

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

国際的動向を踏まえた
医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早 川 堯 夫

平成18 (2006) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究----- 1
早 川 堯 夫

II. 分担研究報告

1. バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方----- 67
ーバイオ医薬品の同等性／同質性評価法の動向ー
川 西 徹
(資料)
- 1) GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS: CHMP/437/04
(2004年11月)
 - 2) GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING
BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: QUALITY
ISSUES: EMEA/CHMP/BWP /49348/2005 (2005年3月)
 - 3) GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING
BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL
AND CLINICAL ISSUES: EMEA/CHMP/42832/2005 (2005年5月)
 - 4) ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS
CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE:
NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL
PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT HUMAN INSULIN:
EMEA/CHMP/32775/2005 (2005年5月)
 - 5) ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS
CONTAINING BIOTECHNOLOGY -DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE:
NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL
PRODUCTS CONTAINING SOMATROPIN : EMEA/CHMP/94528/2005 (2005年6月)
 - 6) ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS
CONTAINING BIOTECHNOLOGY -DERIVED PROTEINS AS ACTIVE
SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON
BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT
GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR: EMEA/CHMP /31329/2005
(2005年6月)
 - 7) ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS
CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE:
NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES:GUIDANCE ON BIOSIMILAR MEDICINAL
PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT ERYTHROPOIETINS:
EMEA/CHMP/94526/2005 (2005年6月)

2. 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討.....	124
川崎 ナナ	
3. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究.....	139
—血管新生療法の現状と展望—	
新見 伸吾	
4. 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究.....	165
石井 明子	
5. 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを 最小にするための方策に関する研究.....	179
山口 照英	
6. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究.....	189
—遺伝子治療用医薬品の新薬治験申請に必要な化学、製造、品質管理に 関する情報について—	
内田 恵理子	
7. 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際動向調査研究.....	209
檜山 行雄	
(資料)	
1) 品質リスクマネジメント(Quality Risk Management QRM)ガイドライン 〈英文最終文書〉	
2) 品質リスクマネジメント(Quality Risk Management QRM)ガイドラインの骨子	
3) 即時報告会スライド Q10 部分	
4) ICH Q10 Concept paper	
5) 即時報告会スライド	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	261
--------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 医薬品医療機器総合機構・顧問

新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する以下の研究を行った。

- 1) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保のための同等性/同質性評価の国際的動向として、異なる製造業者間の製品（バイオ後発品）の同等性/同質性評価について検討した。欧米におけるバイオ後発品の承認申請の動きと規制の枠組みについて明らかにするとともに、バイオ後発品の同等性評価における問題点を明らかにした。
- 2) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法に関する研究として、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンをモデル糖タンパク質として用いて、昨年度開発した糖鎖プロファイリング法及び別途開発した糖ペプチド解析法を利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分に関する迅速・簡便な構造特性解析のためのストラテジーを確立した。
- 3) 血管新生療法の現状と展望として、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療を用いた血管新生療法に関する現在の状況や今後の課題を明らかにするとともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスに関する最近の知見について明らかにした。
- 4) 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究として、日米 EU 三極における改変型タンパク質医薬品承認の状況と、それぞれの品目の特性を明らかにするとともに、タンパク質医薬品の品質・安全性確保における改変型タンパク質に特有の課題として、化学修飾工程を有する場合の特性解析、生物学的性質と免疫原性の評価の重要性を明らかにした。
- 5) 遺伝子治療用医薬品の安全性確保に関する研究として、「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策」について検討し、遺伝子治療薬の生殖細胞への移行のリスクを評価するためのスキームを含めた非臨床試験の方法、非臨床試験の結果から臨床試験の実施をどの様な判断するか、また臨床試験の実施に当たっての対応等について考慮すべき点などを明らかにした。
- 6) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究として、遺伝子治療薬の新薬治験申請に必要な化学、製造、品質管理に関する情報について FDA のガイダンス案を基に検討し、新薬治験申請における遺伝子治療薬の品質、安全性確保において考慮すべき点を明らかにした。
- 7) 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際動向の研究として、医薬品品質保証における品質リスクマネジメントの考え方の国際的動向及び製剤開発から製造管理への適用例を示した。また、品質システムに関する考え方の国際的な議論の経過と包括的品質システムのあり方について考察した。

分担研究者

川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部長
川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第1室長
新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第3室長
石井明子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第2室長
山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部長
内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 第1室長
檜山 行雄 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部 第3室長

協力研究者

伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部

A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテクノロジー一等の先端技術をより高度に応用した医薬品の開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開が我が国においても急速に進んでいる。また、これらの新医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、品質、安全性を確保した製品を恒常的に提供する上で不可欠な品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著しい外国

での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保規準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究を行うものである。今年度は以下の項目について研究を行った。

- 1) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—
- 2) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法に関する研究
- 3) 血管新生療法の現状と展望
- 4) 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究
- 5) 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策に関する研究
- 6) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—遺伝子治療用医薬品の新薬治験申請に必要な化学、製造、品質管理に関する情報について—
- 7) 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際動向の研究

B. 研究方法

B. 1 バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—

バイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価に関連する公表論文、米国 FDA の関連文書、EMA CHMP の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国および欧州の関連情報、また遺伝子組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見、さらに ICH 文書の関連部分等を参考に、製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価法について調査した。

B. 2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

1) hCG の還元カルボキシメチル化

hCG (200 µg; Sigma) を 8 M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl、pH 8.6 (270 µl) に溶解し、2-メルカプトエタノール 2 µl を加え、室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 5.7 mg を試料溶解溶液 45 µl に溶かして試料溶液に加え、遮光下、室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラム (Amersham Bioscience) を用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

2) ペプチドの調製

還元カルボキシメチル化した hCG (100 µg) を 95 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 100 µl に溶かし、トリプ

シン (3 µg) を加えて、37 °C で 18 時間消化した。

3) 糖鎖の調製

還元カルボキシメチル化 hCG (100 µg) を 95 µl のリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、5 単位の PNGaseF と 37 °C で 18 時間反応させて糖鎖を切り出した。70% 冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ、上清を SpeedVac で減圧乾固した。糖鎖を 50 µl の水に溶解し、0.5 M NaBH₄ (50 µl) と反応させて糖アルコールとした。カーボンカートリッジ ENVI-Carb (Supelco) を用いて脱塩し、減圧乾固後、50 µl の水に溶解して試料溶液とした。

4) ペプチドマッピング

以下の条件で LC/MS¹⁻⁴ を用いたペプチドマッピングを行い、データ依存的に得られた MS²⁻⁴ スペクトルを用いてデータベース検索を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)
カラム : MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製、0.2×50 mm、3 µ)
溶離液 A : 0.01% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液
溶離液 B : 0.01% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液
グラジエントプログラム :
B 液 : 5% (0~10 分)、5~65% (10~70 分)
流速 : 2 µl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Electron 社)
イオン源 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200 °C
キャピラリー電圧 : 1.8 kV
スキャン範囲 (*m/z*) : 300-2, 000
衝突エネルギー : 35%
測定方法 :

- ① Full MS¹ scan (positive ion mode)
- ② インソース CID
- ③ Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)

Database search analysis :

検索エンジン : TurboSEQUENT (Thermo Electron)
データベース : NCBInr

5) 糖鎖の解析

以下の条件で糖鎖の LC/MSⁿ を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)
カラム : Hypercarb (Thermo electron 社製、0.2×150 mm、5 µ)
溶離液 A : 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)
溶離液 B : 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸

アンモニウム水溶液 (pH 9.6)
グラジエントプログラム：
B 液：5~40% (0~60 分)
流速：2 μ l/min

MSⁿ：

装置：Finnigan LTQ (Thermo Electron 社)
イオン源：nanoESI
キャピラリー温度：200°C
キャピラリー電圧：1.8 kV
スキャン範囲 (m/z)：450-2, 000
衝突エネルギー：35%
測定方法：

- ① Full MS¹ scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴(negative ion mode)

6) 略語

Fuc：フコース；Gal：ガラクトース；Hex：ヘキソース；HexNAc：N-アセチルヘキソサミン；NeuAc：N-アセチルノイラミン酸

B. 3 血管新生療法の現状と展望

これまで試みられてきた血管新生療法として、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスについての最近の知見について、参考文献[1-4]を中心に調査および研究を行った。

B. 4 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究

改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向を、米国食品医薬品庁 FDA [5]、米国 Biotechnology Industry Organization [6]、欧州医薬品審査庁 EMEA [7]、European Commission – Enterprise and Industry DG – Pharmaceuticals [8]、医薬品医療機器総合機構[9]の医薬品に関するサイト、および、文献[10,11]を参考に、調査した。

B. 5 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策に関する研究

ICH 見解案の「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策」を中心に調査研究を行った。また、関連する指針としてヨーロッパ医薬品庁(EMEA)のコンセプトペーパー[33]についても調査研究を行い、我が国や FDA との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

B. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究 – 遺伝子治療薬の新薬治験申請に必要

な化学、製造、品質管理に関する情報について –

FDA が 2004 年 11 月に FDA 審査官および申請者に向けて発出した「遺伝子治療薬の新薬治験申請(IND)における化学、製造及び品質管理(CMC)に関する情報の内容と審査」ガイダンス案[34]を中心に、関連する各種基準やガイドラインについても調査研究を行い、遺伝子治療薬の品質、安全性確保において考慮すべき点やわが国との規制の違いなどを検討した。

B. 7 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際動向の研究

ICH Q9 ガイドラインが 2005 年 3 月に専門家会議における合意 (STEP2)、各局政府による一般からの意見収集を経て 2005 年 11 月に最終文書合意に至った過程、及び新たにトピックにとりあげられた Quality System (Q10)の議論の進捗について検討した。

C. 研究結果及び考察

C. 1 バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方 – バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向 –

バイオ医薬品は開発に通常 10 年単位の時間を必要とする。一方、分子生物学、生化学、タンパク質化学、分析化学、細胞生物学領域の技術革新は目覚しく、バイオ医薬品の製造技術においても医薬品開発期間中に様々な新技術が開発、導入される。したがって一度設定した製造方法についても、規制当局から承認を受け市販された後、(あるいは開発期間中においても)製造方法の変更が望まれることが少なくない。しかしながら、販売承認は、申請用のデータを得た時の製造方法によって製造された製品に関して得られたデータに基づいて評価した結果であり、製造方法の変更後の医薬品の有効性および安全性について保証するものではなく、新しい製法による製品の有効性、安全性に関する検討が必要と考えられる。とはいえ、製造方法を変更した製品の有効性および安全性を評価するために、新薬と同様のデータを求めることは、医薬品の安定的供給を図る意味からも、また社会的な資源の節約という意味からも合理的とはいえない。また、製造方法の変更は、生産コストの削減のみならず、医薬品の品質の改善に結びつくケースも多く、安全性の観点からも好ましいケースが少なくないが、変更の際し、その影響を評価する上で重要でないデータを求めることは、好ましい製造方法の変更の阻害要因にもなりうる。そのため、これら医薬品の製法変更時の評価法について、妥当な方法の確立が求められてきた。

バイオテクノロジー応用医薬品のほとんどは有効成分である目的物質において本質的に分子多様性 heterogeneity があり、同一性の定義・判定法を定めることは難しい。また製造技術が多様であるため、それに応じた不純物、混入物等の解析が必要である。したがって、製造工程の変更が医薬品の安全性、有効性に及ぼす影響を評価するためには、製品の特徴

を考慮しつつ合理的に評価する必要がある。

本研究は以上のような現状を踏まえ、この分野の国際動向を調査し、製法の異なるバイオテクノロジー医薬品の同等性・同質性の評価法を確立するための基礎資料を提供するために行った。昨年度、懸案であった ICH-Q5E「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価」ガイドラインの国内通知が発出され、開発企業による製法変更に伴い実施される同等性／同質性評価については、今後上記ガイドラインを参考として実施することとなり、大きな前進をみた。そこで今年度は、残された大きな課題である、異なる製造業者間の製品（バイオ後発品）の同等性／同質性評価について調査、考察する。

C.1.1 バイオ後発品、登場間際

バイオ医薬品は 1982 年に米国でヒトインスリンを第一号として認可され、その後様々な製品が開発され、世界各国で認可されている。現在、バイオ後発品開発の動きが話題となっている一番の理由は、2001 年から特許切れの製品がでてきたことであり、その数は序々に増えている（平成 16 年度川西分担研究報告書、表 1 参照）。タンパク質性医薬品の場合、化学薬品のように構造が判っていれば製造は比較的容易という訳ではないので、多くのメーカーが後発品の開発をめざすとは思えない。しかしながら、主として欧米の後発品メーカー、あるいはアジア諸国の製薬企業を中心に、バイオ後発品開発の機運が高まっている。またバイオ医薬品の製造技術を有している先発メーカーにおいても、余剰の生産設備を利用した後発品の製造を始めようとする動きがある。

バイオ後発品の開発の機運が高まっている第 2 の理由としては、先進国における医療費高騰があげられる。先進国においては、高齢化も相まって医療費の高騰が社会経済的に大きな負担となっており、医療費の中で大きな割合を占める薬剤費の節約は医療費削減に向けて大きな目標となっている。

我が国においては、バイオ後発品について今現在具体的な承認申請の動きはないが、いくつかの製薬企業がその期を伺っているようである。一方世界的にみると、ヒト成長ホルモンは少なくとも 9 業者、エリスロポエチンは 11、インターフェロンは 10、インスリンは少なくとも 5 業者が後発品の開発を計画しているという情報がある。

C.1.2 欧州におけるバイオ後発品の承認申請の動き

実際に承認申請までに至っているケースとしては、1993 年サンド社がヒト成長ホルモン製剤（Genotropin）の後発品であるオムニトロープの申請を行い、EMEA（欧州医薬品審査庁）の科学委員会である CPMP が承認を勧告したにもかかわらず欧州委員会が認めなかったという複雑な動きが明らかとなっている。その背景としては、先発メー

カーと後発メーカー間の利害関係の対立があったことが推測されるが、それ以外にバイオ後発品の規制上の扱い、および評価法が明確になっていなかったことによると思われる。

当初 EMEA が 2002 年に施行した同等性／同質性評価ガイドラインの適用対象には、先発メーカーが製造工程を変更した場合ばかりでなく、後発メーカーが先発品と同等と主張して承認申請する場合も含まれていた（平成 13 年度川西分担研究報告書参照）。即ち同等性・同質性評価の基本原則は、先発メーカー内の製法変更であろうと、後発メーカーが先発品と同等と主張して後発品を承認申請した場合でも同じであり、同一ガイドラインの対象範囲とされていた。しかし、後発品の場合、品質特性の比較のみでは同等性・同質性を示すことが困難な場合が多く、そのため非臨床・臨床試験関係に関して考慮すべきポイントを扱った補遺ドラフトを作成し、補強を図った。しかしそれでも不十分であり、バイオ後発品を切り離すような方針の転換が図られたものと推測される。

EMEA はバイオ後発品のみを対象として、“Biosimilar” の概念を導入し、その評価に関する以下の基本ガイドラインドラフト 3 つ、およびさらに申請が予想される製品別に非臨床、臨床評価についての 4 つの補遺ガイドラインドラフトを 2004 年 11 月～2005 年 6 月に公表して、パブリックコメントを求めた。

1. GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS: CHMP/437/04 (2004 年 11 月) (川西分担研究報告書資料 1)
2. GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: QUALITY ISSUES: EMEA/CHMP/BWP /49348/2005 (2005 年 3 月) (川西分担研究報告書資料 2)
3. GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES: EMEA/CHMP/42832/2005 (2005 年 5 月) (川西分担研究報告書資料 3)
4. ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT HUMAN INSULIN: EMEA/CHMP/32775/2005 (2005 年 5 月) (川西分担研究報告書資料 4)
5. ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY

-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING SOMATROPIN : EMEA/CHMP/94528/2005 (2005年6月)

(川西分担研究報告書資料5)

6. ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR: EMEA/CHMP/31329/2005 (2005年6月) (川西分担研究報告書資料6)
7. ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES: GUIDANCE ON BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT ERYTHROPOIETINS: EMEA/CHMP/94526/2005 (2005年6月) (川西分担研究報告書資料7)

さらに2005年12月にこれら7つのガイドラインドラフトについての公開ワークショップが開催され、関係者間の意見交換が行われた。

EMA/CHMPとしては、パブリックコメントおよび公開討論会での意見交換を参考に、最終ガイドラインを作成、合意が得られれば、3月を目途に公表の予定である。

以上のような規制当局の動きと連動するように、2006年1月にOmnitropeが、標準薬であるGenotropinとの同等性/同質性が示され、CHMPからは承認に肯定的な意見があったことが報道され(川西分担研究報告書資料8)、さらに同3月にはソマトロピン後発品であるValtropinの承認についても肯定的な結論が間近に出されるとの発表がなされている(川西分担研究報告書資料9)。したがって、欧州では近日中にバイオ後発品が承認されることが確実視されている。ちなみに、Omnitropeは豪州では2004年9月にすでに承認されており、現在先発品にくらべて、約20%安い価格で販売されている。

C.1.3 米国におけるバイオ後発品の承認申請の動き

一方Omnitropeは米国でも2003年7月にFDAに承認申請され、2004年8月にはFDAから審査は終了しており追加コメントはないが、承認の可否

について決定するには至らなかった旨、申請者に告げられたと報道されている。その理由としては、米国においてバイオ後発品を認可する上での、規制上の枠組みが明確でないことが指摘されている。この経過を不服として、サンド社は2005年9月にFDAを提訴した(川西分担研究報告書資料10)。

米国におけるバイオ後発品の評価法ガイドラインについては、一昨年までにその作成を目指すためのFDA主催のワークショップが2回開催された。しかしその後評価法ガイドラインの作成作業は中断しているようである。背景としては、バイオ後発品の認可に対して、先発メーカーからの強い反対があるものと推測される。FDAはそれまでバイオ後発品に関するワークショップを主催し、ガイドライン作成の姿勢を示していたが、2005年12月の3回目のワークショップは、タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価のための特性解析技術に関する討論を中心としたものとなり、バイオ後発品評価ガイドラインの中味に関する具体的な討論は行われなかった(川西分担研究報告書資料11)。

C.1.4 欧米におけるバイオ後発品の規制の枠組み

C.1.4.1 欧州の場合

欧州では、サンド社によるOmnitropeの簡易医薬品申請をうけて、バイオ後発品の承認審査を、どの規制ルートにあてはめるかの議論が開始された。その結果、欧州におけるヒト医薬品の申請に関する法律(Directive 2001/83/EC)中のジェネリック(Article 10(1)(a)(iii))の承認申請のために必要とされる評価資料では十分でない場合があると、2003年6月に当該法律を改正し、SBMP(Similar Biological Medicinal Product)というカテゴリーを追加した(Directive 2003/63/EC)。SBMPでは、品質特性、および生物学的同等性評価のみからでは同等と結論できない場合は、さらに毒性学的プロファイルおよび臨床プロファイルデータが必要であり、それらの試験で必要とされるデータの程度はケースバイケースであること、またその判断については関連ガイドラインを参照することとした。SBMPの承認申請にあたっては、通常のModule1、Module2、およびフルのModule3に加えて、品質特性に関する同等性/同一性評価データ、および略式非臨床、臨床データ、それに加えて同等性/同質性非臨床、臨床評価データが必要となる場合がある。

同等性/同質性評価を行う上で参照すべき関連ガイドラインは、先発メーカーによる製法変更時ではICH-Q5Eガイドライン、SBMPの場合ではC.1.2であげた7つのガイドラインである。SBMPの関連ガイドラインとしては、非臨床/臨床評価(EMA/CHMP/42832/2005)の補遺として、さらにインターフェロンあるいはモノクローナル抗体の非臨床、臨床試験ガイドラインが更なる検討対象とされているようである。

このように欧州ではバイオ後発品申請にあたっての規制ルートの整備は最終段階にある。

C.1.4.2 米国の場合

米国においては、生物製品の承認申請の規制上のルートとしては、

(A)「遺伝子および細胞治療薬、血液製剤、ワクチン、抗毒素およびアレルゲンならびにその抗体、製法においてまた試薬として使用されるタンパク質」を対象とする PHS 法(Public Health Service Act: 公衆衛生サービス法)

(B)「モノクローナル抗体、サイトカイン、成長因子、タンパク質、インターフェロン、動物または微生物から抽出される医療および免疫療法用タンパク質などの生物製品、および化学合成医薬品」を対象とする FDC 法(Food, Drug, Cosmetic Service Act: 食品医薬品化粧品法)

の二つがある。

(A) においては、BLA(Biologic License Application: 生物製剤申請)にあたって、申請者によって示された品質、有効性、安全性を明らかにするデータが必要とされ、臨床試験を省略するような略式申請はない。このことが、Biogeneric は規制上ありえない理由となっており、米国ではバイオ後発品を Biogeneric と呼ばずに、通常 Follow-on biologics と呼ぶ。

化学合成医薬品の Generic(既存の製品のコピーとして製造された製品)は(B)の規制下で ANDA 申請(21USC § 505(j))の対象として分類され、製剤学的同等性および生物学的同等性からなる治療上同等性(Therapeutic equivalent)が明らかにされているのなら、それ以外の非臨床、臨床データなしに承認申請できる。

(B)においては上記 ANDA 申請以外に、ペーパーNDA 申請と呼ばれるもう一つの略式申請のルートがあり(21USC § 505(b)(2))、従来からもモノクローナル抗体、サイトカイン、成長因子、タンパク質、インターフェロン、動物または微生物から抽出される医療および免疫療法用タンパク質に、このルートで承認された製品がある。この申請では、有効性、安全性を示す臨床データについては、申請者以外によるデータを引用することが可能である。したがって、バイオ後発品の申請にあたってこのルートを経る可能性が大きい。実際サンド社の Omnitrope はペーパーNDA 申請されている。今現在は司法の判断を待つ状態となっているようであるが、今後の承認審査の行方が注目される。

FDA のバイオ後発品の同等性/同質性評価における科学的側面の基本原則は、上記ワークショップでの FDA の専門家の発表によると、既に公表されている先発メーカーによる製法変更時の同等性/同質性評価に関するガイダンス、および ICH-Q5E の基本原則と同様のものである。ただし、後発品の同等性/同質性評価は、先発メーカーによる同等性/同質性評価に求められる要件を下回ることはないとされている。また後発品については、臨床試験が求められるケースが増えるので、臨床試験に関する基本原則を扱うガイドラインの整備は必要、というのが、FDA の専門家の基本的な考え方と思われる。

C.1.5 バイオ後発品の同等性評価

以上のように、欧米でのバイオ後発品の評価の基本原則は、科学的には先発メーカーの製法変更時の同等性/同質性評価と同じということが共通認識になりつつある。しかしながら、科学的には同様の扱いとはいえ、バイオ後発品の同等性評価においては、

- 1) 比較すべき標準物質(先発品)、特に原薬の入手が困難な場合が少なくないこと、および入手できても関連情報が圧倒的に少ない。
- 2) したがって、品質特性の評価では同等性/同質性を示すことができないケースが増え、非臨床、臨床評価の比重が高まる。
- 3) 特に安全性については、市販後の調査に委ねられる部分が多い。

という違いがあり、現実には同等性/同質性評価の内容はかなり異なったものになることが予想される。

とりわけ、我が国においては、臨床試験による同等性/同質性評価の議論が不足しており、コンセンサスの確立が早急に必要になると思われる。

C.2 生物製品の特性・品質解析、品質評価法の検討

バイオテクノロジー応用技術の進歩に伴い、様々な糖タンパク質がバイオ医薬品として開発されている。糖タンパク質の糖鎖部分は、活性等に影響を及ぼすだけでなく、糖鎖抗原として有効性や安全性にも影響を及ぼすことが知られている。また、糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法の影響を大きく受けて変化することから、糖タンパク質関連医薬品においては、糖鎖部分の恒常性を確保することが重要とされている。しかし、糖鎖の構造は複雑で不均一性が高く、解析が容易ではないことから、糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価、製造方法変更時における同等性/同質性評価、並びに昨今の国際的重要課題の一つであるバイオジェネリック医薬品の評価において、最終産物の糖鎖の恒常性を評価するための技術開発が国際的にも強く望まれている。

我々は、LC/MS を用いて、糖タンパク質の糖鎖に関する構造特性解析法の開発を行ってきた。これまでに、グラファイトカーボンカラム(GCC)を接続した LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の特性解析、及び同等性/同質性評価に活用することを検討してきた。特に昨年度の本研究では、イオントラップ型(IT)質量分析装置を用いて、よりインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。また、別途我々は、LC/ITMS とタンパク質データベースを利用した糖ペプチド解析法を見出した。これは、従来困難とされてきた糖ペプチドの同定と部位特異的糖鎖構造解析を可能にするものである。そこで本年度は、モデルとして局方医薬品でもあるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

(hCG)を用いて、改良型糖鎖プロファイリング法と部位特異的糖鎖解析法を取り入れた、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分に関する迅速・簡便な構造特性解析のストラテジーを確立する。

C. 2.1 hCG のペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、タンパク質性医薬品の一次構造を確認することを目的として、従来から取り入れられている試験法の一つである。最近では、LC/MS と組み合わせ、MS¹ で得られた分子量や MS² で得られたペプチド配列情報からピークを帰属するのが一般的になっている。この MS² を利用したペプチドマッピングは、プロテオミクスにおけるペプチド同定の定法としても知られている。これは、MS² によってペプチドから生じた b イオン及び y イオンを、データベースに登録されているタンパク質から生じるペプチドに由来する b 及び y イオンの理論値と照合することによって、ペプチドの配列を推定するものである。糖ペプチドの場合は、MS² によって糖鎖部分が優先的に開裂するため、データベースとの照合が難しく、これまで、データベース検索による糖ペプチドの同定は難しいとされてきた。しかし、先に我々は、MS² で糖鎖を開裂させて糖鎖構造情報を得、さらに、GlcNAc 結合ペプチドを前駆イオンとして MS³ を行い、生じた b 及び y イオンを利用してデータベース検索することにより、ペプチド配列情報を得られることを見出した。この方法を利用することによって、糖ペプチドの同定はもとより、結合部位毎の糖鎖の構造・不均一性解析が可能になると思われる。そこで我々は、hCG をモデルとして、糖タンパク質のペプチドマッピングへの LC/MSⁿ とデータベース検索の応用可能性について検討を行った。

hCG は α サブユニット、及び β サブユニットのヘテロダイマーからなる糖タンパク質である。 α サブユニットは 92 アミノ酸残基からなり、Asn52 と 78 に N 結合型糖鎖が結合している (Fig.1)。 β サブユニットは 145 アミノ酸残基からなり、Asn13 と 30 に N 結合型糖鎖、並びに Ser121、127、132、及び 138 に O 結合型糖鎖が付加している。酵素消化を完全に行うために hCG を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、N 結合型糖鎖が結合した 4 つの糖ペプチド (A6、A9、B3、及び B4)、並びに O 結合型糖鎖が結合した 3 つの糖ペプチド (B13、B14、及び B15) を含むペプチド混合物を調製した。

Fig.2 は、C18-LC/ITMS 装置を用いて得られた hCG トリプシン消化物のペプチドマップである。ここではポジティブイオンモードでフル MS¹ スキャン、インソース CID、及びデータ依存的 MS²⁻⁴ 測定を行った (Table 1)。尚、インソース CID とは、イオン化してから検出器に導入されるまでの間に気体を衝突させてイオンを開裂させる方法である。また、データ依存的 MSⁿ では、MSⁿ⁻¹ の各スキャンで最も強く検出されたイオンを前駆イオンとして

自動的に MSⁿ を行った。Fig.2A は MS¹ のトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、ペプチド及び糖ペプチドに由来するピークが表れている。Fig. 2B は、インソース CID によって生じた糖鎖に特徴的な GlcNAc の B イオンのみを抜き出したクロマトグラムで、主に糖ペプチドに由来するピークが表れている。これらの糖ペプチドの配列を推定するために、タンパク質データベース解析エンジン TurboSEQUENT を用いて、得られたマスペクトルとタンパク質データベース NCBI nr に登録されているタンパク質の照合を行った。その際に、糖ペプチドの同定を可能にするため、検索条件に Asn、Thr、及び Ser に GlcNAc が結合している可能性を追加して検索した。その結果、Fig.2B の 19-22、20、及び 53 分に溶出されたピークは、GlcNAc が結合したペプチド A9、A6、及び B4 と帰属された。また、3、22-27、及び 32-35 に溶出されたピークは、ペプチド B13、B3、及び B15 と同定された。これらのペプチドからは糖鎖が完全に脱離したペプチドイオンが生じたため、データベース検索上では糖ペプチドとして特定されなかったが、MS² スペクトル上に糖鎖に特徴的なイオンが検出されることから、糖ペプチドと判定した。26 分のピークは、データベース検索によって同定されなかったが、MS² スペクトルを解析した結果、B14 であることが推定された。このペプチドには糖鎖が 2 本結合しているため、データベース検索では同定できなかったものと思われる。

各ペプチドに結合している糖鎖の構造は、MS² スペクトルから推定した。Fig. 3 は 7 つの糖ペプチドの典型的な MS² スペクトルと、その帰属結果を示している。A-D は N 結合型糖鎖が結合した A6、A9、B3、及び B4 で、E-G は O 結合型糖鎖が結合した B13、B14、及び B15 である。N 結合型糖鎖は、混成型及び複合型糖鎖で、O 結合型糖鎖は、シアル酸が結合した 3-4 糖からなる糖鎖であることが確認された。

C. 2.2 hCG の糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の恒常性を評価するため、遊離糖鎖のプロファイリングが糖鎖試験として設定されている。これまでは、2-アミノピリジンや 2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識と HPLC によるプロファイリングや、HPAEC-PAD によるプロファイリングが取り入れられてきた。我々はより情報量が豊富な LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングを開発し、エリスロポエチン、肝細胞増殖因子、甲状腺刺激ホルモン、トロポモジュリン等の構造特性解析に応用してきた。今年度は、昨年度開発した LC/MSⁿ に基づく改良型糖鎖プロファイリング法 (Table 2) を用いて、hCG の N 結合型糖鎖のプロファイリングを行った。

Fig.4A 及び 4B は、ポジティブ及びネガティブイオンモードのフル MS¹ スキャンによって得られた糖鎖プロファイルである。各ピークの糖鎖配列は、MS¹ によって測定された分子量及び MS² スペクト

ルから解析した。糖鎖配列解析の一例として、Fig.5に37分に溶出された糖鎖のMS²スペクトルを示す。一連のBイオンシリーズ、及びYイオンシリーズが検出され、シアル酸が結合した複合型糖鎖と推定された。

以下同様に主なピークのMS²スペクトルを解析した結果、hCGの主な糖鎖の構造はシアル酸結合混成型及び複合型2本鎖と推定され、ペプチドマッピングの結果とよく一致した。さらに、2本鎖糖鎖に加えて、ペプチドマッピングでは検出されなかったトリシアロ3本鎖型糖鎖が検出された。糖鎖プロファイリングは糖鎖の詳細な解析に適していることが示唆された。

C.2.3 糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造に関する構造特性解析のためのストラテジー

hCGを用いた実験により、LC/MSⁿシステムを用いたペプチドマッピングによって、部位毎の糖鎖の概略が明らかになること、さらに、改良型糖鎖プロファイリングによって、糖鎖構造や不均一性の詳細が明らかになることが確認された。この2つの手法を用いることによって、分子内に複数の糖鎖結合部位を持つ糖タンパク質の構造解析や、類似糖タンパク質の同等性・同質性評価が可能になることが示唆された。

Fig.6は、LC/MSⁿを利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖に関する構造特性解析の流れを示したものである。まず、酵素消化を完全に行うため、糖タンパク質は予め還元カルボキシメチル化する。サンプルを2つに分け、一方をトリプシン等でペプチドに断片化する。このとき、LC/MS²に適したサイズのペプチド、すなわちC18カラムに保持される程度の疎水性を持ち、MS²が可能な分子量で、かつ、分子内に糖鎖を1分子しか含まないペプチドが得られるように消化酵素を選択するのが望ましい。Lys-C、Glu-C、またはAsp-Nやそれらの組み合わせも検討する。そして、得られたペプチド断片のLC/MSⁿを行う。

つぎに、ペプチドマップで得られたデータを基に、以下の手順で糖ペプチドを解析する。まず、すべてのペプチド・糖ペプチドのマスマスペクトルデータを使ったデータベース検索を行い、ペプチド及び糖ペプチドの配列を推定する。このとき、データベース検索エンジンの検索条件に糖鎖付加の可能性を追加する。つぎに、MS²スペクトルの中から、糖鎖に特徴的なイオンを指標にして糖ペプチドを選別する。その中で既にデータベース検索エンジンによって同定された糖ペプチドは、MS²⁻⁴スペクトルから糖鎖構造を推定する。データベース検索で同定されなかった糖ペプチドについては、MS²スペクトル中の各プロダクトイオンを帰属してペプチド関連イオンを探し出し、マニュアルでペプチド配列と糖鎖配列を推定する。

残りの還元カルボキシメチル化糖タンパク質にはPNGaseFを作用させてN結合型糖鎖を遊離させる。LC/MSを用いた糖鎖プロファイリングを行い、

糖鎖構造を詳細に解析する。両者を比較し、構造特性を明らかにする。

我々は、今回用いたhCG以外に、ラットやマウス組織中の微量糖タンパク質の構造特性解析に本ストラテジーが応用可能であることを確認している。このストラテジーは今後、開発途中の微量糖タンパク質やバイオジェネリックの糖鎖解析にも応用可能と期待される。

C.3 血管新生療法の現状と展望

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

虚血性疾患のひとつである虚血心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率および死亡率が高く、米国の場合その患者数は1000万人以上、世界全体では数億人にも達する。

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

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

る。今後、高齢化に伴いこのような症例が増加することが危惧される。

虚血性疾患の原因となる冠状動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの、鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては、成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。65才以上では1000人あたり10人の症例の発症率であることから、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合、大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていないものの、放置しても血管は再形成されないため、治療は必須である。鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人（165%の増加）と年々増加しており問題となっている。

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

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

虚血性疾患のひとつである虚血心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率および死亡率が高く、米国の場合その患者数は1000万人以上、世界全体では数億人にも達する。

虚血心臓病の症状は、心筋の損傷がない労作性狭心症から、左心室において可逆的および非可逆的な障害のある心筋虚血の段階、非可逆的な心筋障害の段階、うっ血性心不全に至る壊死まで幅広い。その進行速度は主として動脈硬化性プラークの成長あるいは一過性の破裂に依存している。このような症状が進行すると慢性的な安定狭心症あるいは心筋梗塞を含む急性冠状動脈症候群になり、心外膜冠動脈において血流が障害される。その結果、冠動脈血液により酸素が必要量供給されない場合、心臓組織が虚血になり、冠状動脈のかん流が心筋の酸素要求性に対応できなくなる。虚血組織に対して血液の供給を回復は、冠状動脈かん流を改善させる必要がある。その戦略として従来から用いられてきた治療法は、冠動脈バイパスあるいは冠動脈血管形成術のよ

うな外科的に、障害が起きた心筋に対する血流が物理的に回復させる方法、硝酸やβ-ブロッカーのような薬物を投与することで心筋の酸素要求性を低下させ、かん流の供給/需要のバランスを回復させる方法などである。

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

虚血性疾患の原因となる冠状動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの、鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては、成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。65才以上では1000人あたり10人の症例の発症率であることから、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合、大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていないものの、放置しても血管は再形成されないため、治療は必須である。鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人（165%の増加）と年々増加しており問題となっている。

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

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

C. 3.1 血管新生 (neovascularization) の生理的な概念

血管発生 (vasculogenesis)、狭義の血管新生

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

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

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

の増殖あるいは内皮細胞-平滑筋細胞の相互作用を調節する。HIF-1 α の活性化は TNF- α 、IL-1、PR39 のような炎症性サイトカインにより誘導される。

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

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

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

血管新生の開始についてはよくわかっているが、その後、効率的良く動静脈のネットワークが形成されるプロセスについてはよくわかってはいない。例えば、血管新生がシステムティックに起こり、その結果、動脈および静脈が形成される、分子および血流力学的機構に関する研究はまだ始まったばかりである。動脈-静脈を規定する因子に関する知見は、

ゼブラフィッシュの研究がほとんどである。血液循環が始まる前の段階で、VEGF、Notch-Jagged、Ephrin が動脈-静脈を規定すると考えられる。

C.3.2 血管成長の機構

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

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

血管新生、毛細血管の増殖と肥大は虚血に対して

生体が反応することにより起きる。心筋梗塞後に形成される瘢痕は生きているが、冬眠の心筋に囲まれている。新血管のネットワークは数日以内に形成され、危険にさらされている組織に栄養を与える。血管新生は内皮細胞の増殖と遊走である。内皮細胞は既存の毛細血管から広がり、血管を発芽させる。新しく形成された血管は週皮細胞にコートされるまでの間は退縮しやすい。このような可塑性のある時期である中間段階では血管ネットワークが整備され、組織の代謝要求に応じることができるようになる必要がある。過剰に毛細血管ネットワークが成長すると、局所の組織かん流が増加するが、閉塞血管領域の血流を代償し、心臓の機能を維持するためには、虚血領域の上流からもっと大きな血管が成長する必要がある。虚血域において血管新生が起きると、毛細血管床の局所における抵抗性が低下し、同じ圧力で動脈上流における血流が増加することになる。

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

C.3.3 成人の心筋における血管新生 (neovascularization) の過程

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

C. 3. 4 虚血における増殖因子の発現調節

ほとんどの増殖因子は虚血組織でアップレギュレートされる。最もよく知られている組織低酸素反応系では低酸素刺激により転写因子 HIF-1 α のレベルが上昇する (Fig. 7)。HIF-1 α は血管新生標的遺伝子のプロモーターに結合し転写を誘導する。このような血管新生標的遺伝子にはエリスロポエチン、VEGF-A、VEGFR-1 受容体をはじめ、その他約 40 の遺伝子が含まれる。HIF-1 α の反応が律速段階かどうかは不明であるが、冠動脈疾患に対する動脈形成反応が弱い患者から取り出した単球は、低酸素刺激による VEGF のアップレギュレーションが低下する。同様に、高齢あるいは糖尿病ウサギの下肢において、低酸素刺激による HIF-1 α タンパク質の誘導、および DNA 結合能の増加が低下し、その結果、VEGF のアップレギュレーションが低下する。血管新生の要求が高まる時期において、HGF/SF も不足する。閉塞性動脈の患者では低酸素の期間、血管における HGF 産生はダウンレギュレーションされる。同様に c-met 受容体もダウンレギュレーションされる。興味深いことに、低酸素の期間における HGF のダウンレギュレーションは抗 TGF- β 抗体および FGF-2 の遺伝子導入により抑制されることから、TGF- β および FGF-2 は HGF 産生においてそれぞれ抑制および促進因子として作用することが示されている。対照的に、心筋梗塞の患者では、HGF は顕著に増加する。高齢のレシピエントマウスに移植された心臓における血管新生反応は低下するが、その原因として PDGF-AB の強制動員の低下が考えられる。したがって、PDGF-B あるいは A 鎖の補充により、病態が改善される可能性がある。

C. 3. 5 血管新生療法において有望な増殖因子

C. 3. 5. 1 VEGF

VEGF ファミリーは現在研究が最も進んでいる血管新生促進因子であり、その中で典型的なものは VEGF-A である。少なくとも四種類のアイソフォームの VEGF-A が選択的スプライシングの結果として生成され、121 (VEGF₁₂₁)、165 (VEGF₁₆₅)、189 (VEGF₁₈₉) および 206 (VEGF₂₀₆) がある。VEGF₁₄₅ のような他のアイソフォームも知られているが、その意義については不明である。VEGF のアイソフォームはヘパリン結合能が異なると血管新生能が異なり、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ に比べて血管新生能ははるかに高い。一方、VEGF₁₈₉ と VEGF₂₀₆ はヘパリン硫酸に対する親和性が高いため、細胞あるいはマトリックスに結合したままの状態が存在する。VEGF₁₆₅ と VEGF₁₂₁ はヘパリンには結合せず、血液循環中で検出される。しかしながら、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ と異なり他の細胞表面受容体である neuropilin-1 に結合し、neuropilin 結合領域の欠損した VEGF₁₂₁ に比べて活性が高い。VEGF ファミリーは他に VEGF-B (VEGF-3)、VEGF-C (VEGF-2)、VEGF-D、VEGF-E および

PlGF が知られている。VEGF-E はウイルスタンパク質であり、そのホモログは哺乳類に存在しない。VEGF は三種類のいずれかあるいは全ての種類の VEGF 受容体チロシンキナーゼ、flt-1 (VEGFR-1)、KDR/flk-1 (VEGFR-2)、flt-4 (VEGFR-3) に異なった親和性で結合する。VEGFR-2 はその中でも血管新生のシグナルトランスダクションを最も強く活性化する。また、VEGFR-2 ほどではないが VEGFR-1 も PlGF および VEGF-D が結合することにより同様に活性化し、VEGF-D は VEGF ファミリーの中で骨格筋における血管新生およびリンパ管新生の最も強力な誘導因子である。

VEGF は内皮細胞に対して血管新生促進を促進し、それには遊走促進、透過性促進、生存促進、プラスミノゲンアクチベーターおよび間質性コラゲナーゼの生成促進などが関与している。VEGF は平滑筋の遊走は促進するが、平滑筋細胞および繊維芽細胞の増殖は促進しない。VEGFR-3 の役割については十分解明されていないが、リンパ管新生に関与していると考えられている。PlGF は後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。

VEGF-A はその他に以下のような様々な血管新生促進作用を示す。①内皮細胞の培養において管様構造を誘導する。②*in vivo* マウスのマトリゲルブラグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミングを促進することから、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。

VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈ のノックアウトマウスは虚血系心筋を発症し、心筋血管新生障害による心臓疾患のため、生後 14 日以内に死亡する。VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈ の欠損により誘導される致死性のフェノタイプは、VEGF₁₄₅ と VEGF₁₂₀ が発現してもレスキューされない。三種類の VEGF 受容体のどれかを破壊すると胎生致死になる。最も顕著なフェノタイプは VEGFR-2 の欠損であり、血管形成が完全に障害される。ホモ接合性 VEGFR-2 遺伝子欠損では血管の形成が不十分で、胎生 8.5 日で死ぬ。VEGFR-3 の欠損では胎生 9.5 日後初期血管叢の再構成が障害され循環不全となる。したがって、血管の初期における発達には全ての VEGFR が協調的に発現する必要がある。

C. 3. 5. 2 FGF

FGF には酸性 FGF (FGF-1) および塩基性 FGF (FGF-2) だけでなく 21 種類の構造が関連したポリペプチド増殖因子が含まれる。FGF はチロシンキナーゼファミリー細胞表面受容体および非チロシンキナーゼ受容体 syndecan-2 に結合し、生物学的な作用を示す。FGF は VEGF と同様に、内皮細胞の増殖、遊走およびプラスミノゲンアクチベーターおよび間質性コラゲナーゼの生成を促進する。

また、FGFはVEGFと異なり、中胚葉および神経外胚葉由来のほとんどの細胞、例えば周皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖を促進する。FGF-4は後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。

C.3.5.3 PDGF

PDGFはPDGF-AからDより構成されるファミリーのメンバーであり、VEGFと構造的に類似している。その中でもPDGF-BBが最も作用が顕著であり、血管成長促進活性を示すと共に、周皮細胞による新しく形成された血管構造のコーティングを促進することにより、動脈形成を促進および安定化する。さらに、PDGF-BBは側副を誘導し、心筋虚血の前臨床モデルでは、機能だけでなくかん流を改善する。

C.3.5.4 その他の増殖因子

G-CSF、GM-CSFおよびMCP-1は単核球の流入を促進することにより、動脈形成を促進する。なかでも、MCP-1は側副の成長部位に達すると、マクロファージにより様々な増殖因子の遊離が遊離され、細胞の増殖が促進される。HGF、IL-6、MCP-1も血管新生因子と考えられており、以下のような作用を示す。①内皮細胞の培養において管様構造を誘導する。②*in vivo*マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミングを促進し、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。Ang-2のみが発現した状態では、内皮細胞同士の結合が緩みアポトーシスが誘導されるが、VEGFの共在下では内皮細胞の生存に必要なシグナルが生じ、細胞の解離により増殖および遊走が起きる。一方、アンジオポエチン-1(Ang-1)は静止状態に発現するが、血管透過性の減少、内皮細胞の結合および内皮細胞周囲の細胞の動員による血管安定化といった作用が示唆されている。Ang-1は静止状態をより安定化させることが示唆されているが、単独あるいはVEGFと組み合わせると過剰発現すると血管新生および動脈形成を促進する。Ang-1は後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。さらに、NGF (nerve growth factor)、NPY (Neuropeptide Y)をはじめとする様々な因子が虚血組織において新しい血管の成長を誘導することがみつまっている。

なお、各因子が血管新生 (neovascularization) のどの段階に作用するかについて、Table 3にまとめて示す。

C.3.6 内皮が増殖因子による血管新生促進に及ぼす影響

増殖因子による新血管形成の促進が、内皮の状態によりどのように影響を受けるかについては、ほと

んど解明が進んでいない。動物を用いた血管新生療法において有効性が示されている研究のほとんど全ては、正常な若い動物が用いられている。一方、研究目的の項で述べたように、臨床試験では進行したアテローム性動脈硬化症の患者で主に高齢者が対象となる。年齢の上昇に伴い、増殖因子による治療効果が低下し、その結果、臨床試験が失敗する可能性も場合によっては否定できない。この可能性は、ApoE^{-/-}マウスにおいて血管新生促進因子の効果があまりよくないという知見からも示唆されている。

C.3.7 血管新生増殖因子タンパク質を用いた血管新生療法の概要

血管新生療法の最終目的は重篤な作用部位において血管新生増殖因子のレベルを増加させることであり、そのための様々なデリバリーの方法が考えられる。正攻法としては組換えタンパク質を局所あるいは組織にデリバリーすることである。このようなタンパク質は静脈、動脈内特に冠動脈内、心筋内、心膜内に対するアプローチを用いて投与できる。その場合、デリバリーのタイプにかかわらず、理論的に正確な用量反応性に関するデータは入手可能である。タンパク質治療の場合は細胞への遺伝子導入、ウイルスあるいはプラスミドの転写、目的遺伝子のタンパク質への翻訳が必要ない。タンパク質治療の最大の問題点は血管新生反応の誘導に要する期間において治療効果を示す有効な濃度を維持することが必要ということである。なお、その期間はケースバイケースで異なり一概に定めることはできない。タンパク質が新しい血管の成長を直接促進させる場合、新しい血管の成長の開始だけでなく、新しく形成された血管を安定化し成熟させるためには持続的に存在することが必要となるので、必要な期間は数週間の場合もある。他方、「C.3.5 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、GM-CSF、G-CSF、PIGF、MCP-1は単核球の強制動員を介して血管の成長および安定化を促進することから、その期間はさほど長くなくてもよいのかもしれない。

C.3.8 血管新生増殖因子タンパク質を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究としてタンパク質治療が用いられている (Table 4)。FGF-1 (10 μg/kg) の安全性が冠動脈 CAGB バイパス・グラフト (coronary-artery bypass graft) を受けた三枝冠動脈疾患の 20 人の患者で最初に示された。その患者に対し増殖因子が内胸動脈 LAD (left anterior descending coronary artery) (左冠動脈前下降枝) 吻合の近くに心筋内投与された。血管造影では増殖因子を処置した患者ではコントロールの患者に比べ、毛細血管充満圧の増加が示唆されたが、その他には冠動脈のかん流あるいは心室機能の改善を示す証拠はなかった。別の CAGB プラス試験では CAGB を受けた 24 人の患者において行なわれた。その患者において、生きているが虚血である

心筋に対して、血液を供給する主な動脈の一つは技術的な理由によりバイパスできないと考えられた。全投与量として 10 あるいは 100 μg の FGF-2 あるいはプラセボを含有する 10 個のヘパリンアルギン酸ビーズを無作為に投与した。3 ヶ月後、100 μg の FGF-2 を投与した患者における虚血障害の程度は、プラセボに比較して顕著に減少した。このグループの患者は寛解し、一方、コントロールグループの 7 人の内の 3 人は狭心症が持続し、そのうち 2 人はさらに血管再生治療が必要となった。3 年後において、高濃度の FGF-2 を投与したグループでは症状改善が続いた。

冠動脈内 FGF-2 投与の安全性および治療効果は二つの非盲検用量増加試験で試された。両方の場合で、投与によるシステムティックな低血圧の所見はなく、FGF2 は高濃度まで安全であった。多くの患者において、磁気共鳴および放射性映像により心筋かん流の改善を示す客観的な知見だけでなく症状の改善が示された。

治療効果について 337 人の二重盲検フェーズ II 試験で試験された。それにおいては、プラセボのコントロールに対し、冠動脈内へ三つの異なった量 (0.3, 3, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) FGF-2 を投与し比較が行なわれた。90 日の追跡データによると、FGF-2 投与患者においてトレッドミル時間が若干改善された。同時に、CCS (Canadian Cardiovascular Society) (カナダの心臓血管学会) 狭心症基準および SAQ (Seattle Angina Questionnaire) (シアトル狭心症質問表) 狭心症頻度基準の有意な改善がみられた。磁気共鳴では虚血領域の全体的な改善はみられなかった。試験のサブグループの解析によると、症状、ETT (excise treadmill time) (運動トレッドミル時間) の改善、磁気共鳴により測定される障害虚血域の低下示される改善度は、病状がより悪化した患者で最も顕著であった。そのような患者では他の患者と比べ、基準となる運動能が低い、基準となる症状の頻度が高い、放射性映像によるかん流欠損の程度が大きいといった特徴がある。しかしながら、このように FGF が治療効果を有するかどうかについては二重盲検試験を用いた検討が必要である。

二重盲検試験の重要な点は二重盲検プラセボを対照として単に症状の改善を示すだけでなく、増殖因子治療に対し症状の改善を示した患者の集団において、その全体像を評価することである。また、この患者群母集団におけるプラセボ効果の程度と有病率の評価も重要な点である。実際、二重盲検試験におけるプラセボでの反応との比較により、初めて有効性を評価することができる。先に示した試験では、多数のハイリスク患者で冠動脈内 FGF-2 投与の相対的な安全性のみが示されたといえる。

プラセボ反応の有病率と非盲検解析の危険性は冠動脈内および静脈内 VEGF-A₁₆₅ の臨床試験で十分に示されている。冠動脈内 (n=16) および静脈内 (n=14) に VEGF の投与を行った 2 つの小規模なフェーズ II 試験では、SPECT (single-photon emission computed tomography) (単光子放出コン

ピュータ断層撮影) イメージングにおいて得られる期待できる結果だけでなく、運動能、症状 (脳梗塞のクラスとして規定) において有意な改善を示すと判定された。これらの試験に続き VIVA (Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis) (虚血における血管内皮細胞増殖因子を用いた血管新生) 試験が 178 人の患者で無作為に行なわれた。この試験では 120 日まで追跡を行い、治療のオプションがない患者に対して、プラセボ、低用量 VEGF₁₆₅ (17ng/kg/min) あるいは高用量 VEGF₁₆₅ タンパク質 (50ng/kg/min) を無作為に割り当てた。VEGF₁₆₅ のグループの患者に対して、0 日目に冠動脈内に注射後、3, 6, 9 日目に静脈かん流を行なった。この試験ではこの母集団に対する VEGF の効果は全体として示されなかった。VEGF₁₆₅ を処置した患者はプラセボと比較して、ベースラインから 60 日までの主要なエンドポイントである ETT において、有意な改善はなかった。120 日まで、プラセボと比較したが、高投与量 VEGF₁₆₅ 処置患者において ETT が改善する傾向はなかった。同様に、処置後 60 日で、VEGF₁₆₅ 処置患者とコントロールの患者を比較すると、狭心症のクラスでベースラインからの改善に違いはなかった。一方で、120 日では、高投与量 VEGF₁₆₅ で処置した患者とプラセボと比較すると、統計的な有意な狭心症のクラスの改善があった。60 日目で行なった心筋かん流の試験では、VEGF 処理の患者とプラセボ処理の患者を比較すると、有意な改善はなかった。

これまで述べた戦略とは多少異なった戦略が小規模の試験で進められた。その中では 進行性 CAD (coronary artery disease) (冠動脈疾患) の患者に対して、最初 GM-CSF の冠動脈内投与、続いて 2 週間後に皮下投与を行いその効果が調べられた。生理食塩水で処置した患者ではみられなかったが、GM-CSF 投与の患者において小さいが有意な側副動脈血流の増加が示された。「C.3.5 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、GM-CSF の関連タンパク質である G-CSF の薬効は骨髓幹細胞の遊離だけでなく心臓における動脈狭窄の部位に対する単核球の強制動員の増加を介していると考えられているが、本知見はこの考えと矛盾しないしかしながら、最近の試験では、CAD 患者におけるこれらサイトカインの安全性に関する懸念が提起された。

タンパク質製剤における増殖因子の安全性はこれまで重大な問題とはなっていなかった。目に見えないほどの小さな腫瘍の増殖促進、アテローム性動脈硬化症の促進、冠状動脈プラークの血管新生の促進を介した不安定なプラークの産生など、多くの危険性が理論的には存在するが、今まで試験で見つかったものはない。今までに唯一認められている副作用としては、VEGF による深刻な低血圧および浮腫そして非常に高濃度 (48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) の FGF-2 による CNS (central nervous system) (中枢神経系) の副作用 (ありありとした夢、悪夢、情動不安) がある。

C.3.9 遺伝子治療を用いた血管新生療法の現状

現在タンパク質治療に代わるものとしては遺伝子治療があげられる。遺伝子治療を用いた戦略はたんぱく質治療の場合と基本的に同じである。遺伝子治療ではプラスミドあるいはウイルスを用いた遺伝子導入が主に用いられている。遺伝子治療は最適な条件において、標的とする組織においてタンパク質を長期間高濃度で発現することが理論的には可能である。この点、タンパク質を連日投与する場合に比べ、安価で実地的である。例えば VEGF の場合、分泌タンパク質であるので、全ての細胞に導入する必要がない。したがって、その遺伝子を筋注によりデリバリーした場合、筋肉で得られる効率が局所のタンパク質濃度を上げることが可能かもしれない。しかしながら、現在のプラスミドあるいはアデノウイルスを用いた遺伝子治療ではタンパク質の発現の持続時間は1-2週間と短く、予想した程にはうまくいっていない。遺伝子治療技術の欠点としてはアデノウイルスタンパク質に対して炎症反応が生じること、ベクターの投与量が同じでも患者が異なれば遺伝子発現レベルも異なるという点もある。遺伝子およびタンパク質のデリバリーで共通の問題は、最適の投与ルートとは何かということである。遺伝子導入のアプローチの場合、効果的な局所濃度を得るためには、局所的にデリバリーできる技術が必要となる。これに関連し、アデノウイルスは内皮の障壁に対して不透過であること、血液循環において裸のDNAは速やかに分解されるだけでなく、血管内にプラスミド投与した場合その導入レベルは非常に低いことも知られている。

C.3.10 遺伝子治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究として遺伝子治療が用いられている (Table 5)。

フェーズ I の試験では、CMV プロモーター/エンハンサーにより VEGF₁₆₅ 遺伝子発現を促進し、小規模な左前開胸術を介して直接心筋に 125 μg あるいは 250 μg の量が投与され、プラスミドによりコードされる VEGF₁₆₅ の安全性および有効性が評価された。その結果、このようなアプローチは一般的に安全であり、手術できない冠動脈疾患の患者において、側副陰影の増加を示す所見が血管造影法により得られ、症状も有意に改善された。慢性心虚血の患者で、VEGF₁₆₅ をコードする naked プラスミドの投与前後における、梗塞、虚血および正常心筋が NOGA 左心室エレクトロメカニカルマッピングにより観察され、さらに好ましい結果が得られた。同様な結果がカテーテルを用いた心筋内投与でみられた。しかしながら、このような有効性は二重盲検無作為試験ではまだ試験されていない。

アデノウイルスの VEGF₁₂₁ 遺伝子治療の有用性について、侵襲的冠動脈バイパスの補助としてあるいは低侵襲開胸術を介した単独療法として試験された。その際、直接心筋へ注射することにより、可逆的な虚血領域に投与された AdGvVEGF₁₂₁ のフェ

ーズ I 臨床試験が行われた。患者は 100 μl 投与、10 箇所/患者および 5 つの投与グループ (4×10⁸, 4×10^{8.5}, 4×10⁹, 4×10^{9.5}, 4×10¹⁰ pfu) のいずれかで処置された。この試験ではアデノウイルス投与に関連した副作用は示されず、かん流、狭心症の程度、ETT 評価において改善を示唆する結果が得られた。Ad-VEGF₁₆₅ および p1VEGF₁₆₅ リポソームの、血管形成術後の再狭窄の予防および心筋虚血の処理における安全性および有効性が KAT (Kuppia Angiogenesis Trial) で評価された。患者にはかん流により Ad-VEGF₁₆₅ (2×10¹⁰ pfu) あるいは VEGF₁₆₅ プラスミド (2000 μg DNA) が投与された。このフェーズ II 試験では遺伝子導入に関連する副作用、臨床的な再狭窄の割合にコントロールとの違いはなく Ad-VEGF₁₆₅ を処置した患者において良好な心筋のかん流が示された。以上に述べた試験の中には VEGF₁₆₅ が治療上有益な効果ももたらす可能性を示唆するものもあるが、いずれも二重盲検では示されていない。以下の FGF 治療での経験が示すように、非盲検フェーズ I における有効性に関して肯定的な結果を、二重盲検フェーズ II/III 試験の成績で示すのは容易ではない。タンパク質あるいはプラスミド投与後、そのデリバリーの有効性が薬物動態学解析により詳細に解析されない限り、血管新生が効率よくおきるとは判定できない。しかしながら、VEGF₁₆₅ により血漿レベルにおける循環 EPC が増加するという知見は興味深い。

同様な状況が冠動脈内投与による Ad-FGF-4 遺伝子治療試験でも起きた。二つのフェーズ I AGENT (Angiogenic Gene therapy) (血管新生遺伝子治療) で FGF-4 をコードするアデノウイルスをウイルス粒子として 3.3×10⁸ から 10¹¹ 個まで投与し、安全性および有効性が評価された。Ad-FGF-4 処置患者において機能的な改善 (ETT 評価、心筋かん流) の傾向が示された。しかし、大規模二重盲検フェーズ III 試験を行った時、治療効果は全く無かった。

なお、現在、末梢動脈障害の患者において、HGF/SF 遺伝子治療のフェーズ I 試験も行なわれている。

C.3.11 細胞治療を用いた血管新生療法の概要

「C.3.1 血管新生 (neovascularization) の生理的な概念」の項で述べたように、EPC が血管新生に関与する可能性が示されたことから、細胞治療を用いた血管新生療法の可能性についても検討が行われている。以下のようにその可能性を支持する動物実験の結果を示す。EPC を生体外で増殖させ、虚血後肢の無胸腺ヌードマウスあるいは梗塞ヌードマウスに投与すると、新生血管に取り込まれ、血流と心筋の機能が回復する。骨髄由来の単核球細胞あるいは Lin⁻, c-kit⁺ の細胞画分を虚血心筋に投与すると病態が改善する。濃縮したサイドポピュレーションの細胞を骨髄に移植すると、梗塞心筋に取り込まれ、内皮細胞および心筋細胞に分化する。採取したばかりの骨髄穿刺液を豚アメロイドモデルおよ

び梗塞ラットモデルにデリバリーすると、血管およびかん流が増加する。虚血後肢モデルマウスに骨髓細胞を移植すると、血管壁には取り込まれないが、支持細胞として機能する。前駆細胞はパラクラインの機構によっても血管形成および組織再生を促進する可能性がある。血液を循環している細胞が心筋に強制動員されると、VEGF、MCP-1、FGF、Ang、IL-1 β 、TNF- α 、HGF、IGF-1、SDF-1のような血管新生促進因子がすぐに放出され、その結果血管新生の促進およびアポトーシスの阻害が起きる。

骨髓由来細胞が虚血組織へ取り込まれる割合について検討が行われているが、その推定値は、内皮細胞の3%および心筋細胞の0.02%が骨髓由来であるというものから、内皮細胞および心筋細胞の最大40%までが骨髓由来であるというもので様々である。

C.3.12 細胞治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究として細胞治療が用いられている (Table 6)。

最初の試験で重度の虚血心臓疾患の患者が冠動脈バイパス時に自家骨髓細胞の投与を受け、その後少なくとも1年追跡調査が行なわれた。骨髓細胞を腸骨から採取し、バイパスされない虚血心筋に 5×10^7 から 1×10^8 個/部位 (平均10部位)の細胞が投与された。術後の試験では患者5人のうち3人で冠動脈かん流の改善が示された。別の研究では、バイパス手術時に、6人の患者に対して梗塞境界領域に沿って自家 AC133+骨髓細胞が 1.5×10^6 個投与された。この手法は安全であり、追跡調査では左心室の機能は4人の患者において、かん流は5人の患者においていずれも改善した。しかしながら、細胞治療は単独ではなく冠動脈バイパス移植に対する補助としてデリバリーされていることから、このようにコントロールグループがない条件では有効であると結論することは困難である。BM-MNC (bone marrow-derived mononuclear cell) (自己骨髓由来単核球細胞)を用いた治療が10人の心筋梗塞の患者で試験された。フィコール濃度勾配により分離した BM-MNC (0.65% AC133+細胞と2.1% CD34+細胞)が急性心筋梗塞発症後5-9日後の患者に、冠動脈血管造影の際に置いたバルーンカテーテルを介して投与された。標準治療のみ行なった患者に比べ細胞治療のグループでは3ヵ月後梗塞部位は有意に減少し、1回拍出係数および駆出分画率が向上した。さらに安定狭心症の患者の虚血心筋内に、自家 BM-MNC を、NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に投与する試験が行なわれた。投与を行なった8症例で BM-MN を構成するそれぞれ細胞の割合は異なり、CD34+細胞(0.9%-8.9%)、CD3+ T細胞(2.3%-12%)、CD11b+D15+ 顆粒球前駆細胞(26.3%-70.6%)であった。細胞は NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に心筋内に投与された。3ヶ月の追跡調査で症状と心筋かん流の改善が示された。

他の二つの試験でも、慢性虚血心臓疾患の患者に

対する骨髓由来細胞の心内膜 (心臓) への移植が NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に行なわれた。吸引し過ぎたばかりの未分画自家骨髓由来細胞、2.4ml ($32.6 \pm 27.5 \times 10^6$ 個/ml) が10人の患者に対し、12箇所部位に投与された。投与した細胞は平均して以下のような構成を示した。多核白血球74.6%、リンパ球19.3%、単球3.5%、巨核球2.6%であった。CD34+細胞は2.6%で、そのうち47.9%がCD45を共発現した。10人の患者全てにおいて不整脈あるいは副作用はなく投与は成功であった。その内8人の患者は三ヵ月後狭心症スコアが改善された。20人の患者 (処置11人、コントロール9人)による盲検非無作為試験において、メカニカルな機能が低下した心筋領域に対する、フィコール濃度勾配により分離した BM-NPC ($25.5 \pm 6.3 \times 10^6$ 細胞/患者)の投与が NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に行なわれた。移植された細胞集団は、コロニー形成アッセイ (顆粒球-マクロファージコロニー形成単位)で評価したコロニー形成能で平均 $2.4\% \pm 1.33\%$ であり、CD45低発現のCD34+造血前駆細胞から構成されていた。6ヶ月および12ヶ月の追跡調査後、BM-NPCの心内膜への投与により持続的な治療効果が示され、心筋かん流と運動能が改善された。その効果は単核球、B細胞および造血前駆細胞のサブポピュレーションの割合と一致した。

他の研究において、急性心筋梗塞5-29日後、BM-MNC ($78 \pm 41 \times 10^6$ 個/患者)が、冠動脈ステントの留置部位に冠動脈内投与された。BM-NPCは平均してCD34+ $\sim 0.6\%$ 、CD117+ $\sim 1.7\%$ 、CD133+ $\sim 0.6\%$ の細胞から構成されていた。6ヵ月後、処置を受けた20人の患者を磁気共鳴により評価すると、非無作為コントロールグループと比較して、局所および広範囲において左心室機能の有意な改善がみられた。

以上述べた全ての試験において、ある程度機能の改善がみられたが、サンプルサイズが非常に小さいことに加えて、盲検および無作為の同時コントロールグループが無い場合その評価は困難であった。このように、これらの研究から結論できることは冠動脈内あるいは心筋内経路による細胞の投与は安全と思われるということである。

TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement) (急性心筋梗塞における前駆細胞の移植と再生の促進)試験では、再かん流急性心筋梗塞の59人の患者に BM-MNC あるいは CPC (circulating blood-derived progenitor cells) (循環血液由来前駆細胞)が無作為に投与された。CPCはヘテロな前駆細胞の集団であり、3日間のex vivo培養後フェノタイプを調べたところ、Dilアセチル化LDLを取り込み、VEGFR2、endoglin、von Willebrand factor、PECAM、VE-cadherin あるいはCD146といった典型的な内皮マーカータンパク質を発現することから、内皮のフェノタイプであることが示された。標準的な手法により分離された BM-NPC は CD34

および CD45 陽性であった。急性心筋梗塞 4 日後、患者は前駆細胞 (10ml 懸濁液) が投与された。左心室血管造影法により、BM-NPC および CPC をかん流したグループと非無作為対応コントロールグループを比較して評価すると、広範囲において駆出分画率が有意に改善された。機能的な改善と収縮末期容量の低下が磁気共鳴映像法により確認された。1 年の追跡調査後、BM-NPC あるいは CPC のかん流は安全であり、BM-NPC グループあるいは CPC グループで心筋の機能が改善され、両グループで差はなかった。この研究は前に進むための大きなステップではあるが、盲検および同時コントロールが無いため機能的に評価するのは依然として非常に困難であった。フェーズ I 臨床試験 BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) (ST 上昇型の梗塞の再生を促進するための骨髄移植) では、頸皮動脈インターベンション後、それぞれ 30 人の患者が冠動脈内自家骨髄細胞投与あるいは標準的な医療処置を受けた。骨髄細胞は採取後ゲラチン-ポリコハク酸塩濃度勾配沈降により 128ml から 26ml に濃縮した。総量として 24.6×10^8 個の細胞が得られ、その中には平均 9.5×10^6 個の CD34⁺細胞、 3.6×10^6 個の造血コロニー形成細胞を含まれていた。6 ヶ月後、骨髄細胞の投与により左心室の心臓収縮機能が促進され、ステント再狭窄や向不整脈作用のような副作用は起きなかった。しかしながら、18 ヶ月の追跡調査後、コントロールにおいても持続的な改善が起こったため、骨髄細胞処置とコントロールグループの差は消失した。細胞を用いた治療は有望ではあるが、その臨床試験の結果の解釈は注意を要する。公正な評価を行なうには、適切な大規模の無作為、二重盲検試験が必要である。

慢性虚血心臓疾患の患者の細胞治療の欠点は、患者自身の骨髄単核球細胞において血管形成能が低下することである。患者 (n=8) と健常人 (n=8) から分離された BM-NPC は同じ前駆細胞：CD34⁺/CD133⁺、CD49d⁺、CXCR4⁺から構成されるが、患者の細胞におけるコロニー形成能、SDF-1 あるいは VEGF に対する遊走反応は健常人の細胞と比較すると有意に低い。患者からの BM-MNC を虚血後肢に投与した場合、健常人のコントロールからの BM-MNC と比較すると、血流の回復効果が低いことが示された。

C.3.13 血管新生療法の問題点と今後の展望

血管新生増殖因子のタンパク質、および遺伝子治療、細胞治療による血管新生療法の臨床試験の結果は示したように全体として期待を裏切るものであり、処置した患者においてプラセボを超える改善、無作為二重盲検試験において、コンスタントに示すことができなかった。以下にその問題点と今後の展望について示す。

(1) 現在の評価項目を再検討する必要がある

このようにうまくいかなかった原因として評価

項目が間違っているあるいは評価項目を査定する方法が不適切あるいは妥当ではない可能性が考えられる。これら臨床試験で用いられる放射線映像技術 (例えば、タリウム、sestamibi) は空間分解能が低く、末期の CAD 患者における心筋かん流における小さな変化を検出する能力には限界がある。さらに、長期にわたり測定する心筋虚血の割合に大きなばらつき (50%までの変動) があるように思われる。そのため治療により向上する心筋のかん流を検出するうえにおいて、シンチグラフ技術の有用性については限界があるかもしれない。血管新生療法で処置した心臓領域内のかん流変化を検出する場合、心筋かん流を定量化できる可能性のある、高空間分解能を有した核磁気共鳴映像法は、より適しているかもしれない。将来の研究において、概説した様々な新規の治療の有用性を評価する場合、処置前後における心筋かん流の評価には、MRI のようなより高感度の技術を用いることを考える必要がある。

(2) 従来検討されていなかった血管新生促進因子を用いる

現在臨床研究で検討されているタンパク質、あるいは遺伝子は FGF、VEGF、GM-CSF、HGF と限られている。5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項で述べたように、PDGF、MCP-1、G-CSF、Ang-1、Ang-2、NGF、NPY など様々な因子が血管新生促進作用を示し、その作用機構は必ずしも同じでないことから、このような因子を用いることも検討する必要がある。これはタンパク質および遺伝子治療において同様である。

(3) 複数の血管新生促進因子を用いる

血管新生のプロセスは複雑で高度に秩序だった調節を受けていることから、一種類の増殖因子では、末期の冠状動脈性心臓病を治療する際、特効薬とはならない可能性がある。むしろ、CAD の患者の治療を進展させるには複数の増殖因子を組み合わせた治療法が临床上の有用性をコンスタントに得るために必要かもしれない。

増殖因子を組み合わせる戦略は、増殖因子の治療効果が相乗的であること、ある因子が血管形成の開始を促進するのに対し他の因子は血管の成熟を促進するといったように、それぞれの因子がお互いに機能を補えることから合理的といえる。インビトロにおいて、増殖因子の相乗性が、例えば FGF-2、VEGF-A、VEGF-C で示されている。種々の動物モデルで、FGF-2 は PDGF 受容体をアップレギュレーションすることから、PDGF-BB と FGF-2 は相乗的であった。相乗性が治療効果を発揮する場合は、相乗性が治療効果に限定されている時、およびどちらかの投与量を低下させることにより、FGF の形質転換作用あるいは VEGF-A の過透過性のような副作用が抑制され、かつ治療効果が低下しない場合である。このような増殖因子を組み合わせた臨床試験はまだ実施されていない。

その他の合理的なアプローチは、「C.3.5 血管新生