

2. ヒト幹細胞からの肝細胞分化誘導とその創薬非臨床試験への応用

佐藤陽治, 石田誠一, 鈴木和博, 簾内桃子

今日の医薬品開発では、ヒトでの肝毒性および薬物体内動態・薬物相互作用を予測するための非臨床試験において、ヒト肝細胞・肝組織を用いた毒性試験および薬物動態・薬理試験を行うことが非常に重要だと認識されている。しかし、ヒト肝細胞・肝組織の入手の難しさ、個体差およびロット差の問題など、大きな問題点が依然として存在する。本稿では、これらの問題点について解説するとともに、その克服を目指し、ヒト多能性幹細胞から肝細胞を効率的に誘導して肝毒性・代謝研究に応用する試みについて述べる。

はじめに

生体の薬物に対する反応において、ヒトと動物との間にはきわめて大きな種差がある。その主な原因として、標的組織における反応性の相違と薬物の体内動態の相違があげられる。特に、薬物動態関連因子は実験動物とヒトの間には著しく大きな種差があることが知られている。これらの種差のため、開発中の医薬品

候補化合物がヒトでの臨床段階において思わぬ毒性を示したり、期待される薬物動態を示さなかったりするなどして、開発中止になることがある。そこで最近ではヒト細胞・組織を用いた非臨床試験が広く行われるようになった。医薬品開発の初期においてヒト細胞・組織を用いた非臨床試験を行うことは、開発にかかわる意思決定を早めることを可能とし、医薬品開発の効率化と経済性に資するとともに、結果として無駄な動物実験を省くことにも役立つ。

肝臓はヒト体内では最大の腺組織であり、代謝において中心的な役割を担い、健康な生命の維持に大きく寄与している。このため、薬物誘発性の肝機能障害（薬物性肝障害）は薬物に由来する副作用のなかでも医薬品開発の過程における開発中止、警告表示あるいは販売中止に至る主要な薬物関連有害事象の1つとなっている。したがって、医薬品開発においては、薬物およびその代謝産物のヒト肝臓に対する毒性を可能な限り早期に予測することが大切となる。また、薬物のヒト

【キーワード&略語】

薬物性肝障害, 特異体質, 薬物代謝, 個人差, 幹細胞

ES細胞: embryonic stem cell (胚性幹細胞)

FGF: fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

HGF: hepatocyte growth factor (肝細胞増殖因子)

HNF-3β: hepatocyte nuclear factor-3β (肝細胞核因子3β)

IPS細胞: induced pluripotent stem cell (人工多能性幹細胞)

In vitro generation of hepatocytes from human stem cells and its application to non-clinical drug development
Yoji Sato¹⁾/Seiichi Ishida²⁾/Kazuhiro Suzuki¹⁾/Momoko Sunouchi²⁾: Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences¹⁾/Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences²⁾ (国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部¹⁾/国立医薬品食品衛生研究所薬理部²⁾)

表1 薬物性肝障害の分類

	中毒性肝障害	特異体質性肝障害	
		アレルギー性	代謝性
用量依存性	あり	なし	なし
動物での再現性	あり	なし	なし
原因	薬物・代謝産物自体の毒性	反応性代謝産物の抗原性 (T細胞依存性肝細胞障害)	薬物代謝関連酵素の個人差 (遺伝的特徴)

肝臓での代謝過程を理解することは、「毒性学」の観点からだけでなく、ヒトにおける薬物の体内動態の評価および複数の薬剤を投与する場合の薬物間相互作用の評価という「薬物動態学」または「臨床薬理学」の観点からも重要である。薬物の肝毒性および代謝過程を非臨床試験のなかで評価する際、ヒト肝細胞・肝組織を用いることで種差の問題の多くを克服することが可能となる。しかし、ヒト肝細胞・肝組織には、入手の難しさ、個体差およびロット差など、大きな問題点が存在している。

近年、幹細胞を分化誘導してさまざまな細胞種を効率的に作製する方法の開発が急速に進んでいる。ヒト幹細胞から肝細胞を効率的に誘導し、肝毒性・代謝研究へ応用できれば、これまでのヒト肝細胞・肝組織を用いた非臨床試験における問題点の多くを解決することができると期待されている。

1 薬物性肝障害・薬物応答性

多くの薬物は肝臓で代謝されるため肝障害（肝毒性）を示す可能性がある。薬物性肝障害の肝臓における症状としては、脂肪肝、肝細胞死、毛細胆管性胆汁うっ滞、胆管障害、類洞壁障害、リン脂質症、線維化、硬化、腫瘍などが認められるが、いずれが発生するかは薬物の投与量と頻度、投与期間、および細胞の薬物に対する応答性（薬物動態、薬効・副作用の出方）などによってさまざまである。発症機序をもとにした場合、薬物性肝障害には大きく分けて「中毒性肝障害」と「特異体質性肝障害」とが存在する（表1）¹⁾。

1) 中毒性肝障害と特異体質性肝障害

中毒性肝障害の場合は薬物自体またはその代謝産物が肝毒性をもっており、用量依存性であり、動物実験で再現しやすい。したがって、既存の技術でも毒性発現を予測もしくは予防することが論理的には可能であ

る。

これに対し、特異体質性肝障害は薬物に対する特異体質が原因で起きるもので、一般的に用量依存性がなく、動物実験では認められない性格をもち、前もって予測することが困難である。医薬品開発のうえで問題となる薬物性肝障害の多くはこの特異体質性肝障害に属している。特異体質性肝障害は現在ではさらに「アレルギー性特異体質」によるものと「代謝性特異体質」によるものとに分類されている。アレルギー性特異体質性肝障害は薬物の反応性中間代謝産物がハプテンとなり担体タンパク質と結合して抗原性を獲得し、T細胞依存性肝細胞障害により惹起される肝障害である。

一方、代謝性特異体質性肝障害は薬物代謝関連酵素の特殊な個人差（遺伝的特徴）に起因する²⁾。

2) 薬物によって異なる肝障害

中毒性であれ、特異体質性であれ、肝機能障害を惹起しやすいのは化学的に反応性の高い代謝物を生成する薬物であることが知られている。ただし、反応性代謝物を生成しても、ある薬物では惹起される肝障害が中毒性であり、別の薬物では特異体質性となる。薬物によって異なるタイプの肝毒性を引き起こす仕組みは明らかではないが、反応性代謝物が結合する相手のタンパク質種の差による可能性があげられている¹⁾。いずれにせよ、ヒトにおける反応性代謝物の生成を予測し、その個人差（特に非常に低い比率で存在する遺伝的特徴）と特異体質性肝障害との相関性を評価することは薬物性肝障害の予測において重要である。

3) 薬物応答性の個人差

また、肝毒性試験のみならず、薬物動態・薬理試験として肝臓での代謝プロフィールを取得し、薬物の体内動態や複数の薬剤を同時に服用する際にみられる薬物相互作用など、いわゆる「薬物応答性」の個人差を臨床試験開始前に予測することも医薬品開発では重要

表2 非臨床試験においてヒト肝細胞・肝組織を用いる長所・短所

	長所	短所
総体として	<ul style="list-style-type: none"> 医薬品開発における有効性・安全性の予測 ◆ヒト <i>in vivo</i> における代謝プロフィールおよび代謝能レベル ◆薬物輸送に関する置換 ◆薬物相互作用の予測 	<ul style="list-style-type: none"> 入手が困難 大きい個体差 技術要求 バイオハザード対応が必要
ヒト肝細胞・肝組織	<ul style="list-style-type: none"> 代謝プロフィール・代謝能評価可能 (第I相, 第II相) 薬物誘導能検討可能 代謝レベルの薬物間相互作用検討可能 <i>in vivo-in vitro</i> 相関が高い 	<ul style="list-style-type: none"> 入手が困難 ロット差が大きい 高い技術レベルが必要 ドナー情報が限定
ヒト肝ミクロソーム	<ul style="list-style-type: none"> さまざまな代謝能 P450発現が高い 簡便である 入手しやすい P450レベルでの相互作用検討可能 	<ul style="list-style-type: none"> 多くの第II相代謝酵素の欠如により, 総体的代謝能評価ができない 個体差が大きい ドナー情報が限定
ヒトES細胞・iPS細胞由来肝細胞 (予想)	<ul style="list-style-type: none"> 代謝プロフィール・代謝能評価可能 (第I相, 第II相) 薬物誘導能検討可能 代謝レベルの薬物間相互作用検討可能 特定ドナー由来の規格化された品質の細胞を大量に入手可能 多くのロットを用意することが可能なので個体差情報と母集団情報の双方を取得可能 (iPS細胞) 	<ul style="list-style-type: none"> 培養, 分化誘導, 肝細胞の分離・回収に高い技術が必要 匿名化されておりドナー情報が得られない (ES細胞)

(文献3より)

である。薬物応答性の個人差には、薬物代謝・動態関連分子や薬物標的分子の遺伝的多型、ならびにそれらの発現に影響する環境的要因がかかわっている。したがって、薬物応答性の個人差を予測するためには、これら遺伝的・環境的要因とヒト肝臓または肝細胞・肝組織での代謝プロフィールとの関連を明らかにする必要がある。

2 ヒト肝細胞・肝組織を用いた非臨床試験

安全で有効性の高い新薬を効率的に開発するには、ヒトでの薬効や副作用ならびに薬物相互作用を非臨床試験で高精度・高感度に予測し、早期に臨床試験に入ることが求められる。そのため、医薬品開発の初期段階においては、主に肝毒性・薬物応答性の種差の問題の多くを克服するという意味で、ヒト肝細胞・肝組織を用いた試験の重要性が広く認識されている。肝毒性・薬物応答性予測においてヒト肝細胞・肝組織を利用することの長所・短所を表2にあげる。ヒト肝組織は、医薬品候補物質のヒト *in vivo* における代謝プロフィールとそのレベルの予測、肝薬物輸送能、および薬物相互作用予測のための優れた実験系である。また、肝ミクロソーム分画はCYP (シトクロムP450) をは

じめとする主要な薬物代謝酵素を含み、取り扱いが簡単であること、凍結試料として入手しやすいなどの利点がある。ただし短所として、ミクロソームには、多くの第II相薬物代謝^{※1}酵素群が含まれないことから、薬物全体の代謝プロフィールに関するデータを得ることができない。一方、遊離ヒト肝細胞ならびに初代培養ヒト肝細胞にはすべての薬物代謝関連の酵素が含まれることから、薬物の代謝経路および代謝パターンを明らかにできる。米国食品医薬品局 (FDA) が2006年に提示した薬物相互作用に関するドラフトガイダンス⁴⁾のなかでは、新薬の申請書類に初代培養ヒト肝細胞を用いた薬物代謝誘導試験などを資料として添付することが推奨されている。

しかしながら、これら従来のヒト肝細胞・肝組織標本を用いた試験系では、標本のドナーの個人差などに起因するロット差が大きいことが問題とされている。

※1 第II相薬物代謝

薬物代謝反応は第I相と第II相に大別される。官能基形成や開裂反応 (酸化・還元・加水分解) である第I相反応に対し、第II相反応は内因性物質 (グルクロン酸・硫酸・グリシンなど) との抱合体化である。第II相反応を触媒する酵素は主に細胞質にある。

ロット間のばらつきが大きくてもロット数が十分多ければ試験系として問題はないが、ヒト肝細胞・肝組織標本のもう1つの大きな問題として、わが国における法的制約もあり、その入手が困難なことがある。人手先を海外に大きく依存していることから、人種差の評価が難しく、倫理的に問題を孕むことも問題とされている。特異体質性肝障害の発症率は一般に5,000人に1人未満とされており⁵⁾、例えば多数の特異体質性肝障害発症者の肝細胞を得ることなどは著しく困難である。

特異体質性肝障害のような低頻度で観察される肝毒性や薬物応答性の個人差を十分に予測することが可能な非臨床試験を行うためには、①用いられるヒト肝細胞・肝組織のロット（ドナー）の数をできるだけ多く、かつ各ロットについては②規格化された品質（細胞の形質・調製過程）のものを③安定的に大量に得ることが求められる。しかし、従来の試験系で用いられるようなヒト肝細胞・肝組織標本ではこの3要件を満たすことは容易ではない。また、可能ならば日本人からの標本を用いることが望まれる。これらの問題を解決する手段として、近年、幹細胞から誘導された肝細胞の利用に期待が集まっている。

3 幹細胞からの肝細胞分化誘導

ヒト肝細胞は、たとえ初代培養して増殖させたとしても、徐々に生理機能が減弱し、現在の技術では最長1カ月程度で多くの機能を失ってしまう。また株化された肝細胞由来細胞はごく限られた肝機能しか示さない。胎児の肝臓に存在する肝芽細胞または成体肝臓中に存在するオーバル細胞と呼ばれる細胞は肝幹細胞として肝細胞への分化能をもつが、組織中の細胞数が少ないため、その単離が難しく、非臨床試験に用いることができるほどの体外増殖も困難である。骨髓細胞や臍帯血、羊膜などからも肝細胞様の細胞が誘導されることが報告されているが⁶⁾、肝幹細胞と同様、原材料としての組織・血液の供給量に限りがある。

そこで近年、多能性幹細胞であるヒト胚性幹細胞（ES細胞）やヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）などからヒト肝細胞を誘導しようと試みられている。分化能および自己複製能が有限である体性幹細胞と比較した場合、これらの多能性幹細胞は、ひとたび肝細胞への

効率的分化誘導方法が確立すれば、その多能性および無限の自己複製能ゆえに安定した原材料供給が可能となる点で有利である。現時点では肝臓中の肝細胞に比肩するだけの形質をもつ細胞を非臨床試験に用いられるほど大量に人為的に誘導する方法は確立されていないが、ヒトES細胞からの肝細胞様細胞の誘導の効率および生理機能は年々着実に進歩し続けている。ヒトES細胞から肝細胞を誘導する場合、大きく分けて、未分化細胞を内胚葉系に分化させるステップと、内胚葉系細胞を肝細胞へ分化・成熟させるステップとが必要となる。したがって、内胚葉系細胞をいかに効率的に獲得するかが第1の課題となる。

これまでの研究により分化誘導開始時にアクチビンAなどを添加することが内胚葉系細胞への誘導に効果的であることが知られている⁶⁾⁷⁾。内胚葉系細胞から肝前駆細胞の誘導にはFGFなどが有効であるとされている。これは、胚発生時に肝前駆細胞を含んだ肝臓前駆組織（肝芽）の出現を誘導する因子の1つがFGFであることと合致する。肝前駆細胞の増殖および成熟にはHGFやオンコスタチンMおよびデキサメタゾンなどが用いられることが多い。

現在、これらの因子の量やタイミングだけでなく新たな液性因子の探索や、転写因子HNF3-βの過剰発現による分化の方向付け、細胞外マトリックス、細胞の足場材料、三次元培養などをさまざまに組合わせた形での培養条件の最適化が精力的に模索されている⁸⁾⁹⁾。また、酸素分圧や酸化ストレス状態などの細胞近傍の環境因子、およびES細胞のエピジェネティックな調節などについても最適化の余地があると考えられる。

'07年に初めて報告されたヒトiPS細胞からは、すでに神経細胞、骨細胞、心筋細胞、脂肪細胞、膵臓細胞、血管細胞、造血細胞、内皮細胞など、さまざまな細胞種への分化誘導法が報告されている。ヒトiPS細胞から肝細胞を直接誘導した例はなかなか出なかったが、ごく最近、比較的効率的な肝細胞様細胞の誘導法が報告された¹⁰⁾。今後の研究の進展が期待される。

4 幹細胞由来肝細胞の非臨床試験への応用

ヒトES細胞およびヒトiPS細胞は高い増殖能・多能性・自己複製能を兼ね備えている。これらを再生医

療・細胞治療に応用する場合はがん化の懸念など、安全性上の高いハードルが存在するが、非臨床試験への応用ではその心配がない。そこで、従来のヒト肝細胞・肝組織を用いた非臨床試験の問題点を克服することを目指し、ヒト多能性幹細胞を効率的に肝細胞に誘導する技術の開発を通じて、信頼性が高くハイスループットの化合物スクリーニング系を樹立する試みが現在続けられている。ヒトES細胞およびヒトiPS細胞から肝細胞への分化については現状の技術では効率または形質の面で十分なものとは言えない。しかし、将来的に優れた分化培養方法が確立されれば、一定の品質のヒト肝細胞を安定的かつ大量に供給することが可能となると考えられる。

ただし、受精卵を原材料とするヒトES細胞は倫理的理由などにより多くのドナーからの樹立が困難と予想され、また制度上ドナーを匿名化する必要があるため、表現型と遺伝型との相関の解析が難しいという問題が存在する。一方、ヒトiPS細胞は原材料としての体細胞を多くのドナーから入手しやすく、またドナーの情報も確保しやすいと考えられる。したがって、多数のドナー由来のヒトiPS細胞由来の肝細胞を用いて薬物の代謝プロフィールおよび遺伝子プロフィールなどを取得し、ドナー情報と照合することが可能になれば、肝毒性・薬物応答性の個人差の詳細なメカニズムが明らかにされることが期待できる。また、もし十分な数のドナーに由来するiPS細胞由来肝細胞を得ることが可能ならば、それらを利用してスクリーニング系を構築し、低頻度の特異体質性肝障害および薬物応答性の個人差を予測することが技術的に可能となることも期待できる。

おわりに

ヒト肝細胞・肝組織を用いた医薬品候補化合物の非臨床試験は、今日の創薬において大変重要なものと認識されているが、原材料の入手をはじめ多くの問題が残されている。ヒトES細胞およびヒトiPS細胞からの

肝細胞誘導方法を確立すれば、その多くを解決することができると考えられる。特にヒトiPS細胞は異なるドナー由来の多くのロットをバンク化することが可能であり、特異体質性肝障害および薬物応答性の個人差の予測に威力を発揮することが期待される。ただし、そのためには肝細胞誘導方法の確立のみでは十分ではなく、例えば細胞チップ²⁾のようなハイスループットのアッセイシステムの構築や、*in vivo*における肝毒性・薬物応答性と*in vitro*の細胞応答性とをつなぐデータベースおよびインフォマティクスなど、周辺技術の開発も非常に重要になる。

文献

- 1) 池田敏彦：日本薬理学雑誌，127：454-459，2006
- 2) 厚生労働省：『重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性肝障害』，2008
- 3) 籙内桃子，大野泰雄：『摘出ヒト組織・細胞を用いた非臨床研究』（大野泰雄ほか/編），pp125-137，エル・アイ・シー，2005
- 4) Draft Guidance for Industry：Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling, U.S. Food and Drug Administration Publication, US FDA, 2006
- 5) Li, A. P.：Chem. Biol. Interact., 142：7-23, 2002
- 6) D'Amour, K. A.：Nat. Biotechnol., 23：1534-1541, 2005
- 7) Hay, D.C.：Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105：12301-12306, 2008
- 8) Snykers, S. et al.：Stem Cells, 27：577-605, 2009
- 9) Dalgetty, D. M. et al.：Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 297：G241-248, 2009
- 10) Song, Z. et al.：Cell Res, 19：1233-1242, 2009

<筆頭著者プロフィール>

佐藤陽治：国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長（細胞治療薬担当）。博士（薬学）。1995年に東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了後、米国シンシナティ大学医学部・ポスドク。'98年に国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部・研究員、2002年に新設の遺伝子細胞医薬部・主任研究官となり、'04年より現職。研究テーマ：幹細胞・体細胞の情報伝達系、再生医療・細胞治療の安全性評価。趣味：登山。

<つぶやき>

『規制科学』という分野に携わっています。一見、威圧感がありますが、実は先端医療の安全性・品質について『何を』『どのように』明らかにすべきかを示すという点で実用化までの電車のレールを敷くような仕事です。」

※2 細胞チップ

多くの小さな穴（ウェル）をもち、細胞の反応や変化を観察するために細胞をウェルあたり1つずつ均一に入れることのできるチップ。現在、数十万個～百万個のウェルをもったシリコンや樹脂製のチップが製作されている。

Gタンパク質共役型受容体— TRPCチャネルタンパク複合体形成による心肥大シグナル制御

西田 基宏¹⁾, 佐藤 陽治²⁾, 仲矢 道雄¹⁾, 黒瀬 等¹⁾

要約: 高血圧による圧負荷や虚血などのストレスによって誘発される心筋細胞の肥大化(心肥大)には, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による Ca^{2+} シグナリング経路の活性化が重要な役割を果たしている。この過程には, カテコラミンやアンジオテンシン (Ang), エンドセリン (ET) などの神経体液性因子の関与が示唆されており, これらは全て G_q タンパク質と共役する受容体を介して心肥大を誘導する。しかし, G_q タンパク質による Ca^{2+} シグナリング活性化のメカニズムについてはよく分かっていなかった。我々は, ラット新生児の初代培養心筋細胞を用いて, ジアシルグリセロール (DAG) で活性化される transient receptor potential canonical (TRPC) チャネル (TRPC3 と TRPC6 のヘテロ4量体チャネル) が Ang II 刺激による Ca^{2+} シグナリングの活性化および心肥大形成を仲介することを初めて明らかにした。また, 全ての G_q タンパク質共役型受容体刺激が心肥大を引き起こすわけではなく, TRPC3/TRPC6 チャネルとタンパク複合体を形成する G_q タンパク質共役型受容体だけが心肥大を起こすこともわかってきた。さらに, TRPC3/TRPC6 チャネルを阻害する化合物が個体レベルの心肥大や心機能障害を抑制することも明らかにされてきた。これらの結果は, TRPC3/TRPC6 チャネルが心不全治療薬の新たな標的分子となることを示唆している。

1. 心不全と心肥大

心不全は, あらゆる心疾患の終末像である。日本国内の慢性心不全患者数は100万人以上と推定されており, 高齢化に伴いその数は年々増加傾向にある。心不全患者の5年生存率は50%程度と低い。患者のQOL改善や医療費軽減の観点からも, より画期的な治療法

の開発が求められている。

高血圧や心筋梗塞などの負荷が心臓にかかる時, 心臓は自身を大きく(肥大)することでポンプ機能を維持しようとする。心肥大は, 心不全患者にみられる典型的な所見であり, 心エコーで容易に, かつ非侵襲的に診断することができる。初期の心肥大は負荷に適応するための代償機構と考えられているものの, 負荷が取り除かれずと心肥大は心不全へと進行する。したがって, 心不全の前段階で生じる心肥大の抑制が, 結果的に心不全の予防・治療につながるだろうと期待されている。

2. 病的な心肥大と Ca^{2+} シグナリング

心肥大は, 形態組織学的に, 運動や妊娠などで生じる生理的心肥大と, 高血圧や虚血により生じる病的な心肥大の2つに大きく分けられる(図1)。どちらも負荷によって肥大が誘発されるものの, 病的な心肥大だけが時間経過とともに心機能の低下(心不全)を起こすことが知られている。病的な心肥大の発症・成因には, カテコラミンや Ang II, ET-1 などの神経体液性因子の関与が強く示唆されている。

病的な心肥大の形成には, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が極めて重要な役割を果たすと考えられている(図2)。例えば, 電位依存性L型 Ca^{2+} チャネル, 三量体GTP結合タンパク質 G_q の α サブユニット, カルモデュリン依存性キナーゼ (CaMKII), カルシニューリンを過剰発現させることで心肥大が惹起される。1998年Molkentinらは, カルシニューリンによって脱リン酸化され活性化される転写因子 nuclear factor of activated T cells (NFAT) が心肥大の誘導因子として働くことを初めて明らかにした(1)。NFATは生理的心肥大

キーワード: TRPCチャネル, ジアシルグリセロール, Gタンパク質, 受容体, 心肥大

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

E-mail: nishida@phar.kyushu-u.ac.jp 原稿受領日: 2009年5月13日, 依頼原稿

²⁾国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 (〒158-0098 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

Title: Regulation of cardiac hypertrophy by the formation of G protein-coupled receptor-TRPC channel protein complex.

Author: Motohiro Nishida, Yoji Sato, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose

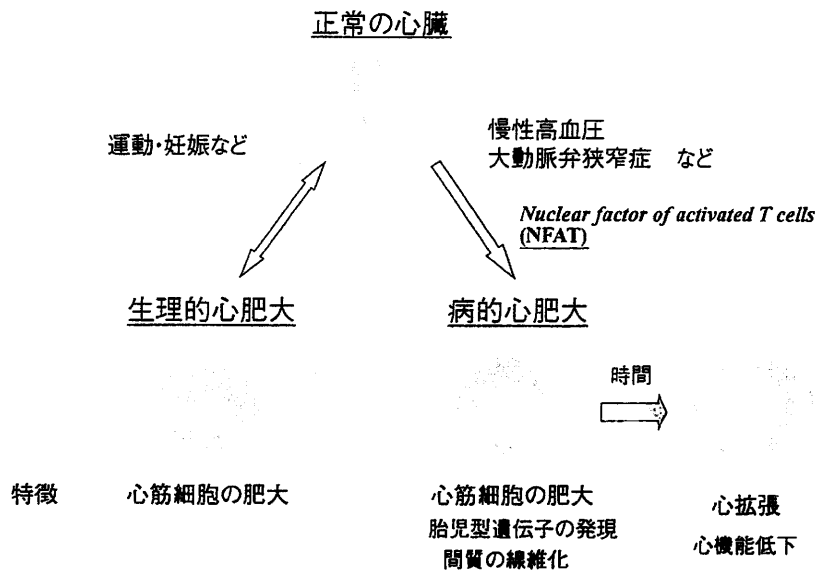


図1 心臓の形態変化(心肥大)と心不全との関係

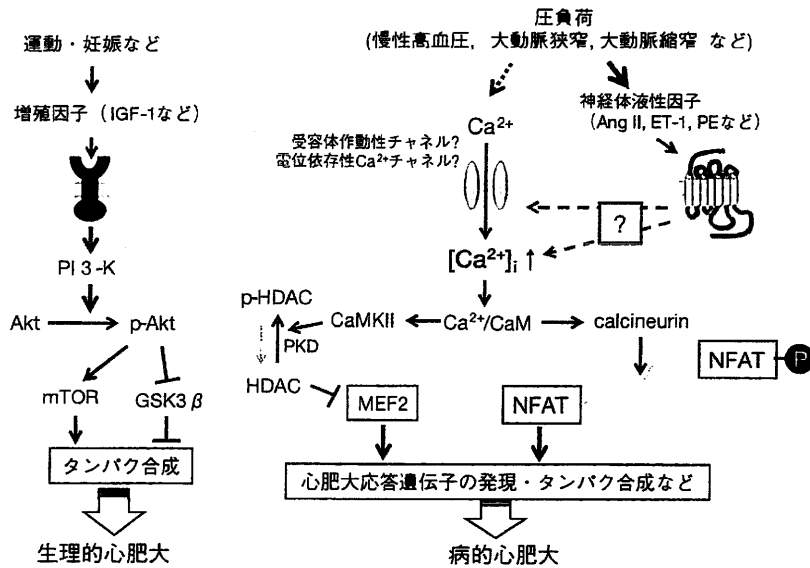


図2 生理的心肥大と病的な心肥大の発症メカニズムの違い

では活性化されず、病的な心肥大でのみ活性化されることから、心不全の初期誘導因子として一躍脚光を浴びるようになった。その後、NFATと並行して心肥大を誘導する転写因子 myocyte-enhancer factor (MEF) の活性を負に制御するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が CaMKII によって不活性化されることも明らかとなり(2, 3), 病的な心肥大における Ca²⁺シグナリングの重要性が確立されてきた。しかしながら、NFAT や HDAC の活性化に結びつく Ca²⁺供給源につ

いては未だに明らかにされていない。そこで我々は、心筋細胞の肥大形成に関わる Ca²⁺シグナリングを評価する実験系を構築した(図3)。Ca²⁺シグナリングは、一般的に、①刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇 (amplitude) が大きくなるか、②間歇的な Ca²⁺振動の頻度 (frequency) が増加することで活性化されると考えられている。CaMKII が自身の活性化のために大きな amplitude を必要とするのに対し、NFAT は amplitude が小さくても Ca²⁺振動の頻度増加を自身の活性とし

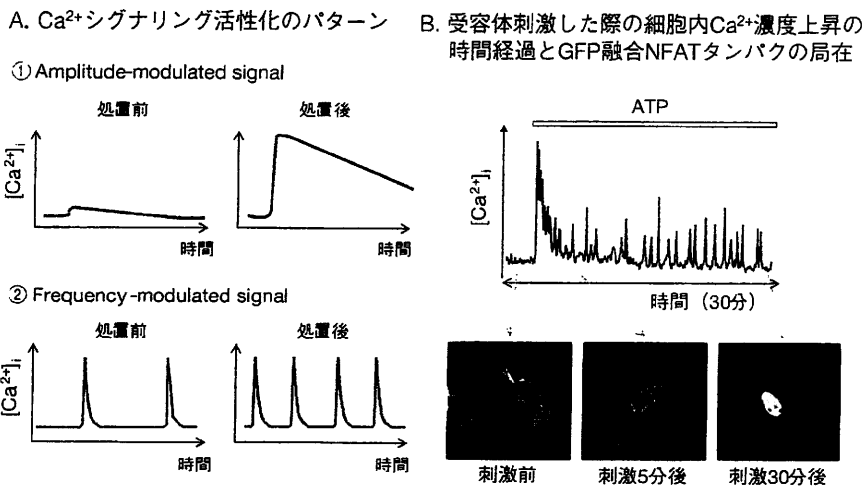


図3 心筋細胞の受容体刺激により活性化されるCa²⁺シグナリングの解析方法

て検出することができる。我々は、アゴニスト刺激により持続的に生じる間歇的なCa²⁺濃度上昇(Ca²⁺振動)とNFAT活性化を測定することで、心肥大形成に関わるCa²⁺シグナリング活性化の機序解析を行った。

3. 心筋細胞のTRPCチャンネル

心臓の興奮収縮活動は、電位依存性L型Ca²⁺チャンネルやリアノジン受容体チャンネルを通過するCa²⁺によって引き起こされる。しかし、これらのCa²⁺透過チャンネルが心肥大シグナルの活性化にも貢献しているとは考えにくい。そこで、有力な候補として最近注目を集めているのがtransient receptor potential (TRP)チャンネルである(4)。このうち、TRPCファミリーは、イノシトール代謝回転と関連した受容体を刺激することによって活性化される「受容体作動性カチオンチャンネル(RACC)」の分子実体であると考えられている。動物のTRPCチャンネルは7種類(TRPC1-TRPC7)存在している。TRPC3, TRPC6, TRPC7はジアシルグリセロール(DAG)によって直接活性化されるというユニークな特徴をもつ。特に、TRPC6チャンネルは機械的伸展刺激によりDAGによる活性化が増強されることが最近明らかにされている(井上らの頁参照)。ラットの心筋細胞にはTRPC2以外の全てのチャンネルが発現しているものの、各々のチャンネルの生理的役割についてはまだ明らかではない。

4. 心肥大を誘導するDAG感受性TRPCチャンネル

非興奮性細胞におけるNFAT活性化や生理機能の

発現は、主にイノシトール-1, 4, 5-三リン酸(IP₃)受容体を介したCa²⁺放出によって制御されることが良く知られている。しかし、心室筋細胞におけるIP₃受容体の発現量がリアノジン受容体の発現量の約1/100程度であることや(5)、実際の細胞の興奮によって生じる周期的なCa²⁺スパイクはリアノジン受容体を介したCa²⁺放出(Ca²⁺-induced Ca²⁺ release: CICR)によるものであることから、心筋のIP₃受容体が非興奮性細胞と同じような役割を担うとは考えにくい。我々は、ホスホリパーゼ-C (PLC)活性化によりIP₃とともに生成されるDAGがAng II刺激によるNFAT活性化に重要であることを見出した(6)。このメカニズムには、TRPC3/TRPC6を介した陽イオン流入による膜電位のシフト(脱分極)とそれに伴う心筋細胞の自動発火頻度の増加(すなわち電位依存性Ca²⁺チャンネルの活性化を介したCa²⁺流入量の増加)が関与していた。さらに、心筋細胞にTRPC3またはTRPC6に対するsiRNAを処置することで、Ang II刺激により誘発される肥大応答がほぼ完全に抑制された。

TRPCチャンネルの下流で働く電位依存性Ca²⁺チャンネルの実体については、まだ明確にできていない。しかし最近、T型Ca²⁺チャンネルの遺伝子欠損マウスが圧負荷で誘発される心肥大を抑制することが報告された(7)。我々も、Ang II刺激で誘発される持続的なCa²⁺スパイクとNFATの活性化がL型Ca²⁺チャンネル阻害薬(ニトレンジピン)のみならずT型Ca²⁺チャンネル阻害薬(ミベフラジル)でも抑制されることを最近見出ししている。ニトレンジピンはT型Ca²⁺チャンネルも抑制しうることから(8)、ラット新生児の心筋細胞においてもT型Ca²⁺チャンネルがNFAT活性化や心肥大

を誘導する Ca^{2+} 流入経路として働いているのかもしれない。

5. TRPC チャンネル発現増加と心不全

圧負荷や虚血によって生じるイオンチャンネルの量的・質的变化(リモデリング)もまた不整脈や心機能低下を引き起こす原因になると考えられている。TRPC チャンネルもまた、肥大大心や不全心で発現量が増加することが明らかにされている。例えば、Kuwaharaらは、マウスへの圧負荷処置や心不全患者でTRPC6の発現が増加していることを見出している(9)。さらに、TRPC6の発現増加と肥大大マーカー分子(ANP)の発現上昇とが相関することから、TRPC6が単に心肥大を仲介しているだけでなく、心疾患時に見られた発現上昇がポジティブフィードバック的に働いている可能性もあると指摘している。Bushらは、ラットへの圧負荷処置でTRPC3の発現が増加すること、また β アドレナリン受容体を刺激してもTRPC3の発現が増加することを示した(10)。さらに、恒常的活性型のカルシニューリンを発現させたマウスでもTRPC3の発現が増加していることを示した。一方、ヒトの心不全末期の患者では、Kuwaharaらが報告したTRPC6ではなくTRPC5の発現上昇がみられたと報告している。Ohbaらはラット腹部大動脈の狭窄による圧負荷をかけた際に、TRPC1の発現が増加することを示している(11)。このように、動物種や実験モデルによって発現誘導されるTRPCサブタイプに違いはあるものの、TRPCチャンネルを介したシグナリングが

心肥大の発症・進展に関与するという点では一致した見解が得られている。

我々は、ラット心筋細胞および心線維芽細胞にAng II刺激やエンドセリン(ET)-1刺激を行うことでTRPC6の発現量が増加することを見出した(12)。このメカニズムには、 G_{12} ファミリー($G_{12/13}$)タンパク質を介したc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)およびAP-1転写活性の増加が関与していた。心筋細胞の $G_{12/13}$ タンパク質の α サブユニット($G_{\alpha_{12/13}}$)の機能を阻害しておくこと、Ang IIやET-1刺激により誘発される心肥大応答が抑制される(13, 14)。従って、Ang IIやET-1刺激は、 G_q タンパク質を介してTRPC3/TRPC6チャンネルを活性化するとともに、 $G_{12/13}$ タンパク質を介してTRPC6の発現量を増加させ、協調的に Ca^{2+} -NFATシグナリングを活性化している可能性が考えられる(図4)。

6. 受容体-TRPCチャンネルタンパクの複合体形成と心肥大

G_q タンパク質と共役する全ての受容体が心肥大を誘発するわけではない。例えば、ATPやカルバコール刺激では、 IP_3 が産生され、extracellular signal-regulated kinase (ERK)が活性化されるにも関わらず、心肥大応答は引き起こされない(15)。心筋細胞にATP刺激を行うと、刺激直後からbasal Ca^{2+} 濃度の上昇を伴った強い Ca^{2+} 振動が引き起こされ、30分後には消失した。これに比べ、Ang II刺激やET-1刺激では、刺激した5-10分後から強い Ca^{2+} 振動が起ころはじめ、その Ca^{2+} 振動は30分から1時間後も持続していた。すなわち、ATP刺激による Ca^{2+} 応答はAng IIやET-1刺激のそれと比べて持続しないことがわかった。そこで免疫沈降を行ったところ、AT₁受容体、ET_A受容体はTRPC6と共沈するのに対し、P2Y₂受容体はTRPC6と共沈しないことが明らかとなった。これらの結果は、 G_q タンパク質共役型受容体とTRPC3/TRPC6チャンネルとの複合体形成が、 G_q タンパク質を介した心肥大応答に重要であることを示唆している。

7. TRPCチャンネルを標的とした心不全治療の可能性

心筋にTRPCチャンネルを過剰発現させると心肥大が誘発されることは示されているものの、TRPCチャンネルの機能阻害が実際に病的な心肥大を抑制するかどうかについてはまだ報告されていない。ただ、細胞レベルでは、2-APB、SK&F96365、BTP2などのTRPCチャンネル阻害作用をもつ化合物が心肥大を軽減させるこ

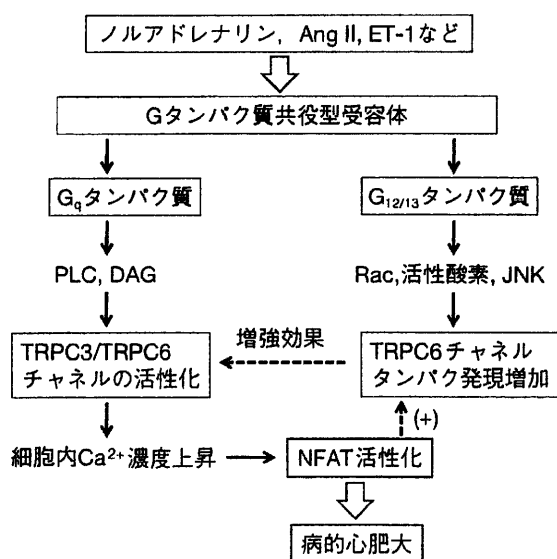


図4 Gタンパク質を介した心肥大応答におけるTRPCチャンネルの役割(ラット新生児心筋細胞の場合)

とがすでに報告されている(10, 16). 電位非依存性の TRPC チャンネルは、いわゆる電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルとは役割が異なるため、心臓の興奮収縮活動に直接関わってこない。すなわち、TRPC チャンネル選択的阻害薬は心機能を低下させずに心肥大を抑制することが期待できる。しかしその一方で、TRPC チャンネルが心臓以外の多くの組織に発現していることや、細胞の恒常性維持に関わっていることも明らかにされており、普通のノックアウトマウスでの解析は困難が予想される。

そこで我々は、京都大学・森研究室との共同研究により、*in vivo* の心肥大に対する TRPC3 選択的阻害薬 (Ethyl-1-(4-(2, 3, 3-trichloroacrylamide) phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (Pyr3)) の効果を調べた。Pyr3 は、ラット心筋細胞において、Ang II 刺激や機械的伸展刺激による NFAT 活性化や心肥大応答を濃度依存的に抑制した。そこで、血圧・心拍数に影響を与えない用量の Pyr3 をマウスに投与したところ、vehicle 投与マウスと比べて、大動脈狭窄による圧負荷で誘発される心肥大 (心重量の増大と心筋細胞面積の増加) や心不全マーカー遺伝子の発現増加が有意に抑制されていた(17)。また、6 週間の圧負荷によって生じる心収縮機能の低下が、Pyr3 投与によって有意に改善されることも明らかとなった。この研究は、TRPC チャンネルを阻害する化合物が治療薬になりうることを個体レベルで証明した最初の知見である。

Pyr3 以外だけでなく、ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬による DAG 感受性 TRPC チャンネルの抑制効果にも着目している。DAG 感受性 TRPC チャンネルタンパク質は、プロテインキナーゼ G やプロテインキナーゼ C によってリン酸化を受けることでチャンネル活性が抑制される(18)。すなわち、ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬や心房性ナトリウム利尿ペプチドなどは、リン酸化依存的に TRPC3 や TRPC6 チャンネル活性を抑制すると考えられる。実際、我々は、PDE-V 阻害薬を心筋細胞に処置すると TRPC6 のリン酸化が増加することを見出している。この結果は、TRPC6 チャンネルの抑制が心肥大に効果を示す可能性を示している。最近、シルデナフィル (バイアグラ®) の心肥大抑制効果について個体レベルでの報告がなされ、PDE-V 阻害薬の臨床応用への期待が高まってきた(19)。

さらに我々は、 $G\alpha_{12/13}$ タンパク質の α サブユニットが圧負荷による心臓の線維化 (コラーゲンの蓄積) 誘導に関わることを最近報告した(20)。線維化は心臓の弛緩機能を悪化させることから、拡張不全の原因として注目されている。線維化と TRPC チャンネルとの関連については全くわかっていない。今後、心臓の $G\alpha_{12/13}$ タンパク質を介した TRPC チャンネル発現増加の意義を明らかにしていくことで新たな展開が見つかるかもしれない。

8. おわりに

NFAT 活性を指標にして心肥大形成に関わる Ca^{2+} シグナル解析を行った結果、DAG 感受性 TRPC チャンネル (TRPC3/TRPC6) という新しい分子を見出すことができた。TRPC チャンネルと心肥大との関連が示されつつある中、我々は TRPC チャンネルが心不全治療薬の新たな標的分子となりうる可能性を個体レベルで証明するところまでようやく辿り着いた。心臓の TRP チャンネル研究はまだ始まったばかりであり、今後は、TRPC チャンネルの生理的役割 (特に興奮収縮活動における役割) についても明らかにしていかなければならない。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力を賜りました。福岡大学医学部・井上隆司先生、京都大学工学部・森泰生先生、清中茂樹先生、ならびに九州大学医学部・井手友美先生に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Molkenin JD, et al. *Cell*. 1998;93:215-228.
- 2) Zhang CL, et al. *Cell*. 2002;110:479-488.
- 3) Passier R, et al. *J Clin Invest*. 2000;105:1395-1406.
- 4) Nishida M, et al. *Microcirculation*. 2006;13:535-550.
- 5) Moschella MC, et al. *J Cell Biol*. 1993;120:1137-1146.
- 6) Onohara N, et al. *EMBO J*. 2006;25:5305-5316.
- 7) Chiang C-S, et al. *Circ Res*. 2009;104:522-530.
- 8) Perez-Reyes E, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:621-627.
- 9) Kuwahara K, et al. *J Clin Invest*. 2006;116:3114-3126.
- 10) Bush EW, et al. *J Biol Chem*. 2006;281:33487-33496.
- 11) Ohba T, et al. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:498-507.
- 12) Nishida M, et al. *J Biol Chem*. 2007;282:23117-23128.
- 13) Arai K, et al. *Mol Pharm*. 2003;63:478-488.
- 14) Nishida M, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:18434-18441.
- 15) Post GR, et al. *J Biol Chem*. 1996;271:8452-8457.
- 16) Hunton DL, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:14266-14273.
- 17) Kiyonaka S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5400-5405.
- 18) Yao X. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;179:527-540.
- 19) Lewis GD, et al. *Circulation*. 2007;115:59-66.
- 20) Nishida M, et al. *EMBO J*. 2008;27:3104-3115.

著者プロフィール

西田 基宏 (にしだ もとひろ)

九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野, 准教授, 博士 (薬学)

◇2001年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了 (長尾拓教授)。その後, 岡崎生理学研究所 統合バイオサイエンスセンター・助手 (森泰生教授), 九州大学大学院薬学研究院・講師 (黒瀬等教授) を経て現職に至る。'06年科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞など受賞。◇研究テーマ 心不全発症を担う細胞内シグナル伝達経路の解析
◇趣味 妻の機嫌取り (掃除, 子連れ散歩など), 熱血本 (漫画含) の読書。



佐藤 陽治 (さとう ようじ)

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部, 室長 (細胞治療薬担当), 博士 (薬学)

◇1995年に東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了 (長尾拓教授) 後, 米国シンシナティ大学医学部・ポスドク (E.G. Kranias 教授), '98年に国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部・研究員, '02年に新設の遺伝子細胞医薬部・主任研究官を経て'04年より現職。◇研究テーマ 幹細胞・体細胞の情報伝達系, 再生医療・細胞治療の安全性評価。
◇趣味 登山。



仲矢 道雄 (なかや みちお)

九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野, 助教, 博士 (医学)

◇2000年東京大学理学部生物化学科卒業, '02年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了 (深田吉孝教授) '06年大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学専攻博士課程修了 (長田重一教授)。その後, 科学技術振興機構・博士研究員 (研究代表 長田重一教授) を経て'07年7月から現職。◇研究テーマ 心臓の病態形成に關与する細胞内シグナル伝達経路の解析 ◇趣味 散歩。



黒瀬 等 (くろせ ひとし)

九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野, 教授, 博士 (薬学)

◇1985年北海道大学薬学系研究科博士課程修了 (宇井理生教授)。その後, 学術振興会奨励研究員, 特別研究員, 東京大学薬学部教務職員 (宇井理生教授), 米国デューク大学ポスドク (Dr R.J. Lefkowitz 研究室), 東京大学薬学部助手 (長尾拓教授), 助教授 (長尾拓教授) を経て'02年九州大学大学院薬学研究院・教授, 現在に至る。◇研究テーマ 心疾患の受容体-Gタンパク質シグナリングからの解析 ◇趣味 読書と映画鑑賞。



表 題

著 者 名

週 刊
医学のあゆみ 別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

ヒト細胞・組織加工医薬品などの安全性確保

Safety of human cellular and tissue-based products



佐藤 陽治

Yoji SATO

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

◎再生医療や細胞治療のツールとして使用することを目的に、細胞または組織を加工した製品を“細胞・組織加工医薬品/医療機器”(細胞組織製品)という。わが国では先ごろ、初の細胞組織製品として重症熱傷治療用培養皮膚製品が薬事法上の承認を受け、また世界に先がけてわが国で開発されたヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)も再生医療・細胞治療への応用に熱い期待が集まっており、国内外で細胞組織製品の熾烈な開発競争が繰り広げられている。しかし、細胞組織製品の本格的な実用化・産業化に至るためには、その安全性評価方法の理解・確立が必須である。本稿ではヒト細胞組織製品の安全性の評価・確保について、最近の厚生労働省の関連指針を軸に概説する。



Key word

細胞・組織加工医薬品、細胞・組織加工医療機器、確認申請、品質管理、ヒト幹細胞臨床研究指針

再生医療(患者の組織の再生・修繕または置換を目的とする治療)および細胞治療(加工した細胞を患者の生理的機能の修復・修正または調節を目的として使用する治療)に使用するために、細胞あるいは組織を加工した製品を“細胞・組織加工医薬品”または“細胞・組織加工医療機器”という。本稿では、これらをまとめて“細胞組織製品”とよぶ。わが国では平成19年(2007)に重症熱傷治療用培養皮膚製品が、国内初の細胞組織製品として薬事法上の承認を受けた。近い将来にはさらに多くの細胞組織製品が実用化されると見込まれている。

しかし、本格的な細胞組織製品の実用化・産業化を達成するためには、検討すべき課題はまだ多い。なかでも重要な課題は、細胞組織製品の安全性をどう確保したらよいのか、ということである。本稿ではヒト細胞組織製品の安全性の評価・確保のポイントについて、厚生労働省の関連指針を軸に解説する。

ヒト細胞組織製品の品質・安全性ガイドライン

わが国でのヒト細胞組織製品の開発の多くは医師の裁量による臨床研究(あくまで研究が主目的)として行われてきたが、商品化をめざした活動としてのヒト細胞組織製品の開発も近年盛んに行われている。逆に、ヒト細胞組織製品の品質・安全性ガイドラインに関しては商品としてのヒト細胞組織製品に対するものが先行しており、大学などの研究機関での臨床研究を対象にした『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針』(以下“ヒト幹細胞臨床研究指針”, 厚生労働省, 平成18年)においても、臨床研究で用いられるヒト細胞組織製品の品質・安全性に関しては商品としてのヒト細胞組織製品に対する品質・安全性ガイドラインを準用する形となっている。

商品としてのヒト細胞組織製品の製造・販売には薬事法に基づく承認が必要となる。使用目的による分類からすれば、“医薬品”あるいは“医療機器”のいずれかに分類されることになるが、どちらに分類されるかによって安全性確保の基準に自動的に差が出るわけではない。いずれにせよ細胞

組織製品は取扱い方法の分類からすれば“特定生物由来製品”とみなされる可能性が高いと想定され、そうなれば保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講じる必要がある。とくに細胞組織製品は臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、リスク予測が難しいため、わが国では治験でヒトに使用する前に製品の安全性と品質の“確認”を厚生労働大臣に求めなければならない(医薬発 906 号通知, 平成 11 年)。この手続きは“確認申請”とよばれている。つまり開発者は新規細胞組織製品について治験実施に適用だけの安全性と品質をあらかじめ示さなければならない。

現在わが国には、細胞組織製品の品質・安全性確保についての主幹となるガイドラインとして、①『細胞組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方』(以下、“基本的考え方”; 医薬発 1314 号通知別添 1, 平成 12 年)、②『ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針』(以下“ヒト自己指針”, 薬食発第 0208003 号, 平成 20 年)、および③『ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針』(以下“ヒト同種指針”, 薬食発第 0912007 号, 平成 20 年)が出されている。②および③は“医薬発 1314 号通知別添 2”(平成 12 年)の改訂版として位置づけされている。なお、これらの指針は輸血用血液製剤、移植医療としての骨髄移植、臍帯血移植、ヒト皮膚や骨などを直接利用する医療行為を対象としていない点で欧米の指針とは異なるので、注意を要する。

上記“基本的考え方”は、細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞組織製品の品質・安全性、ならびに細胞・組織の取扱いに関する科学的および倫理的妥当性を確保することを目的とし、細胞組織製品の承認後のみならず、治験時においても適用される。“基本的考え方”のなかで細胞組織製品の安全性に関してもっとも強調されているのは、細菌、真菌、ウイルスなどの汚染の危険性への対策である。

“ヒト自己指針”および“ヒト同種指針”はそれぞれ、ヒト(自己)由来およびヒト(同種)由来の細胞組織製品の品質および安全性の確保のための基

本的な技術要件についてまとめたもので、製造販売承認申請時のみならず、治験開始前の確認申請で求められる資料について記されている。ヒト(自己)由来製品とヒト(同種)由来製品との間の根本的な差異は、自己由来の細胞・組織を用いる場合にはその細胞・組織を介する感染症伝播のリスクおよび免疫学的な問題が理論上ないことである。しかし、自己由来であっても製造工程におけるクロスコンタミネーションの問題や製造従事者、医療従事者などの安全上の問題は、同種由来の場合と同様に存在する。また、培養工程においてウイルスの増殖するリスクを考慮することが必要な場合もある。さらに自己由来の場合、個別製品の製造となるので、それらの品質のばらつきを最小限にとどめる工夫が必要な反面、製品レベルでの各種試験の実施に試験検体の量的制約がある。それらに留意した合理的な品質確保の方策(製造工程のより厳密な恒常性維持・管理など)を採用する必要がある。なお、自己由来であっても遺伝子改変細胞の場合には相応の留意が必要である。

● “ヒト自己指針” および “ヒト同種指針” の安全性確保策

“ヒト自己指針”および“ヒト同種指針”のコンセプトとして細胞組織製品の品質・安全性確保の方針は、原材料となる細胞・組織の適格性をはじめ、原材料の品質管理・培養方法を含めた製造方法の恒常性の確保、工程評価を含めた妥当性の検証、中間製品の品質管理、最終製品の規格設定および品質管理によって担保することになっている。しかし、細胞組織製品の原料となる細胞・組織は複雑な構造と、“生きている”という動的な特性をもつため、従来の医薬品などに適用されてきた品質管理の必要事項がかならずしも適用できるとは限らない。したがって、細胞組織製品の安全性に関しては特別な配慮が必要となってくる。

1. 感染因子

原材料から最終製品までの製造工程を通じ、安全性に関してもっとも強調されているのは、感染因子の汚染の危険性への対策である。細胞組織製品では、従来の医薬品のような高度な精製やウイルスの不活化・除去を製造時に行うことは非常に

難しい。このため、原材料および製造工程での感染因子の混入をいかに防ぐかが課題となる。

ヒト同種由来製品の場合はドナーからの感染リスクの評価が最重要であり、各種感染症に対する試験や既往歴に関する問診・調査を人念に行う必要がある。ウイルス感染の初期には検査で検出不可可能なウィンドウ期があることから、適切な時期に再検査することが推奨される。また、製造工程でのウイルス増殖リスクがある場合にも製造工程中の適切な段階で再検査が必要となる場合がある。ヒト自己由来製品の場合、製造時のクロスコンタミネーションや製造従事者らへの伝播の可能性について、とくに B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスおよび成人 T 細胞白血病ウイルス感染には留意する。

2. 最終製品の品質管理

最終製品の品質管理では必要で適切な規格および試験方法を設定し、その根拠を明らかにする必要がある。“ヒト自己指針”および“ヒト同種指針”では一般的な品質管理項目および試験として、①細胞数・生存率、②確認試験、③細胞の純度試験、④細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験、⑤製造工程由来不純物試験、⑥無菌試験およびマイコプラズマ否定試験、⑦エンドトキシン試験、⑧ウイルス試験、⑨効能試験、⑩力価試験、⑪力学的適合性試験が例示されている。また、最終製品および重要な中間製品については細胞の生存率・力価などに基づく安定性試験を実施し、適切な貯法や有効期限を設定することが求められる。

3. 非臨床安全性試験

製品の特性および適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能であれば、科学的合理性のある範囲で、適切な動物を用いた試験または *in vitro* での試験を実施する。なお、非細胞・組織成分および製造工程由来の不純物などについては可能なかぎり、動物を用いた試験ではなく理化学的分析法による評価が求められている。ヒト由来の試験用検体は貴重であり、また、ヒト由来の製品を実験動物などで試験してかならずしも意義ある結果が得られるとは限らない。逆に、動物由来の製品モデルを作成し、適切な実験動物に適用する試験系により試験を行うこ

とで、より有用な知見が得られると考えられるような場合には、むしろ、そのような試験系を用いることに科学的合理性がある場合がある。場合によっては細胞を用いる試験系も考慮し、このようなアプローチにより試験を行った際には、その試験系の妥当性について明らかにする必要がある。

ヒト細胞組織製品の安全性において感染症伝播とともに懸念されることとして、製品の造腫瘍性があげられるが、最終製品ごとの造腫瘍性試験を一律に課すのは合理的ではない。たとえば、自己由来細胞でも文献上の知見や類似品の使用経験などから造腫瘍性が考えにくいものについては、規格の培養期間を超えて培養した細胞について目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすることでよい場合もあると考えられる。一方、多分化能を有する幹細胞は体細胞と比較して腫瘍化の可能性が高いとも思われるので、それに配慮した試験を計画する必要があると考えられる。

4. 効力または性能を裏づける試験

現在の科学で技術的に可能かつ科学的合理性のある範囲で、実験動物または細胞などを用い、適切に設計された試験により、細胞・組織加工医薬品などの機能発現、作用持続性および医薬品・医療機器として期待される効果を検討することが求められる。ただし確認申請段階では、当該製品の効力または性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに優れて期待できることが国内外の文献または知見などにより合理的に明らかにされれば、かならずしも詳細な実験的検討は必要とされない。

5. 体内動態

製品を構成する細胞・組織および導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能かつ科学的合理性がある範囲で、実験動物での吸収および分布などの体内動態に関する試験などにより、患者などに適用された製品中の細胞・組織の生存期間、効果持続期間を推測し、目的とする効果が十分得られることを明らかにする。当該細胞・組織が特定の部位(組織など)に到達して作用する場合には、その局在性を明らかにする。

6. 臨床試験

確認申請の段階における安全性については、臨

床上の有用性を勘案して評価されるものである。細胞組織製品について予定されている国内の治験計画について、①対象疾患、②対象とする被験者および被験者から除外すべき患者の考え方、③細胞組織製品の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容、④既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性、⑤現在得られている情報から想定されるリスクおよびベネフィットを含め、被験者への説明事項の案、を踏まえて評価する。

なお、臨床試験は適切な試験デザインおよびエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患および適用方法などを踏まえて適切に計画する。

おわりに

安全な再生医療・細胞治療に国民が広くアクセスできるためには、これらの治療法のメインツールであるヒト細胞組織製品が治験を通じて薬事法上の承認を得ることが望ましい。大学などで実施

される臨床研究は医師法下の医療行為の一環であり、薬事法の規制対象ではなく、そこで用いられるヒト細胞組織製品の品質・安全性には実施施設によるばらつきが出てしまうことがこれまで懸念されていた。前述の“ヒト幹細胞臨床研究指針”では、研究に用いるヒト細胞組織製品について商品化をめざした製品の治験に準じる品質管理を求めており、今後は臨床研究で用いられる製品でも一定の品質・安全性が確保されていくと予想される。

ただし現状では、ヒト細胞組織製品の臨床研究のデータが医薬品などの申請資料として利用できずに改めてデータを取得し直すケースがまだ多く、細胞組織製品の実用化のうえでの大きな時間的・経済的な障害として問題となっている。この問題を解決し、臨床研究の段階から将来の医薬品としての開発を見越したうえでのデータの蓄積を行えるような、シームレスな体制を確立することが今後の課題となると考えられる。

* * *

The Journal of Immunology

This information is current as
of July 4, 2010

**Importance of Neonatal FcR in
Regulating the Serum Half-Life of
Therapeutic Proteins Containing the
Fc Domain of Human IgG1: A
Comparative Study of the Affinity of
Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion
Proteins to Human Neonatal FcR**

Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu
Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi
and Teruhide Yamaguchi

J. Immunol. 2010;184;1968-1976; originally published
online Jan 18, 2010;
doi:10.4049/jimmunol.0903296
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/184/4/1968>

References

This article cites **41** articles, 13 of which can be accessed free
at: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/184/4/1968#BIBL>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is
online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign
up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc., 9650
Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright ©2010 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR

Takuo Suzuki,* Akiko Ishii-Watabe,* Minoru Tada,* Tetsu Kobayashi,* Toshie Kanayasu-Toyoda,* Toru Kawanishi,[†] and Teruhide Yamaguchi*

The neonatal FcR (FcRn) binds to the Fc domain of IgG at acidic pH in the endosome and protects IgG from degradation, thereby contributing to the long serum half-life of IgG. To date, more than 20 mAb products and 5 Fc-fusion protein products have received marketing authorization approval in the United States, the European Union, or Japan. Many of these therapeutic proteins have the Fc domain of human IgG1; however, the serum half-lives differ in each protein. To elucidate the role of FcRn in the pharmacokinetics of Fc domain-containing therapeutic proteins, we evaluated the affinity of the clinically used human, humanized, chimeric, or mouse mAbs and Fc-fusion proteins to recombinant human FcRn by surface plasmon resonance analysis. The affinities of these therapeutic proteins to FcRn were found to be closely correlated with the serum half-lives reported from clinical studies, suggesting the important role of FcRn in regulating their serum half-lives. The relatively short serum half-life of Fc-fusion proteins was thought to arise from the low affinity to FcRn. The existence of some mAbs having high affinity to FcRn and a short serum half-life, however, suggested the involvement of other critical factor(s) in determining the serum half-life of such Abs. We further investigated the reason for the relatively low affinity of Fc-fusion proteins to FcRn and suggested the possibility that the receptor domain of Fc-fusion protein influences the structural environment of the FcRn binding region but not of the FcγRI binding region of the Fc domain. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 1968–1976.

In healthy humans, IgG1 exhibits a long serum half-life of ~21 d (1). This prolonged half-life of IgG can be explained by the interaction with neonatal FcR (FcRn). FcRn is a heterodimer of the MHC class I-like H chain and the β_2 -microglobulin (β_2m) L chain (2). Although this receptor was originally studied as a transporter of IgG from mother to fetus, subsequent studies have shown that this receptor also plays a critical role in regulating IgG homeostasis (3, 4). FcRn binds to the Fc domain of IgG at pH 6.0–6.5 but not, or weakly, at pH 7.0–7.5 (5). Therefore, FcRn protects IgG from degradation by binding to IgG in endosome and releases IgG into plasma (6). As indicated by previous studies in which amino acid substitutions in the Fc domain of IgG for modifying the affinity to FcRn can alter the serum half-life of the IgG, the affinity to FcRn is thought to play a critical role in determining the serum half-life of IgG (7–12).

Recently, therapeutic use of mAb products has become more important for various diseases, including cancer as well as auto-immune and infectious diseases (6, 13, 14). In addition to the mAbs, the Fc-fusion proteins (e.g., etanercept, alefacept, and abatacept) have been developed and have received considerable attention. These Fc-fusion proteins consist of an extracellular domain of membrane receptor linked to the Fc portion of human IgG1. They work like Abs by binding to ligands for the receptors. The receptor portions of etanercept and alefacept are, respectively, the extracellular ligand-binding portion of the human 75-kDa TNFR and the extracellular CD2-binding portion of the human leukocyte function Ag 3. Abatacept consists of the extracellular domain of human CTLA-4 linked to the modified Fc portion of human IgG1.

Most of the mAb products and Fc-fusion protein products have the Fc domain of human IgG1 (6, 14). Accumulating evidence regarding their clinical use has revealed that their serum half-lives are variable, ranging from 4 to 23 d, regardless of the presence of the Fc domain of human IgG1 (6). Although many factors such as m.w., posttranslational modifications including glycosylation, electrical properties, interactions with FcRs or target molecules, and features of the target molecules may influence their serum half-life, the reasons for the variability of half-life have not been elucidated. Among such factors, FcRn might play a critical role in regulating half-life; however, comparative studies between the affinities of these therapeutic proteins to FcRn and their half-lives in humans have not been reported. Therefore, although some Fc domain-containing therapeutic proteins exhibit shorter half-lives in humans, it remains unclear whether the shorter half-lives are due to the lower affinity to FcRn or other factors.

*Division of Biological Chemistry and Biologicals and [†]Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Received for publication October 8, 2009. Accepted for publication December 16, 2009.

This work was supported in part by Grant-in-Aid for Young Scientists 21790172 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and Grants-in-Aid for Scientific Research 18590163 and 20590167 from Japan Society for the Promotion of Science.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Akiko Ishii-Watabe, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail address: watabe@nihs.go.jp

Abbreviations used in this paper: β_2m , β_2 -microglobulin; FcRn, neonatal FcR; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ND, not detected; R^2 , coefficient of determination; SPR, surface plasmon resonance.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0903296

In this study, we examined the affinity of clinically used mAbs and Fc-fusion proteins to recombinant human FcRn by surface plasmon resonance (SPR) analysis. The analytes used were human Ab (adalimumab), humanized Abs (daclizumab, omalizumab, palivizumab, and trastuzumab), chimeric Abs (infliximab and rituximab), mouse Ab (muromonab-CD3), and Fc-fusion proteins (etanercept, alefacept, and abatacept). We found that the affinities of the therapeutic proteins tested to FcRn were closely correlated with their serum half-lives, with a few exceptions. Because Fc-fusion proteins, which have relatively short half-lives (4–13 d), were shown to have lower affinity to FcRn than mAbs, we further investigated the reason for this difference by examining the affinity of the proteins to Fc γ RI or the affinity of papain-digested proteins to FcRn in SPR analyses. Our results suggested the possibility that the receptor portions of Fc-fusion proteins make a difference in the higher-order structure of the FcRn-binding region of Fc (i.e., CH2-CH3 interface) or interfere with binding between the Fc domain and FcRn by steric hindrance.

Materials and Methods

Therapeutic proteins and reagents

Abatacept (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), adalimumab (Abbott, Baar, Switzerland), alefacept (Biogen Idec, Cambridge, MA), daclizumab (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), etanercept (Takeda Pharmaceutical, Osaka, Japan), infliximab (Tanabe Pharmaceutical, Osaka, Japan), muromonab-CD-3 (Jansen Pharmaceutical, Tokyo, Japan), omalizumab (Novartis Pharma Schweiz, Bern, Switzerland), palivizumab (Abbott Japan, Osaka, Japan), rituximab (Zenyaku Kogyo, Tokyo, Japan), and trastuzumab (Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan) were purchased via reagent distributors. Recombinant human TNF- α was purchased from Wako (Osaka, Japan).

Purification of human FcRn

Stably transfected CHO cells expressing both the soluble portion of the hFcRn H chain (residues 1–267 of mature protein) and β_2m were provided by P. J. Bjorkman (California Institute of Technology, Pasadena, CA). Expression and purification of hFcRn were performed according to the method previously reported by West and Bjorkman (15), with slight modifications. Briefly, the CHO cells expressing soluble hFcRn and β_2m were cultured in α -MEM containing 5% dialyzed FBS, 100 μ M methionine sulfoximine, and penicillin/streptomycin. Cell culture supernatant was collected every 2–3 d and was filtered with a 0.45- μ m filter, and sodium azide was then added to 0.05%. The harvested supernatant was acidified to pH 5.8 and then applied to a human IgG column. After washing the column with 50 mM Bis-Tris (pH 5.8), hFcRn complexed with β_2m was eluted with 40 mM Bis-Tris/20 mM Tris (pH 8.1). The eluted fractions containing hFcRn were applied to a Uno-Q1 column, and hFcRn was eluted with pH gradient using 40 mM Bis-Tris/20 mM Tris (pH 8.1) and 40 mM Bis-Tris/20 mM Tris (pH 5.8).

SDS-PAGE and Western blotting

Each fraction of protein eluted from the Uno-Q1 column was diluted in 1 \times SDS loading buffer and was separated in 15% polyacrylamide gel (Bio craft, Tokyo, Japan). After the electrophoresis, the gels were stained with Imperial protein stain (Pierce, Rockford, IL). For Western blotting, proteins separated by SDS-PAGE were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA). The membranes were immunoreacted with rabbit anti-hFcRn H chain peptide (Leu¹³⁵-Gly¹⁴⁸) Ab produced by Medical and Biological Laboratories (Nagoya, Japan) and then with HRP-conjugated secondary Abs (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). The bands of hFcRn were detected using ECL Plus Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

SPR analyses

Analysis of affinity between FcRn and Fc domain-containing therapeutic proteins. The purified recombinant hFcRn was diluted with 10 mM sodium acetate (pH 5.0 or 4.5) and was immobilized onto a CM5 biosensor chip (Biacore, Uppsala, Sweden) using an amine coupling kit (Biacore) at relatively low densities (mainly 300–350 resonance units) to avoid mass transport limitation. The reference cell was treated with *N*-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and ethanol amine using an amine coupling kit without injecting the FcRn. Fc

domain-containing proteins were diluted with the running buffer (50 mM sodium phosphate/150 mM NaCl [pH 6.0]) and injected at 25°C. The running buffer was allowed to flow at a rate of 20 μ l/min. The injections were performed using the KINJECT mode (volume, 40 μ l; dissociation time, 150 s). For regeneration, the regeneration buffer (100 mM Tris/200 mM NaCl [pH 8.0]) was injected for 4 min. Kinetic constants were calculated from the sensorgrams using the bivalent analyte model of BIAevaluation software 4.1.

To obtain the consistent results, we would indicate two points. First, it is necessary to set the bulk refractive index to zero to avoid wrong fitting, because the binding is rapidly reached to the near-equilibrium state. Second, it is necessary to set the injection point correctly. For example, if the sensorgrams of infliximab shown in Fig. 2 were analyzed with the injection point shifted to 0.5 s earlier, the values of k_{a1} , k_{d1} , and K_D were 1.95E+05 M⁻¹s⁻¹, 0.136 s⁻¹, and 697 nM, respectively. When the injection points of the sensorgrams are unclear, it may be better to use the average values of data resulting from two or more different injection points.

Analysis of affinity between Fc γ RI and Fc domain-containing therapeutic proteins. Recombinant human Fc γ RI, which consists of human Fc γ RI (Gln¹⁶-Pro²⁸⁸) and His-tag, was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Fc domain-containing proteins were immobilized to a CM5 biosensor chip in 10 mM sodium acetate (pH 5.0) using an amine coupling kit. Kinetic analyses of Fc γ RI binding were performed according to Ellsworth et al. (16) with some modifications. The running buffer, HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% Surfactant P20 [pH 7.4]) (Biacore), was allowed to flow at 20 μ l/min. The injections of Fc γ RI were performed using the KINJECT mode (volume, 40 μ l; dissociation time, 150 s). To regenerate the immobilized proteins, the regeneration buffer (10 mM glycine-HCl [pH 1.8]) was injected for 15 s. Kinetic constants were derived from the sensorgrams using the 1:1 binding model of BIAevaluation software 4.1.

Papain digestion

The papain (Wako) was activated in the buffer (50 mM sodium phosphate/150 mM NaCl [pH 6.0], 1 mM cysteine, 4 mM EDTA, and 1 mg/ml papain) at 37°C for 15 min. Next, 1 mg/ml Ab or Fc-fusion protein was digested with 0.1 mg/ml activated papain in 50 mM sodium phosphate (pH 6.0), 150 mM NaCl, 0.1 mM cysteine, and 4 mM EDTA at 37°C for 24 h.

Results

Purification of soluble human FcRn

FcRn binds to the Fc domain at acidic pH and then releases it at neutral pH. Recombinant soluble hFcRn expressed from CHO cells was purified using a human IgG column by binding at pH 5.8 and releasing at pH 8.1. The fraction purified by the IgG column was electrophoresed at lane 10 of SDS-PAGE gel (Fig. 1B). This fraction was then purified using an anion-exchange column with a pH gradient elution. The elution diagram is shown in Fig. 1A. Three main peaks were observed. The proteins in these peaks were electrophoresed (Fig. 1B) and subjected to Western blot analysis using anti-hFcRn H chain peptide Ab (Fig. 1C). Several bands were observed at \sim 32 kDa in these fractions, and these bands were immunoreactive to anti-hFcRn H chain peptide Ab. These results indicated that the purified FcRn had several isoforms, possibly because of the difference in posttranslational modification, including glycosylation or proteolysis. As shown in Fig. 1C, the signals of the higher m.w. bands of hFcRn tend to be weak. There is a possibility that the sugar chain at Asn¹²⁵ of hFcRn interfered with the reactivity of the hFcRn to the anti-hFcRn H chain peptide Ab used. We analyzed the affinity of therapeutic mAbs and Fc fusion proteins to FcRn by SPR using the peak I, II, or III fractions eluted from the anion-exchange column. The K_D values were higher when peak I was used as a ligand in SPR analyses than when peaks II or III were used (data not shown). Because the m.w. of the proteins in peak I was smaller than that in peak II/III and the protein content of peak I varied depending on the lot of the cell culture supernatant, peak I seemed to consist of immature FcRn. The K_D values calculated from the experimental data using peaks II and III were comparable (data not shown). We, therefore, used the main peak (i.e., peak III) in the following experiments.

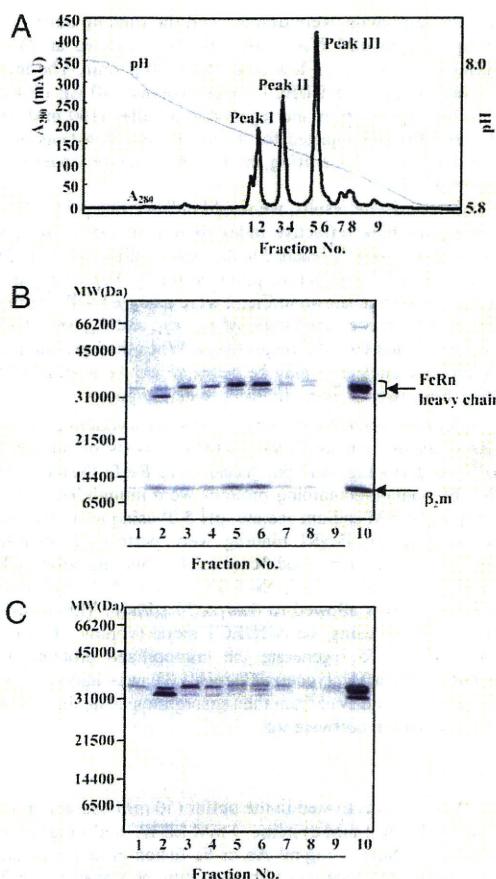
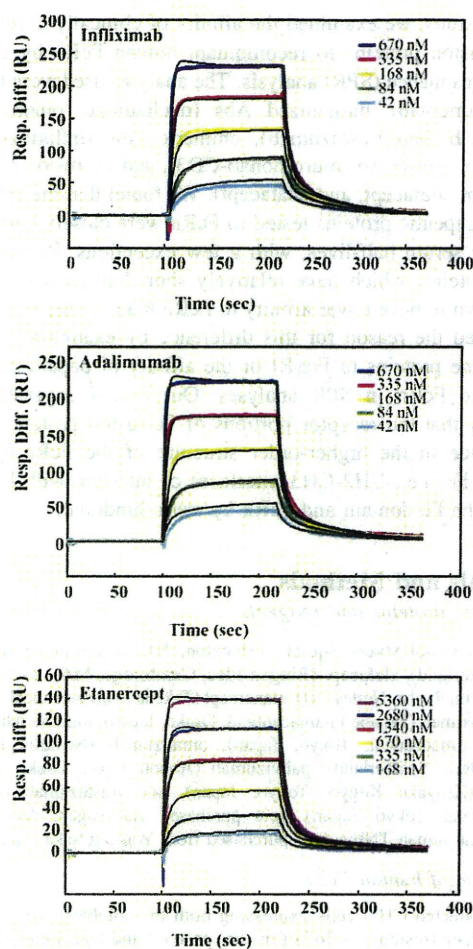


FIGURE 1. Purification and electrophoretic characterization of recombinant human FcRn. *A*, The elution diagram of the anion-exchange chromatography used for the purification of recombinant human FcRn. *B*, SDS-PAGE of the proteins in the fractions indicated in *A*. The protein applied to the anion-exchange column was electrophoresed in lane 10. The gel was stained with Imperial protein stain. *C*, Western blot analysis of eluate from the anion-exchange column by anti-hFcRn H chain Ab.

SPR analyses of the affinity between FcRn and Fc domain-containing proteins

Purified FcRn was immobilized onto a CM5 biosensor chip at relatively low densities as described in *Materials and Methods*. Five or six concentrations of Fc domain-containing therapeutic proteins were then injected. Because injection at higher concentrations caused nonspecific binding to flow cells, we analyzed the affinity of therapeutic proteins using sensorgrams obtained at the concentrations at which nonspecific binding was not observed. For example, infliximab was injected at concentrations of 670, 335, 168, 84, and 42 nM, and we analyzed the affinity to FcRn with the bivalent analyte model (Fig. 2). The colored lines were observed sensorgrams, and the black lines were fitting lines generated by the BIAevaluation software. The K_D value ($= k_{d1}/k_{a1}$) calculated from these sensorgrams was 727 nM. The affinities of adalimumab and etanercept to FcRn were 672 and 3612 nM, respectively (Fig. 2).

The affinities of the 11 kinds of Fc domain-containing proteins to FcRn were measured (Fig. 3). Adalimumab, daclizumab, infliximab, palivizumab, and rituximab were injected at concentrations of 42–670 nM. The concentrations of abatacept, alefacept, and etanercept used were 168–5360 nM, and those of muromonab-CD3, omalizumab, and trastuzumab were 84–1340 nM. Under this condition, the tested therapeutic proteins, except for muromonab-CD3, bound to FcRn. The K_D values measured in our experiments and the serum half-lives in humans reported in the literature are shown in Fig. 3A.



	Infliximab	Adalimumab	Etanercept
k_{a1} (1/Ms)	2.09E-05	2.41E+05	3.71E+04
k_{d1} (1/s)	0.152	0.162	0.134
k_{a2} (1/RUs)	4.56E-05	3.98E-05	3.27E-05
k_{d2} (1/s)	9.78E-03	8.80E-03	5.44E-03
Rmax (RU)	3.76E-02	3.47E+02	1.93E+02
Chi2	1.80E+01	1.74E+01	5.37E+00
$K_D = k_{d1}/k_{a1}$	727 nM	672 nM	3612 nM

FIGURE 2. Representative sensorgrams of SPR analyses. Infliximab (upper panel) or adalimumab (middle panel) was injected at concentrations of 42–670 nM and etanercept (lower panel) at concentrations of 168–5360 nM. The colored lines are the observed sensorgrams, and the black lines are fitting lines generated by the bivalent analyte model of BIAevaluation software. The association of KINJECT was started at ~ 100 s, and the dissociation of KINJECT was at ~ 220 s. The table describes the kinetic values calculated from the sensorgrams of infliximab, adalimumab, and etanercept.

The K_D values and the average values of the serum half-lives are plotted in Fig. 3B. The K_D values were closely correlated to the half-lives (contribution ratio = 0.8675) when the results were analyzed after excluding the data for infliximab, rituximab, and trastuzumab (Fig. 3C). Concerning infliximab, rituximab, and trastuzumab, which have relatively short half-lives and comparable affinity to other long half-life Abs to FcRn, other critical factor(s) seemed to be involved in regulating their half-lives (see *Discussion*). Although it was impossible to plot the data for mouse mAb muromonab-CD3,