

Table 5 Table 4 に示した糖鎖の推定構造

Abbreviation	Structure ^a	Theoretical mass ^b
Hybrid(1)		1440.3
Hybrid(2)		1602.5
Hybrid(3)		1440.3
Hybrid(4)		1805.6
Mono(1)		1278.2
Bi(1)		1643.5
Bi(1)-GN		1846.7
FBi(1)		1789.7

^a Man, mannose; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine.

The structure are based upon the known structure of hCG.

^b Average mass value.

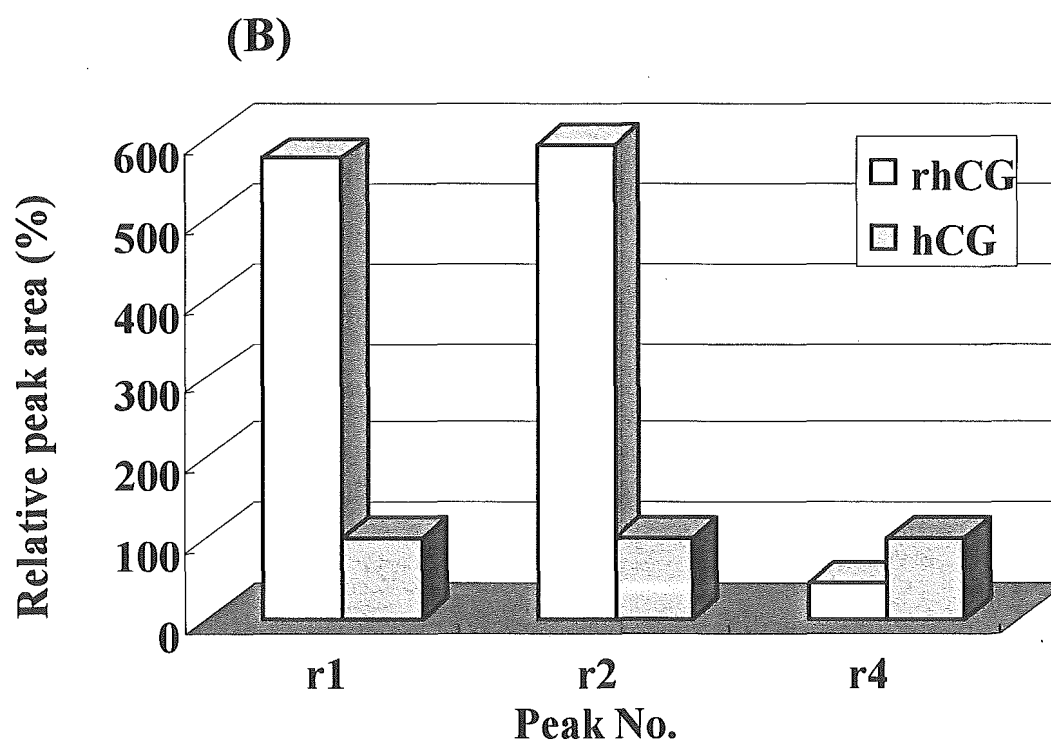
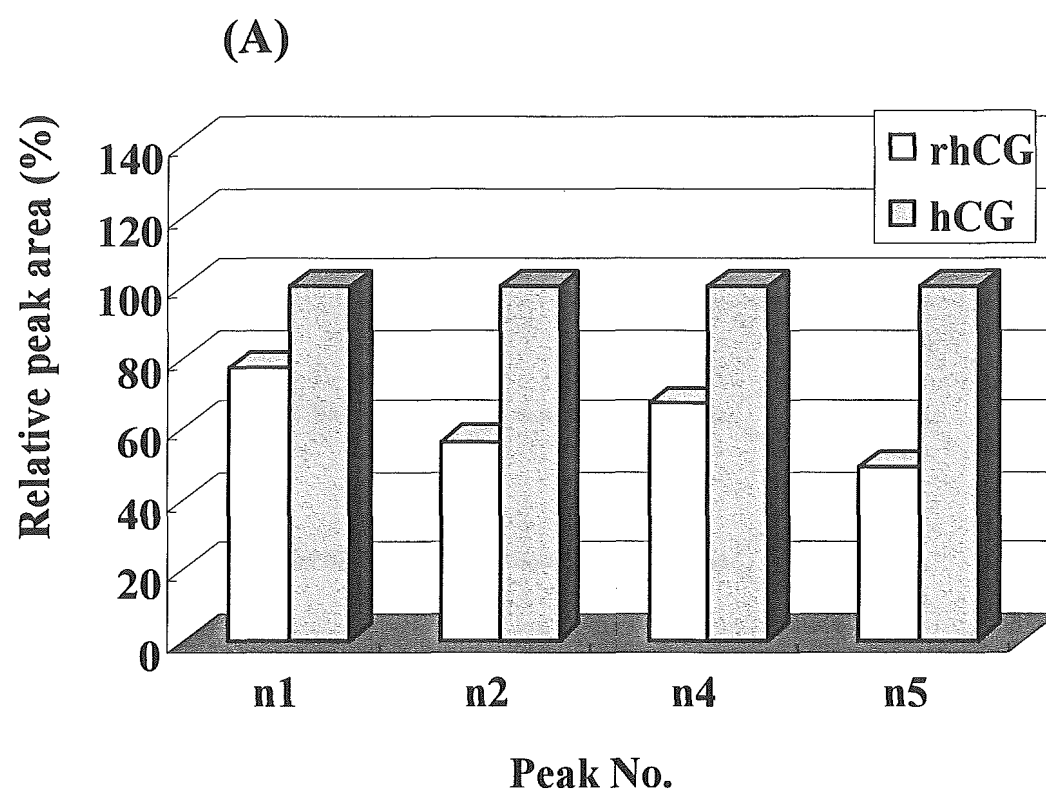
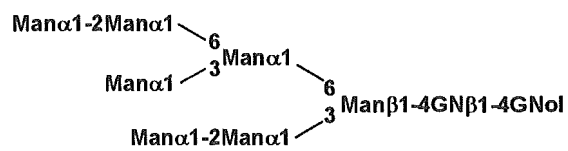


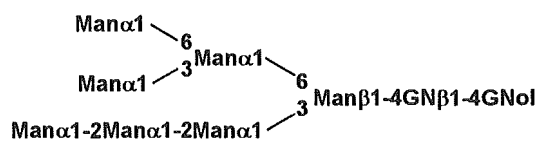
Fig. 9 rhCG及びhCGに共通して結合している 糖鎖の相対結合比

(A) mono-, (B) di-sialylated biantennary

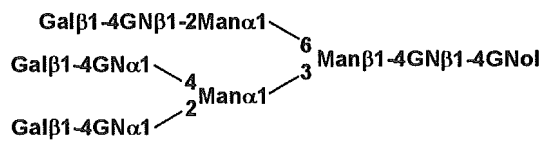
Man7/D1 :



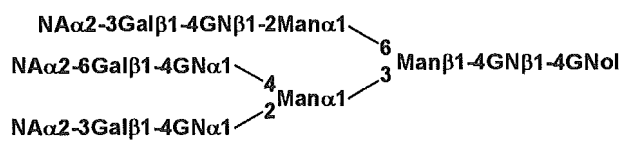
Man7/D3 :



Tri :



TriNA₃ :



TetraNA₄ :

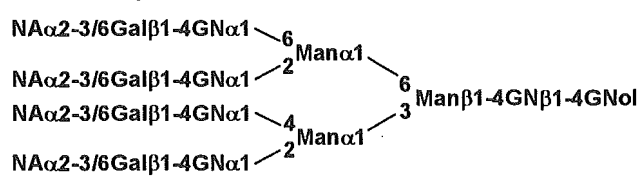


Fig. 10 モデル糖鎖の構造

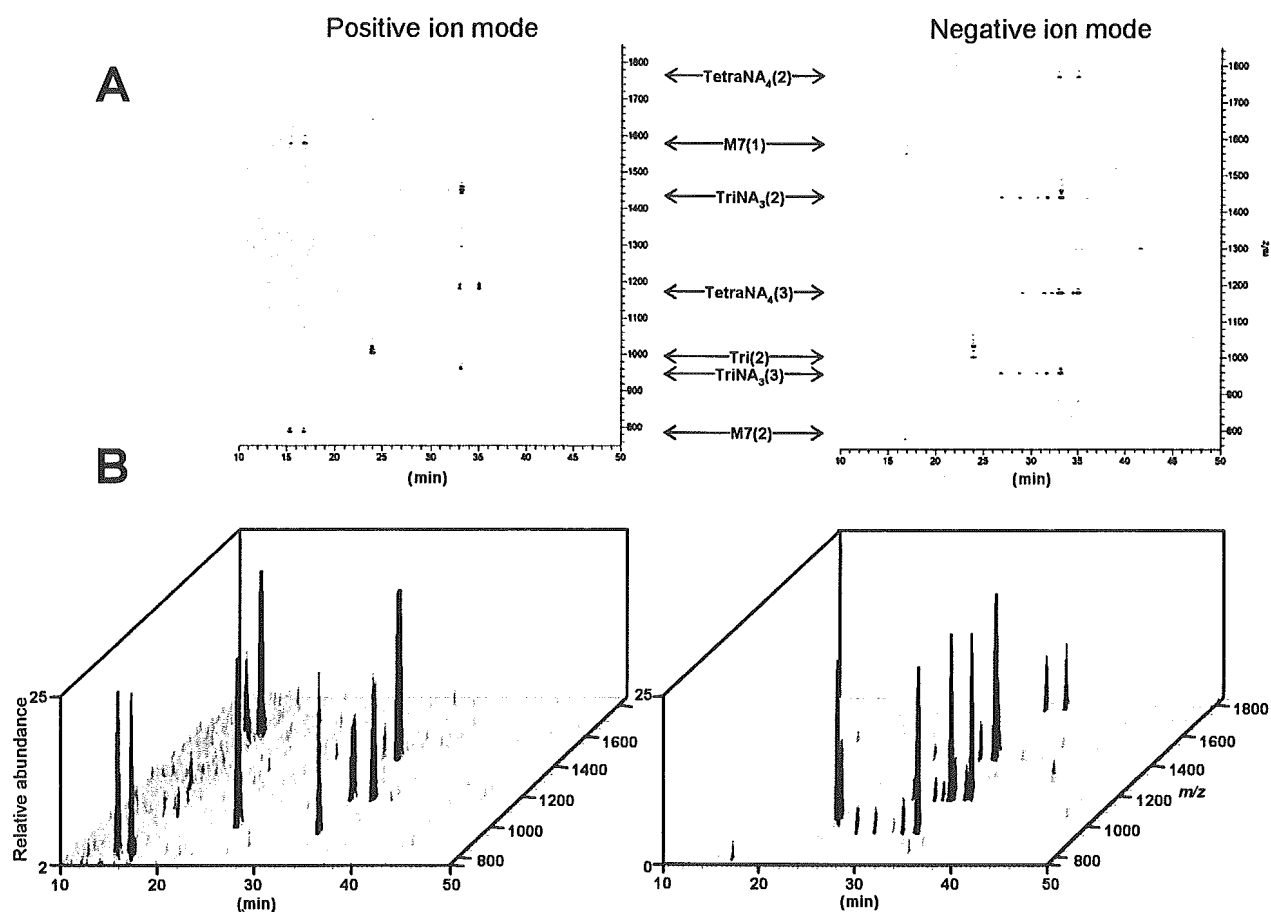


Fig.11 GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMSによるモデル糖鎖のプロファイリング
 (A) 溶出時間 vs m/z 値、(B) 溶出時間 vs m/z 値 vs イオン強度

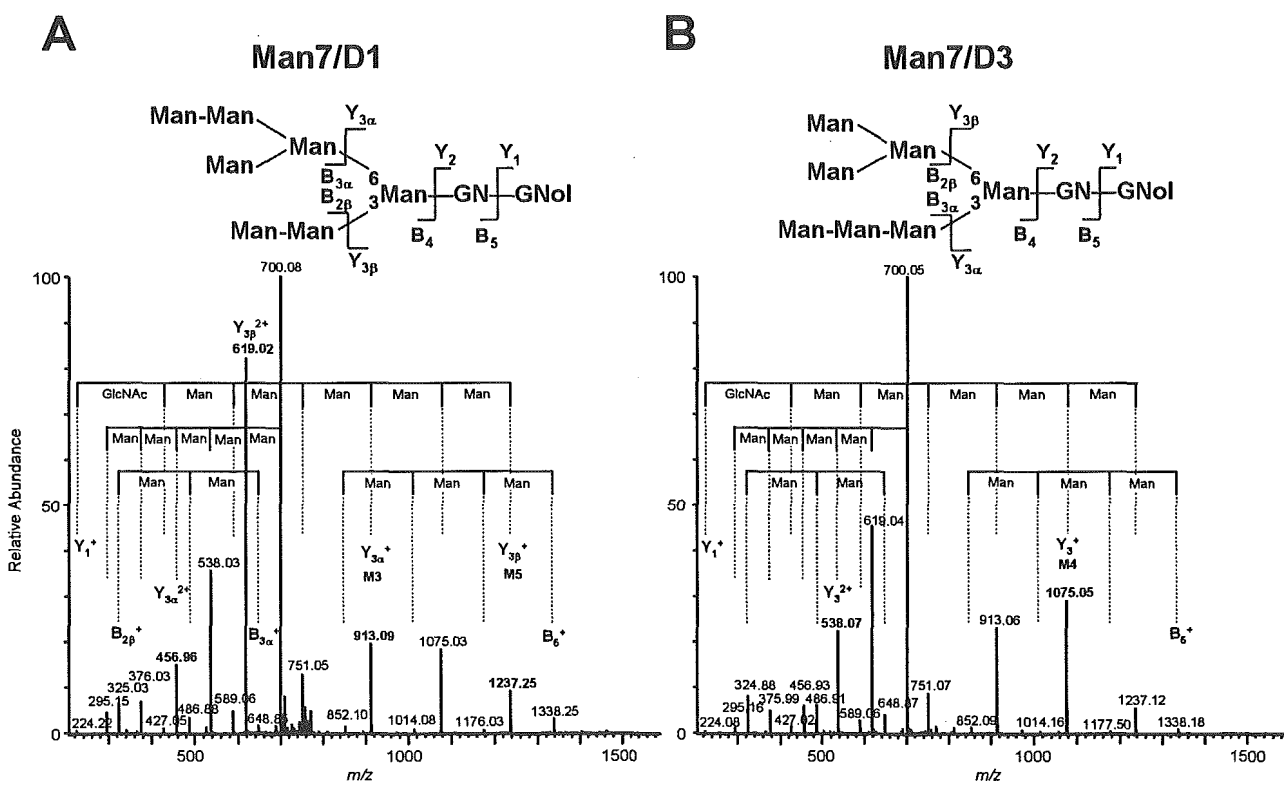


Fig. 12 高マンノース型糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

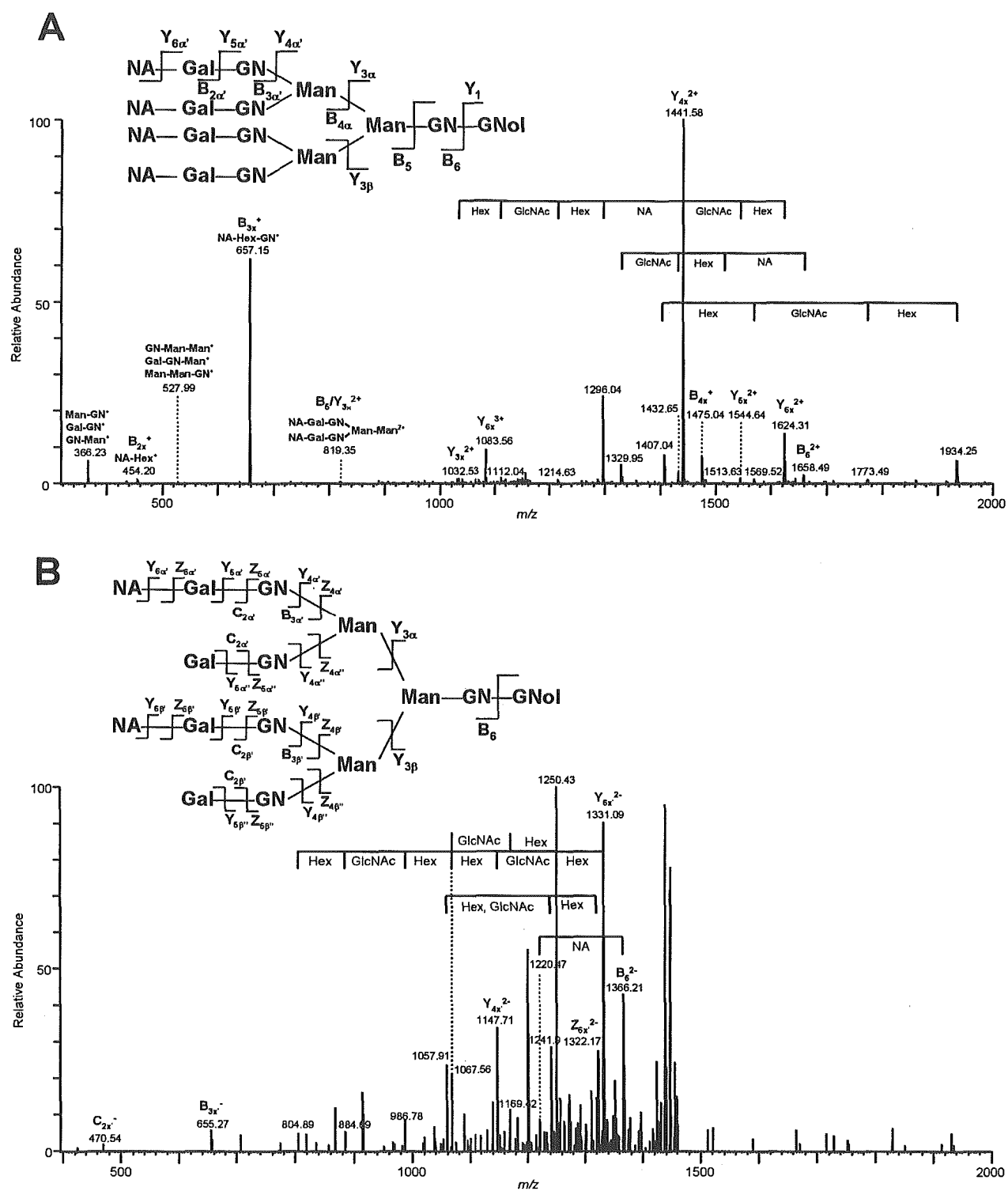


Fig. 13 シアロ糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

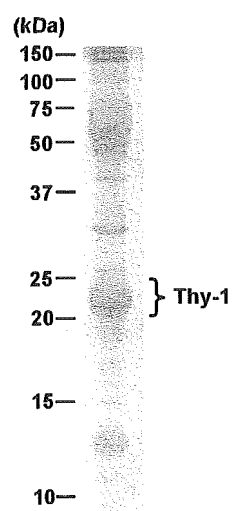


Fig. 14 ラット脳膜由来可溶性GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE

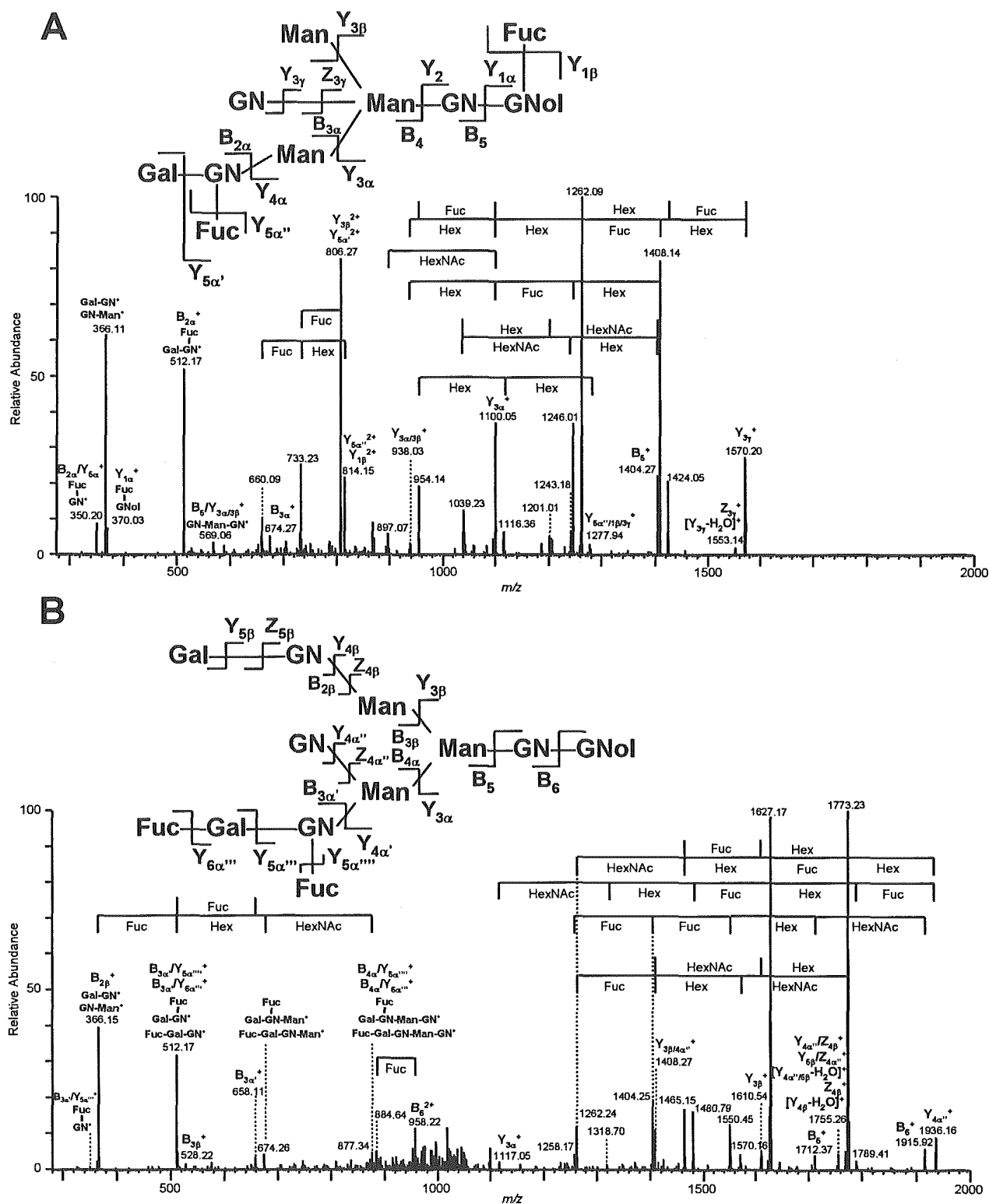


Fig. 16 Thy-1由来フコース結合糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

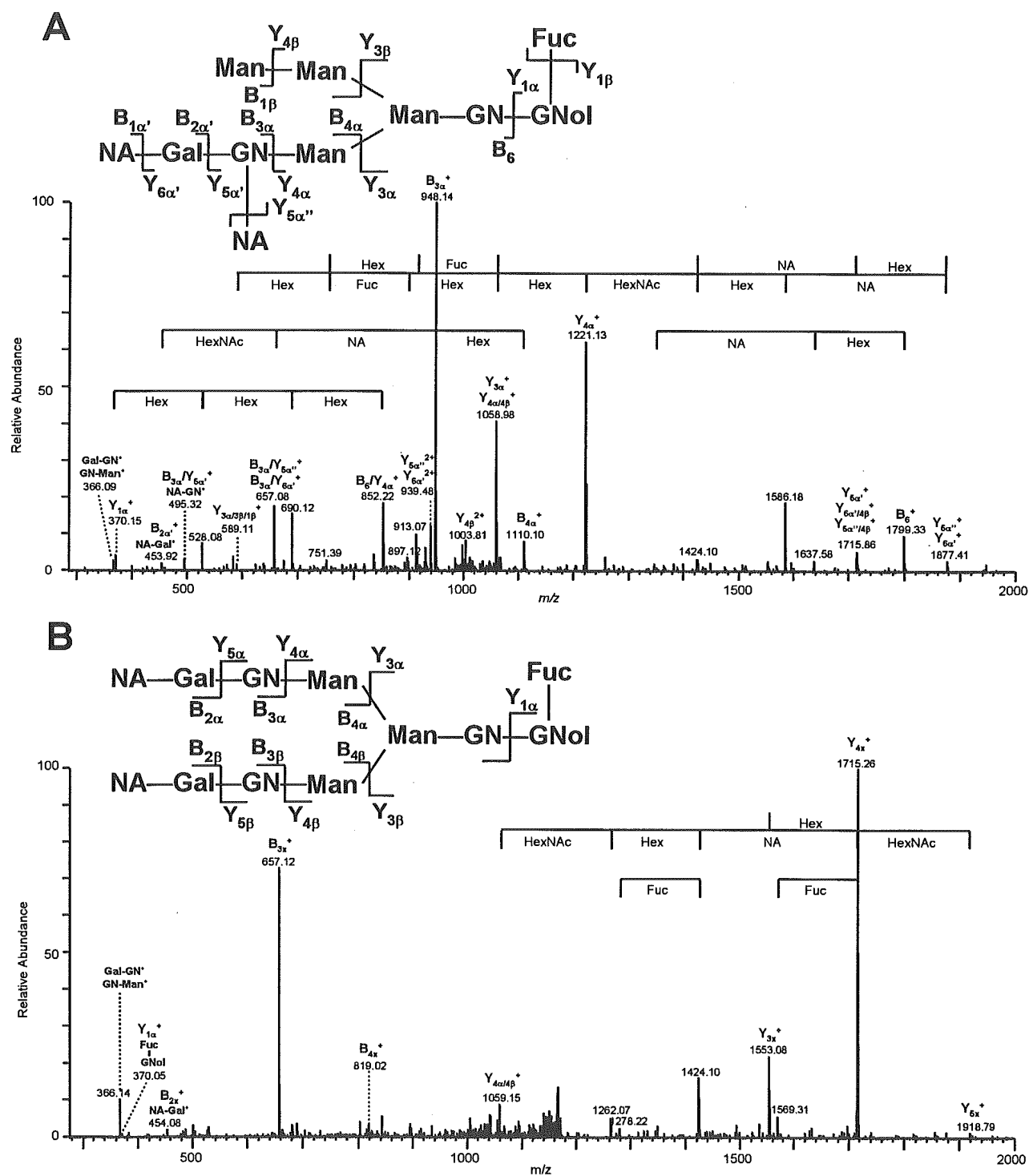


Fig. 17 Thy-1由来シアロ糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

A

MDYYR K YAAI FLVTL SVFLH VLHS¹ APDVQD CPECTLQENP LFSQPGAPIL
 Signal A1
 QCMGCCFSR|A YPTPLR|SK|K|T MLVQK|N⁵²VTSE STCCVAK|SYN R|VTVMGGFK|V
 A2 A5 A6 A7 A8
 EN⁷⁸HTACHCST CYYHK|S
 A9

B

MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA|¹SK|EPLRPR|CR PIN¹³ATLAVEK|EGCPVCITVN³⁰
 Signal B1 B2 B3 B4
 TTICAGYCPT MTR|VLQGVLP ALPQVVCNYR|DVR|FESIR|LP GCPR|GVNPVV
 B5 B6 B7 B8 B9
 SYAVALSCQC ALCR|R|STTDC GGPK|DHPLTC DDPR|FQDSSS S¹²¹K|APPPS¹²⁷LPS
 B11 B12 B13 B14
 PS¹³²R|LPGPS¹³⁸DT PILPQ
 B15

Fig. 18 絨毛性性腺刺激ホルモンの一次構造及び糖鎖結合位置

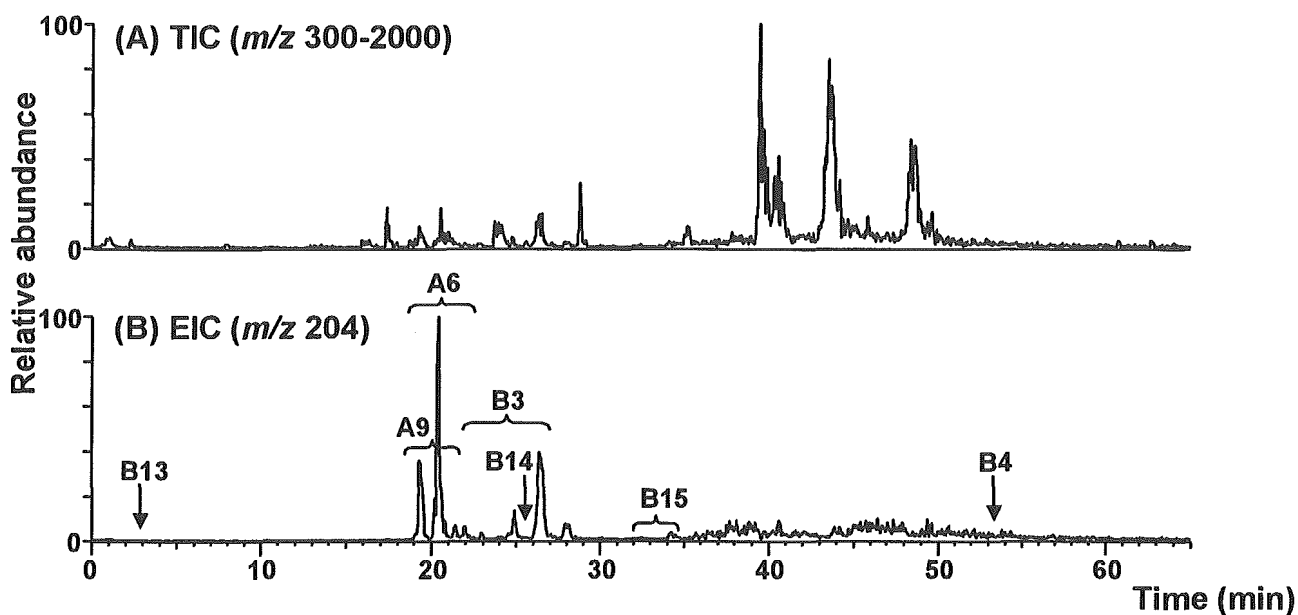


Fig. 19 LC/MSⁿによって得られたhCGのペプチドマップ

Table 6 ペプチドマッピングの分析条件

Sample: Tryptic digest of carboxymethylated hCG (1 µg)

LC:

Column: Magic C18 (0.2 x 50 mm, 3 µ, Michrom BioResources)

Instrument: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

Eluent:

A, 0.1% HCOOH/ 2% CH₃CN

B, 0.1% HCOOH/ 90% CH₃CN

Gradient: 5 % of B in 10 min, 5-65 % of B in 70 min

MS:

Instrument: LTQ (Thermo Electron)

Scan program:

MS¹: *m/z* 300-2000

In-source CID: *m/z* 80-700

Data-dependent MS²⁻⁴

Spray voltage: 1.8 kV

Database search analysis:

Search engine: TurboSEQUEST (Thermo electron)

Database: NCBIInr

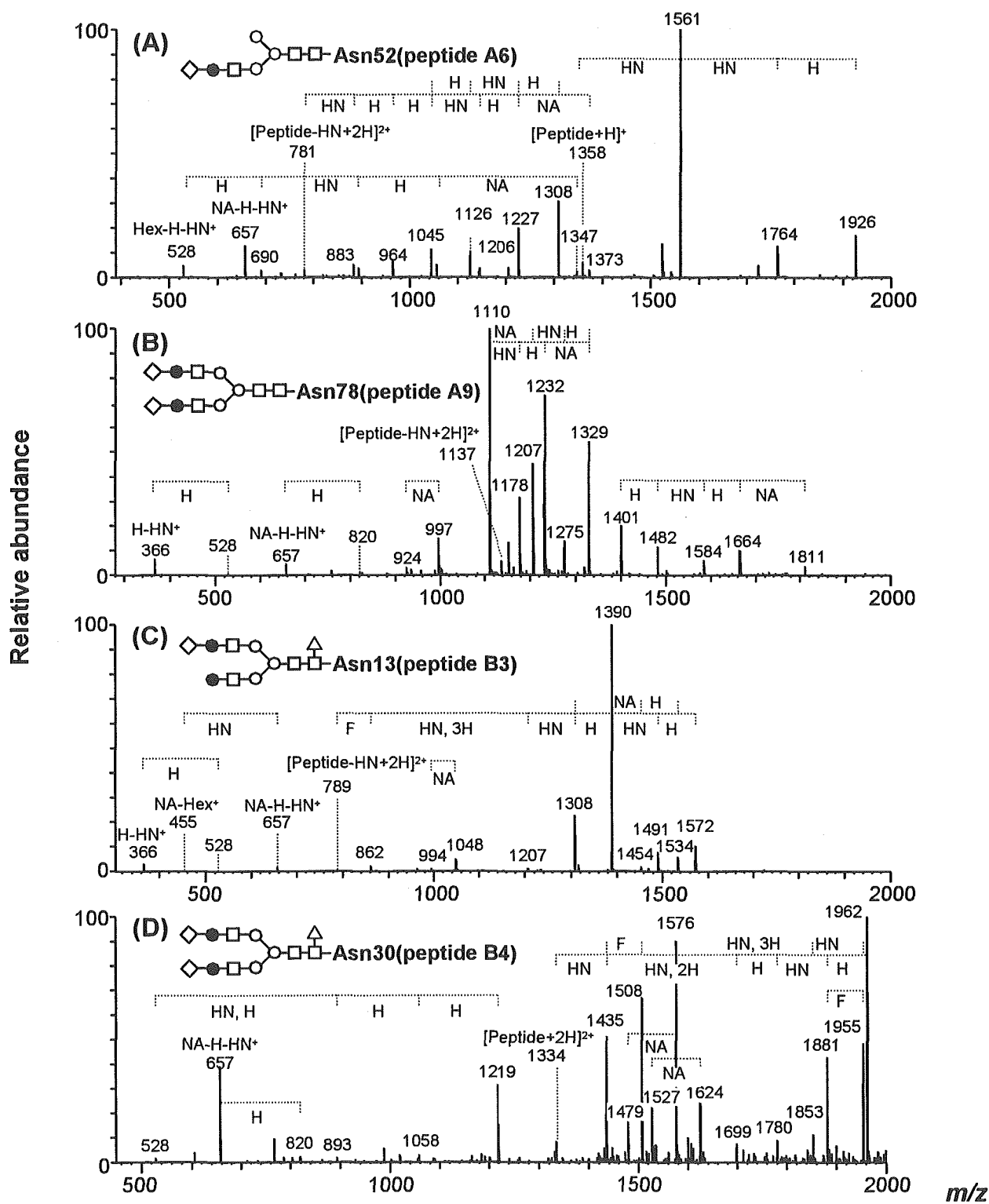


Fig. 20-1 主な糖ペプチドのMS²スペクトル

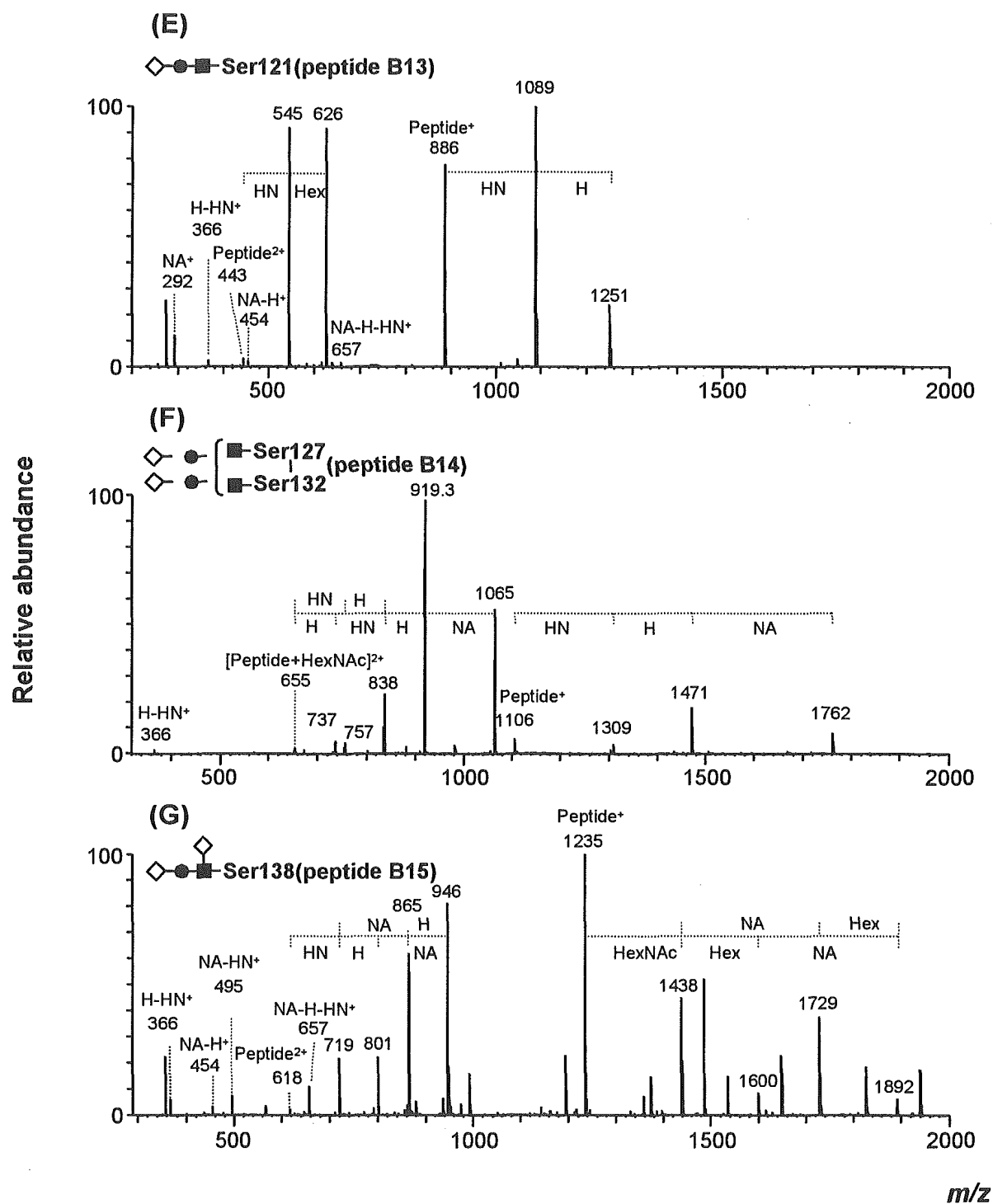


Fig. 20-2 主な糖ペプチドのMS²スペクトル

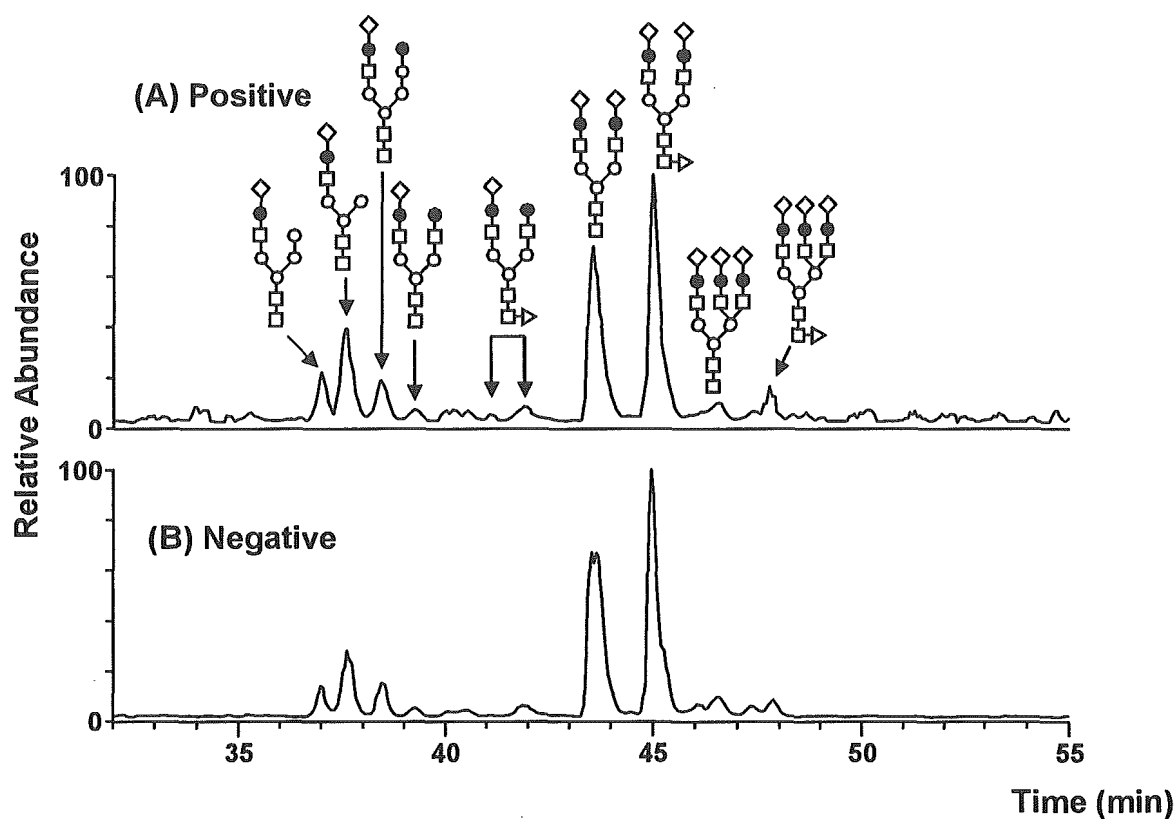


Fig. 21 LC/MS²によって得られたhCGの糖鎖プロファイル

Table 7 糖鎖プロファイリングの分析条件

Sample: Borohydride-reduced *N*-linked oligosaccharides from hCG (6 μ g)

LC:

Column: Hypercarb (0.2 x 150 mm, Thermo Electron)

Instrument: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

Eluent:

A, 5mM NH₄OAc, pH 9.6/ 2% CH₃CN

B, 5 mM NH₄OAc, pH 9.6/ 80% CH₃CN

Gradient: 5-40 % of B in 60 min

MS:

Instrument: LTQ (Thermo Electron)

Scan program:

MS¹: *m/z* 450-2000

Data-dependent MS²⁻⁴

Spray voltage: 1.8 kV

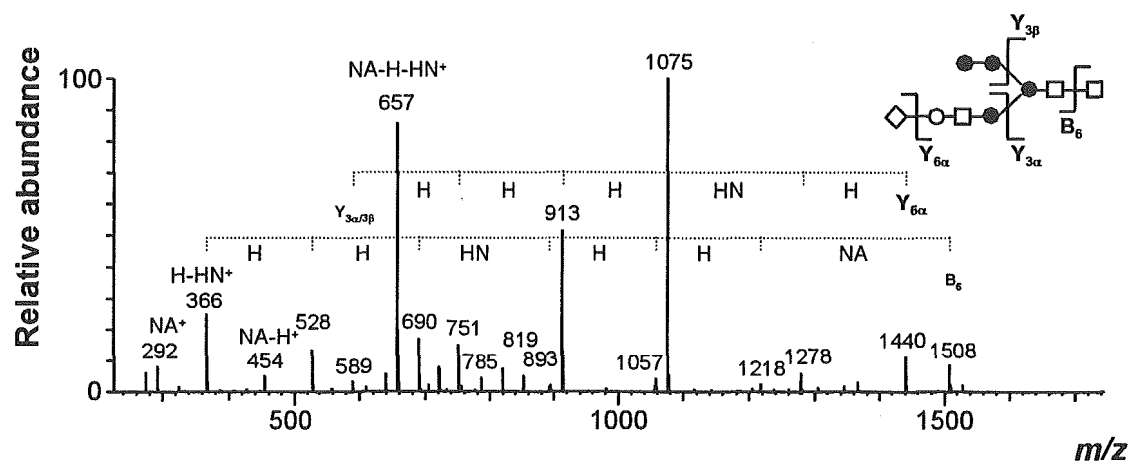


Fig. 22 糖鎖のMS²スペクトル

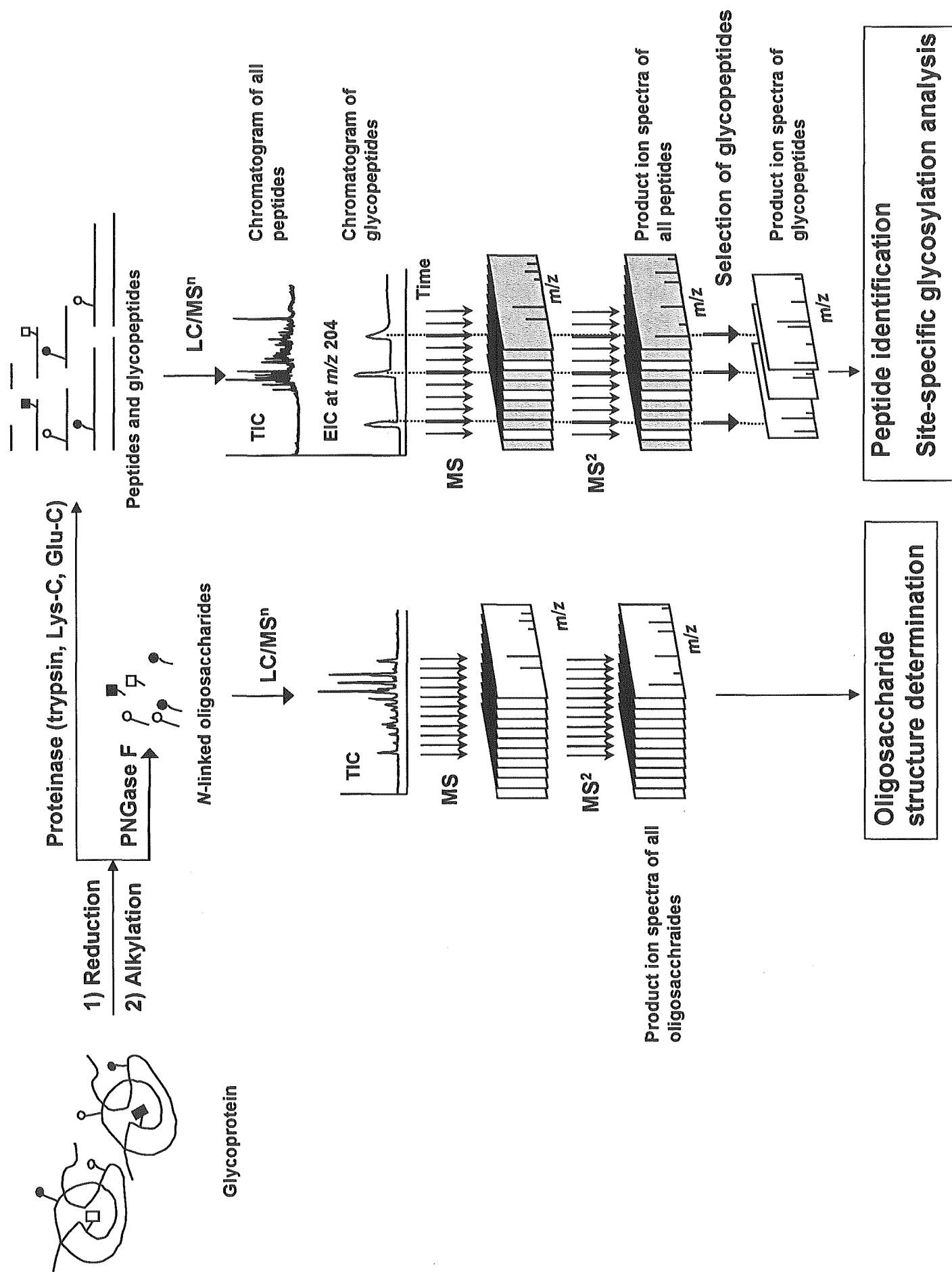


Fig. 23 LC/MSⁿを用いた糖タンパク質性医薬品の構造特性解析のためのストラテジー

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

分担研究者 新見 伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第三室長）

研究要旨

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究として以下の3点について調査および研究を行った。

抗体医薬の現状と展望について調査および研究を行った結果、以下の点が明らかになった。従来のマウスモノクローナル抗体はヒト免疫原性による繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のため、治療薬への適用は非常に限られたものであった。これら問題点を克服するためヒト型モノクローナル抗体が作成され、そのうち幾つかは現在治療薬として承認されている。ヒト型抗体としてはマウス-ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体がある。マウス-ヒトキメラ抗体はマウスモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体C領域に置き換えたものである。ヒト化抗体は抗原が実際に結合する超可変領域を残して、それ以外の部分を全てヒト抗体に置き換えたものである。ヒト抗体にはファージディスプレイ法を用いて作成したものと内因性免疫グロブリンをノックアウトしたマウスに機能的なヒトのIgGを導入して作成したトランスジェニックヒト抗体がある。キメラ抗体、ヒト化抗体においては抗原性が著しく減弱したものの、抗原性の問題は依然残されている。ファージディスプレイヒト抗体は多様性が高いが、完全抗体分子型ではないことに起因する有用性に問題点もある。トランスジェニックヒト抗体は現時点で最も天然ヒト由来の抗体に近い。また、マウスを免疫すればヒト抗体を従来のハイブリドーマ法で容易に得ることができる。技術的な制約からIgG全領域の遺伝子をマウスに導入できないため、抗体の多様性ならびにハイブリドーマ取得率の低下などが問題となっていたが、改善されつつある。抗体の作用機序として抗体の直接作用、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、抗体依存性細胞障害活性、抗体依存性細胞性傷害活性、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がある。現在、ヒト型抗体としてリツキシマブ（非ホジキンリンパ腫）、トラスツズマブ（乳癌）、インフリキシマブ（クローン病、慢性関節リウマチ）などが日本で認可されている。

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について調査および研究を行った結果、以下の点が明らかになった。肝疾患の細胞治療、人工肝臓装置、遺伝子治療の担体としての肝幹細胞の使用が期待されている。肝幹細胞に関する研究の進展により、動物およびヒトにおいて肝幹細胞の存在が確認されている。肝幹細胞の代表的な例としてoval cellと骨髄由来細胞があげられる。oval cellは2-acetylaminofluorene/部分肝切除あるいはcarbon tetrachlorideに代表される肝障害動物モデルの肝臓において発現が上昇し、肝細胞および胆管上皮細胞に分化誘導される。その由来としてヘリング管、門脈路、胆道系の枝分かれ領域などの可能性が提唱されている。Oval cellの増殖および分化に関与する液性因子としてTNF- α 、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、TGF- β 、HGF、EGF、HSSなどが示唆されている。また、feeder layer、コンディショニングメディア、細胞外マトリックスも関与が示唆されている。同様な肝障害モデル動物などにおいて移植された骨髄細胞は肝細胞および胆管上皮細胞に分化することが示されている。さらに、男性から採取した骨髄細胞を移植した女性患者や女性患者の肝臓を移植した男性患者には、Y染色体を持つ肝細胞や胆管上皮細胞が存在した。骨髄由来細胞の肝臓への生着にはstromal derived factor-1の関与が、肝細胞への分化にはHGFの関与が示唆されている。その他の肝幹細胞として小型肝細胞、胎児由来肝幹細胞などが知られている。肝細胞を用いた細胞治療として有望な疾患として原発性肝臓病、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がある。人工肝臓装置の作製には多量の細胞が場合によっては長期間必要となる。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、有用と考えられる。肝幹細胞は遺伝子治療の担体としても有用となる可能性がある。例えば肝臓に欠損している酵素遺伝子や肝臓を標的として疾患の治療に有用なたん白質の遺伝子を導入した肝幹細胞を肝臓に移植し、長期にわたり肝臓において導入遺伝子の発現がおきるようにすることも期待されている。

血管新生療法の現状と展望について調査および研究を行った結果、以下の点が明らかになった。血管新生療法は、新しい血管の成長を促進させることで虚血組織の血流を回復させる虚血性疾患の治療法である。虚血性疾患の患者は極めて多く、既存の治療法に不適症例も少なくないことから、血管新生療法の開発が急務の課題となっている。これまで行なわれた多くの研究から、血管新生に関わるたん白質、遺伝子、細胞を利用したいくつかの血管新生療法が提案され、虚血動物モデルを用いた基礎的な検討をはじめ、進行性の冠動脈および末梢動脈疾患の患者を対象にした臨床試験などによって有効性が評価されてきた。これらの血管新生療法は動物モデルや前臨床試験では有効性を示唆する結果が得られたが、初期の二重盲検無作為臨床試験では有効性が確認されなかった。しかしながら、血管新生療法は、現在の様々な問題点を克服さらに改良を重ねることにより、近い将来において、虚血性疾患の有効な治療法として臨床応用されるものと大いに期待されている。

研究目的

1. 抗体医薬の現状と展望

抗体医薬の始まりは 19 世紀終わりのエミール・ベリングと北里柴三郎による血清療法にさかのぼる。彼等は加熱変性させたジフテリア菌毒素をウサギに注射することにより、ジフテリアに対する抵抗性を獲得させた。さらに、そのウサギの血清を他のウサギに注射すると、ジフテリアに対する抵抗性をワクチンの接種されていないウサギに移せることを発見し、これをヒトに応用した。その後、ヒト血液から精製したガンマグロブリン製剤が開発され老人や術後の患者の日和見感染症、川崎病の自己免疫病に多用されている。1975 年にモノクローナル抗体作成技術がケラーとミルシュタインにより開発されてから、対象となるターゲットに対して高親和性と特異性の高いマウスモノクローナル抗体については基礎研究だけでなく治療薬を目指した膨大な研究が行われてきた。実際、モノクローナル抗体治療薬は①分子化合物に比較して基本的に細胞毒性が低いもしくは無い、②比較的長期にわたり血中濃度の維持が容易である、③結合対象となるリガンド選択性・特異性に優れている、④抗原の捕捉だけでなく生体内からの排除が可能であるといったメリットがある。しかしながら、マウスモノクローナル抗体の治療薬としての利用はヒトへの免疫原性により繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のために、非常に限られたものであった。そこで今日までに、免疫原性、アナフィラキシーショックの危険性を低減し、繰り返し投与を可能にするヒト型モノクローナル抗体を作成する様々な技術が生み出され、このようにして作成されたヒト型モノクローナル抗体の一部は医薬品として承認され臨床で用いられており、現在臨床応用を目指して開発中のものも多い (Table 1、Table 2)。そこで本研究においては抗体医薬の基礎と臨床応用、問題点等について調査および研究を行なった。

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。

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性心臓病は、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。

虚血性心臓病の症状は、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、うっ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、臨床上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、たん白質、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。

B. 研究方法

1. 抗体医薬の現状と展望

ヒト型抗体医薬の作成法、各ヒト型抗体医薬の長所と短所、作用機序ならびに現在認可されている抗体医薬それぞれの特徴について、参考文献 1~45 を中心に調査および研究を行なった。

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

肝幹細胞の由来、肝細胞への分化誘導に関する最近の知見および肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の現状と展望について、参考文献 46~65 を中心に調査および研究を行なった。

3. 血管新生療法の現状と展望

これまで試みられてきた血管新生療法として、たん白質、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、参考文献 66~69 を中心に調査および研究を行なった。

C. 研究結果および考察

1. 抗体医薬の現状と展望

1.1 抗体医薬の作成

1.1.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体は遺伝子組換え技術を用いてマウスモノクローナル抗体の定常 constant (C) 領域をヒト抗体の C 領域に置き換えたものである (Fig. 1)。さらにヒト化抗体は抗体たん白質の三次元構造をもとに、抗原が実際に結合する相補性決定領域 complementarity determining region (CDR) の 1 から 3 を残して、それ以外の部分であるフレーム領域 frame region (FR) を全てヒト抗体に置き換えたものである (Fig. 1)。以下に、マウスハイブリドーマ細胞から、遺伝子として cDNA を用い遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する。

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子 (以下マウス抗体遺伝子) のクローニングである。ハイブリドーマ細胞より RNA を抽出し、①cDNA を作製後、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、たん白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イムノグロブリン (Ig) C 領域をヒト Ig C 領域に組換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製は以下の複雑なステップからなる。ヒト化抗体作製の第一ステップでは、クローニングしたマウス抗体可変 (V) 領域における抗原との結合に寄与する超可変領域 (CDR) 配列とヒト抗体 V 領域に