

事例の解説

事例 1 (12月 2日・月曜日に提示)

医学生であるM君の母方のお祖母さんは、68歳になりますがこれまでとても元気で、毎日畑仕事をしたり、時には2kmほど離れたM君の家に自分で採った野菜を持って来てくれたりしていました。ところが、そのお祖母さんがこの頃、朝起きた後1時間くらい、両手がこわばって上手く握れないと言い始めました。また、両方の肩が痛くて、お鍋を棚に上げるのも大変だと言います。

近くの整形外科を受診し、2週間に一回シオゾールという薬を注射して貰ったところ、手のこわばりや肩の痛みが少し良くなってきたということで、3ヶ月ほどで治療は終わったと言われたそうです。

キーワード

- ☐ 68歳の女性
- ☐ これまでとても元気
- ☐ 朝のこわばり
- ☐ 手が握りにくい
- ☐ 両肩痛
- ☐ 鍋が持ち上げられない
- ☐ 整形外科を受診
- ☐ シオゾール
- ☐ 注射
- ☐ 症状の改善
- ☐ 治療終了

こんなことを考えてみよう

- ☐ 朝のこわばりで初発し、女性に多い病気とは？
- ☐ お祖母さんの手がこわばるのはどうしてだろう？
- ☐ 肩の痛みの原因は？
- ☐ シオゾールってどんな薬？
- ☐ どうして注射するのだろう？何故飲み薬じゃないの？
- ☐ お祖母さんの病気は完全に治ったのだろうか？

解説

今年のテュートリアルでは、関節リウマチを例に**抗体医薬**について考えて貰います。現在抗体医薬は、悪性腫瘍と炎症性疾患を中心に広い範囲のヒト疾患に適用され、腫瘍細胞そのものの機能性抗原分子や、病態発生に重要な鍵を握るサイトカイン或いはその受容体と直接相互作用を行うことで、劇的な治療効果を発揮するものが多くあります。抗体医薬について理解することは、抗体分子の構造と機能、特に可変部と定常部や相補性決定部位(CDRs)の意味、遺伝子再構成と体細胞高頻度突然変異による可変部の多様性形成機構、定常部の抗原性(異種抗原としての免疫グロブリン分子と、アロタイプ)、Fcレセプターへの結合と補体の活性化、モノクローナル抗体の作成法、ファージディスプレイ、そして親和性成熟など、免疫グロブリン分子に関する基本的な概念を殆ど全て学び尽くすことに繋がります。

す。また、関節リウマチに対する抗体医薬の作用を理解することは、炎症の発生メカニズムにおけるサイトカインの役割を理解することに直結します。

さて、**第1回**は事例の発端として、**M君**のお祖母さんが関節リウマチを発症するところから出発します。関節リウマチについては、第6週の「アレルギーと自己免疫病」の講義の中で詳しく解説をしますし、非常勤講師であるリウマチ治療の専門家、泉山朋政博士の講義でも実例を交えて詳しく教えて頂きます。ここでは、関節リウマチそのものについて詳しく学ぶことが目的ではありませんが、関節や軟部組織を中心に持続性の炎症が起こる疾患として、炎症の発生メカニズムについてはある程度考えて貰う必要があります。それはまた、先週の後半から始まっている炎症の講義を振り返って咀嚼する機会でもあります。

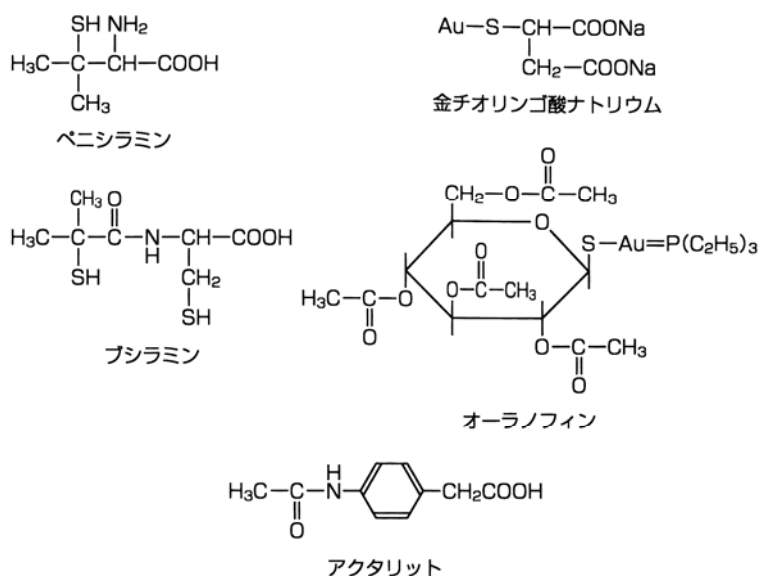
関節リウマチは、寛解と再燃を繰り返しつつ進行性に経過する原因不明の多発性関節炎で、関節炎はしばしば対称性に起こり、検査データとしてリウマトイド因子が陽性を示すことが特徴と言われてきました。関節炎の活動期には疼痛と腫脹が強く、日常生活にも支障を来す程となることがあります。また、関節炎が持続すると軟骨・骨破壊から関節変形に至り、機能障害を残すこともあります。

我が国での有病率は女性が男性のおよそ5倍で、60歳以上では女性1.2%、男性0.25%とされています(厚生労働省 長期慢性疾患調査研究事業報告書 1998)。病理学的には関節滑膜の慢性炎症が主体で、本来一層である滑膜細胞が多層化し、滑膜下の軟部組織にリンパ球とマクロファージが集簇、時にはリンパ濾胞まで形成されます。肥厚した滑膜が関節軟骨表面に進展し、パンヌスを形成します。また、骨髓側にも炎症細胞が集簇し、破骨細胞が活性化、骨破壊が進行します¹⁾。

M君のお祖母さんも示している、一時間以上持続する「朝のこわばり」は、かつてアメリカリウマチ学会の分類基準にも診断項目として含まれていたもので、病態完成時にはほぼ全例に認められ、疾患活動性に一致して消長すると言われます。関節の疼痛・腫脹の初発部位は、近位指節間関節(PIP)、中手指節間関節(MCP)、中足趾節間関節(MTP)、肩関節、手関節などですが、遠位指節間関節(DIP)は冒されにくいと言われます¹⁾。

一般に関節リウマチは単関節から発症し、進行する例では増悪寛解を繰り返して、場所と時期を変え多関節炎に至ります。「リウマチ(rheumatism)」という病名は、ギリシア語のrheumatismosに由来し、ヒポクラテスやガレノスの時代からの疾病の体液説、即ち「悪い体液が病変部に流れ込んで腫れや痛みを生じる(catarrh)」という考え方(この場合、脳から関節へと悪い液体が流れ込むと信じられていた)に由来すると言われています²⁾。

さて、今回治療に使われたシオゾールですが、化学的には金チオリンゴ酸ナトリウム(gold sodium



thiomalate) であり、所謂疾患修飾性(遅効性)抗リウマチ薬(disease-modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs)の一つです。旧くから抗リウマチ薬として使われてきた代表的な**金製剤**ですが、本剤は水溶性であり、筋肉内投与により用いられます。正確な作用機序は分かっていませんが、マクロファージや好中球のリソソーム酵素活性を阻害すると言われており、臨床的にも関節破壊の抑制効果が認められています³⁾。

学生の皆さんは既に炎症反応とそのケミカルメディエーター、好中球による食菌やリソソーム酵素に関する講義を受けていますので、ここではM君のお祖母さんが示す炎症症状に着目し、次回までに関節リウマチやその治療について自習して来て下さい。

参考文献

- 1) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.
- 2) 京極 方久. 慢性関節リウマチ. 免疫病理学的疾患(岡林 篤・編). 文光堂, 1979. pp267-301.
- 3) 宮澤 正顯. 免疫抑制薬・抗アレルギー薬・抗リウマチ薬. 医学生のための薬理学(伊藤 猛雄 他). 南山堂, 1999. pp403-426.

事例 2 (12月 4日・水曜日に提示)

治療を中断したM君のお祖母さんですが、その後両手首が腫れ上がって痛くなり、手首を曲げることが出来なくなっていました。両肘と両膝、それに両方の足首の関節も腫れ上がって痛くなり、起き上がるのも一苦勞です。M君たちに講義をしてくれた先生が院長である、リウマチ専門のクリニックを受診したところ、上記の関節の腫脹と疼痛の他、左の中足趾節間関節に圧痛があることがわかり、血中CRPも高値で、関節リウマチの診断を受けました。リマチルという薬を処方されて毎日飲み、その後プレドニゾロンという薬も飲んだところ、関節の症状は軽くなりました。

キーワード

- ☐ 手首の腫れと疼痛
- ☐ 肘と膝の関節腫脹
- ☐ リウマチ専門医
- ☐ 中足趾節間関節
- ☐ 圧痛
- ☐ 関節リウマチ
- ☐ CRP高値
- ☐ リマチル
- ☐ プレドニゾロン
- ☐ 症状の軽快

こんなことを考えてみよう

- ☐ M君のお祖母さんの病気は治らなかったのか？
- ☐ お祖母さんの病気はどのように始まってどのように進行しているだろうか？
- ☐ リウマチ専門クリニックの先生はどうして中足指節関節に圧痛があると分かったのだろうか？
- ☐ 疼痛と圧痛の違いは何？
- ☐ CRPとは何？
- ☐ CRPを調べると何が分かるの？
- ☐ 関節リウマチとはどのような病気だろうか？
- ☐ リマチルというのはどのような薬だろうか？
- ☐ プレドニゾロンとはどのような薬だろうか？

解説

肩関節の疼痛と朝のこわばりで発症したM君のお祖母さんですが、一旦治療を中断したところで全身の多発関節炎が出現しました。リウマチ専門の医師を受診し、診察所見と検査データから関節リウマチと診断されています。自発的な疼痛のない関節でも、診察により圧痛が確認される場合があります、触診は関節腫脹や周囲軟部組織の肥厚の有無を判断する上でも重要であると言われます。

学生の皆さんは、事例1を足掛かりに、関節リウマチについてかなり調べて来た筈です。先ず自己学習の成果を発表し、関節リウマチの症状・検査所見や診断法、シオゾールの作用機序などをまとめて下さい。関節リウマチの診断については、詳しく採り上げる必要はありませんが、もしも調べて来たグループがあれば、2010年にアメリカリウマチ学会とヨーロッパリウ

マチ学会が共同で発表した新しい分類基準があることに留意して下さい¹⁾。

今回は血清学的診断により炎症マーカーとしてのCRPが高値であることが示されました。CRP (C-reactive protein) は、肝臓で産生される急性期反応産物の一つで、血清アミロイドタンパク質 (serum amyloid protein: SAP) とともに、血清中に五量体として存在する「ペントラキシンスーパーファミリー」の仲間です。講義でも触れた通り、CRPは細胞膜のホスホコリンに結合し、補体C1qを結合することで補体系を活性化、補体受容体を介するオプソニン作用により、マクロファージによる異種細胞や傷害自己細胞の貪食を引き起こします。

肝臓におけるCRPの産生は、急性炎症のケミカルメディエーターであるIL-1 β やIL-6、TNF α により誘導されますが、肝からのCRP産生を最も強く誘導するのはIL-6です。一方、同じペントラキシンスーパーファミリーの分子として、血管内皮細胞や中膜平滑筋細胞で産生されるペントラキシン3 (PTX3) があり、炎症の初期に産生されるIL-1やTNF α で急激に発現誘導が起こるため、CRPよりもさらに鋭敏な炎症マーカーと期待されています。

関節リウマチと診断されたM君のお祖母さんには、リマチルが投与されました。リマチルは化学名ブシラミンで、SH基を有する免疫調節薬です²⁾。SH化合物には、少なくとも試験管内でリンパ球の増殖・活性化を修飾する「低分子アジュバント」として作用するものが多く、ブシラミンも、抗体産生抑制作用やTリンパ球増殖抑制作用、IL-1産生抑制作用などが報告されています。副作用としては皮疹や掻痒感が多く、腎障害も報告されています。

グルココルチコイドの抗炎症作用については、炎症の講義でも触れていますし、これまでに生理学や生化学の講義でも繰り返し触れられてきたことと思います。プレドニゾロンは、生体内で産生されるコルチゾールの化学合成誘導体で、コルチゾールより遥かに強い生理活性を示します。グルココルチコイドは、実際上体内のほぼ全ての細胞にその受容体が存在し、全遺伝子の1%以上もの発現を制御すると言われます。このため、炎症の制御における正確な作用機序も完全には分からず、同時に副作用も多岐にわたることになります。主要な作用だけでも、IL-1、IL-3などサイトカインの遺伝子発現抑制、IL-8などケモカインの産生抑制、ホスホリパーゼA2及びシクロオキシゲナーゼの抑制によるプロスタグランジン類の産生阻害、NO合成酵素の機能抑制、顆粒球の細胞膜安定化によるリソソーム酵素の放出阻害、Tリンパ球のアポトーシス誘導などがあり、これらを通じて炎症反応を強力に阻害します²⁾。一方で、タンパク質の糖化を引き起こして血糖値を上昇させ、肥満や骨粗鬆症を引き起こします。関節リウマチの治療にグルココルチコイドを使用する場合には、骨粗鬆症を防止するため、破骨細胞の機能を抑制するビスホスホネートを併用するのが良いとされます¹⁾。

参考文献

- 1) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.
- 2) 宮澤 正顯. 免疫抑制薬・抗アレルギー薬・抗リウマチ薬. 医学生のための薬理学(伊藤 猛雄 他). 南山堂, 1999. pp403-426.

事例 3 (12月 6日・金曜日に提示)

プレドニゾロンで関節炎の症状は軽快しましたが、3ヶ月程の間に体重が10kgほど増えてしまい、骨密度の低下も生じました。そこでプレドニゾロンを減量し、メトトレキサート(リウマトレックス)という薬に切り換えました。M君はメトトレキサートと聞いて、抗がん剤ではなかったかなと思いました。

その後、メトトレキサートが増量されましたが、血液検査でCRPの高値が続いているということで、主治医の先生は「**生物学的製剤のレミケード**を使ってみましょう」と言いました。M君は、「生物学的製剤って一体どんな薬なのかな」と思いました。

キーワード

- ☐ 症状軽快
- ☐ 体重増加
- ☐ 骨密度低下(骨粗鬆症)
- ☐ プレドニゾロン減量
- ☐ メトトレキサート(リウマトレックス)
- ☐ 抗がん剤
- ☐ CRP高値の持続
- ☐ 生物学的製剤
- ☐ レミケード

こんなことを考えてみよう

- ☐ 急激な体重増加が起こった理由は何だろうか？
- ☐ 骨密度の低下はプレドニゾロンと関係があるのだろうか？
- ☐ 関節リウマチの治療に抗がん剤を使うのだろうか？
- ☐ CRPの高値は何を意味するのだろうか？
- ☐ 生物学的製剤とは何だろうか？
- ☐ レミケードとは、一体どのような薬だろうか？

解説

強力なグルココルチコイドであるプレドニゾロンを使用したことで、関節炎の症状は軽快しましたが、副作用によって体重増加が生じ、骨粗鬆症も起こってしまいました。

グルココルチコイドは、骨組織に対する直接効果とカルシウム代謝に対する効果の両方を介して、骨代謝に影響を与えます。グルココルチコイドのカルシウム代謝に対する効果としては、腸管からのカルシウム吸収と腎尿細管におけるカルシウム再吸収の両方を抑制することが知られており、血中カルシウム濃度の低下により、二次性に副甲状腺機能亢進症が生じます(その結果、破骨細胞機能が亢進する)¹⁾。一方、グルココルチコイドの骨組織に対する直接効果として、骨芽細胞の分化・増殖抑制があります。実験的にも、グルココルチコイドの過剰投与の結果、破骨細胞の数や骨吸収には変化が見られなかったが、骨形成が著明に抑制されたことが報告されています²⁾。グルココルチコイドの過剰投与に起因するステロイド骨粗鬆症では、骨密度の低下が明らかになる前から骨質の劣化が顕著になります。このため、前回述べた通り、元々の病態によって骨粗鬆症(骨破壊)が生じる関節リウマチの治療にプレドニゾロンを使用するにあたり、最近では破骨細胞機能を抑制するビスホスホネートを併用することが多くなりました^{1, 2)}。

学生の皆さんは、グルココルチコイドによる炎症の抑制機構を自己学習して来たでしょうか？ また、CRPについて調べて来たでしょうか？

M君のお祖母さんは、プレドニゾロンの投与により一旦関節炎症状が軽快しましたが、副作用が生じてしまったため、プレドニゾロンは減量し、メトトレキサートが使われました。M君が気付いた通り、メトトレキサートは葉酸拮抗薬で、元々抗がん剤(抗悪性腫瘍薬としての商品名は「メソトレキセート」)ですが、抗リウマチ薬としては1999年に「リウマトレックス」の商品名で市販が開始され、現在では抗炎症効果と抗リウマチ効果の両方を示す疾患修飾性抗リウマチ薬として、**疾患活動性が高い場合の関節リウマチ治療の第一選択薬**となっています。

メトトレキサートの作用機序については、これまでも、またこれからも学ぶ機会が多いと思いますが、葉酸拮抗薬として核酸合成阻害作用を示すとともに、メチル基転移反応の抑制により、タンパク質合成も阻害します。しかし、抗リウマチ薬としての投与量(通常、1週間単位の投与量はメトトレキサートとして6mg)は、抗がん剤としての投与量(急性白血病や悪性リンパ腫で、メトトレキサートとして1週間に1回30~100mg/kg)よりも遥かに低く、その場合の作用機序は、アデノシン代謝阻害とタンパク質メチル化の阻害が主なものではないかと考えられています²⁾。即ち、メトトレキサートは5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボスクレオチドトランスホルミラーゼの機能抑制を介してアデノシンデアミナーゼを強力に阻害し、細胞内にアデノシンを増加させます。**アデノシンデアミナーゼ欠損症が原発性免疫不全症候群の一つである**ことから分かるように、この酵素の機能障害はリンパ球増殖を強く抑制し、免疫抑制が起こります。また、タンパク質メチル化の抑制は、Rasのような細胞内シグナル伝達分子のメチル化を阻害し、好中球の運動能や接着能、リンパ球や滑膜細胞の活性化や増殖を抑制します。

メトトレキサートは骨や滑膜に移行しやすく、関節液中の濃度は血中濃度の約10倍に達するとも言われます。治療継続率が他の疾患修飾性抗リウマチ薬よりも高く、無効による中止例が少ないことから、有効例が多いと判断され、関節リウマチの疾患活動性が高い場合の第一選択薬の地位を確立しています。

副作用としては葉酸欠乏による肝酵素の上昇が見られるものの、一過性の場合も多く、肝硬変に進行することは希であると言われます。重篤な副作用としては間質性肺炎(0.1~5%未満)と骨髄抑制(1~2%)があり、比較的軽い副作用として、悪心・嘔吐、口内炎、舌炎、腹痛が5~20%に見られます。口内炎や舌炎は、患者にとって苦痛です。

ここでは、メトトレキサートについて詳しく学んで貰うことが目的ではないので、学生の皆さんは抗がん剤としてのメトトレキサートの使い方と抗リウマチ薬としてのそれは違うこと、最近ではメトトレキサートが抗リウマチ薬の第一選択となっていることを記憶に留めて下さい。その上で、**事例3**の最後に出て来る**生物学的製剤とレミケード**に注意を向けて下さい。これが今回の事例のハイライトです。

生物学的製剤とは、元々動物個体や培養細胞などで作製されたワクチン製剤や抗血清、サイトカイン製剤などを指す用語でしたが、現在ではむしろ「バイオテクノロジー技術によって生み出された医薬品」というニュアンスが強く、特に悪性腫瘍や炎症性疾患を対象とした抗体製剤や、受容体リガンドまたは受容体拮抗抗体製剤を「生物学的製剤」と呼ぶことが多くなっています。関節リウマチに対しては2003年から国内で使用が開始されており、これまでの抗リウマチ薬に比べて薬剤費が(極めて)高価であること、点滴静注が必要である(皮下注射出来るものもある)ことが難点ですが、完全な寛解の誘導を含めた高い有効性に期待が持て、特に関節破壊抑制効果に優れていることが知られています。メトトレキサート(「リウマトレックス」)を中心とする治療で十分に病勢のコントロールが出来ない場合は、出来るだけ早

期に生物学的製剤を導入して関節破壊を防ぐという治療指針が、現在では国際的にも広く受け入れられています²⁾。今回最初に用いられたレミケードは、一般名インフリキシマブ (Infliximab) であり、ヒトTNF α に対するマウス・ヒトキメラ型モノクローナル抗体です。

学生の皆さんは既に、抗体分子の基本構造、Bリンパ球による抗体産生のしくみを講義で学んでいます。事例の最後に出て来たレミケードを足掛かりに、週末の間にモノクローナル抗体やキメラ抗体について自己学習を進めて下さい。

参考文献

- 1) 東野 英明. ホルモン. 医学生のための薬理学(伊藤 猛雄 他). 南山堂, 1999. pp247-297.
- 2) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.

事例 4 (12月 9日・月曜日に提示)

お祖母さんの治療にレミケードという生物学的製剤が使われるというので、M君はレミケードのことを調べて見ました。どうやら、ヒトのサイトカインであるTNF α に対してマウスで作ったモノクローナル抗体を、ヒトの身体に投与できるようにキメラ化したものであるようです。M君は講義でモノクローナル抗体について聞いたことがあるように思いますが、どうやって作るのだったか良く思い出せません。また、ヒトの抗体をマウスに投与して、ヒトの抗体と反応するマウスの抗体を作り、蛍光標識して使うと言う実験を実習でやった覚えがあります。マウスの抗体をヒトに投与しても大丈夫なののでしょうか？それに、キメラ抗体とは何のことでしょうか？

キーワード

- ☐ レミケード
- ☐ 生物学的製剤
- ☐ サイトカイン
- ☐ TNF α
- ☐ モノクローナル抗体
- ☐ モノクローナル抗体の作り方
- ☐ 抗体の抗原性
- ☐ 異種抗原
- ☐ マウスの抗体をヒトに投与
- ☐ キメラ抗体

こんなことを考えてみよう

- ☐ 抗体のタンパク質としての本態は何か？
- ☐ 抗体タンパク質にも抗原性はある？
- ☐ 蛍光抗体法やELISAで使う抗ヒト免疫グロブリン抗体はどうやって作るの？
- ☐ アイスタイプ、アロタイプって憶えている？
- ☐ 血清療法、血清病って何だっけ？
- ☐ 抗体産生細胞のクローンとは？
- ☐ モノクローナル抗体って、どうやって作るのだろう？

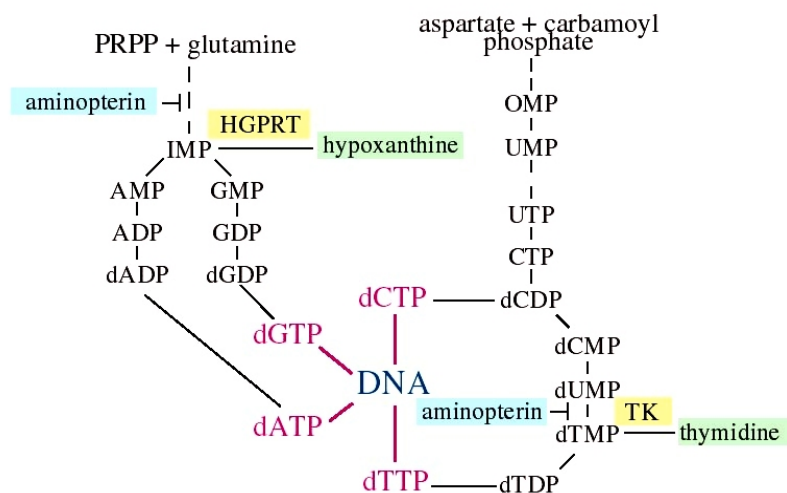
解説

炎症反応の発生におけるTNF α の重要な役割については、既に先々週の講義で学んでいます。

関節リウマチの発症メカニズムは完全に解明されている訳ではありませんが、何らかの感染性因子が引き金となって滑膜細胞による抗原提示が起こり、これが初期にTh17細胞、続いてTh1細胞を活性化、産生されたIL-6やTNF α が滑膜細胞を活性化させて、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)とIL-1 β の産生を誘導し、軟骨基質の分解を引き起こすとともに、破骨細胞を活性化させて関節破壊を引き起こすと考えられています¹⁾。なお、少なくとも実験系では、初期にTh17細胞から産生されるIL-17が破骨細胞前駆細胞の分化と活性化に重要な役割を果たすとされます²⁾。関節における炎症症状の発現には、特に炎症の最盛期においてTNF α の役割が大きく、上記の通りTNF α による滑膜細胞の活性化がMMPsとIL-1 β の産生を引き起こすことから、TNF α の機能抑制が関節炎症状の軽快と骨破壊の進行防止に有効であると考えられます。

さて、レミケードですが、これはヒトTNF α に対して作製されたマウスのモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の可変部を、それぞれヒトのIgG1(κ)を構成する軽鎖(κ 鎖)及び重鎖(γ_1 鎖)の定常部につなぎ替えた、キメラ抗体です。

モノクローナル抗体の作製については、既に講義でも触れていますが、一般にはマウスなどの実験動物を目的の抗原で繰り返し免疫した後、そのリンパ節や脾臓の細胞を取り出し、抗体産生能を欠くミエローマ細胞と融合させた後、融合細胞だけが増殖できる**選択培地**で培養します。ミエローマ細胞には核酸合成のサルベージ回路に必要なヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフ



ェラーゼ (HGPRT) を欠損した株を用い、融合細胞の選択培地 (HAT) 培地には *de novo* 合成を抑制するため葉酸アナログのアミノプテリン (aminopterin: A) と、核酸の材料であるヒポキサンチン (H) 及びチミジン (T) を加えておきます。目的抗原で免疫された動物由来のリンパ球と融合していないミエローマ細胞は、HGPRT を欠損しているため、培地中のヒポキサンチンを活用できず、*de novo* 経路が抑制される HAT 培地中では増殖できません。一方、融合していない正常リンパ球は *de novo* 経路が抑制されてもサルベージ経路で核酸を合成できますが、元々試験管内での分裂増殖回数には限りがあります。融合細胞は、ミエローマ細胞で欠損していた HGPRT の機能が正常リンパ球由来の遺伝子で補われるため、HAT 培地中でも増殖を続けられます。

こうして融合細胞が選択できますが、勿論生じた融合細胞の大部分は目的の抗原と反応する抗体を産生してはいません。そこで、目的の抗原と反応する抗体を産生する融合細胞だけを選び出すことが必要です。そこで、融合細胞の集団を多数のウェルを持つ培養プレートでクローン化し、各クローンの培養上清をスクリーニングして、目的の抗原と反応する抗体を産生しているクローンを選び出します。この操作を繰り返すことで、目的の抗原と強く反応する抗体を大量に産生するハイブリドーマのクローンを選択する訳です。

目的の抗原と強く反応する抗体を産生するハイブリドーマクローンを出来るだけ効率良く得るため、現在では動物の免疫法やハイブリドーマ細胞のクローニング法に種々の工夫が施されています。例えば、抗原の皮下投与を繰り返した動物に、最後は脾臓内に直接抗原の注射を行うことで、目的抗原に特異的に反応する抗体産生細胞の割合を一気に増やす方法があり、ハイブリドーマ細胞のクローニングも、2週間以上がかかるマルチウェルでの培養ではなく、フィブリンゲルを用いて僅か数日間でコロニー形成をさせる方法があります。また、動物の免疫や産生抗体のスクリーニングに遺伝子操作によって得られた抗原を用い、遺伝子レベルで純化された抗原で効率良く特性の高い抗体を得ることも出来ます³⁾。

ところで、動物を免疫して抗体を得る以上、ハイブリドーマ細胞から産生された抗体分子はヒトにとって異種のタンパク質です。ヒトの免疫グロブリンを実験動物に投与して「抗ヒト免疫グロブリン抗体」が得られることや、細菌毒素などに対する動物血清をヒトに反復投与すると血清病が起ることから明らかな通り、異種動物の免疫グロブリンは異物として抗原性を発

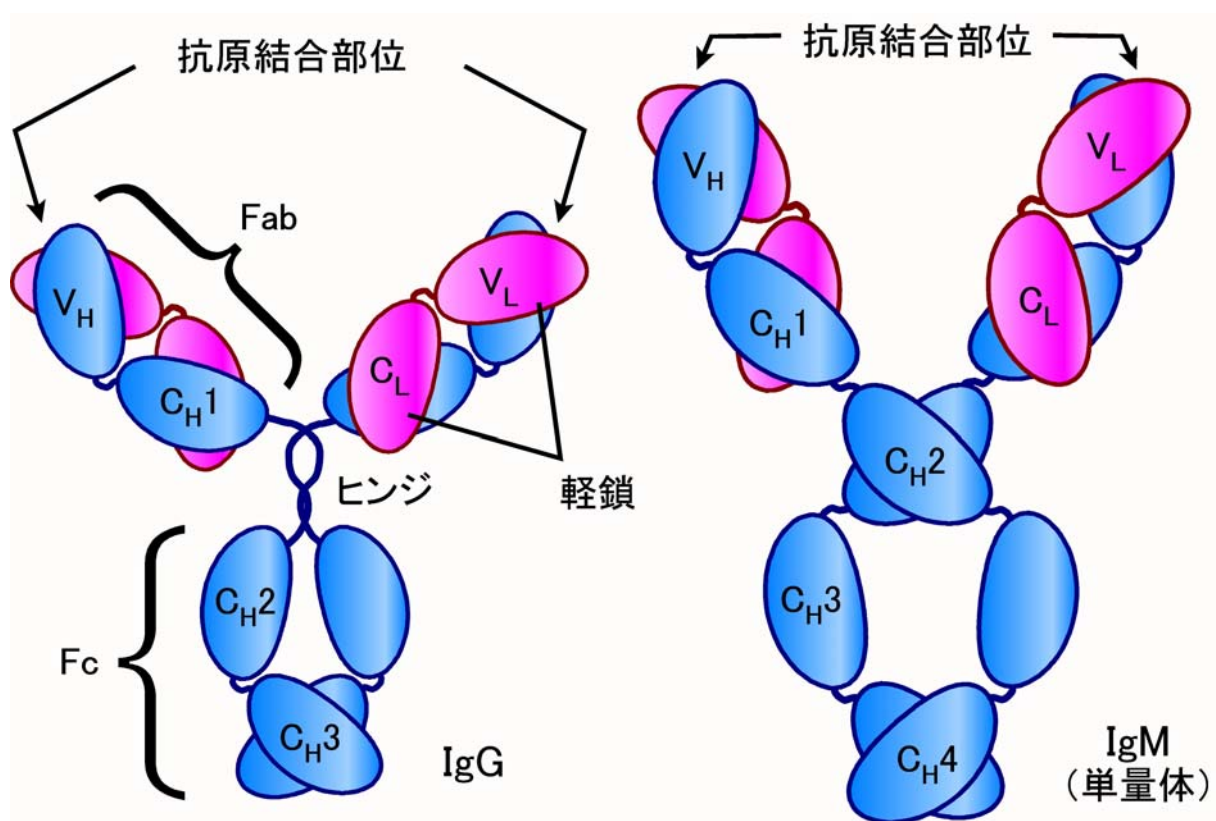
揮します。従って、例えばマウスで作られたヒトのTNF α に対するモノクローナル抗体を、治療のため患者に繰り返して投与していると、患者の体内でマウスの免疫グロブリンに対する抗体が産生され、投与した抗体が免疫複合体として急速に分解・排除されてしまうばかりか、**血清病**のような病態(腎炎、関節炎、血管炎)やアナフィラキシーショックが生じる危険性があります。

そこで、生物学的製剤としてヒトに投与する抗体分子は、可能な限りヒトの免疫グロブリン分子に近いものが望まれることになります。

生物学的製剤としての抗体医薬品を、ヒトにとって抗原性の少ないものにするための方策としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト型抗体、単一鎖可変部断片(single-chain FV)などがあります。キメラ抗体とは、マウスなど異種動物で作製された抗体の可変部(V_H と V_L)を、ヒトの免疫グロブリン分子の定常部($C_H1 \sim C_H3$ と C_L)につなぎ替えたものです。この場合、軽鎖及び重鎖の可変部に含まれるフレーム部分の抗原性は残されることになり、得られたキメラ抗体のおよそ30%のアミノ酸配列は、ヒト以外の種に由来することになります。このため、キメラ抗体であっても、その可変部のフレーム部分に対する抗体産生が起こる可能性は否定できません。

キメラ抗体から更にヒト型化を進めた抗体に、ヒト化抗体があります。これは可変部の中でも抗原との結合に直接関与する**相補性決定部位(CDRs)**の配列だけを、異種動物で作られた抗体由来の配列とし、可変部のフレーム部分も含めたそれ以外全ての部分を、ヒトの免疫グロブリンで置き換えたものです。関節リウマチなどの治療に用いられる生物学的製剤の例としては、トシリズマブ(ヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体)があります。

一方、相補性決定部位も含めた可変部と定常部の全てがヒト由来の配列であれば、ヒト体内での抗原性は更に低下すると考えられます。この場合、目的の抗原でヒト個体を免疫することは、倫理的にも困難がありますが、実際には後で述べる通り、全く免疫を行っていないヒトの免疫グロブリン遺伝子から、ファージディスプレイ法を用いて目的抗原と反応する可変部の遺伝子を選び出すことが可能であり、これによって完全ヒト型抗体から成る生物学的製剤



が得られています。さらに、免疫グロブリン遺伝子座を破壊した遺伝子改変マウスに、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を含む染色体断片を導入し、抗原で免疫することによりヒトの免疫グロブリンを抗体として産生するようにしたマウスを用いる方法もあります(その例は後の事例で出て来ます)。

生物学的製剤の世界では、マウスで作られたモノクローナル抗体をそのまま使う場合は、その一般名に **-omab** (mabは monoclonal antibody: mAb) を付け(例: イブリツモマブ Ibritumomab; 抗ヒトCD20マウスモノクローナル抗体)、キメラ抗体の場合は **-ximab** を付けることとし(例: 上記のインフリキシマブ Infliximabや、リツキシマブ Ritsuximab; 抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ抗体)、異種抗体由来のCDRsのみをヒトの免疫グロブリン分子に挿入したヒト化抗体の場合は **-zumab** を付ける(例: トシリズマブ Tocilizumab; ヒト化抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体) こととなっています。更に、完全ヒト型モノクローナル抗体の場合は、**-umab** と付けます(例: アダリムマブ Adalimumab; ヒト型抗ヒトTNF α モノクローナル抗体)。

参考文献

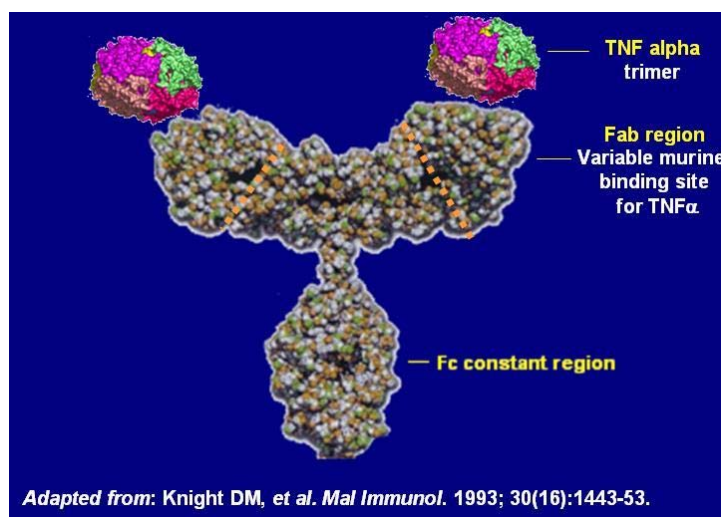
- 1) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.
- 2) Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7:29-37.
- 3) 宮澤 正顯. 組換え型ワクシニアウイルスを用いた抗原特異的免疫応答の誘導. *Medical Immunol.* 1989; 17:27-32.

事例 5 (12月11日・水曜日に提示)

M君はお祖母さんの治療に使われているレミケードが、ヒトのTNF α に対するキメラ抗体で、マウスで作った抗ヒトTNF α モノクローナル抗体の可変部と、ヒトのIgG1定常部を繋いだものであることを知りました。M君は、どうしてIgG1なのだろうと思いました。また、同じヒトのIgGでも、家系によって定常部の抗原性が違うということを講義で習ったような気がします。マウスの可変部を持ったヒトのIgG1を、治療のために点滴静注しても大丈夫なのでしょうか？

キーワード

- ☐ キメラ抗体
- ☐ モノクローナル抗体
- ☐ TNF α
- ☐ IgG1
- ☐ 定常部
- ☐ 可変部
- ☐ 定常部の抗原性
- ☐ 同種の家系
- ☐ ヒトとマウス
- ☐ 何故IgG1なのか
- ☐ 点滴静注



こんなことを考えてみよう

- ☐ 抗体分子の抗原性にはどのようなものがあつたらうか？
- ☐ アイスタイプ、アロタイプ、イディオタイプとは？
- ☐ キメラ抗体はどのようにして作るのだろうか？
- ☐ モノクローナル抗体の作り方は分かったかな？
- ☐ 抗体分子のアイスタイプによる性質の違いは？
- ☐ ヒトIgGのアイスタイプごとにどんな違いがあるのかな？
- ☐ ヒトIgGのアイスタイプによる機能の違いは？

解説

M君はレミケードがキメラ抗体であることに気が付きました。しかもその定常部はヒトのIgG1です。実際、大半の抗体医薬はヒトIgG1をその骨格としていますが、これはなぜでしょうか？このことを理解するためには、免疫グロブリンのアイスタイプとアロタイプに関する理解が必要です。

ヒトでもマウスでも、一個体の血液・粘液中には同一の抗原と結合する複数の免疫グロブリン分子種が同時に存在しています。これを免疫グロブリンのアイスタイプと言います。アイスタイプには軽鎖(κ 鎖、 λ 鎖)のアイスタイプと、重鎖のアイスタイプがありますが、抗体分子の分子量や機能の違いに影響を与えるのは重鎖のアイスタイプです。

ヒト免疫グロブリンの重鎖のアイスタイプには μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ のクラスがあり、 γ と α は更に、 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4及び α 1と α 2のサブクラスに分かれます。従って、一人のヒトの体内には、上記の重鎖のアイスタイプに基づき、IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgEの9つのアイスタイプ(クラス、サブクラス)の抗体が存在し得ます。

これら抗体分子のアイスタイプには、互いに生物学的性質と機能の違いがあります。それら

アイソタイプ	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
毒素・ウイルス中和	+	++	++	++	++	++	++	—
マクロファージ Fc レセプターへの結合	—	+++	±	++	+	+	+	—
補体活性化(古典経路)	+++	++	+	++	—	—	—	—
補体活性化(第二経路)	—	—	—	—	—	+	—	—
肥満細胞 Fc レセプターへの結合	—	—	—	—	—	—	—	+++
上皮細胞 polyIg レセプターによる輸送	—	—	—	—	—	+	++	—
胎盤通過能	—	+++	+	++	±	—	—	—
サイトカインによるクラススイッチの誘導		IFN- γ IL-4 IL-10		IFN- γ IL-4 IL-10	IL-4 IL-13	IL-5 TGF- β IL-10	上皮細胞 APRIL	IL-4 IL-13

生物学的性質と機能の違いは、重鎖の定常部のアミノ酸配列と糖鎖結合の差異、ヒンジの長さや補体結合部、Fc受容体結合部のアミノ酸配列の違いによって生じます。

IgG1はヒトIgGのアイソタイプの中で、最も血中濃度が高いものです。また、全てのヒトの免疫グロブリンアイソタイプの中で、**血中の半減期が最も長く(約21日)**、従って抗体医薬として投与したとき血中での持続時間が最も長くなると期待されます。更に、古典経路による補体結合能がIgMやIgG3に次いで強く、目的抗原を結合した後補体を活性化し、補体受容体を介して急速に排除できると期待されます。また、IgG1とIgG3はマクロファージや好中球、それにNK細胞のFc受容体への結合能も高く、オプソニン化による貪食や、例えば悪性腫瘍の表面抗原に対する抗体の場合、所謂ADCC活性による標的細胞の破壊も期待できます。

このように、IgG1はその半減期の長さやFc部分の機能性の高さから、抗体医薬として理想的なアイソタイプであると考えられるのです。但し、**胎盤通過性があるため、妊婦に投与すれば胎児に移行してしまいます。**

IgG1アイソタイプが抗体医薬として優れていると考えられる、可能なもう一つの理由があります。それは、ヒトのIgG1にはアロタイプが少ないことです。

同一のアイソタイプの抗体分子であっても、同一種内(ヒト同士の間、或いはマウスどうしの間)で、家系(系統)による抗原性の違いが存在する場合があります。これをアロタイプと言います。例えばマウスの場合、アロタイプの異なる系統間で互いに免疫グロブリン分子を抗原として免疫操作を行うと、抗アロタイプ抗体が出来ることが知られています。

ヒトIgGにもアロタイプがありますが、実は最もアロタイプ(同一アイソタイプの対立遺伝子)の種類が多いのはIgG3です。これは、IgG3が系統発生的に最も古いIgGで、その遺伝子構成が最も古い免疫グロブリンであるIgMに近いことと関係があるでしょう。一方、IgG3に較べて、IgG1はアロタイプの数が少ないのです。しかも雑種であるヒトでは、一個人がIgG1のアロタイプ遺伝子についてホモ接合である可能性は低く、元々数の少ないIgG1アロタイプの遺伝子が完全不適合である確率はかなり低くなりますので、IgG1を抗体医薬に用いれば抗アロタイプ抗体が出来る可能性も低くなるだろうと期待されます¹⁾。

実際にインフリキシマブ(IgG1のアロタイプG1m17)が投与されたクローン病の患者で、ヒトIgG1のアロタイプに対する抗体の出現頻度が検討されていますが、異なるアロタイプであるG1m3をホモ接合で持つ患者が被投与者の中に48%あったにもかかわらず、抗アロタイプ抗体の出現率は被投与者のG1mアロタイプに関わらず有意差はなかったとの報告があります¹⁾。G1mアロタイプの違いによる抗原性の差がごく僅かであるためかも知れません。

参考文献

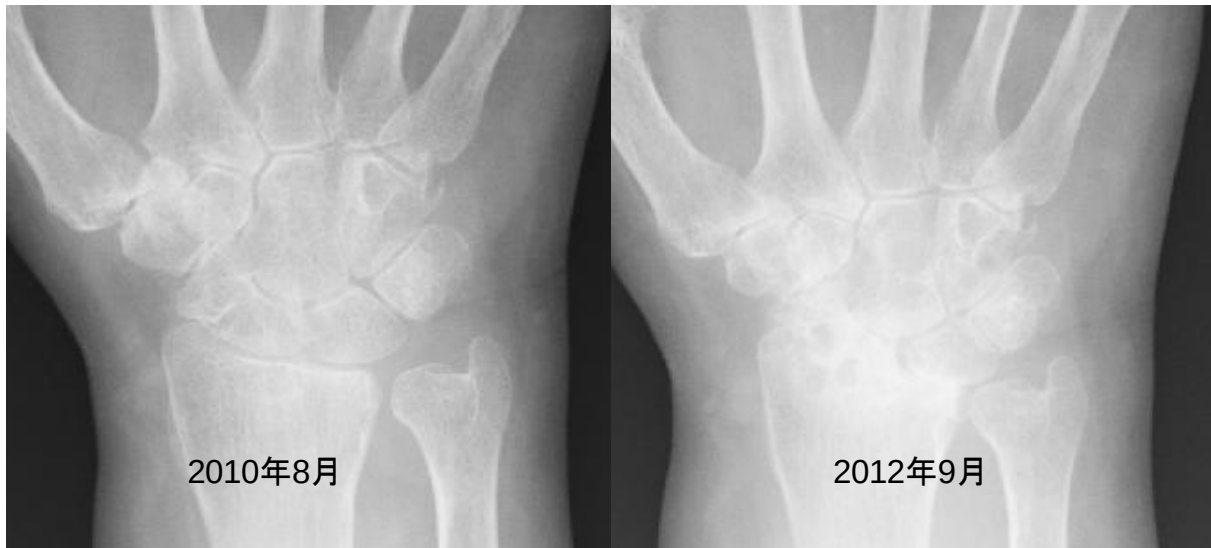
- 1) Jefferis R, Lefranc M-P. Human immunoglobulin allotypes. *mAbs* 2009; 1:1-7.

事例 6（12月13日・金曜日に提示）

レミケードによる治療開始後、M君のお祖母さんは朝のこわばりが解消し、関節炎症状も軽くなりました。レミケードの点滴静注を3回受けた後には、関節の腫脹や疼痛も完全に消失し、寛解状態となりました。併用していたプレドニゾロンとメトトレキサートも減量できました。

半年程寛解状態が続いたのでリマチルを中止し、肝機能が少し悪化してきたので、メトトレキサートを減量することになりました。するとCRPが上昇し、左手と左肘の痛みが悪化し、左肘関節には腫脹も生じたため、タクロリムスを併用することになりました。

M君は、タクロリムスは確か臓器移植の時に使われる薬だったなと思いました。



レミケードの減量後に起こった関節破壊の進行

キーワード

- ☐ 朝のこわばり解消
- ☐ 関節炎症状
- ☐ レミケード
- ☐ 点滴静注
- ☐ 関節の腫脹と疼痛
- ☐ 寛解状態
- ☐ 併用
- ☐ プレドニゾロン
- ☐ メトトレキサート
- ☐ 減量
- ☐ 肝機能
- ☐ CRP上昇
- ☐ 疼痛の再燃
- ☐ 腫脹の再燃
- ☐ タクロリムス
- ☐ 臓器移植

こんなことを考えてみよう

- ☐ 寛解状態とは何だろうか？
- ☐ レミケードは何に効いたのか？

- ☐ お祖母さんの関節炎症状にはどのようなものがあったかな？
- ☐ プレドニゾロンやメトトレキサートはずっと使っていたのだろうか？
- ☐ 肝機能が悪化したとは、具体的にどのようなことだろうか？
- ☐ 肝機能の検査法は？
- ☐ 肝機能悪化の原因は何だろうか？
- ☐ CRP上昇は何を示すの？
- ☐ タクロリムスってどんな薬？
- ☐ タクロリムスの出現で臓器移植はどう変わったの？

解説

メトトレキサートが疾患活動性の高い関節リウマチの第一選択薬となり、生物学的製剤の出現で骨破壊の抑制や関節炎の完全寛解が望めるようになった関節リウマチの治療ですが、患者の症状所見を注意深く観察しつつ、検査データや副作用の出現に十分注意を払って、複数の治療薬の組合せを慎重に選んでいくことが現在でも求められています。M君のお祖母さんの場合も、リマチル(ブシラミン)とプレドニゾロンの併用から始まった治療に、疾患活動性を勘案しつつ注意深くメトトレキサートを加え、骨粗鬆症の予防のためビスホスホネートを併用、メトトレキサートの増量でも十分な改善が得られなかったため、レミケードの静注を併用して寛解を得ています。

レミケードは単独で用いられることはなく、必ずメトトレキサートと併用します。これは、単に併用によって臨床効果を増強させるのみでなく、関節中での濃度が高くなるメトトレキサートの特性から、X線写真上で認められる骨破壊を抑制し、同時にその免疫抑制作用により、キメラ抗体であるレミケード(インフリキシマブ)に対する中和抗体の産生を抑制する目的もあると考えられます¹⁾。しかし、メトトレキサートには肝機能障害の副作用があり、実際この事例でもGOT、GPTが上昇してきたため、寛解が得られたこともあり、メトトレキサートを減量しています。しかしながら、メトトレキサートの減量後CRPが上昇し、関節痛と関節炎所見が再燃しましたので、免疫抑制薬であるタクロリムスを併用しています。

タクロリムスについては、この週の講義の中でTリンパ球抗原受容体からのシグナル伝達に関連して詳細に述べていますので、学生はその名前を想起できるはずです。

タクロリムス、別名FK506は、シクロスポリンAとともに、臓器移植における拒絶反応の制御を一変させた免疫抑制薬です²⁾。T細胞抗原受容体からの細胞内シグナル伝達では、ホスホリパーゼCの活性化に伴って細胞膜リン脂質からイノシトール3リン酸が遊離し、これが小胞体からのカルシウムイオン放出を起こします。放出された Ca^{2+} は細胞質内の不活性化カルシニューリンに結合してこれを活性化させ、活性化カルシニューリンはNFATに結合してその脱リン酸化を誘導、リン酸の外れたNFATはカルシニューリンとともに核内に移行し、遺伝子発現を誘導します。シクロスポリンとタクロリムスはこの過程を特異的に阻害しますが、それはシクロスポリンが細胞質内のシクロフィリンに、またタクロリムスがFKBPに結合し、これらがカルシニューリンに結合することでその Ca^{2+} による活性化を阻害するためです。

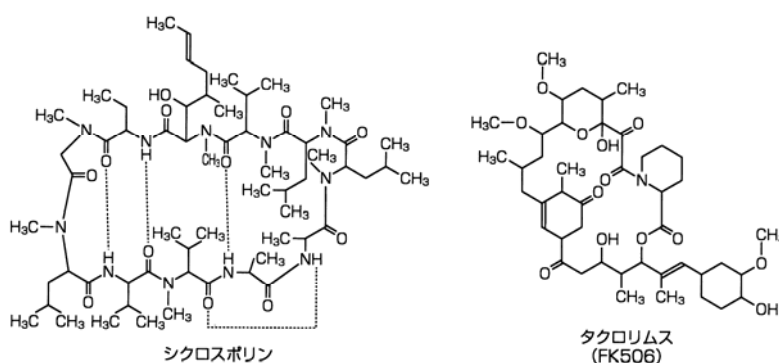
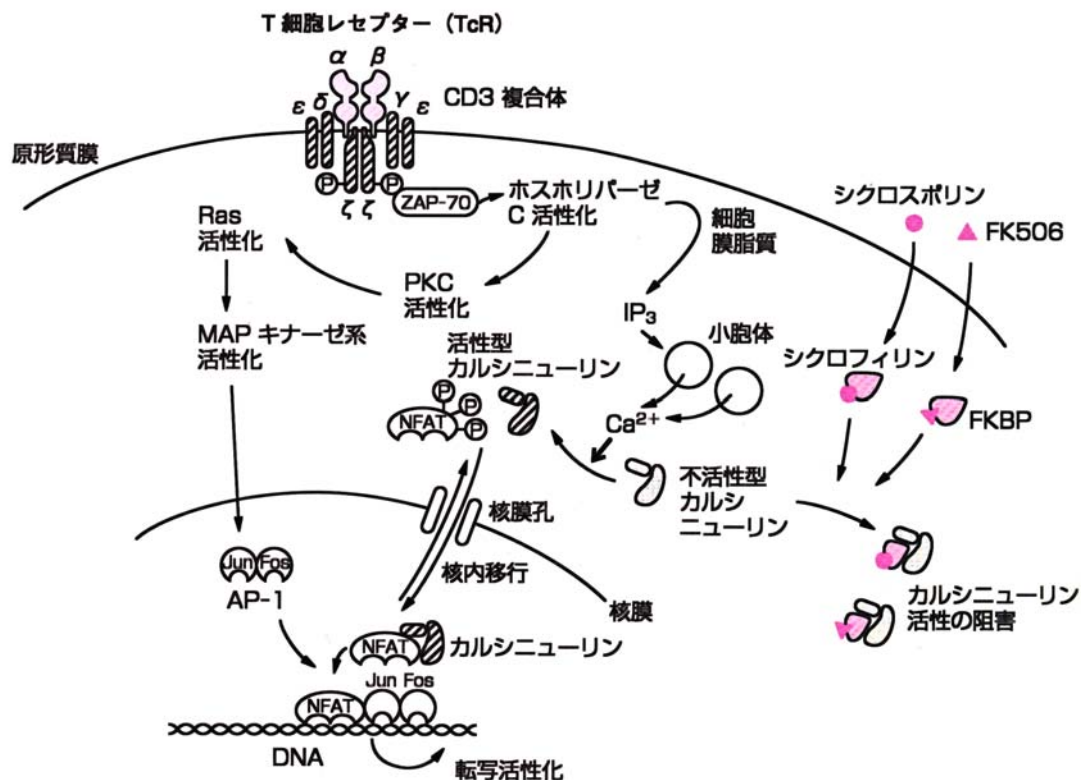


図 16-10 免疫抑制性抗生物質



従って、タクロリムスもシクロスポリンもT細胞抗原受容体からのシグナル伝達によるTリンパ球活性化を妨げることが出来、移植抗原に対するTリンパ球の感作そのものを抑制できます。

タクロリムスは我が国で土壤中の放線菌から発見された抗生物質ですが、臓器移植への適用とともに、我が国では関節リウマチと全身性エリテマトーデスにおけるループス腎炎の治療薬として認められています¹⁾。高額であることが難点ですが、副作用による中止例は少なく、高齢者にも比較的安全に投与できると言います。副作用としては、シクロスポリンと同様腎機能の悪化が問題で、中枢神経障害、心不全・不整脈もあるようです。

学生の皆さんは、ここでTリンパ球の活性化機構、Tリンパ球抗原受容体のシグナル伝達、シクロスポリンとタクロリムスの作用機序を復習して下さい。

なお、生物学的製剤にはいくつかの注意すべき副作用がありますが、特に重要なものは感染症とアレルギー反応です。中でも結核は重要で、ツベルクリン反応陽性など結核感染の既往があると思われる患者の場合、抗結核薬を投与しつつこの治療を行うべきとされています。結核以外では、種々の病原体による肺炎が約3% (100人に3人) に起こります¹⁾。

事例は実在の症例を下敷きにしていますが、その症例でもイソニアジドとバクタ(サルファメソキサゾールトリメトプリムの合剤)を併用し、結核の再燃とニューモシスチス肺炎に備えています。

参考文献

- 1) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.
- 2) 宮澤 正顕. 免疫抑制薬・抗アレルギー薬・抗リウマチ薬. 医学生のための薬理学(伊藤 猛雄 他). 南山堂, 1999. pp403-426.

事例 7 (12月16日・月曜日に提示)

タクロリムス投与で3ヶ月程症状が軽快していたM君のお祖母さんですが、主治医はタクロリムスの副作用を警戒し、レミケードの投与を6週毎に増量して、タクロリムスは中止しました。お祖母さんは体調も良く、どこも痛いところは無くなったと喜んでいましたが、半年後のX線検査で右手関節に骨破壊の進行を認め、レミケードの効果が無くなってきたと考えた主治医は、同じ生物学的製剤であるシンポニー(ゴリムマブ)の皮下注射に変更しました。

同じ抗ヒトTNF α 抗体だそうですが、これまで使って来たレミケードとシンポニーとはどう違うのだろうと、M君は疑問を感じました。

キーワード

- ☐ タクロリムス
- ☐ 副作用
- ☐ レミケード増量
- ☐ タクロリムス中止
- ☐ 体調が良い
- ☐ 痛いところはない
- ☐ X線検査
- ☐ 骨破壊
- ☐ レミケードの効果低減
- ☐ 生物学的製剤
- ☐ シンポニー
- ☐ 皮下注射
- ☐ 抗ヒトTNF α 抗体
- ☐ レミケードとシンポニーの違い

こんなことを考えてみよう

- ☐ タクロリムスにはどのような副作用があるのか
- ☐ 主治医がレミケードの効果が無くなったと考えた理由は？
- ☐ X線写真上の骨破壊の所見とはどのようなものだろうか？
- ☐ レミケードの投与回数を増やしたら、却って効果が少なくなったのは何故だろうか？
- ☐ レミケード(インフリキシマブ)とシンポニー(ゴリムマブ)の違いは何だろうか？
- ☐ レミケードは点滴静注だったのに、シンポニーは皮下注射なのは何故だろうか？

解説

レミケードの効果で関節痛が殆ど無くなっていたM君のお祖母さんですが、タクロリムスを中止し、レミケードの投与量を増やしたところで、症状には表れないものの、X線写真上の骨破壊の所見が出て来ました。前述の通りレミケードはメトトレキサートとの併用が必要ですが、寛解が得られたところでメトトレキサートを減量し、一旦タクロリムスを併用した後これを中止してレミケードを増量したため、レミケードに対する中和抗体が出現してきたのかも知れません。

そこで主治医は、完全ヒト型抗ヒトTNF α 抗体であるゴリムマブを使用することにしました。ゴリムマブ(Golimumab)は、その名称(-umab)から明らかな通り、可変部全体を含めて完全にヒトの遺伝子産物のみから成る抗ヒトTNF α 抗体です。しかし、どうしてもヒトのTNF α に対

するヒトの抗体を作ることが出来るのでしょうか？

現在、完全ヒト型抗体の作成法には大きく分けて二つがあります。一つは、今回の事例で治療に用いられたゴリムマブがそうであるように、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現するように遺伝的に改変されたマウスを用いて目的の抗原で免疫する法であり、もう一つはヒトの細胞から取り出した免疫グロブリン遺伝子を試験管内で発現させて、抗体分子(の可変部)を作らせる方法です。後者には、その代表的な技法として、大腸菌のファージディスプレイを用いてヒトの免疫グロブリン可変部遺伝子を多数発現させ、その中から目的の抗原(この場合はヒトのサイトカイン)と結合する可変部の遺伝子を選び出す方法があり、実際にはこの方法で作成された完全ヒト型抗体が先に臨床応用されました。関節リウマチの治療に用いられるヒト型抗ヒトTNF α 抗体製剤である**アダリグマム(商品名「ヒュミラ」)**はその例です。

ファージディスプレイ法では、ヒトの末梢血中にあるBリンパ球で発現している免疫グロブリン可変部遺伝子の中から、目的の抗原と反応する可変部を選び出して定常部に繋がりますが、そもそも「自己抗原」であるヒトのTNF α に反応する可変部の遺伝子が、正常の二次リンパ組織や血液中に存在しているのでしょうか？。

ここで思い出すべきは、講義でも詳しく触れる**自己反応性Bリンパ球抗原受容体の排除機構**です。末梢リンパ組織のTリンパ球抗原受容体が、胸腺での念入りのネガティブセレクションによりほぼ完全に自己反応性を欠いているのに対し、Bリンパ球抗原受容体の自己反応性除去は不完全で、骨髄で見出されるBリンパ球抗原受容体の半分近くは自己反応性を残しており、末梢のリンパ節でも、そこに存在するBリンパ球の抗原受容体遺伝子を試験管内で発現させると、その2割近くは自己抗原への結合能を示します¹⁾。それにも関わらず通常自己抗体が産生されないのは、自己抗原由来ペプチドを認識するTリンパ球が事実上存在せず、抗体産生に必要なT-B細胞間相互作用が、自己抗原に対しては起こらないからと考えられます。実際、微生物感染などに際して、自己抗原とBリンパ球エピトープを共有する異種抗原に対してTリンパ球が感作された場合には、交差反応性のエピトープでこの抗原を取り込んだ自己反応性Bリンパ球が、そのTリンパ球認識エピトープ部分を外来抗原で感作されたTリンパ球に提示し、T-B細胞間相互作用を経て抗体産生細胞に分化することが起こり得ます。微生物感染を引き金として発症する自己免疫性アレルギー疾患であるリウマチ熱やGuillain・Barre症候群などは、このような機序(**T-cell bypass**)で起こると考えられます²⁾。従って、ヒトの末梢リンパ組織中には、普段活性化されることはありませんが、ヒトTNF α に対して結合能を示す免疫グロブリンの可変部遺伝子も多数存在する筈であると考えられます。

問題は、そのような免疫グロブリン遺伝子をどのようにして取り出すかです。そこで活用されるのが、ファージディスプレイを用いた遺伝子工学的手法です。この手法では、大腸菌のM13などフィラメントスファージの外被タンパク質に、その感染能を失わせないように外来タンパク質を挿入し、挿入した遺伝子産物の機能によってファージを選択します。ヒト型抗体作製の場合は、ヒトの免疫グロブリン遺伝子の軽鎖と重鎖の可変部を組にして大腸菌のフィラメントスファージに発現させ、大腸菌から得られたファージの集団を抗原との結合能で選択して、目的の抗原と結合したファージだけを再度大腸菌に感染させて増やします。

この場合、ヒト免疫グロブリンの軽鎖と重鎖の可変部遺伝子は、ヒトの末梢血やリンパ節のDNAからPCRで増幅してファージDNAに挿入すれば良く、特定の抗原と反応するBリンパ球からその抗原に特異的な可変部cDNAだけを取り出す必要はありません。目的の抗原に感作されているヒトのリンパ球を使う場合もありますが(例えば、ワクチン接種を受けた人や、目的となる抗原を発現する微生物に感染した既往のある人の細胞を使う場合)、目的の抗原に曝されたことの全く無い、ナイーブな人のリンパ球から可変部の遺伝子を取り出しても構いません。

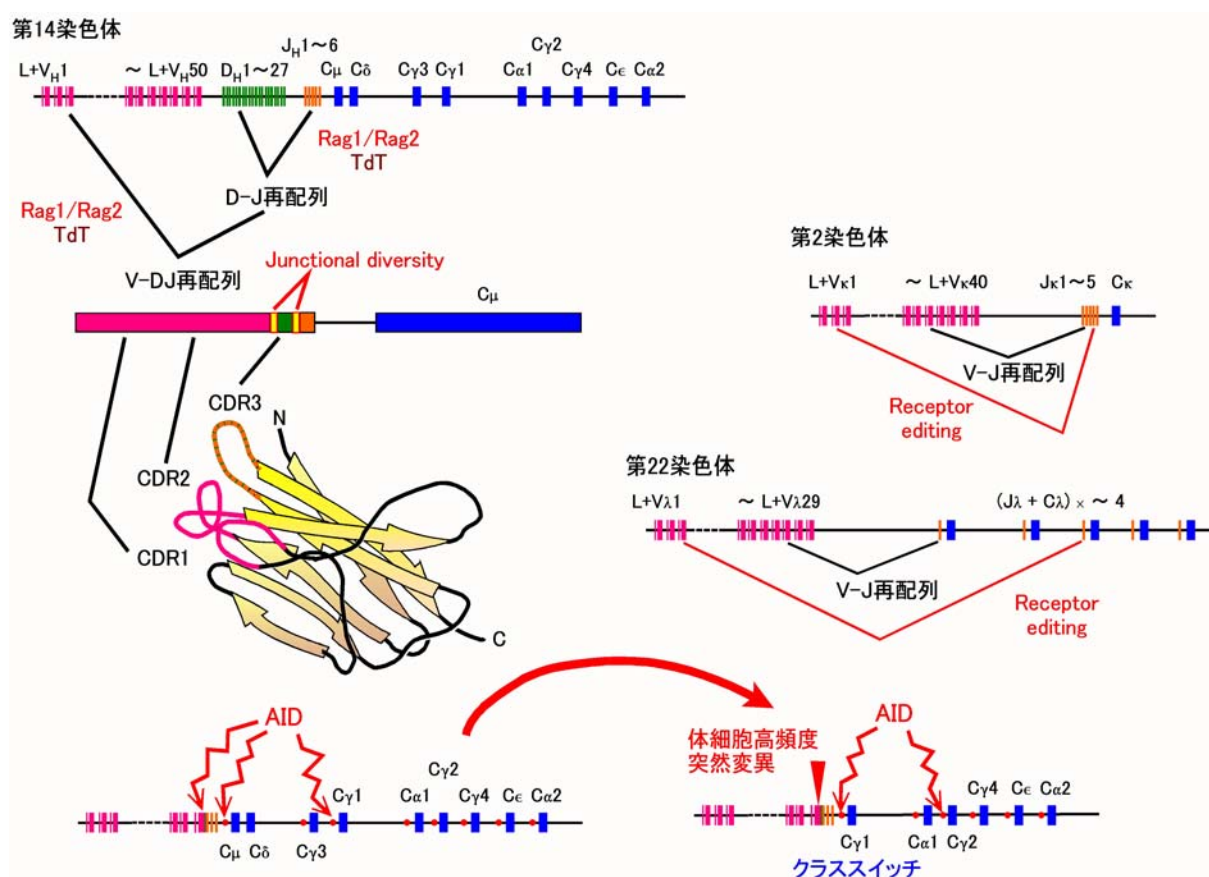
実際には、目的の抗原に最も強く結合する可変部の組を取り出すために、「試験管内親和

性成熟」とでも呼ぶべき方法が使われます。即ち、ランダムに組合わされた軽鎖と重鎖の可変部を発現するファージの集団を、抗原との結合において競合させ、結合力の強いファージだけを残して残りを洗い流してしまいます。その上で、抗原に結合したファージを溶出して大腸菌に感染させ、得られたファージ集団を更に抗原結合能により選択する操作を繰り返します。

ヒト型抗ヒトTNF α 抗体製剤であるアダリブマム(商品名「ヒュミラ」)の作成過程では、更に巧妙な手法が用いられました³⁾。即ち、ヒトTNF α に対してマウスで作製されたモノクローナル抗体の可変部遺伝子を挿入したファージを上記の選択系に共存させて、これより強い抗原結合能を示すヒト型可変部遺伝子を持つファージを選択し、さらには得られたヒトの軽鎖可変部と、マウス抗ヒトTNF α 抗体重鎖可変部の組、ヒト重鎖可変部とマウス軽鎖可変部の組を競合体に使い、「親和性成熟」を繰り返したのです。

一方、今回の事例でも実際に用いられたシンボニー(ゴリムマブ)は、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現するように遺伝的な改変が加えられたマウスを免疫することで得られた、完全ヒト型抗体です。

免疫グロブリン遺伝子可変部の多様性形成に関与するのは、講義でも述べた通り複数の可変部遺伝子断片の再構成による組合わせの効果と、遺伝子再構成の際に起こる結合部の塩基配列多様性(junctional diversity)、それに抗原によるBリンパ球の活性化の後に起こる体細胞高頻度突然変異です(下図)。これら可変部の多様性形成に関与するのは、遺伝子断片のつなぎ替えを起こすRAG1/RAG2、結合部多様性形成に関与するTdT、及び体細胞高頻度突然変異を引き起こすAIDなどの酵素群ですが、細胞や遺伝子改変マウスを用いた実験的研究により、ヒト免疫グロブリン遺伝子可変部の多様性形成は、上記の酵素群を発現するマウスの細胞内でも起こることがわかっていました。従って、免疫グロブリン遺伝子座を載せたヒトの染色体断片をマウスに導入することが出来れば、マウス体内でヒトの可変部が再構成され、発現するものと期待できます。しかし、この際マウスの免疫グロブリン遺伝子



座が残ったままだと問題を生じます。

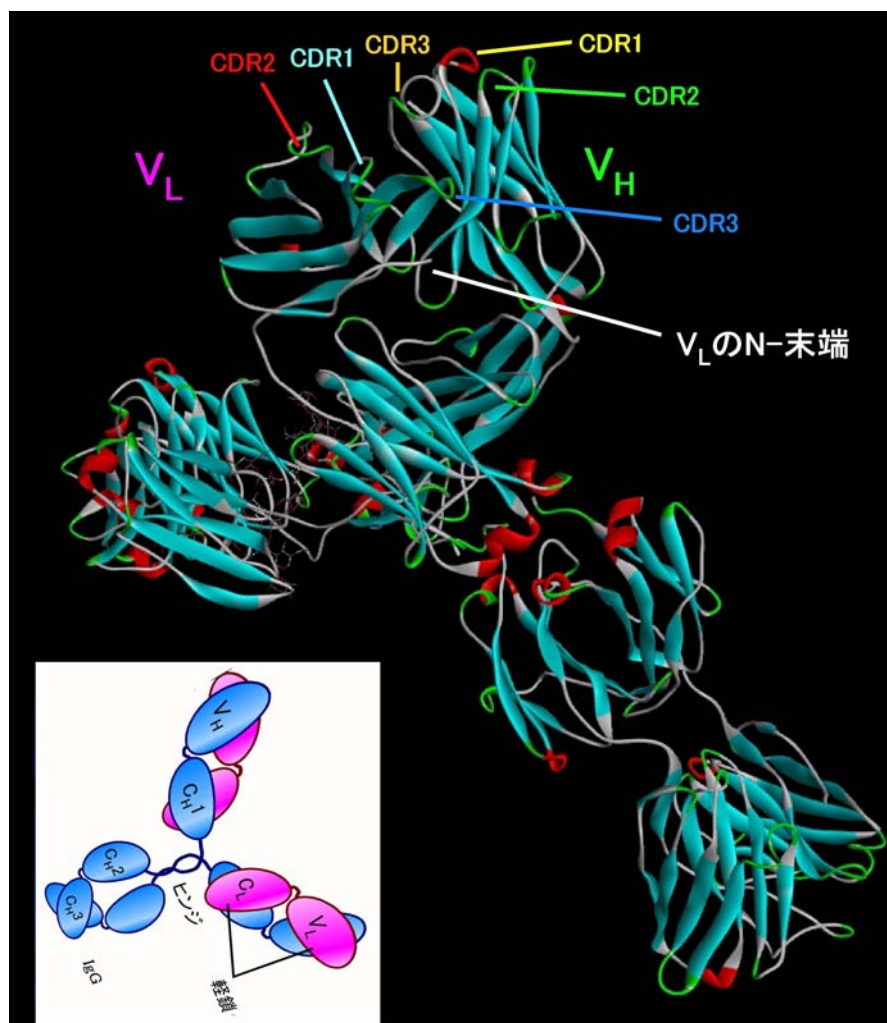
即ち、同一のBリンパ球前駆細胞にマウスの免疫グロブリン遺伝子座とヒトの免疫グロブリン遺伝子座の両方があった場合、先にマウスの可変部再構成が起こりその産物であるポリペプチドが発現してしまえば、それ以上可変部再構成は進まず、ヒトの可変部は発現しません(対立遺伝子排除に相当する現象)。また、例えば重鎖だけヒトの可変部であったとしても、軽鎖の方でマウスの可変部が使われてしまえば、結局キメラ抗体が出来てしまい、完全ヒト型抗体とはなりません。従って、ヒトの免疫グロブリン遺伝子可変部が発現するマウスを作製する前提として、マウスの免疫グロブリン遺伝子座は破壊しておく必要があります。

そこで、免疫グロブリン重鎖と κ 鎖の遺伝子が破壊されたマウスに、ヒトの免疫グロブリン遺伝子座を含む染色体断片を導入する試みがなされました⁵⁾。マウスの場合、軽鎖に占める λ 鎖の割合は5%未満で、 λ 鎖は実際上殆ど発現しないので、たとえごく僅かにマウス λ 鎖を含むキメラ抗体が産生されたとしても、それをスクリーニングに過程で排除するのは簡単であると判断された訳です。免疫グロブリン遺伝子座を破壊したマウスに最初に導入されたヒトの免疫グロブリン遺伝子座断片は、重鎖についてV断片のごく少数と、D断片・J断片の全て、及び定常部の μ 鎖・ δ 鎖と γ 1鎖遺伝子を含む染色体断片で、軽鎖についてもV断片の一部と、J断片及びC κ 定常部遺伝子を含む染色体断片でした⁵⁾。

興味深いことに、重鎖及び軽鎖可変部のV断片を一部しか持たない遺伝子改変マウスでも、これを抗原で免疫すると殆どあらゆる抗原構造に対応できる可変部を持った抗体産生細胞が検出されました。このことは、免疫グロブリン可変部の多様性形成は、遺伝子断片の再構成による組合せの数が限られていても、結合部の多様性と体細胞高頻度突然変異で十分にカバーできることを示しています。そうすると、逆に「何故多数のV断片が染色体上に維持されているのか」と

いう疑問が生じますが、これについては、糖鎖抗原に対する抗体の反応性にはV断片の多様性が重要であり、微生物の糖鎖に対する抗体産生という進化上の要求から、複数のV断片が保たれているのではないかという考察があります⁵⁾。このことは、講義でも触れた通り、抗体分子の抗原結合部位では重鎖と軽鎖のCDR1, CDR2が外側に位置し、これらによって囲まれた抗原結合領域の中央近くに重鎖・軽鎖のCDR3が位置していること(右の図)からも納得できるでしょう。

現在では、ヒトの重鎖と軽鎖の可変部か



ら定常部までのほぼ全ての染色体領域を発現する遺伝子改変マウスも作製されています。

アダリブマム(「ヒュミラ」)のように、ヒト末梢血のBリンパ球が(生理的に)持つ免疫グロブリン可変部遺伝子をファージディスプレイ法で発現させて選択した抗体と、ゴリムマブ(「シンポニー」)のように、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現するマウスで産生されたヒト型抗体とでは、どのような違いがあると考えられるでしょうか？

両者の大きな違いは、形成された多様な抗原結合部位に、生体内でどのような選択が起こっているかにあります。ヒトの末梢リンパ組織で発現しているBリンパ球抗原受容体には自己反応性のものが多く残されているとは言え、それらは自己抗原による選択を経たBリンパ球が発現しているものです。骨髄におけるreceptor editingや、脾臓での濾胞型Bリンパ球分化過程を経て、自己抗原と強く反応する受容体を持ったBリンパ球前駆細胞は相当程度排除されていますから、ヒト抗原と反応するBリンパ球があることは確かだとしても、その受容体が見す抗原との親和性は、他種動物で作られた抗体程高くはないでしょう。また、T-B細胞間相互作用が起こりませんから、自己抗原と強く反応するBリンパ球は増殖してクローンを拡大している訳ではなく、目的のヒト抗原と反応する可変部遺伝子を選択するには、膨大なスクリーニングが必要でしょう。

一方、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現する遺伝子改変マウスの場合、体内で形成されるBリンパ球抗原受容体のレパトアに対して、ヒト抗原による選択は加わっていません。従って、例えばマウスのTNF α とヒトのTNF α とで異なった部分の構造を認識するBリンパ球が二次リンパ組織に存在しており、抗原で免疫を行うことにより、そのようなBリンパ球が分裂増殖することが期待されます。さらに、ヒトのTNF α 由来のペプチドを認識できるヘルパーTリンパ球も免疫操作によって活性化されますから、リンパ濾胞に胚中心が形成され、生理的な機構によってクラススイッチと親和性成熟が起こるでしょう。免疫操作を繰り返す程、親和性の高い抗原結合部位を持ったBリンパ球の数が増えていく筈です。従って、アダリブマブを得る過程で行われたような、人為的な遺伝子変異の導入や「試験管内親和性成熟」の操作は不要です。

実際、ファージディスプレイで選択されたアダリブマム(「ヒュミラ」)に比べ、ヒト免疫グロブリン遺伝子発現マウスを繰り返し免疫することによって得られたヒト型モノクローナル抗体であるゴリムマブ(「シンポニー」)の方が、臨床効果が高いと感じているリウマチ専門医もあるようです。臨床応用はファージディスプレイよりも遅れましたが、今後はヒト免疫グロブリン遺伝子発現マウスを用いたヒト型抗体が、抗体医薬の主役に躍り出てくるかも知れません。

ヒトとマウスのキメラ抗体であるレミケードの場合、その約30%(重鎖と軽鎖の可変部全体)がマウス由来のアミノ酸配列を持つタンパク質なので、ヒトの体内では異物と認識されることが避けられず、連用しているとレミケードに対する抗体(抗キメラ抗体)が産生され、中和によって効果が薄れてくることがしばしばあると言われます。また、免疫複合体形成による体内からの排除に加えて、副反応としてのアレルギー反応がおこる可能性もあります。このため、投与を繰り返すと、アナフィラキシーショックも約0.5%の頻度で起こると言われます⁴⁾。このアレルギー反応や抗キメラ抗体産生を抑制するため、抗原提示細胞との接触の機会を少しでも低減させるため静注で投与し、必ずメトトレキサートと併用しますが、肝障害などのためメトトレキサートが併用できない例では、レミケードも使用できないこととなります。

キメラ抗体と異なり、完全ヒト型抗体であるアダリブマムやゴリムマブの場合、抗原提示細胞の多い皮下に投与することが可能であり、患者が自己注射することも出来ます。治験でも、中和抗体の産生はほとんど認められませんでした。また、投与開始後の継続率が高いことから、効果がよく持続すると考えられています。その他の副作用に関しては、他のTNF α 阻害薬と大差はなく、特に感染症に対しては十分な注意が必要となります。

参考文献

- 1) Wardemann, H. and M. C. Nussenzweig. B-cell self-tolerance in humans. *Adv. Immunol.* **95**: 83-110, 2007.
- 2) 宮澤 正顯. 免疫. 解明 病理学 病気のメカニズムを解く 第2版(青笹 克之・編). 医歯薬出版, 2013. pp89-138.
- 3) The Humira Story or "How D2E7 became a star." Abott Immunology.
- 4) 塩沢 俊一. 膠原病学 免疫学・リウマチ性疾患の理解のために 改訂第4版. 丸善, 2009.
- 5) Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1117-1125, 2005.

事例 8（12月18日・水曜日に提示）

M君のお祖母さんは、シンボニーの注射を受けるようになってから関節の腫れや痛みがなくなり、それから半年以上が過ぎた現在でも、症状はずっと良くなったと満足しています。

この日は事例について多数のキーワードを挙げたり、自己学習の課題を抽出したりする必要はありません。前回までの事例、特に月曜日のゴリムマブについての自己学習の成果を発表し、完全ヒト型抗体の作成過程や、試験管内での親和性成熟などについて理解して下さい。

金曜日に事例発表会を行います。その際には事例の下敷きとなった実際の症例も含め、関連する症例と関節リウマチ治療の現状や問題点について、非常勤講師の泉山朋政先生（元・東北労災病院膠原病リウマチ部長、現・東仙台リウマチ内科クリニック院長）に解説して頂きます。