加することになる。

梗塞部位において毛細血管ネットワークが機能するには、虚血領域上流の大動脈からの血流が必要である。大側副動脈において酸素と栄養物の交換が効果的に起きるには、機能を有する毛細血管ネットワークが必要である。血管形成と動脈形成は異なったプロセスであり、その特徴も異なるが、心筋の血流低下に対する生体の反応という点では関連している。

C.3.3.3 成人の心筋における血管新生 (neovascularization) の過程

慢性虚血成人心臓における血管新生 (neovascularization) は血管新生、動脈形成、場合によっては血管発生を含む数々のプロセスから成り立っている。成人における血管新生は HIF-1 α の活性化を介して、組織低酸素状態により主に促進される。HIF-1 α は VEGF および VEGF 受容体 flt-1 そして neuropilin-1 の転写を増大させる。その結果、毛細血管のベッドサイズが顕著に増大するが、近位動脈導管における流量が十分ではない病巣があると、組織に対し全体的な血流の増加には有効ではない。対照的に、動脈形成は側副導管の成熟化あるいは de novo の成長のプロセスであり、有効に血流を運ぶことのできる血管を産生する。これらの血管の直径は血管造影で視覚化できるほどの十分な大きさである。最初の動脈形成刺激はせん断応力と動脈狭窄の部位における血液由来単核細胞の蓄積と考えられており、結果として FGF、PDGF、VEGF を含む多くの血管新生増殖因子の遊離および産生が起こる。さらに複雑なことに、成人における血管新生 (neovascularization) には血管新生および動脈形成だけでなく、血管発生も含まれると考えられている。虚血疾患において、血管発生の冠状動脈と末梢循環における意義についてはよくわかっていない。そしてまさにこの事が問題になっている。従って、血管新生、動脈形成、恐らくは血管発生が成人の心臓において血管新生 (neovascularization) に関与する。その中で動脈形成が心筋血流の改善に最も重要である。

C.3.3.4 虚血における増殖因子の発現調節

ほとんどの増殖因子は虚血組織でアップレギュレートされる。最もよく知られている組織低酸素反応系では低酸素刺激により転写因子 HIF-1 α のレベルが上昇する。HIF-1 α は血管新生標的遺伝子のプロモーターに結合し転写を誘導する。このような血管新生標的遺伝子にはエリスロポエチン、VEGF-A、VEGFR-1 受容体をはじめ、その他約 40 の遺伝子が含まれる。

HIF-1 α の反応が律速段階かどうかは不明であるが、冠動脈疾患に対する動脈形成反応が弱い患者から取り出した単球は、低酸素刺激による VEGF のアップレギュレーションが低下する。同様に、高齢あるいは糖尿病ウサギの下肢において、低酸素刺激による HIF-1 α タンパク質の誘導、および DNA 結合能の増加が低下し、その結果、VEGF のアップレギュレーションが低下する。血管新生の要求が高まる時期において、HGF/SF も不足する。閉塞性動脈の患者では低酸素の期間、血管における HGF 産生はダウンレギュレーションされる。同様に c-met 受容体もダウンレギュレーションされる。興味深いことに、低酸素の期間における HGF のダウンレギュレーションは抗 TGF- β 抗体および FGF-2 の遺伝子導入により抑制されることから、TGF- β および FGF-2 は HGF 産生においてそれぞれ抑制および促進因子として作用することが示されている。対照的に、心筋梗塞の患者では、HGF は顕著に増加する。高齢のレシピエントマウスに移植された心臓における血管新生反応は低下するが、その原因として PDGF-AB の強制動員の低下が考えられる。したがって、PDGF-B あるいは A 鎖の補充により、病態が改善される可能性がある。

C.3.3.5 血管新生療法において有望な増殖因子

(1) VEGF

VEGF ファミリーは現在研究が最も進んでいる血管新生促進因子であり、その中で典型的なものは VEGF-A である。少なくとも四種類のアイソフォームの VEGF-A が選択的スプライシングの結果として生成され、121 (VEGF₁₂₁)、165 (VEGF₁₆₅)、189 (VEGF₁₈₉) および 206 (VEGF₂₀₆) がある。VEGF₁₄₅ のような他のアイソフォームも知られているが、その意義については不明である。VEGF のアイソフォームはヘパリン結合能が異なると血管新生能が異なり、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ に比べて血管新生能ははるかに高い。一方、VEGF₁₈₉ と VEGF₂₀₆ はヘパリン硫酸に対する親和性が高いため、細胞あるいはマトリックスに結合したままの状態が存在する。VEGF₁₆₅ と VEGF₁₂₁ はヘパリンには結合せず、血液循環中で検出される。しかしながら、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ と異なり他の細胞表面受容体である neuropilin-1 に結合し、neuropilin 結合領域の欠損した VEGF₁₂₁ に比べて活性が高い。VEGF ファミリーは他に VEGF-B (VEGF-3)、VEGF-C (VEGF-2)、VEGF-D、VEGF-E および PlGF が知られている。VEGF-E はウイルスタンパク質であり、そのホモログは哺乳類に存在しない。VEGF は三種類のいずれかあるいは全ての種類の VEGF 受容体チロシンキナーゼ、flt-1 (VEGFR-1)、KDR/flk-1 (VEGFR-2)、flt-4 (VEGFR-3) に異なった親和性で結合する。VEGFR-2 はその中でも血管新生のシグナルトランスダクションを最も強く活性化する。また、VEGFR-2 ほどではないが VEGFR-1 も PlGF および VEGF-D が結合することにより同様に活性化し、VEGF-D は VEGF ファミリーの中で骨格筋における血管新生およびリンパ管新生の最も強力な誘導因子である。

VEGF は内皮細胞に対して血管新生促進を促進し、