

がって、siRNA 及び shRNA が RNAi 経路の飽和と毒性を示すかどうかは、細胞内に蓄積された siRNA のレベルに依存すると思われる。

RNAi 治療薬を最適で安全なものとして開発する必要条件として、内在性の RNAi 経路をより理解することも必要である。重要なステップは、治療の標的となる組織あるいは細胞における、各種の RNAi に関する特定の因子の特性及び発現プロファイルの比較である。以下に示すように、ウイルス-RNAi 相互作用を更に研究することにより、治療用 RNAi を最適化する機構及び概念が明らかになる可能性がある。実際、多くのウイルスは、感染細胞において RNAi 成分と相互作用しその機能を抑制する^{128,129)}。例えば、AV は、そのウイルス RNA により、exportin-5 の機能を飽和し消失させる⁸⁸⁾。これは、ベクターによりコードされる shRNA を高いレベルで発現する細胞において起きる現象と類似している。同様に、*in vivo* における siRNA レベルを定量して比較する方法を考案すると共に、異なった RNAi トリガーをデリバリーするため複数の利用可能なベクターを用いることも重要である。

同じ観点から、多くの研究者により、RNA の発現調節及び組織特異的な発現を可能とする、RNA ポリメラーゼ II を基にした新規の RNAi プロモーターの開発が行われている。その最終目標は、これらのプロモーターの使用により、内在性の miRNA 系特に exportin-5 及び RISC の過剰飽和のリスクを避けながら、核における shRNA の発現を十分高いレベルで厳密に調節し、強力で持続した RNAi を起こすことである。現在、可逆的あるいは永続的な変異体を含め、様々な遺伝子発現ベクター系の改変が行われている¹³⁰⁾。この戦略では、内在性の miRNA は通常 RNA ポリメラーゼ II から発現する。多くの場合、特定の shRNA は内在性の miRNA とのハイブリッド型で発現させる。したがって、このハイブリッド型では、miRNA の存在により shRNA が RNAi を起こす構造となっていないことが障害となる。また、この戦略では、shRNA の最も効率的な発現とプロセッシングは保障されるが、ハイブリッド shRNA/miRNA 転写物の切断には、核の Drosha が必要とされる。したがって、他の細胞内 RNAi 成分が飽和されるリスクも同時に増加する。一般的に、治療用 RNAi に適したベクターの最終目標は、この

ような最適なプロモーター系と最適なデリバリーベヒクルを結合させることである。このようなオプションは、ベクターを基にした RNAi 発現系に限定されており、siRNA をベースにした戦略では適用できない。この組み合わせにより、最終的に、shRNA コンストラクトの特異的なターゲティングだけでなく、最大限に厳密な遺伝子導入が可能になることが期待される。このように、off-target 細胞における有害事象を除去することにより、患者において、最大の安全性だけでなく最も高い有効性を保障することが可能となる。

4. 新規の RNAi を基にした治療戦略

RNAi の最も代表的な臨床適用は、ヒトの疾患に関連した遺伝子あるいは mRNA を直接ターゲティングすることである。

4.1 組み合わせ RNAi

病原性のウイルスを標的として RNAi 治療を用いる際の懸念は、過去において他の単独治療が直面した障害と同じである。最も大きな障害は、高い比率で起きるウイルスの変異により急速に生じるウイルスのカプシドミュータントを調節することである^{128,129)}。この典型的な例が "Hepatitis C Virus" (HCV) 及び HIV のような RNA ウイルスである。HCV の場合は、1 年間にウイルスのヌクレオチド当たり 103 個の変異を取り込む。また、HIV は急速に変異を取り込んでいる。これらの場合では、RNAi の優れた特異性が逆に欠点となる。なぜなら、siRNA/shRNA とウイルス標的 mRNA 間の単一ヌクレオチドミスマッチにより、認識と抑制が無効になるからである。ウイルスの変異の問題をうまく解決する方法は、siRNA のカクテルあるいは多くの種類の shRNA を発現するベクターを用いて、標的とするウイルスゲノムをターゲティングすることである。この戦略では、一般的にウイルスゲノム内の異なった部位及び理想的にはウイルスファミリーのすべてのメンバーの中で高度に保存されている配列に対して、複数の RNAi トリガーを同時にターゲティングする。この戦略により理論的には、これら RNAi トリガーにより、エスケープミュータントの形成が効果的に阻止できるはずである。実際多くの研究により、この組み合わせ RNAi によるアプローチの妥当性が評価されており、わずか 3 種類あるいは 4 種類

の siRNA/shRNA の組み合わせにより、HIV のような非常に変異の頻度が高いウイルスでも、十分抑制できることが示唆されている¹²⁸⁾。抗ウイルス組み合わせ RNAi では、ウイルスにハイジャックされる細胞の受容体や細胞質あるいは核タンパク質など病原体の感染に寄与する宿主因子を標的とした、RNAi トリガーを混合することも可能であると考えられる。

組み合わせ RNAi 戦略は、がんを含む他のヒトの疾患の治療にも有望である。その例は、BRAF 及び SKP2 の共抑制であり、単独治療よりも優れた抗腫瘍効率が示されている¹³⁰⁾。なお、これらの遺伝子は、メラノーマ細胞でアップレギュレーション及び変異が起こる頻度が高い。改良型のがん特異的な組み合わせ RNAi は、通常のがん治療薬の有効性を増強させることを目的として、化学療法あるいは放射線に対する抵抗性に寄与するがん遺伝子を抑制するために実施される。その例として、MultiDrug Resistance 1 によりコードされる P-glycoprotein がある。結腸癌細胞において、P-glycoprotein のレトロウイルス/shRNA を介したサイレンシングにより、抗がん剤に対する感受性が増強した¹³²⁾。また、HIF-1 α の抑制に、AV ベクターを介した shRNA の発現が用いられた¹³³⁾。なお、HIF-1 α は、低酸素条件下で急速に成長する腫瘍でアップレギュレートされる。この抑制により、マウスにおける腫瘍の成長が遅れるだけでなく、同時に放射線を照射することにより、相乗的な腫瘍成長抑制効果が発揮された。このように、がんの治療において、ベクターを用いた組み合わせ RNAi の概念が有効であることが示されている。その他の組み合わせ RNAi の戦略は、リボザイム、アンチセンス、トランスドミナントタンパク質のような他の遺伝子発現の阻害剤のいずれかと組み合わせ、shRNA を発現するベクターをデザインすることである。注目すべき候補は、HIV 感染を撃退するためにデザインされたレンチウイルスベクターである。このトリプルベクターは、抗 HIV shRNA、細胞内 HIV CC 5 receptor に対するリボザイム、ウイルス TAT タンパク質を隔離するための HIV-TAR デコイを共発現し、初代造血細胞で HIV の複製を阻害した¹³⁴⁾。また、このトリプルベクターを導入した CD34⁺ 造血幹細胞を SCID-hu マウスの脾臓に移植すると、その細胞は正常な T 細胞に分化し、培養系で HIV 感染に抵抗を示した¹³⁵⁾。それに代わる

将来の世代のベクターは、レポーターあるいはマーカーとして用いるタンパク質あるいは相乗効果を有するタンパク質を共発現するベクターである。最初の例は、 γ -グロブリン cDNA と共にヒト鎌状 β -グロブリンに対する shRNA を共発現するレンチウイルスである¹³⁶⁾。鎌状細胞貧血患者からの CD34⁺ 細胞にこのベクターを導入すると、赤血球依存的に γ -グロブリンを発現し、 β^s は特異的に低下した。本結果より、幹細胞由来の分化組織・細胞において、相乗的な遺伝子のサイレンシング/発現が必要となる治療戦略の実現可能性が示された。

このように有望な成功例が示されているが、RNAi の組み合わせとベクターについては、更に最適化が必要である。現時点での主要な不明点は、複数の遺伝子を運ぶヘアピン RNA 及び関連するプロモーターの遺伝的安定性に関する懸念である。少なくともプラスミドベクターに関しては、一つのプロモーターでも最大 10 個の shRNA コピーを連結させることは妥当と思われるが、ヘアピン RNA の数が 3 個を超えると不安定になるとの報告もある¹²⁹⁾。これらのパラメーターに関しては、一つあるいは数個のプロモーターにおける多数のヘアピンの位置及び個々の shRNA を分離する配列の長さ及び構造のような他の因子も含めて、徹底的に試験を行い最適化することが必要である。最終的には、特定の疾患のターゲティングに多数の配列を用いる場合、RISC への個々の siRNA の取り込みにおいて、有害な競合を避けることが重要である。競合により特異的な siRNA の効果が制限されると、組み合わせ RNAi 治療の概念が無効になる。

4.2 治療標的としての miRNA

哺乳類及びヒトにおける RNAi 経路の主な機能は、内在的にコードされる miRNA の産生及びプロセッシングであることが明らかになってきた⁶⁻⁹⁾。miRNA は、通常 3' UTR の部分的に相補性のある mRNA へ結合し阻害することで作用し、おそらくは数千の遺伝子発現を転写後に調節する。これには明らかにオーバーラップするプロセスがあり、正確な機構は十分には解明されていないが、大部分は mRNA の分解よりもむしろ転写の阻害を介して起こる可能性が高い^{8,9,12,137-140)}。この結果、miRNA が、分化、形質転換、あるいはウイルス感染のような、多数の多様性のある良性あるいは悪性の細胞プロセスの重要なレ

ギュレーターになる。したがって miRNA は疾患の治療戦略について幅広い可能性を提供し、これらの分子を研究あるいは開発する様々な戦略が検討されている¹⁷⁾。

その一つとして、一過性にあるいは持続的に表現型の機能を抑制させることを目的として、特異的かつ効率的に miRNA の機能を阻害する、新規の方法論が導入された¹⁴⁾。その方法の一つは、“Cytomegalovirus” (CMV) プロモーターにより駆動される不安定化 GFP レポーター遺伝子の 3'UTR に、直列に複数の miRNA 結合部位を挿入するものである。もう一つは 5' 及び 3' ステムループを有する U6 “small nuclear RNA” (snRNA) プロモーターを含むベクターの中に、miRNA 結合部位領域をサブクロニングするものである。miRNA スポンジと呼ぶこれらコンストラクトは、導入した細胞で相補的な 7 個の配列を有する miRNA と結合し選択的に阻害できた。その効果は、標準的な条件で用いた場合、Antagomir¹⁴²⁾ 及び Locked Nucleic Acid Antisense Oligodeoxynucleotide¹⁴³⁾ を含む過去に報告されている主要な miRNA の阻害剤と少なくとも同等であった。本研究で miRNA スポンジも通常 miRNA により調節されている内在性の標的を抑制できたことから、このようなコンストラクトは、ターゲティングの妥当性評価において、非常に有望な手段であることが示唆された。実際、少なくとも一過性に導入した細胞における miRNA スポンジのコピー数は、細胞当たり数千であり、おそらくほとんどの miRNA を抑制するのに十分であると推定された。

治療用 RNAi の観点から、この新しい方法論は、ウイルスの治療用ベクターから発現されるトリガーを用いて、miRNA の機能を抑制する多くのオプションを提供できるため、非常に興味深い。適用が可能と考えられる例として、腫瘍形成における miRNA の機能の評価¹⁴⁴⁾、最終的には動物モデル及び患者においてがんを引き起こす miRNA の抑制が含まれる。別の興味あるオプションは、肝細胞で高発現し、ウイルスゲノムの 5'UTR に対する結合により、HCV の複製に必要である “miRNA-122” (miR-122)¹⁴⁵⁾ の遮蔽に、miRNA スポンジを用いることである。これにより、新規なウイルスの肝細胞感染に対する抑制法が提供されるだけでなく、他の RNAi、例えば、他の抗 HCV shRNA 及び HCV 阻害剤を組み合わせ

ることができる。

しかし、この場合も、この系の多くのパラメーターを、十分に特性解析し最適化する必要がある。例えば、理想的な miRNA 結合部位の数、スポンジ内におけるお互いの配置は不明である。これらの問題は今後動物実験で評価する必要がある。また、この新規方法論には安全性についてリスクがある。懸念の一つは、特に一個の miRNA がおそらく数百あるいは数千の標的を調節するという事実から、内在性 miRNA を完全かほぼ完全に遮蔽することにより、細胞が有害な効果を受ける可能性があるということである^{139,140)}。miRNA ファミリーの大部分の機能は不明であるので、多数の miRNA の同時抑制が細胞及び生物体に耐容でない可能性は否定できない。

4.3 導入遺伝子の組織選択的な発現

先ほどの戦略とは別に、GFP 遺伝子の 3'UTR に miRNA (mir-142-3p) の結合部位を挿入する戦略も取られている¹⁴⁶⁾。mir-142-3p は血液系統の細胞に選択的に発現する。近年、遺伝子治療において、導入遺伝子産物に対する宿主の免疫反応が、安定した遺伝子導入の障害となることが指摘されている。この研究の目的は、宿主免疫反応誘導の大きな要因である、抗原提示細胞での導入遺伝子発現を抑制するため、造血系細胞での導入遺伝子発現を抑えつつ、それ以外の系列の細胞で高い遺伝子発現を実現する方法を、miRNA システムを利用して開発することであった。実際、免疫不全マウスにレンチウイルスでデリバリーさせると、GFP は造血系統ではなく非血液細胞、特に肝細胞及び内皮細胞にのみ発現した。その結果、GFP は抗原提示細胞で発現しないため、マウスは抗 GFP 免疫反応を起こさず、ベクターの発現は維持された。ごく最近のフォローアップ研究で、同じ原理が造血細胞における組換えヒト第 IX 因子 “Human Clotting Factor IX” (hFIX) の off-target 発現を抑制するために用いられた¹⁴⁷⁾。これは、抗原提示細胞における hFIX の発現を阻止し、通常マウスにおいて長期間 hFIX を導入する際に障害となる、抗 hFIX 特異的な適応免疫反応の誘導を抑制した。実際、hFIX-mir-142-3p 融合ベクターで処理した免疫応答性血友病 B マウスでは、治療効果を有する hFIX 活性が 9 箇月持続した。過去における導入遺伝子の組織選択的な発現は、例えば、肝臓特異的なプロモーターのように、転写のコントロール

を介して主に行われた。したがって、新規の RNAi を介した転写後の調節が加われば、ベクターを介した組織特異的な遺伝子発現の新たな戦略となる可能性がある。

これらの研究では、異なる種間で導入遺伝子が用いられたので、ヒトでは同様には当てはまらないように思われる。したがって、shRNA 発現カセットを含む他の導入遺伝子とベクターの組み合わせで、このアプローチの可能性を確認する必要がある。実際、shRNA 配列と miRNA 結合部位を融合させることにより、理想的には、全身的な RNAi ベクターの投与からでも、望ましい標的細胞にのみ、RNAi トリガーの選択的及び特異的な発現を起こすことが理論上は可能である。このアプローチにより有効性と選択性を最大限に得るために、例えば、細胞あるいは組織特異的なベクター及びプロモーターを用いて、翻訳及び転写ターゲティング戦略を組み合わせることが可能である。他方、組織選択的な発現の方法論には、例えば、miRNA の結合部位の理想的な数及び位置の同定など、miRNA スポンジとしての最適化が更に必要である。

RNAi をベースにした発現系の中で注目すべき点は、調節領域の遺伝子配列に対する小さな dsRNA が、その遺伝子の転写を停止させるという報告である^{70,148,149}。そのようなプロセスが哺乳細胞で実際に起こるなら、核においてこのような dsRNA を短時間で一過性に発現させることにより、遺伝子発現を止めることができるかもしれない。これを、上記の miRNA を基にした系だけでなく、通常の RNAi 戦略と組み合わせることにより、疾患に関連した遺伝子の発現を調節する、新規の治療アプローチを提供できる可能性がある。この戦略については、現在 siRNA を核に効率よくデリバリーする技術はないので、ウイルスベクターを用いることにより可能になるかもしれない。

おわりに

約 10 年前の RNAi の発見は、分子生物学の転換期となり、哺乳類における遺伝子機能の解析の強力な手段となった。人工的な RNAi のトリガー及び細胞内マシンを用いて、相補的な転写産物を効率よくターゲティングし、事実上すべての遺伝子をサイレンシングすることが可能になった。そして、*in vivo*

の研究から、ウイルス及び非ウイルスを用いたデリバリー方法により、選択的かつ強力に標的の遺伝子を抑制できることが明らかになった。基礎的な RNAi 研究の飛躍的な進展を応用した、トランスレショナルリサーチがすさまじい速さで起こり、既に数種類の RNAi を基にしたヒト臨床試験が進行中である。一方、RNAi が新しい治療法となるには、幾つかの克服すべき障害と懸念がある。毒性に関連したものとしては、RNAi に関連した飽和、競合、免疫反応の惹起があげられる。また、有効性に関しては、臨床適応症、用いる投与ルート、標的とする細胞に着目したデリバリーのアプローチがあげられる。また、RNAi の機構について更に理解が進むことも重要である。これらの課題を克服し、RNAi を用いた治療法が更に発展して革新的な治療法となることを期待したい。

文 献

- 1) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C.: *Nature*, **391**(6669), 806-11 (1998).
- 2) Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.: *Nature*, **411**(6836), 494-8 (2001).
- 3) Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T.: *Genes Dev*, **15**(2), 188-200 (2001).
- 4) Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S.: *Genes Dev*, **16**(8), 948-58 (2002).
- 5) Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., Turner, D. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(9), 6047-52 (2002).
- 6) Dykxhoorn, D. M., Lieberman, J.: *Annu Rev Med*, **56**, 401-23 (2005).
- 7) Hannon, G. J., Rossi, J. J.: *Nature*, **431**(7006), 371-8 (2004).
- 8) Kim, D. H., Rossi, J. J.: *Nat Rev Genet*, **8**(3), 173-84 (2007).
- 9) Tomari, Y., Zamore, P. D.: *Genes Dev*, **19**(5), 517-29 (2005).
- 10) Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V. N.: *Nature*, **425**(6956), 415-9 (2003).
- 11) Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., Kim, V.N.: *Genes Dev*, **18**(24), 3016-27 (2004).

- 12) Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., Pasquinelli, A. E.: *Cell*, **122**(4), 553-63 (2005).
- 13) Aigner, A.: *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**(1), 9-21 (2007).
- 14) Aagaard, L., Rossi, J. J.: *Adv Drug Deliv Rev*, **59**(2-3), 75-86 (2007).
- 15) De Fougerolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., Lieberman, J.: *Nat Rev Drug Discov*, **6**(6), 443-53 (2007).
- 16) Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S., Favaro, E.: *Mol Aspects Med*, **28**(1), 143-66 (2007).
- 17) Hammond, S. M.: *Trends Mol Med*, **12**(3), 99-101 (2006).
- 18) Grimm, D., Kay, M. A.: *J Clin Invest*, **117**(12), 3633-41 (2007).
- 19) Nguyen, T., Menocal, E. M., Harborth, J., Fruehauf, J. H.: *Curr Opin Mol Ther*, **10**(2), 158-67 (2008).
- 20) Gewirtz, A. M.: *J Clin Invest*, **117**(12), 3612-4 (2007).
- 21) Ebbesen, M., Jensen, T. G., Andersen, S., Pedersen, F. S.: *Int J Med Sci*, **5**(3), 159-68 (2008).
- 22) Huang, C., Li, M., Chen, C., Yao, Q.: *Expert Opin Ther Targets*, **12**(5), 637-45 (2008).
- 23) Novobrantseva, T. I., Akinc, A., Borodovsky, A., De Fougerolles, A.: *Curr Opin Drug Discov Devel*, **11**(2), 217-24 (2008).
- 24) De Fougerolles, A. R.: *Hum Gene Ther*, **19**(2), 125-32 (2008).
- 25) Corey, D. R.: *J Clin Invest*, **117**(12), 3615-22 (2007).
- 26) Lu, P. Y., Woodle, M. C.: *Methods Mol Biol*, **437**, 93-107 (2008).
- 27) Akhtar, S., Benter, I. F.: *J Clin Invest*, **117**(12), 3623-32 (2007).
- 28) Hokaiwado, N., Takeshita, F., Banas, A., Ochiya, T.: *IDrugs*, **11**(4), 274-8 (2008).
- 29) Liu, G., Staal, F. W., Li, Q. X.: *Histol Histo-pathol*, **22**(2), 211-7 (2007).
- 30) Shen, J., Samul, R., Silva, R. L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S. F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana, K., Aitchison, R., Pavco, P., Campochiaro, P. A.: *Gene Ther*, **13**(3), 225-34 (2006).
- 31) Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., Barik, S.: *Nat Med*, **11**(1), 50-5 (2005).
- 32) Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J., Woodle, M. C., Zhong, N., Lu, P. Y.: *Nat Med*, **11**(9), 944-51 (2005).
- 33) Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P. W., Abraham, N. G., Kappas, A., Lee, P. J.: *J Biol Chem*, **279**(11), 10677-84 (2004).
- 34) Bhandari, V., Wing, R. C., Lee, C. G., Zhu, Z., Nedrelow, J. H., Chupp, G. L., Zhang, X., Matthay, M. A., Ware, L. B., Homer, R. J., Lee, P. J., Geick, A., De Fougerolles, A. R., Elias, J. A.: *Nat Med*, **12**(11), 1286-93 (2006).
- 35) Thakker, D. R., Natt, F., Husken, D., Van der Putten, H., Maier, R., Hoyer, D., Cryan, J. F.: *Mol Psychiatry*, **10**(8), 782-9, 714 (2005).
- 36) Thakker, D. R., Natt, F., Husken, D., Maier, R., Muller, M., Van der Putten, H., Hoyer, D., Cryan, J. F.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(49), 17270-5 (2004).
- 37) Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings, Mieszczak, M., Barclay, J., Natt, F. J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., Wishart, W., Hall, J.: *Nucleic Acids Res*, **32**(5), e49 (2004).
- 38) Makimura, H., Mizuno, T. M., Mastaitis, J. W., Agami, R., Mobbs, C. V.: *BMC Neurosci*, **3**, 18 (2002).
- 39) Wang, Q., Ilves, H., Chu, P., Contag, C. H., Leake, D., Johnston, B. H., Kaspar, R. L.: *J Invest Dermatol*, **127**(11), 2577-84 (2007).
- 40) Hickerson, R. P., Smith, F. J., Reeves, R. E., Contag, C. H., Leake, D., Leachman, S. A., Milstone, L. M., McLean, W. H., Kaspar, R. L.: *J Invest Dermatol*, **128**(3), 594-605 (2008).
- 41) Zimmermann, T. S., Lee, A. C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A. J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliensky V., Manoharan, M., Vornlocher, H. P., MacLachlan, I.: *Nature*, **441**(7089), 111-4 (2006).
- 42) Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Kagan, E., Yu, E. Z., Geisbert, J. B., DiCaprio, K. D., Fritz, E. A., Jahrling, P. B., McClintock, K., Phelps, J. R., Lee, A. C., Judge, A., Jeffs, L. B., MacLachlan, I.: *J Infect Dis*, **193**(12), 1650-7 (2006).
- 43) Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., Shaw, L.,

- Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hart-sough, K., Machermer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C. S., Jeffs, L. B., Judge A., MacLachlan, I., Polisky, B.: *Nat Biotechnol*, **23**(8), 1002-7 (2005).
- 44) T. Yokota, S. Iijima, T. Kubodera, K. Ishii, Y. Katakai, N. Ageyama, Y. Chen, Y. J. Lee, T. Unno, K. Nishina, Y. Iwasaki, N. Maki, H. Mizusawa and H. Akari: *Biochem Biophys Res Commun*, **361**(2), 294-300 (2007).
- 45) Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J., Tolentino, M. J.: *Mol Vis*, **9**, 210-6 (2003).
- 46) Landen, C. N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K.: *Cancer Res*, **65**(15), 6910-8 (2005).
- 47) Halder, J., Kamat, A. A., Landen, C. N., Han, L. Y., Lutgendorf, S. K., Lin, Y. G., Merritt, W. M., Jennings, N. B., Chavez-Reyes, A., Coleman, R. L., Gershenson, D. M., Schmandt, R., Cole, S. W., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K.: *Clin Cancer Res*, **12**(16), 4916-24 (2006).
- 48) Gray, M. J., Van Buren, G., Dallas, N. A., Xia, L., Wang, X., Yang, A. D., Somcio, R. J., Lin, Y. G., Lim, S., Fan, F., Mangala, L. S., Arumugam, T., Logsdon, C. D., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., Ellis, L. M.: *J Natl Cancer Inst*, **100**(2), 109-20 (2008).
- 49) Nakamura, H., Siddiqui, S. S., Shen, X., Malik, A. B., Pulido, J. S., Kumar, N. M., Yue, B. Y.: *Mol Vis*, **10**, 703-11 (2004).
- 50) Luo, M. C., Zhang, D. Q., Ma, S. W., Huang, Y. Y., Shuster, S. J., Porreca, F., Lai, J.: *Mol Pain*, **1**, 29 (2005).
- 51) Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q. Y., Lee, S. J., Bronson, R. T., Knipe, D. M., Lieberman, J.: *Nature*, **439**(7072), 89-94 (2006).
- 52) Zhang, Y., Cristofaro, P., Silbermann, R., Pusch, O., Boden, D., Konkin, T., Hovanesian, V., Monfils, P. R., Resnick, M., Moss, S. F., Ramratnam, B.: *Mol Ther*, **14**(3), 336-42 (2006).
- 53) Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., Bertin, S. L., Reppen, T. W., Chu, Q., Blokhin, A. V., Hagstrom, J. E., Wolff, J. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(32), 12982-7 (2007).
- 54) Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E., Triche, T. J.: *Cancer Res*, **65**(19), 8984-92 (2005).
- 55) Heidel, J. D., Yu, Z., Liu, J. Y., M. Rele, S., Liang, Y., Zeidan, R. K., Kornbrust, D. J., Davis, M. E.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(14), 5715-21 (2007).
- 56) Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Muramatsu, T.: *Cancer Res*, **64**(10), 3365-70 (2004).
- 57) Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A., Ochiya, T.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(34), 12177-82 (2005).
- 58) Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. O., Hovgaard, M. B., Schmitz, A., Nyengaard, J. R., Besenbacher, F., Kjems, J.: *Mol Ther*, **14**(4), 476-84 (2006).
- 59) Pille, J. Y., Li, H., Blot, E., Bertrand, J. R., Pritchard, L. L., Opolon, P., Maksimenko, A., Lu, H., Vannier, J. P., Soria, J., Malvy, C., Soria, C.: *Hum Gene Ther*, **17**(10), 1019-26 (2006).
- 60) Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., Vornlocher, H. P.: *Nature*, **432**(7014), 173-8 (2004).
- 61) Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Kotliansky, V., Manoharan, M., Stoffel, M.: *Nat Biotechnol*, **25**(10), 1149-57 (2007).
- 62) DiFiglia, M., Sena-Estevés, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Sah, D. W., Zamore, P. D., Aronin, N.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(43), 17204-9 (2007).
- 63) McNamara, J. O., Andrechek, E. R., Wang, Y., Viles, K. D., Rempel, R. E., Gilboa, E., Sullenger, B. A., Giangrande, P. H.: *Nat Bio-*

- technol*, 24(8), 1005-15 (2006).
- 64) Chu, T. C., Twu, K. Y., Ellington, A. D., Levy, M.: *Nucleic Acids Res*, 34(10), e73 (2006).
- 65) Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7297-301 (1995).
- 66) Meade, B. R., Dowdy, S. F.: *Adv Drug Deliv Rev*, 59(2-3), 134-40 (2007).
- 67) Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K. E., Kim, M. H., Davidson, B. L., Lee, S. K., Shankar, P., Manjunath, N.: *Nature*, 448(7149), 39-43 (2007).
- 68) Song, E., Zhu, P., Lee, S. K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D. M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D. B., Shankar, P., Marasco, W. A., Lieberman, J.: *Nat Biotechnol*, 23(6), 709-17 (2005).
- 69) Peer, D., Zhu, P., Carman, C. V., Lieberman, J., Shimaoka, M.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 4095-100 (2007).
- 70) Janowski, B. A., Huffman, K. E., Schwartz, J. C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D. S., Minna, J. D., Corey, D. R.: *Nat Struct Mol Biol*, 13(9), 787-92 (2006).
- 71) Grimm, D., Pandey, K., Kay, M. A.: *Methods Enzymol*, 392, 381-405 (2005).
- 72) Grimm, D., Kay, M. A.: *Curr Gene Ther*, 3(4), 281-304 (2003).
- 73) Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., Hunter, L. A.: *Embo J*, 10(12), 3941-50 (1991).
- 74) Yamamoto, N., Suzuki, M., Kawano, M. A., Inoue, T., Takahashi, R. U., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H.: *J Virol*, 81(4), 1990-2001 (2007).
- 75) Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A.: *J Clin Invest*, 117(6), 1456-65 (2007).
- 76) Herzog, R. W.: *Mol Ther*, 15(4), 649-50 (2007).
- 77) Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., High, K. A.: *Nat Genet*, 24(3), 257-61 (2000).
- 78) Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, Glader, V. R., B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., Lessard, R. R., Sommer, J. M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H. C., High, K. A., Kay, M. A.: *Nat Med*, 12(3), 342-7 (2006).
- 79) Marshall, E.: *Science*, 288(5468), 951-7(2000).
- 80) McCarty, D. M., Monahan, P. E., Samulski, R. J.: *Gene Ther*, 8(16), 1248-54 (2001).
- 81) Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., Kay, M. A.: *Nature*, 441(7092), 537-41 (2006).
- 82) McCarty, D. M., Fu, H., Monahan, P. E., Toulson, C. E., Naik, P., Samulski, R. J.: *Gene Ther*, 10(26), 2112-8 (2003).
- 83) Paskowitz, D. M., Greenberg, K. P., Yasumura, D., Grimm, D., Yang, H., Duncan, J. L., Kay, M. A., Lavail, M. M., Flannery, J. G., Vollrath, D.: *Hum Gene Ther*, 18(10), 871-80 (2007).
- 84) Xia, H., Mao, Q., Eliason, S. L., Harper, S. Q., Martins, I. H., Orr, H. T., Paulson, H. L., Yang, L., Kotin, R. M., Davidson, B. L.: *Nat Med*, 10(8), 816-20 (2004).
- 85) Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Ramratnam, B.: *Mol Ther*, 9(3), 396-402 (2004).
- 86) Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovskiy, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D.: *J Virol*, 72(12), 9873-80 (1998).
- 87) Chang A. H., Sadelain, M.: *Mol Ther*, 15(3), 445-56 (2007).
- 88) Andersson, M. G., Haasnoot, P. C., Xu, N., Berenjian, S., Berkhout, B., Akusjarvi, G.: *J Virol*, 79(15), 9556-65 (2005).
- 89) Gartel, A. L., Kandel, E. S.: *Biomol Eng*, 23(1), 17-34 (2006).
- 90) Pai, S. I., Lin, Y. Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung C. F., Wu, T. C.: *Gene Ther*, 13(6), 464-77 (2006).
- 91) Takeshita, F., Ochiya, T.: *Cancer Sci*, 97(8), 689-96 (2006).
- 92) Yoo, J. Y., Kim, J. H., Kwon, Y. G., Kim, E. C., Kim, N. K., Choi, H. J., Yun, C. O.: *Mol Ther*, 15(2), 295-302 (2007).
- 93) <http://www.opko.com/>
- 94) <http://www.pharmalive.com/News/index.cfm?articleid=609882>
- 95) <http://www.ft.com/cms/s/2/eb1f6c2c-f776-11dd->

- 81f7-000077b07658,dwp_uid=e8477cc4-c820-11db-b0dc-000b5df10621.html
- 96) <http://www.quarkpharma.com/qbi-en/products/53/>
- 97) www.quarkpharma.com/qbi-en/newslist/firstDMEpatient/
- 98) www.alnylam.com
- 99) quarkpharma.com/abi-en/home/homepage/
- 100) http://www.eurekalert.org/pub_releases/2008-01/ka-nih011008.php
- 101) <http://www.genomeweb.com/rnai/facing-funding-wose-nucleonics-puts-itself-block-begins-liquidating-lab-gear>
- 102) Sun, L. Q., Wang, L., Gerlach, W. L., Symonds, G.: *Nucleic Acids Res*, **23**(15), 2909-13 (1995).
- 103) Wang, L., Witherington, C., King, A., Gerlach, W. L., Carr, A., Penny, R., Cooper, D., Symonds, G., Sun, L. Q.: *Hum Gene Ther*, **9**(9), 1283-91 (1998).
- 104) Macpherson, J. L., Ely, J. A., Sun, L. Q., Symonds, G. P.: *Front Biosci*, **4**, D497-505 (1999).
- 105) Fanning, G., Amado, R., Symonds, G.: *J Gene Med*, **5**(8), 645-53 (2003).
- 106) Amado, R. G., Mitsuyasu, R. T., Rosenblatt, J. D., Ngok, F. K., Bakker, A., Cole, S., Chorn, N., Lin, L. S., Bristol, G., Boyd, M. P., MacPherson, J. L., Fanning, G. C., Todd, A. V., Ely, J. A., Zack, J. A., Symonds, G. P.: *Hum Gene Ther*, **15**(3), 251-62 (2004).
- 107) Mitsuyasu, R. T., Merigan, T. C., Carr, A., Zack, J. A., Winters, M. A., Workman, C., Bloch, M., Lalezari, J., Becker, S., Thornton, L., Akil, B., Khanlou, H., Finlayson, R., McFarlane, R., Smith, D. E., Garsia, R., Ma, D., Law, M., Murray, J. M., Von Kalle, C., Ely, J. A., Patino, S. M., Knop, A. E., Wong, P., Todd, A. V., Haughton, M., Fuery, C., Macpherson, J. L., Symonds, G. P., Evans, L. A., Pond, S. M., Cooper, D. A.: *Nat Med*, **15**(3), 285-92 (2009).
- 108) <http://transderminic.com/>
- 109) Sledz, C. A., Holko, M., De Veer, M. J., Silverman, R. H., Williams, B. R.: *Nat Cell Biol*, **5**(9), 834-9 (2003).
- 110) Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducaux, A., Nicoulaz, A. L., Iggo, R.: *Nat Genet*, **34**(3), 263-4 (2003).
- 111) Jackson, A. L., Linsley, P. S.: *Trends Genet*, **20**(11), 521-4 (2004).
- 112) Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S.: *Nat Biotechnol*, **21**(6), 635-7 (2003).
- 113) Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilesley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W. S., Khvorova, A.: *Nat Methods*, **3**(3), 199-204 (2006).
- 114) Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S., Khvorova, A.: *RNA*, **12**(7), 1188-96 (2006).
- 115) Jackson, A. L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B. N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P. S.: *RNA*, **12**(7), 1179-87 (2006).
- 116) Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., Johnson, J. M.: *Nature*, **433**(7027), 769-73 (2005).
- 117) Lin, X., Ruan, X., Anderson, M. G., McDowell, J. A., Kroeger, P. E., Fesik, S. W., Shen, Y.: *Nucleic Acids Res*, **33**(14), 4527-35 (2005).
- 118) Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., De Fougères, A., Endres, S., Hartmann, G.: *Nat Med*, **11**(3), 263-70 (2005).
- 119) Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C., MacLachlan, I.: *Mol Ther*, **13**(3), 494-505 (2006).
- 120) Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., MacLachlan, I.: *Nat Biotechnol*, **23**(4), 457-62 (2005).
- 121) Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliensky, V., Sah, D. W.: *Nat Chem Biol*, **2**(12), 711-9 (2006).
- 122) Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R.: *Genes Dev*, **17**(24), 3011-6 (2003).
- 123) Nishitsuji, H., Kohara, M., Kannagi, M., Masuda, T.: *J Virol*, **80**(15), 7658-66 (2006).
- 124) Hemmings-Mieszczak, M., Dorn, G., Natt, F. J., Hall, J., Wishart, W. L.: *Nucleic Acids Res*, **31**(8), 2117-26 (2003).
- 125) Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., Zamore, P. D.: *PLoS Biol*, **2**(4), E98 (2004).
- 126) Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., Shimizu, N.: *Genomics*, **82**(3), 323-30 (2003).
- 127) John, M., Constien, R., Akinc, A., Goldberg,

- M., Moon, Y. A., Spranger, M., Hadwiger, P., Soutschek, J., Vornlocher, H. P., Manoharan, M., Stoffel, M., Langer, R., Anderson, D. G., Horton, J. D., Koteliensky, V., Bumcrot, D.: *Nature*, **449**(7163), 745-7 (2007).
- 128) Grimm, D., Kay, M. A.: *Mol Ther*, **15**(5), 878-88 (2007).
- 129) Leonard, J. N., Schaffer, D. V.: *Gene Ther*, **13**(6), 532-40 (2006).
- 130) Wiznerowicz, M., Szulc, J., Trono, D.: *Nat Methods*, **3**(9), 682-8 (2006).
- 131) Sumimoto, H., Hirata, K., Yamagata, S., Miyoshi, H., Miyagishi, M., Taira, K., Kawakami, Y.: *Int J Cancer*, **118**(2), 472-6 (2006).
- 132) Pichler, A., Zelcer, N., Prior, J. L., Kuil, A. J., Piwnica-Worms, D.: *Clin Cancer Res*, **11**(12), 4487-94 (2005).
- 133) Zhang, X., Kon, T., Wang, H., Li, F., Huang, Q., Rabbani, Z. N., Kirkpatrick, J. P., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W., Li, C. Y.: *Cancer Res*, **64**(22), 8139-42 (2004).
- 134) Li, M., Li, H., Rossi, J. J.: *Ann N Y Acad Sci*, **1082**, 172-9 (2006).
- 135) Anderson, J., Li, M. J., Palmer, B., Remling, L., Li, S., Yam, P., Yee, J. K., Rossi, J., Zaia, J., Akkina, R.: *Mol Ther*, **15**(6), 1182-8 (2007).
- 136) Samakoglu, S., Lisowski, L., Budak-Alpdogan, T., Usachenko, Y., Acuto, S., Di Marzo, R., Maggio, A., Zhu, P., Tisdale, J. F., Riviere, I., Sadelain, M.: *Nat Biotechnol*, **24**(1), 89-94 (2006).
- 137) Patel, D. J., Ma, J. B., Yuan, Y. R., Ye, K., Pei, Y., Kuryavyi, V., Malinina, L., Meister, G., Tuschl, T.: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 81-93 (2006).
- 138) Tang, G.: *Trends Biochem Sci*, **30**(2), 106-14 (2005).
- 139) Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P.: *Cell*, **120**(1), 15-20 (2005).
- 140) Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Burge, C. B.: *Cell*, **115**(7), 787-98 (2003).
- 141) Ebert, M. S., Neilson, J. R., Sharp, P. A.: *Nat Methods*, **4**(9), 721-6 (2007).
- 142) Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M.: *Nature*, **438**(7068), 685-9 (2005).
- 143) Orom, U. A., Kauppinen, S., Lund, A. H.: *Gene*, **372**, 137-41 (2006).
- 144) Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., R. Mak, H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., Golub, T. R.: *Nature*, **435**(7043), 834-8 (2005).
- 145) Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., Sarnow, P.: *Science*, **309**(5740), 1577-81 (2005).
- 146) Brown, B. D., Venneri, M. A., Zingale, A., Sergi, L. S., Naldini, L.: *Nat Med*, **12**(5), 585-91 (2006).
- 147) Brown, B. D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L. S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., Naldini, L.: *Blood*, **110**(13), 4144-52 (2007).
- 148) Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E., Looney, D. J.: *Science*, **305**(5688), 1289-92 (2004).
- 149) Kim, D. H., Villeneuve, L. M., Morris, K. V., Rossi, J. J.: *Nat Struct Mol Biol*, **13**(9), 793-7 (2006).

治療用タンパク質の免疫原性 その1

新見 伸吾*, 原島 瑞**, 日向 昌司*, 山口 照英*

医薬品研究 Vol. 40, No. 11 別刷 (2009年)

財団法人 日本公定書協会

治療用タンパク質の免疫原性 その1

新見 伸吾*, 原島 瑞**, 日向 昌司*, 山口 照英*

(受付:平成21年7月6日, 受理:平成21年10月21日)

Immunogenicity of Therapeutic Proteins Part 1

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA**, Masashi HYUGA* and Teruhide YAMAGUCHI*

はじめに

1980年代に導入された組換えDNA技術を用いて生産された組換えヒトタンパク質の各種疾患における使用は医薬品に革命をもたらした。現在、200以上の高度に精製された治療用タンパク質が医療現場に提供されている。そのうち承認された治療用タンパク質の75%以上が組換えヒトタンパク質である^{1,2)}。一部のモノクローナル抗体及び動物由来製品を除いて、これら治療用タンパク質はヒトが本来産生するタンパク質と同じアミノ酸配列である。したがって、このような製品では本来ヒトでは抗体産生が誘導されないことが期待される。しかし、予想に反してこれらの製品でも抗体産生が誘導されることが報告された³⁻⁶⁾。一般的に、抗原が抗体の産生や細胞性免疫を誘導する性質を免疫原性と呼ぶ。本稿において免疫原性とは、タンパク質性治療薬をヒトに投与した場合、その治療薬に対して抗体が生じる事を指す。抗体が検出される頻度はタンパク質性治療薬製品により異なり、1%以下から70%以上と幅広い⁷⁾。非中和抗体応答によっても有効性の低下が報告されているが、中和抗体応答の誘導は有効性を低下させ臨床結果に最も大きな悪影響を及ぼす可能性が高い。幸いなことに、ほとんどの製品で有害な抗体応答により影響を受ける患者の数は治療患者全体に比べて少

ない⁸⁾。しかし、場合によっては中和抗体の誘導により治療薬だけでなくそれに対応する内在性タンパク質が中和され重篤な有害事象が生じることがある。後述する慢性腎不全患者において組換えヒトエリスロポエチンにより誘導される赤芽球癆 (pure red cell aplasia, PRCA)⁹⁾、健常ボランティア及び癌患者において polyethylene glycol (PEG) 化組換えヒト megakaryocyte growth and developmental factor (MGDF) により誘導される血小板減少症⁹⁾はその典型的な例である。

本稿においては、抗体産生の誘導に関与する可能性のある様々な因子、及びそれら因子が免疫原性に及ぼす影響について動物モデル、治験及び臨床で検討した結果について概説する。なお本稿は成書¹⁰⁻¹⁸⁾を参照した。

1. 異種タンパク質

ヒトとは由来が異なるタンパク質は、アミノ酸配列が異なるためヒトに対して外来抗原となり、多くの場合免疫原性がある。また、ヒトとアミノ酸配列が1個異なるだけでも、場合によっては免疫原性が変化する場合がある。

ストレプトキナーゼ、スタフィロキナーゼ、アスパラギナーゼ、カルシトニンなどのような微生物由来、植物由来、サケ由来の製品には免疫原性があ

* 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

** 日本大学総合科学研究所 東京都千代田区五番町12-5 (〒102-8251)

University Research Center, NIHON UNIVERSITY, 12-5 Gobancho Chiyoda-ku, Tokyo 102-8251, Japan

る¹⁹⁻²³⁾。これらの製品において免疫応答は非常に速く誘導され、多くの場合単回投与後に生じる。また、この型の免疫応答は発生頻度が非常に高く、生じる抗体は中和抗体であり長期間持続する。

組換えウシ及びブタインスリンは、インスリン依存的な糖尿病患者に対して、ヒトインスリンよりも免疫原性が高い。ブタインスリンはB鎖が高次構造上、表面に露出していない点においてヒトインスリンと異なる²⁴⁾。この事実からブタインスリンの免疫原性がヒトインスリンに比べてあまり高くない理由が説明できる。一方、ウシインスリンは組換えブタあるいはヒトインスリンよりも免疫原性が高い^{25,26)}。

手術における止血の補助治療薬として用いた場合、組換えヒトトロンピンでは抗体が産生されないが、ウシ血漿由来トロンピンでは患者の27%で抗体が産生される²⁷⁾。

改変モノクローナル抗体も免疫原性を有し、治療用抗体に対する抗体の出現率はそれぞれ異なる。キメラモノクローナル抗体はマウスモノクローナル抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域に置き換えたものである。また、ヒト化抗体は抗原が実際に結合する相補性決定領域の1から3を残して、それ以外のフレームをすべてヒト抗体に置き換えたものである。各種疾患の治療に用いる44種類のマウスモノクローナル抗体のうち38種類でほとんど100%の患者で抗体産生が誘導される。更に、これらマウスモノクローナル抗体の80%が顕著な抗モノクローナル抗体応答を引き起こし、そのほとんどは安全性に関するデータが悪いため治療用タンパク質としての開発は中止された²⁸⁾。次世代の改変モノクローナル抗体であるキメラモノクローナル抗体はマウスモノクローナル抗体よりも一般的に免疫原性が低いことが報告されている。しかし、ある研究では15のキメラモノクローナル抗体の40%が顕著な抗体産生を起こすことが報告されている²⁹⁾。また、キメラ抗体cMOv18(卵巣がんで使用)は抗キメラ抗体の産生を誘導する²⁹⁾。他のキメラモノクローナル抗体、例えばAbciximab(血小板糖タンパク質IIa/IIIbアンタゴニスト)³⁰⁾で治療した患者の5%及びInfliximab/Remicade[®](TNF α を標的、クローン病及びリウマチ性関節炎で使用)³¹⁾で治療した患者の60%で抗体が検出されている。また、他の報告によると、キメ

ラ抗体であるRituximab(CD20を標的とし非ホジキンリンパ腫で使用)及びヒト化抗体であるAlemizumab(慢性リンパ性白血病で使用)で治療した患者では、それぞれ25%及び30%で抗体が検出され、程度は異なるがほとんどすべての治療用モノクローナル抗体は免疫原性がある³²⁾。このようにヒト化抗体でも完全に免疫原性が消失するわけではない。

ヒト治療用タンパク質の1アミノ酸変異が免疫原性に影響を及ぼした例もある。A鎖19Tyrを欠失させたヒトインスリンでは、抗ヒトインスリン抗体に対する結合活性が2.2%まで低下するが、インスリンの受容体との結合活性は約65%維持される³³⁾。他方、tissue plasminogen activator(TPA)トランスジェニックマウスにおいて、組換えヒトTPAの1アミノ酸を置換したものは、野生型ヒトTPAとは異なり、抗体の産生を誘導する³⁴⁾。

2. 製造工程

2.1 不純物

製造に用いる宿主及び原料となる組織に由来する不純物は、タンパク質治療薬の免疫原性に影響を及ぼす。インスリン依存的な糖尿病の治療に用いられた初期の型のインスリンはブタ及びウシ組織由来であり、非常に免疫原性が高かった³⁵⁾。その後精製法の改良により純度が高くなり免疫原性は低下した³⁵⁾。組換えタンパク質において宿主由来のエンドトキシン及び宿主タンパク質のような不純物は、それ自身がアジュバントとして作用するかあるいは直接免疫原となる³⁶⁾。例えば、ヒト成長ホルモンgrowth hormone(GH)の場合、最初の組換え製品であるN末端にメチオニンが付加されたメチオニル組換えヒトGHは、不純物と製造過程において生成された凝集体により、脳下垂体由来ヒトGHよりも免疫原性が高かった。メチオニル組換えヒトGHでは、12箇月以上治療した46名のGH欠損の小児のうち、ヒトGHの治療を過去に受けたことがない患者20人のうち15人、脳下垂体由来ヒトGHの治療を受けたことのある患者26名のうち3名で、GH特異的な抗体が持続して検出された³⁷⁾。それ以降、不純物及び凝集体が適切に除去された非メチオニル組換えヒトGHに変更すると、患者11人のうち9人で完全に抗体が検出されなくなった。また、最近の例として、組換えヒトGHのバイオシミラー(バイオ

後続品)であるOmnitrope[®]の最初の治験では、患者の最大60%で非中和抗GH抗体が産生され、患者のすべてで抗宿主細胞由来タンパク質抗体の産生が誘導された³⁹⁾。その後、宿主細胞由来タンパク質を更に除去することにより、抗GH抗体の形成は他のGHで報告されている範囲内に改善された³⁹⁾。

2.2 グリコシレーション

以下に示すように、治療用タンパク質のグリコシル化(糖鎖の付加)が抗原決定基(エピトープ)部位をマスクすることにより免疫原性を低下させる可能性が示されている。

組換えヒトinterferon (IFN)- β は再発寛解型多発性硬化症の第一選択薬であり、憎悪率、再発時の重篤度、神経機能不全を低下させることが示されている³⁹⁾。再発寛解型多発性硬化症の患者の大規模な研究で、IFN- β 1a (Avonex[®]及びRebif[®])よりもIFN- β 1b (Betaferon[®])で治療した患者のほうが中和抗体を有する患者の比率が高いことがわかった⁴⁰⁾。IFN- β 1aは哺乳類の細胞株で製造されるのに対し、IFN- β 1bは大腸菌で製造され、17位のセリンがシステインに置換され、N末端のメチオニン残基が除去されている点が二つの組換えIFNで異なっている⁴¹⁾。大腸菌で製造されるタンパク質はグリコシル化されておらず、エピトープが暴露されたままになっている可能性を考えると、大腸菌における製造がIFN- β 1bの免疫原性増加に寄与したと予想される。したがって、哺乳類細胞株で産生されたグリコシル化タンパク質を使用することにより免疫原性を低下できるかもしれない⁴⁾。

酵母で産生された組換えヒトgranulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)が投与された患者13人のうち4人で、大腸菌で産生された組換えヒトGM-CSFと交差反応する抗体が生じる。しかし、これらの抗体はCHO細胞で産生した組換えヒトGM-CSFとは交差反応しない。酵母細胞はN結合型糖鎖のみを付加するが、大腸菌は糖鎖を付加しない。一方、CHO細胞はO及びN結合型糖鎖を付加する。CHO細胞で産生された組換えヒトGM-CSFからO結合型糖鎖が除去されると、酵母由来の組換えヒトGM-CSFに対する抗体がこのアイソフォームに反応する。しかし、酵母由来組換えヒトGM-CSFに対して産生された抗体は、CHO細胞で産生されたN結合型糖鎖のみが除去された

組換えヒトGM-CSFとは反応しない。この知見はO結合型糖鎖がCHO由来組換えヒトGM-CSFのエピトープをブロックしていることを示唆している^{42,43)}。

一方、ヒトは糖鎖の非還元末端でgalactose- α 1,3-galactose構造を生成することはできないが、ヒト治療用組換えタンパク質の発現に用いる哺乳類の細胞株の中には α 1,3-ガラクトシル転移酵素を発現し、この非常に免疫原性が高い二糖を生成するものもある⁴⁴⁾。したがって、このような細胞株で産生された治療用タンパク質は場合によって免疫原性を有する可能性がある。

結腸直腸癌と頭頸部の扁平上皮癌の治療に用いるキメラ抗体であるCetuximabで治療された患者76人のうち25人で、この薬剤に対する過敏症応答が起こった⁴⁵⁾。そのうち、患者の17人でCetuximabに対するIgE抗体が検出された。Cetuximabの産生に用いたマウス細胞株SP2/0は α 1,3-ガラクトシル転移酵素を発現する⁴⁶⁾。このIgE抗体はCetuximabに対する過敏症応答に関与しており、Cetuximabの重鎖のFab領域に存在するgalactose- α 1,3-galactose構造に特異的であることがわかった。

2.3 産生細胞

治療用組換えタンパク質の製造においては、用いる細胞株により翻訳後修飾を行う能力が異なるため、それぞれに適した発現系が必要である。ほとんどの治療用タンパク質は、CHO細胞、BHK細胞のような哺乳動物の細胞株で産生される。翻訳後修飾が必要でない治療用タンパク質の生産には酵母あるいは大腸菌を用いることができる⁴⁷⁻⁴⁹⁾。原核生物である大腸菌の発現系では、目的タンパク質と結合して安定化させる特異的なシャペロンが欠損している。したがって、これらシャペロンが存在しない大腸菌で一部の有核生物タンパク質を発現させる場合、ミスフォールディング及び凝集を起こす可能性がある^{48,49)}。

産生細胞が免疫原性に影響を及ぼす可能性については、第IX因子欠損モデルマウスにおいて、産生細胞が異なる組換え第IX因子で免疫応答が異なることから示されている。マウスの血友病Bの細胞治療で、ヒト第IX因子を産生するよう改変した組換え遺伝子導入C2C12筋原細胞を第IX因子欠損マウスに移植した⁵⁰⁾。その結果、部分的に表現型が是正され

たが、すべてのマウスで組換えヒト第IX因子に対する抗体が生じた^{51,52}。しかし同様に遺伝子導入したG8筋原細胞を移植したマウスでは抗ヒト第IX因子抗体が生じなかった。このように、マウスにおいて、C2C12筋原細胞はG8筋原細胞よりも免疫原性が明らかに高いヒト第IX因子を産生した。

他の動物あるいはヒトモデル動物を用いた同様な研究は行われていないが、上記の結果は産生に用いる細胞によって治療用タンパク質の免疫原性が異なる可能性を示している。

2.4 PEG化

PEG化は分解の抑制、抗原提示細胞によるプロセッシング及び提示の抑制、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) とT細胞エピトープの結合を物理的に阻止することにより免疫原性を低下させる可能性がある⁵³⁻⁵⁷。大腸菌由来のPEG化アスパラギナーゼは未修飾アスパラギナーゼに比べて抗体産生が低い⁵⁸。マウス及びラットにおいて、PEG化組換えヒトIFN- β 1bは未修飾組換えヒトIFN- β 1bに比べて抗体産生が低い⁵⁹。一方、PEG化は生物活性及び薬物動態を含めた総合的な観点から考慮する必要がある。例えば、PEG化組換えヒトIFN- α は天然型ヒトIFN- α に比べて*in vitro*における抗ウイルス活性はわずか7%であるが、臨床的には薬物動態の改善により未修飾組換えヒトIFN- α を上回る有効性を有している⁵⁶。

2.5 低温殺菌

ウイルスの伝播リスクを低下させるために63°C 10時間の液状加熱による低温殺菌がヒト血漿由来の第VIII因子の製造に導入されたが、コンフォメーション (立体構造) 変化により免疫原性が増加した⁶⁰。

3. 患者の特性

患者の特性は治療用タンパク質の免疫原性に強い影響を与える。免疫機能が低下している患者、例えば、化学療法を受けているガン患者の一部は、免疫正常者よりも治療用タンパク質に対する抗体を生じにくい^{61,62}。患者が先天的に産生できないヒト治療用タンパク質をその患者へ単回あるいは繰り返し投与すると、中和抗体が高い頻度で産生される。第IX因子、第XI因子及び第VIII因子を先天的に欠損した患者は、これら治療用タンパク質による治療を受けた後に、中和抗体が高頻度に出現する⁶³⁻⁶⁷。これらに

関連し、ヒトタンパク質には、アミノ酸配列が異なる多くの多型があることは注意すべき点である。

第VIII因子の変異が中和抗第VIII因子抗体の出現のリスクに及ぼす影響を分析するための単一遺伝子疾患として、血友病Aは有用である。一般的に、血友病Aは二つのグループに分類される。第1のグループには大規模な欠失、ナンセンス変異、イントロン22の位置の反転のような分子欠損型の患者が含まれ、患者の血漿には第VIII因子が検出されない。第VIII因子に対する免疫寛容の欠損が予測される患者のグループでは、約20%の発生率で抗第VIII因子抗体が検出される⁶⁸。第2のグループには小さな欠失/挿入、ミスセンス、スプライス部位変異の患者が含まれ、患者は部分的に不完全で機能のない第VIII因子を産生する。したがって、投与された治療用第VIII因子に対して、患者は寛容となっている。第2グループの患者では10%以内の発生率で抗第VIII因子抗体が検出される⁶⁹。

HAMSTeRS血友病患者より得られたデータから、抗体産生のリスクに基づき、変異の型を更に細かく分類すると、第1グループでは、リスクは大きな欠損の患者で最も高く(約75%)、次がナンセンス変異の患者及びイントロン22の位置が反転の患者である⁷⁰。第2グループでは、小さな欠失/挿入変異に起因するフレームシフトにより、その後ストップコドンが生じ、タンパク質は不完全な構造で産生される。したがって、そのリスクは主な遺伝的欠損と同じと予想される。しかし、実際は小さな変異/挿入変異により抗体を生じるリスクは小さい(7.4%)⁷¹。DNA複製及びDNAからRNAへの転写において、DNAポリメラーゼ及びRNAポリメラーゼの読み取りエラーにより、長く伸びたアデニンの近くの位置のリーディングフレーム (読み取り枠) で小さな欠失/挿入が起こるが、これらの欠失/挿入は内在的に回復が可能である⁷⁰⁻⁷²。このように内在性第VIII因子が少量でも産生されると、抗体の出現は十分に阻止される。また、ポリA付加シグナル領域で小さな欠失/挿入変異が起きても、抗体産生のリスクはあまり高くならない(20.5%)。ミスセンス変異の患者では何らかの機能のない第VIII因子が産生され、ほとんどの患者で免疫寛容が十分誘導される。また、スプライス部位が変異しても、抗体出現のリスクはほとんどない。これは、第VIII因子RNA

の一部が正常にスプライシングされ、免疫寛容を誘導するのに十分なレベルの第Ⅷ因子が産生されるためと考えられる⁷³⁾。

しかし、第Ⅷ因子の遺伝子変異により、重篤な第Ⅷ因子欠損患者でみられた免疫応答の必ずしもすべてが説明できるわけではない。例えば、抗体産生リスクの解析が、第Ⅷ因子タンパク質の発現が障害されるイントロン22の反転変異の患者で行われ、興味深い知見が得られている。この変異ではわずか3分の1の患者でのみ抗第Ⅷ因子抗体が産生される。これは、母親の第Ⅷ因子が胎児の免疫系に提示されて免疫寛容が誘導されるからかもしれない。また、患者の免疫系の多型によっても、抗第Ⅷ因子抗体の産生が阻害されるか、あるいは相乗的に増加されるかもしれない⁶⁹⁾。

Scharrer 等はメタ分析を実施し、患者の人種差が第Ⅷ因子に対する抗体産生のリスクに及ぼす影響について明らかにした⁷³⁾。その結果、黒人における抗体の発生頻度は白人の2倍であった(51.9%、27人のうち14人、対25.8%、191人のうち51人)。この知見は、MHCクラスI/II及び各種のサイトカインのような免疫応答に関与する遺伝子の多型が、抗第Ⅷ因子抗体の出現に影響を及ぼす可能性を示している。更に、血友病Aの兄弟における抗体産生の発生頻度(50%)は、親戚の頻度(9%)よりも顕著に高い⁷⁴⁾。第Ⅷ遺伝子の遺伝的な欠損は兄弟と親戚で同様と考えられるので、免疫応答遺伝子の多型が抗第Ⅷ因子抗体の形成に影響を及ぼす可能性がある。そこで、MHCクラスI/IIの型が抗体産生のリスクに及ぼす影響について解明がなされたが、一致した結果は得られていない⁷⁵⁻⁷⁹⁾。イントロン22変異のみを有する患者に関する最近の研究において、MHCクラスI/IIの型が抗体産生に及ぼす影響について解明がなされた。その研究では、抗体を産生する患者に比べて産生しない患者において、MHCクラスI/IIの異なった対立遺伝子の保有頻度が高いかどうかに基づき、リスクあるいは保護対立遺伝子が決められた。その結果、MHCクラスI/II対立遺伝子A3、B7、C7、DQA0102、DQB0602及びDR15が、リスク対立遺伝子(相対リスク0.1~0.2)として決定された。MHCクラスI/II対立遺伝子C2、DQA0103、DQB0603及びDR13は、抗体を産生する患者よりも産生しない患者のほうで頻度がより高いため、保護対立遺伝

子として決定された。しかし、このサンプルサイズはあまりにも小さいため、統計的な有意性に基づき明確な結論を出すことは困難である。別の研究では、多発性硬化症の患者で、MHCクラスIIハプロタイプDRB*0701の存在が、抗IFN- β 抗体の産生と強く関連していた⁸⁰⁾。

4. 剤型、保存及びハンドリング

剤型、保存及びハンドリング(取り扱い)は単独あるいはお互いの相互作用により治療用タンパク質の抗体産生を増加させる可能性がある。

治療用タンパク質は許容可能な保存期間を維持するために、通常、溶液あるいは凍結乾燥後4°Cに保存する⁸¹⁾。また、タンパク質の分解を防ぐために、治療用タンパク質製剤に安定化剤を加えることが多い。しかし、用いられた製剤化の方法によっては、抗体産生を増加させる可能性がある⁸²⁾。

密閉した容器の中でも、治療用タンパク質は、振動、せん断力、温度変化、光、反応性のガス、水蒸気を含む外的因子により、酸化、脱アミド化、凝集、切断のような修飾を受ける^{82,83)}。その結果、治療用タンパク質の分解により、本来の治療用タンパク質では検出されない新規の抗原エピトープが出現し、抗体産生を増加させる可能性がある⁷⁾。治療用タンパク質の凝集は溶液環境、温度、表面とタンパク質分子の相互作用、及び凍結乾燥の間のタンパク質溶液の変化により起こり、抗体産生を増加させる可能性がある⁸²⁾。治療用タンパク質の酸化は溶液中及び凍結乾燥の間に起こり、それに伴う治療用タンパク質の立体構造変化により抗体産生が増加する可能性がある⁸²⁾。酸化は酸化剤を含む不純物及び保存中の光の暴露により起こり、最も酸化を受けやすいアミノ酸は、メチオニン、システイン、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン残基である⁸⁴⁾。なお、脱アミド化が抗体産生に及ぼす影響についてはあまりよくわかってはいない⁸⁾。

組換えヒト第Ⅷ因子、組換えヒトGH、組換えヒトインスリンを含む多くの治療用タンパク質は、振動あるいはせん断により容易に凝集する^{12,85-91)}。界面活性剤は振動/せん断力による治療用タンパク質の凝集を防ぐために通常用いられる^{90,92-94)}。特に、Pluronic F88とポリソルベート20は振動/せん断により誘導される組換えヒトGHの凝集を防ぐために

用いられる^{59,89~95}。PEG化GM-CSFと組換えヒトインスリンの凝集は、ポリソルベート20とグリセリンモノオレエートによりそれぞれ阻害される^{96,97}。

治療用タンパク質の保存時における過度の加熱、光、空気への暴露は分解物の形成速度を増加させる。

ヒト血清アルブミン(HSA)を含む凍結乾燥の組換えヒトIFN- α 2a製剤では、室温保存で、凝集体及び組換えヒトIFN- α 2aとHSAの複合体が形成され、抗体産生が増加したが、4°C保存では増加しなかった^{98,99}。そこで、HSAを除いた溶液の剤型及びバイアルの2~8°Cでの保存が導入され、抗体産生が低下した。

ポリソルベートは上記のように、ある治療用タンパク質では凝集を抑制するが、場合によっては以下に示すように、タンパク質の酸化により凝集体形成の促進及び立体構造の変化を起こす。したがって、添加剤として使用する場合には、注意する必要がある。

その有害効果の一つは、ポリソルベートに含まれる過酸化水素による治療用タンパク質の酸化であり、過酸化水素は加工あるいは保存時において自動酸化により生じる^{100~102}。この酸化は、酸化分解を受けやすい特定の治療用タンパク質において、かつ多くの場合、その治療用タンパク質が低濃度で製剤化された場合には深刻な問題となる可能性がある。例えば、溶液中で保存した組換えヒト ciliary neurotrophic factor 及び組換えヒト granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の場合では、ポリソルベート80に含まれる過酸化水素により酸化分解が起こる。また、組換え interleukin-2の変異導入タンパク質では、溶液及び固形の状態において、ポリソルベート80に含まれる過酸化水素により、剤型及び温度依存的に酸化が促進される^{102,103}。

ポリソルベートにおいて可能性のある他の有害効果は、治療用タンパク質との直接的な相互作用である。そのような相互作用はポリソルベート20, 40, 80と組換えヒトGHで報告されている^{89,92}。ほとんどの治療用タンパク質は、溶液状態において立体構造の不安定さが増すので、そのような直接的な相互作用は、立体構造の安定性に寄与するタンパク質の折り畳み形成能の微妙なバランスを壊す可能性がある。実際、ポリソルベート20は、29°C溶液状態での保存において、濃度依存的にPEG化組換えヒト

G-CSFの凝集を促進する。ポリソルベート80においても、組換えヒトエリスロポエチンで同様な現象が報告されているが、他の要因が関与する可能性も含めて後述する。

メチオニンの酸化は多くの治療用タンパク質の主要な分解経路の一つである。治療用タンパク質のメチオニン残基は酸化されやすく、通常の条件ではメチオニンスルホキシド、過酷な条件ではスルホンが生じる。溶液剤型では、組換えヒト型モノクローナル抗体HER2は強い光の暴露及び温度の上昇により酸化を受ける。温度の上昇により誘導される酸化はフリーラジカルの形成から生じ、強い光の暴露により誘導される酸化は1分子の酸素を介した経路により起こる。メチオニン及びチオ硫酸のような抗酸化剤を製剤に添加することにより温度の上昇による酸化の誘導が抑制される¹⁰⁴。

マウス由来モノクローナル抗体 muromonab-CD3 (Orthoclone OKT[®]3)では、特定のアスパラギン残基において脱アミド化、システインと幾つかのメチオニン残基において酸化が起き、重鎖及び軽鎖が架橋した分解物も示されている。なお、分解物質の割合は抗体の保存条件に依存する¹⁰⁵。

組換えヒトインスリンにおいて、患者が薬局でインスリンを購入してから自己投与するまでの取扱い時間と保存条件が免疫原性に影響を及ぼす可能性が示されている¹⁰⁶。溶液での保存の間に、脱アミド体、共有結合二量体、オリゴマーのようなインスリン転換生成物が生じた結果、治療効果が消失すると共に抗体産生が増加する可能性がある。ヒトあるいはウシインスリンによる治療に振り分けられた12人の糖尿病患者で、胸のポケットのような推奨保存温度よりも高い温度でバイアルを保存した場合、及びバイアルを光に暴露した場合、正常保存時に比べてインスリン転換生成物が早く生じる。興味深いことに、高い温度では、組換えヒトインスリンのほうがウシインスリンよりもその転換生成物が生じやすい。組換えヒトインスリン及びウシインスリンでは等張安定化剤としてそれぞれグリセロール及び塩化ナトリウムが用いられている。したがって、両者における転換生成物の生じやすさの違いは、種というよりも製剤化の違いによるものと思われる。

5. 密閉容器

密閉容器は外的環境から治療用タンパク質の保護を目的として使用するが、治療用タンパク質と相互作用し、生物活性及び免疫原性に影響を及ぼす可能性がある。ガラスに混入する不純物、ガラスと空気との境界面、滑剤、シリンジハブに用いる物質は、治療用タンパク質に対する抗体の出現に影響を与える。タンパク質溶液と空気との接触によりタンパク質の凝集が誘導される現象は、50年以上前から明らかになっている。誘導された立体構造の変化により治療用タンパク質は部分的に折り畳まれていない状態になり、凝集しやすくなる⁹⁹⁾。空気と溶液の表面における分子間タンパク質相互作用により、治療用タンパク質において本来埋もれているペプチドの疎水性領域が露出し、凝集が起こりやすくなる。輸送の間の攪拌及び高圧充填ラインでは、この境界領域が増加するため、凝集の可能性が増加する。ヒ素はガラス容器の製造から混入する可能性のある不純物であり、治療用タンパク質の免疫原性を増加させる。したがって、ガラス容器に含まれるヒ素の限度値は薬局方で定められている。容器は、保存された治療用タンパク質製剤の品質にも影響を与える。バイアルはガラス表面、バイアルストッパー及びバイアルストッパーに含まれる成分の遊離を抑制するためにバイアルストッパーにコートされた物質のみから構成されているため、製品の免疫原性が増加するリスクは、シリンジよりも低い。他方、シリンジは治療用タンパク質の吸着を促進させる。実際、シリンジに対する治療用タンパク質の吸着は急速に起こり、タンパク質の立体構造を変化させ不安定化させる¹⁰⁰⁾。シリコンオイルのような化学コーティング剤は、容器と治療用タンパク質の結合を抑制するために用いられるが、容器の表面処理に用いると治療用タンパク質と接触する可能性がある。疎水的な表面と滑剤はタンパク質の吸着を起こし、治療用タンパク質の変性及び分解を起こす。シリコンオイルは治療用タンパク質の凝集を引き起こし、その機構として直接的なタンパク質との相互作用あるいは溶媒を介した効果が考えられる¹⁰⁰⁾。ゴムストッパーから治療用タンパク質製剤に滲出する加硫剤及び可塑剤由来の有機化合物は、治療用タンパク質に対する抗体の出現頻度を増加させる可能性があるが、この点については組換えヒトエリスロポエチンの場合を例にとり後述

する。

6. 投与の頻度、期間、経路

治療用タンパク質の投与頻度、期間及び経路は抗体産生に重要な影響を及ぼす。例えば、IFN- β 1aを週に1回あるいは3回患者の皮下に投与し、12箇月後に出現する結合抗体の割合が比較されている⁴⁰⁾。その結果、週に3回投与した場合では患者の97%で、週に1回投与した場合では患者の58%で抗体が生じる。同様に週に1回患者の筋肉に投与した場合では、結合抗体が出現する割合は33%である。IFN- β 1aを1日おきと週に1回患者の皮下に投与した場合、1日おきの場合では抗体の出現が3~6箇月でピークに達するのに対し、週に1回の場合では9~12箇月にピークに達する¹⁰⁰⁾。そして、ピーク時における抗体の出現率は、週に1回の場合は1日おきの半分である。このように、免疫原性が引き起こされる可能性は皮下投与で最も高く、その次が筋肉内投与で、静脈投与は最も低いと考えられている。皮下ルートが抗体産生を引き起こしやすいのは、皮膚の免疫系が非常に発達しており、ランゲルハンス細胞などが抗原提示及び免疫応答に寄与するからと考えられる。吸入型のインスリンであるExubera[®]は通常の皮下投与インスリンよりも抗体の出現頻度が高い¹⁰⁰⁾。この理由は以下に示すように粘膜に免疫能があるからかもしれない。粘膜の免疫機構はIgAの産生誘導を行う誘導組織とIgAが分泌・機能する実効組織、それらをつなぐ帰巢経路から構成されている。誘導組織において粘膜面に存在する抗原提示細胞はリンパ球を活性化させ、遊走させる働きを持っている。リンパ球はリンパ節で分化した後実行組織に到達し、IgAを産生する。この際、一度誘導組織を離れたリンパ球は同じ組織に戻ってくる傾向を持ち、これをリンパ球のホーミング（帰巢現象）と呼ぶ。最終的に産生されたIgAは抗原や微生物に対して粘膜を防御する。

7. 内在性のタンパク質の中和を伴う重篤な有害事象が起きたケース

7.1 PEG化組換えヒトMGDF

血小板産生を促進する可能性のある因子として、生体ではグリコシル化されているヒトthrombopoietin (TPO)のN末端側から163アミノ酸残基を有す

る非グリコシル化タンパク質である PEG 化組換えヒト MGDF の治験が血小板減少症で、特に骨髄の破壊を伴わない化学療法を前処置とした設定で行われた^{111,112)}。これらの治験で PEG 化組換えヒト MGDF はほとんどの患者で安全であり、血栓症は起きなかった。しかし、2 回あるいは 3 回 PEG 化組換えヒト MGDF が投与された健常ボランティア 325 人のうち 13 人、骨髄機能の完全な破壊を伴わない化学療法の集中治療が行われ、複数回 PEG 化組換えヒト MGDF が投与された癌患者 650 人のうち 4 人で、持続的な血小板減少症（血小板数 $\leq 100 \times 10^9/L$ ）が起こった。そこで最も重篤な血小板減少症の患者 3 人で、PEG 化組換えヒト MGDF に対する抗体と血小板減少症との関連が調べられた³⁾。その結果、PEG 化組換えヒト MGDF で治療した患者において内在性 TPO に対する中和抗体が検出され、その抗体は TPO の最初の 163 アミノ酸残基のペプチドのエピトープに結合した。患者の 2 人において内在性 TPO レベルが増加したが、その TPO は抗 TPO 抗体と結合した免疫複合体であり、生物学的に不活性であった。患者の MHC クラス I/II、血小板の表現型及び TPO の mRNA は正常であった。一方、500 名以上の癌化学療法患者を対象にした組換えヒト TPO を用いた臨床研究において、患者の 1 人で部分的な中和抗体が出現した以外は、抗 TPO 抗体が原因の血小板減少症は報告されていない^{113,114)}。したがって、このように PEG 化組換えヒト MGDF で免疫原性が生じた原因として、①グリコシル化されていないこと、②立体構造の不安定性を PEG 化が防御できなかったこと、③組換えヒト TPO は静脈投与であるのに対し、PEG 化組換えヒト MGDF は皮下投与のため、免疫原性が増加した可能性が考えられる。

7.2 組換えヒトエリスロポエチン

組換えヒトエリスロポエチンは腎性貧血患者の治療などに幅広く使用されているが、それに対する中和抗体の出現が原因である有害事象 PRCA は、長年非常にまれな合併症であった。実際、そのような例は 1998 年まではわずか 3 例しか公表されていなかった^{115,116)}。しかし、それ以降に報告された PRCA の例数は劇的に増加した^{9,117)}。そのほとんどは、アメリカ以外で販売された組換えヒトエリスロポエチンのある特定のエポエチンアルファ製剤 (Eprex[®]) で治療した慢性腎不全の患者で起きた。その増加は

1998 年に狂牛病による感染を回避するためにヨーロッパで出された勧告に従い、Eprex[®] の添加剤が HSA からポリソルベート 80 とグリシンに変更されたことがきっかけとなった。結果的に、この添加剤の変更により組換えヒトエリスロポエチンに対する抗体の出現が増加し、投与された組換えヒトエリスロポエチン及び内因性のエリスロポエチンが中和され、PRCA が増加した。しかし、添加剤の変更により免疫原性が増加した原因については、以下に示すように複合的要因が考えられる。

1 番目の可能性は、ポリソルベート 80 と Eprex[®] によるミセルの形成である。Eprex[®] に添加されたポリソルベート 80 の濃度は 0.03 w/v (%) であり臨界ミセル濃度をはるかに越える。一方、他のエポエチンベータでは臨界ミセル濃度を若干しか超えない 0.01 w/v (%) が添加されている。そこでタンパク質がミセルに封入される間に、抗原性を有する疎水性部位がミセルの表面に配置され免疫原性が増加したとする仮説が立てられた。また、ヒト免疫系はウイルスに対して活発な応答を起こすが、ミセルはウイルスに似た構造を形成し、免疫応答を引き起こす可能性も指摘された。実際に Eprex[®] をゲル濾過クロマトグラフィーで分離すると、モノマーのエポエチンだけでなく、高分子画分において多量のタンパク質の溶出が検出された¹¹⁸⁾。一方、エポエチンベータでは高分子画分に溶出する物質は検出されなかった。

2 番目の可能性は、ポリソルベート 80 により、Eprex[®] を充填したシリンジに使用する未コートゴムストッパーから有機化合物が滲出しアジュバントとして作用することである。その後、この有機化合物は、ゴムの硬化剤として通常使用されるフェノール誘導体であることが明らかになった。更に、この滲出物は同じ Eprex[®] 製剤及びコートしていないゴムストッパーであらかじめ充填したプラセボのシリンジでは検出されたが、コートしていないシリンジストッパーの HSA を添加剤として加えた Eprex[®] 製剤あるいは FluroTec[®] コートしたシリンジストッパーに交換した Eprex[®] 製剤では検出されなかった¹⁶⁾。滲出物がアジュバントとして働く可能性を明確に調べるために動物実験が実施された。その結果、マウスにおいて滲出物フリーの Eprex[®] に滲出物を添加しても免疫応答には影響を与えなかったが、

Eprex® の代わりにオボアルブミンを用いた場合は、オボアルブミン単独に比べて濃度依存的に免疫応答がより強く促進された¹⁹⁾。

3番目の可能性は不適切なハンドリングと保存である。エポエチンアルファのHSAフリー製剤は以下のストレス条件で変性あるいは凝集体の形成を受けやすく、抗体産生を増加させる。これらのストレス条件には、温度の劇的な増加、光に対する長期間の暴露、バイアルあるいはシリンジの過度の振動が含まれる。例えば、患者が自己投与する場合、薬局で購入してから投与するまでの間で、エポエチンアルファのHSAフリー製剤を不適切にハンドリングしたり保存した場合はPRCAの急増に大きな役割を果たした可能性がある。これに関連し、未コート充填シリンジの滲出物の濃度は、推奨保存温度2~8℃でも保存時間と共に増加するが、46℃で2日間保存後の製品で検出された滲出物の量は、2~8℃で保存したものよりも高いことが報告されている¹⁰⁾。実際、自己投与が行われていたフランスではPRCAの発生頻度が最も高い。一方、PRCAの発症例の数が少ないドイツとイタリアでは、Eprex®は透析スタッフにより通常投与されていた。

4番目の可能性は投与方法として皮下注射を用いたことである。先に述べたように皮下投与は静脈投与に比べて免疫原性を増加させる可能性がある。

2003年にポリソルベート80が添加された製品のすべてで、あらかじめ充填されたシリンジをFluro-Tec® コートしたストッパーへ変更すると共に、流通の厳密な低温管理がなされ、慢性腎不全の患者に静脈投与する勧告がなされた。その後、報告されたPRCAの例数は急速に低下した。この低下は先ほど述べた単一あるいは複数の変更によると思われるが、すべての変更がほぼ同時に行われたため、その原因を特定することは困難である。

おわりに

治療用タンパク質により中和抗体が生じ患者に重大な有害事象を起こすことは比較的まれであるが、様々な要因により治療用タンパク質に対する抗体が産生される可能性は常に存在する。その主な要因は宿主由来不純物(宿主由来タンパク質、エンドトキシン等)及び目的物質由来不純物(凝集体、酸化体、分解物等)である。したがって、治療用タンパク質

の製造工程においては、これら不純物の混入と生成が可能な限り少なくなるよう頑健性の高い製法を確立し、適切に品質管理を行う必要がある。また、グリコシル化を含め、発現に用いる宿主細胞の選択にも注意を払う必要があると共に、必要に応じてPEG修飾を検討することも有用かもしれない。剤形については目的物質由来不純物の増加を伴わない適切な添加剤を選択する必要がある。保存及びハンドリングについては適切な条件に保たれるよう厳密に管理することが必要である。モノクローナル抗体については免疫原性により有害事象が生じる場合、免疫原性を高めるエピトープを除去することも考慮する必要がある。このように最大限の注意を払っても免疫原性が生じる場合は、その原因を徹底的に解明し適切に対処する必要がある。また、その出現を見逃さないようにするためには長期間にわたる広範囲の市販後調査が重要となる。一方、治験及び承認後の臨床使用における免疫原性のリスクを低下させるには、開発の初期段階で治療用タンパク質候補の免疫原性を予測することが有用である。今回はこの点について概説する予定である。

文 献

- 1) Walsh, G.: *Nat Biotechnol*, **24**(7), 769-782 (2006).
- 2) Shankar, G., Pendley, C., Stein, K. E.: *Nat Biotechnol*, **25**(5), 555-61 (2007).
- 3) Li, J., Yang, C., Xia, Y., Bertino, A., Glaspy, J., Roberts, M., Kuter, D. J.: *Blood*, **98**(12), 3241-8 (2001).
- 4) Rudick, R. A., Simonian, N. A., Alam, J. A., Champion, M., Scaramucci, J. O., Jones, W., Coats, M. E., Goodkin, D. E., Weinstock-Guttman, B., Herndon, R. M., Mass, M. K., Richert, J. R., Salazar, A. M., Munschauer, F. E., 3rd, Cookfair, D. L., Simon, J. H., Jacobs, L. D.: *Neurology*, **50**(5), 1266-72 (1998).
- 5) Porter, S.: *J Pharm Sci*, **90**(1), 1-11 (2001).
- 6) Ryff, J. C., Schellekens, H.: *Trends Pharmacol Sci*, **23**(6), 254-6 (2002).
- 7) Koren, E., Zuckerman, L. A., Mire-Sluis, A. R.: *Curr Pharm Biotechnol*, **3**(4), 349-60 (2002).
- 8) Schellekens, H.: *Clin Ther*, **24**(11), 1720-40; discussion 1719 (2002).

- 9) Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., Kolta, A., Kiladjian, J. J., Martin-Dupont, P., Michaud, P., Papo, T., Ugo, V., Teyssandier, I., Varet, B. and Mayeux, P.: *N Engl J Med*, **346**(7), 469-75 (2002).
- 10) Sharma, B.: *Biotechnol Adv*, **25**(3), 325-31 (2007).
- 11) Schellekens, H.: *Nephrol Dial Transplant*, **20 Suppl 6**, vi3-9 (2005).
- 12) Sharma, B.: *Biotechnol Adv*, **25**(3), 318-24 (2007).
- 13) De Groot, A. S., Scott, D. W.: *Trends Immunol*, **28**(11), 482-90 (2007).
- 14) Locatelli, F., Del Vecchio, L., Pozzoni, P.: *Perit Dial Int*, **27 Suppl 2**, S303-7 (2007).
- 15) Kessler, M., Goldsmith, D., Schellekens, H.: *Nephrol Dial Transplant*, **21 Suppl 5**, v9-12 (2006).
- 16) Sharma, B.: *Biotechnol Adv*, **25**(3), 310-7 (2007).
- 17) Mukovozov, I., Sabljic, T., Hortelano, G., Ofosu, F. A.: *Thromb Haemost*, **99**(5), 874-82 (2008).
- 18) Onda, M.: *Curr Drug Targets*, **10**(2), 131-9 (2009).
- 19) Grauer, A., Ziegler, R., Raue, F.: *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **103**(6), 345-51 (1995).
- 20) Lawley, W. J., Fletcher, S., Squire, I. B., Woods, K. L., Hewitt, C. R.: *Clin Sci (Lond)*, **99**(3), 239-46 (2000).
- 21) Schellekens, H.: *Trends Biotechnol*, **22**(8), 406-10 (2004).
- 22) Rosenschein, U., Lenz, R., Radnay, J., Ben Tovim, T., Rozenszajn, L. A.: *Isr J Med Sci*, **27**(10), 541-5 (1991).
- 23) Fernandes, A. I., Gregoriadis, G.: *Int J Pharm*, **217**(1-2), 215-24 (2001).
- 24) Ottesen, J. L., Nilsson, P., Jami, J., Weilguny, D., Duhrkop, M., Bucchini, D., Havelund, S., Fogh, J. M.: *Diabetologia*, **37**(12), 1178-85 (1994).
- 25) Fireman, P., Fineberg, S. E., Galloway, J. A.: *Diabetes Care*, **5 Suppl 2**, 119-25 (1982).
- 26) Fineberg, S. E., Galloway, J. Fineberg, A., N. S., Goldman, J.: *Diabetes*, **32**(7), 592-9(1983).
- 27) Weaver, F. A., Lew, W., Granke, K., Yonehiro, L., Delange, B., Alexander, W. A.: *J Vasc Surg*, **47**(6), 1266-73 (2008).
- 28) Hwang, W. Y., Foote, J.: *Methods*, **36**(1), 3-10 (2005).
- 29) Buist, M. R., Kenemans, P., van Kamp, G. J., Haisma, H. J.: *Cancer Immunol Immunother*, **40**(1), 24-30 (1995).
- 30) 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., Effron, M. B., Braden, G. A.: *Circulation*, **104**(8), 870-5 (2001).
- 31) Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., Geert, D. H., Carbonez, A., Rutgeerts, P.: *N Engl J Med*, **348**(7), 601-8 (2003).
- 32) De Groot, A. S., Martin, W.: *Clin Immunol*, **131**(2), 189-201 (2009).
- 33) Du, X., Tang, J. G.: *Biochem Mol Biol Int*, **44**(3), 507-13 (1998).
- 34) Stewart, T. A., Hollingshead, P. G., Pitts, S. L., Chang, R., Martin, L. E., Oakley, H.: *Mol Biol Med*, **6**(4), 275-81 (1989).
- 35) Chance, R. E., Root, M. A., Galloway, J. A.: *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, **205**, 185-98 (1976).
- 36) Chirino, A. J., Mire-Sluis, A.: *Nat Biotechnol*, **22**(11), 1383-91 (2004).
- 37) Massa, G., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Bouillon, R.: *Clin Endocrinol (Oxf)*, **38**(2), 137-42 (1993).
- 38) Pavlovic, M., Girardin, E., Kapetanovic, L., Ho, K., Trouvin, J. H.: *Horm Res*, **69**(1), 14-21 (2008).
- 39) Sorensen, P. S., Ross, C., Clemmesen, K. M., Bendtzen, K., Frederiksen, J. L., Jensen K., Kristensen, O., Petersen, T., Rasmussen, S., Ravnborg M., Stenager, E., Koch-Henriksen, N.: *Lancet*, **362**(9391), 1184-91 (2003).
- 40) Ross, C., Clemmesen, K. M., Svenson, M., Sorensen, P. S., Koch-Henriksen, N., Skovgaard, G. L., Bendtzen, K.: *Ann Neurol*, **48**(5), 706-12 (2000).
- 41) Abdul-Ahad, A. K., Galazka, A. R., Revel, M., Biffoni, M., Borden, E. C.: *Cytokines Cell Mol Ther*, **3**(1), 27-32 (1997).
- 42) Takano, K., Shizume, K.: *Acta Paediatr Scand Suppl*, **325**, 19-24 (1986).
- 43) Suh, B. K., Jorgensen, E. V., Root, A. W.: *J Pediatr Endocrinol Metab*, **8**(2), 97-102 (1995).
- 44) Galili, U., Shohet, S. B., Kobrin, E., Stults, C. L., Macher, B. A.: *J Biol Chem*, **263**(33), 17755-62 (1988).