

それには遊走促進、透過性促進、生存促進、プラスミノー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。PIGF 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。

(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ー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。

(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トイ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。

(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かっている。

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 13 にまとめて示す。

C.3.3.6 内皮が増殖因子による血管新生促進におよぼす影響

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.3.3.7 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、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 は単核球の強制動因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.3.3.8 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 14)。FGF-1 (10 μ g/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 μ g 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 μ g 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、投与によるシステマ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、そして 30 μ g/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領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 日目で、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。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 の薬効は骨髄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い。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 μ g/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.3.3.9 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タンパク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、安価で実際的である。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で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.3.3.10 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 15)。

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 μ g あるいは 250 μ g 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 Ad_{Gv}VEGF₁₂₁ のフェーズ I 臨床試験が行われた。患者は 100 μ l/投与、10 箇所/患者および5つの投与グループ(4 \times 10⁸、4 \times 10^{8.5}、4 \times 10⁹、4 \times 10^{9.5}、4 \times 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 \times 10¹⁰ pfu)あるいは VEGF₁₆₅ プラスミド (2000 μ g 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 \times 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1試験も行なわれている。

C.3.3.11 細胞治療を用いた血管新生療法の概要

C.3.3.1 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髄細胞を移植すると、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。

骨髄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%が骨髄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%までが骨髄由来であるというものまで様々である。

C.3.3.12 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 16)。

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髄細胞の投与を受け、その後少なくとも 1 年追跡調査が行なわれた。骨髄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⁺ 骨髄細胞が 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) (自己骨髄由来単核

球細胞)を用いた治療が十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 ヶ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髄由来細胞の心内膜 (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。吸引ろ過したばかりの未分画自家骨髄由来細胞、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 人の患者は三ヶ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⁺ ~0.6%、CD117⁺ ~1.7%、CD133⁺ ~0.6% の細胞から構成されていた。6 ヶ月後、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ため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

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髓移植)では、頸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髓細胞投与あるいは標準的な医療処置を受けた。骨髓細胞は採取後グラチン-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が含まれていた。6ヵ月後、骨髓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、骨髓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、患者自身の骨髓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.3.3.13 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を、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。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、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、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、VEGF あるいは FGF-2 のような血管新生促進因子と周皮細胞の強制動員を促進する Ang-1、PDGF-BB のような成熟促進因子を組み合わせて用いることである。壁細胞(周皮細胞)は過透過性を抑制するだけでなく、未成熟な血管を安定化させる。機能がお互いに効率よく補える増殖因子の組み合わせとして、Ang-1 と VEGF-A そして PDGF-BB と FGF-2 が考えられる。

一方、増殖因子の組み合わせで用いると、治療戦略がより複雑になる。例えば、各因子の相対的な投与量、各因子の投与スケジュール、各因子のデリバリー方法などが問題点となり、これらを全て満たす治療戦略を設定することは必ずしも容易ではない。

(4) 他の増殖因子をアップレギュレートする因子を用いる

最近、インビボにおいてアデノウイルスベクターを用いて Hif1- α を過剰発現すると、血管新生増殖因子が多数アップレギュレートされることが示されている。増殖因子の作用は動物の種類により異なる場合があるので、ヒトへ適用する前に複数の動物種で試験する必要がある。これに関連し、内在性 Hif1- α の不活性化を阻害すると、虚血四肢における血管新生が促進される。このように、他の増殖因子をアップレギュレートできる因子を用いた戦略も有効かもしれない。

(5) 共通の経路を標的とする

増殖因子のシグナル伝達における共通の経路のなかで、NO の産生は治療の非常に有力な標的である。主に *in vitro* の知見から、VEGF、FGF、TGF- β による血管新生促進効果において NO の関与が示唆されている。しかしながら、NOS 阻害剤、あるいは eNOS および iNOS ノックアウトマウスにおける *in vivo* の知見では、NO の関与について以下のように統一した結論が出ていない。最も説得力のある *in vivo* の知見は以下の Murohara らによる研究である。ウサギ虚血後肢モデルにおいて NO 産生促進因子である L-arginine を食事に加えて与えると、血管新生が促進された。また、マウスの虚血後肢モデルにおいて eNOS 欠損マウスでは野生型のマウスに比べ、血管新生は阻害された。対照的に血管新生の非外科的腸間膜ウインドーモデルで、NO 合成の阻害剤である L-NAME を与えると bFGF による血管新生が促進された。L-NAME を与えた野生型のマウスおよび eNOS および iNOS 欠損マウスを用いた、*in vivo* マトリゲルペレットモデルの結果では、NO は FGF-2 および VEGF-A による血管新生誘導に関与していないことが示されている。同様に、血管新生の腫瘍モデル、*in vivo* のマトリゲルモデルにおいて、NO を放出する NO ドナーである SNAP および S-NAG を投与すると、FGF2 による血管新生の誘導が阻害された。こ

れらの知見は、VEGF、FGF、Ang-1 を含む様々な増殖因子により誘導される血管新生において、NO がメディエーターとして作用することを示す数々の報告と対照的である。従って、血管新生および動脈新生における NO の役割について、統一的な見解は得られておらず、NO ドナーあるいは NO 合成酵素阻害剤がそれぞれ血管新生を促進あるいは抑制するかどうかについては、臨床的に試験されていないというのが現状である。

(6) 持続的なデリバリーが可能な方法を用いてタンパク質を投与する

血管新生療法を効果的に行なううえにおいて、デリバリーの持続時間が重要な点である。血管新生促進因子のほとんどは内皮細胞の生存因子としても作用する。したがって、標的細胞における初期のアポトーシスを抑制するためには、単一増殖因子のデリバリーでは持続する必要があると考えられる。増殖因子を組み合わせた最近の研究では、血管新生の初期に血管の安定性が決定されることから、このような治療ではデリバリーは短期間のほうがよいことが示唆された。

一方、増殖因子を長時間デリバリーするために、各種のマトリックスが設計されている。PDGF-BB のデリバリーにセファロースヘパリンビーズを用いた場合、10日間にわたり一次速度式に基づいた良好な放出が起こり、その結果、虚血心筋の流量および機能が改善した。さらに scaffold として poly(lactide-co-glycolide) を用いると、VEGF₁₆₅ と PDGF-BB が異なったキネティクスで効率よく同時にデリバリーされる。生体適合性があり放出が緩やかなポリマーをうまくスメントの上にコートできれば、この領域は急速に進歩する可能性が高い。タンパク質のデリバリーを持続させる他の手段は、プラスミド、複製欠損アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスを用いた遺伝子治療である。持続的にデリバリーするため、タンパク質あるいは遺伝子治療のどちらを用いるかは、薬物動態、安全性、コストに基づいて最終的に決定することになる。

(7) タンパク質を標的的部位に対して効率よくデリバリーする

これに関しては、主として FGF-2 の生体における分布について、多くの研究が行なわれた。その結果、FGF-2 を静脈内あるいは冠動脈内に投与すると、心筋内、末梢動脈障害の場合は筋肉そして心膜内へ選択的にデリバリーされた。虚血領域に対して FGF-2 を心筋内投与した場合、局所における濃度は特に高かった。デリバリーは虚血ゾーン、境界ゾーン、流域に対して行なう必要があると考えられるが、効力を比較した研究はほとんどない。多くの虚血後肢の研究から示されているように、理想的なデリバリーとしては、持続的な動脈内デリバリーが優れているように思われる。しかし、このデリバリーは冠動脈系では技術的に困難である。他のデリバリー法として、冠静脈内への逆投与がある。この技術は、FGF-2 の単回投与では成功しているが、最終的な実現可能性および効果は、臨床試験の結果を待たなければ判断できない。

(8) 増殖因子を遺伝子導入した細胞および増殖因子によりプライミングを行なった細胞を用いる

骨髄由来幹細胞は虚血組織における血管新生へ寄与する。多能性造血幹細胞は、血管新生のプロセスに関与する内皮細胞に分化できる。3.5血管新生療法において有望な増殖因子の項に述べたように、幹細胞から内皮細胞への分化は、様々な増殖因子により調節される。したがって、骨髄由来幹細胞を移植前にこれら増殖因子でプライミングを行なうことにより内皮細胞への分化がより促進される可能性がある。これに関連し、移植された筋細胞の心筋梗塞組織への生着を、HGFが促進することを示唆する知見もある。このように、細胞と血管新生促進因子を組み合わせた治療法は有効な治療法として将来用いられる可能性を秘めている。また、移植する細胞は、デリバリーが必要な標的遺伝子のキャリアーとしても用いることができる。

(9) 内在性前駆細胞を強制動員する

分離した幹細胞を投与する代わりに、血管新生を促進する、骨髄および他の組織からの内在性前駆細胞を強制動員することは非常に魅力的な治療アプローチと思われる。5. 血管新生療法においても若干ふれたが、以下にその可能性を支持する実験結果の詳細について述べる。サイトカイン(G-CSF、Ang-1、PlGF)およびケモカイン(SDF-1)は骨髄からEPCの動員およびその後の末梢循環における増加を促進する。なお、EPC、SDF-1そしてVEGF₁₆₅のレベルの上昇において、どの動員因子が最も強い作用を示すかについては明らかではない。動物モデルでアデノウイルスベクターを用いてSDF-1およびVEGFの遺伝子を静脈内に投与すると、造血前駆細胞および循環EPCの強制動員が速やかに誘導された。一方、Ang-1による前駆細胞の強制動員の誘導は、遅延性であり顕著でない。しかしながら、VEGFとAngを組み合わせるとその効果は相乗的であり、循環中に前駆細胞がより長期にわたる上昇した。さらに、それに関連し骨髄における毛細血管の増殖の増大、結果的に脾臓の巨大化の原因となる脾臓への前駆細胞のホーミングがおきた。患者におけるVEGF遺伝子導入により安全な条件において循環EPCが増加した。

他の候補としてはG-CSFとGM-CSFがあげられる。げっ歯類および人間以外の霊長類における急性心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞後、G-CSFを投与すると、心臓の機能の改善、毛細血管密度の増加、心筋細胞死の低下が起きたしかしながら、心筋梗塞の患者において冠動脈ステントの存在でG-CSFを投与すると、ステント再狭窄が顕著に増加したため、処置は中止された。GM-CSFを組換え体として毎日投与すると、ウサギおよびマウス角膜モデルにおいてEPCが動員され、虚血後肢の新血管形成が促進された。ロムルチド(200 μg/kg/日)によりGM-CSFを誘導すると、梗塞ラットにおいて梗塞からの回復が遅延し、梗塞が拡大した。心筋梗塞の初期段階にGM-CSFを誘導すると、単核球の動員が促進され、梗塞部位における不適切なコラーゲン生成がおきた。したがって、GM-CSF投与の場合、悪い時期に悪い細胞が誘導されるという事態を

避ける必要がある。GM-CSF治療の安全性についてはいくつかの研究で評価されている。冠動脈疾患の患者における小規模無作為、二重盲検、プラセボコントロールの冠動脈内GM-CSF投与の研究では安全性および冠動脈側副血流の改善が示された。

赤血球分化因子として知られるEpo(Erythropoietin)はEPCの動員を促進する。Epoで処置したマウスでは骨髄および末梢血液におけるEPCの数、側副の拡大が促進され、後肢虚血の場合には血流が改善された。冠動脈心臓病の患者において、Epoの血清レベルは循環EPCあるいは骨髄前駆細胞の数と相関した。

HMG-CoA還元酵素の阻害剤であるスタチンはマウスおよび安定冠動脈疾患の患者においてEPCの動員およびその機能的を促進する。スタチンによるEPCの分化の誘導はPI3-kinase/Aktを介している。その他の可能性として、EPCの増殖促進および老化を低下させるサイクリンのアップレギュレーション等、細胞周期に関わる遺伝子発現の調節が考えられる。同様にエストロジェンはEPCのアポトーシスを抑制し、骨髄由来EPCの強制動員および増殖を促進した。エストロジェンの効果はeNOS^{-/-}マウスにおいて完全に消失したことから、eNOS依存性の機構が考えられる。VEGFによるEPCの強制動員の誘導もeNOS欠損マウスでは低下することから、eNOSは骨髄由来EPCの強制動員において必須の役割を果たしていると考えられる。

(10) 本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害する

血管新生のリスクファクターが有無の虚血動物モデルあるいはヒト疾患組織において、増殖因子および増殖因子受容体の発現に関するデータが少ないことを考えると、欠乏していると推測される因子を補充する治療戦略は必ずしも合理的ではないようにも考えられる。また、生体において増殖因子の発現が増加している状態で、それ以上あるいはそれよりもはるかに多量の増殖因子を外から投与した場合、血管新生は促進されるのかという疑問も残る。多くの前臨床試験では、実際VEGFおよびFGFを適切に投与すれば、血管新生が促進されることが示されている。しかし、正常をはるかに超えるレベルで増殖因子を投与すると、例えば、VEGFおよびFGFの場合、病的な血管形成が起きる可能性があり、治療濃度域は狭いと考えられる。

したがって、本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害することに焦点をおいた治療も考える必要がある。例えば、睡眠により誘導される角膜の低酸素刺激では、血管新生が起きない。これは角膜組織のいたる所に発現しているHIF-1αのドミナントネガティブミュータントによると考えられる。興味深いことに、このミュータントは低酸素症によっても調節される。HIF-1αミュータントのアンタゴニストにより、角膜の低酸素刺激による血管新生反応の誘導が回復する。他の生体由来の血管新生の阻害剤、例えばエンドスタチン、トロンボスポンジンは組織虚血の間アップレギュレートされる。興味深いことに、最近の知見によると、ヒト平滑筋肉腫セルライン、SK-LMS-1細胞の担ガンモデルにおいて、HGFは部分的ではあるがトロンボスポンジン-1のダウ

ンレギュレーションを介して腫瘍における血管新生を誘導する。このように、抗血管新生因子の作用を弱めることにより治療効果が改善する可能性がある。

(11) 遺伝子治療において、遺伝子をどこにデリバリーするか

遺伝子治療における望ましい遺伝子のデリバリー部位は治療の最終目標および増殖因子の性質により変わらう。毛細血管の成長を意図する場合は梗塞先端部位が望ましい。健康な組織において側副は、開在冠動脈血管から冬眠心筋へと成長する。導入する部位の微小環境および産生される増殖因子の標的細胞も考慮に入れる必要がある。増殖因子は標的細胞において発現する受容体を介して機能を発揮する。治療効果を得るにはリガンドと受容体の相互作用が必須である。ベクターあるいは産生されたタンパク質は正常な基底膜をうまく貫通できない。多数の平滑筋層で覆われた大きな内径の血管の場合はなおさらである。従って、動脈内皮に作用することを意図して増殖因子を用いる場合は、血管の管腔で作用できるようにする必要がある。血管系を囲む組織の構成細胞である壁細胞に増殖因子を作用させる場合も同様である。増殖因子の可溶性によっても、リガンドのバイオアベイラビリティが調節される。細胞表面のヘパリンプロテオグリカンに結合しやすい増殖因子は、産生細胞の周辺にとどまる。一方、可溶性増殖因子は拡散し、広範囲の組織をカバーする。病的状態の微小環境では、増殖因子のデリバリーの効率が悪い。一方、増殖因子をあまりにも広範囲に過剰発現した場合は重大な副作用がおきる。発現は適切なデリバリー方法を用いて的確な組織のコンパートメントに対し行なう必要がある。しかしながら、局所的に遺伝子導入する場合、導入されたコンパートメントの位置について詳細に調べることは事実上困難である。また、特定の細胞のみに発現させることも困難である。最近、遺伝子デリバリーベクターを組織あるいは細胞に対して特異的にターゲティングする技術が発達しており、遺伝子導入の心筋特異性が改善している。

(12) 遺伝子治療において、遺伝子をどのようにデリバリーするか

心筋における治療的血管新生において多種多様なデリバリーの方法が導入されている。例えば、増殖因子をマウスの尾静脈を介してデリバリーする方法、大動物モデルにおいて最先端の高度な技術を用いて局所にデリバリーする方法などがある。多くのモデルでは開胸術のような侵襲的な手法が必要とされるが、それ自体で若く健康な動物において損傷を与えることになり、その結果、修復過程が始まり内在性の増殖因子が誘導される。さらに重要な点は、別の治療を最も緊急に必要とする重病の患者には、非常に侵襲的でストレスの多い遺伝子導入方法は適していないということである。遺伝子導入ベクターは標準サイズの血管造影用カテーテルを用いて冠動脈に導入できる。冠動脈内投与のアプローチは比較的単純で、特別な器具や医師に特別な訓練は必要なく、血管造影術と組み合わせると侵襲的な手法は必要ではない。通常、冠動脈内投与

は内皮細胞へ遺伝子を導入する目的で用いられる。動物モデルで良好な治療効果が報告されているが、これまでの報告によるとヒトでは臨床効果は低い。静脈内および動脈内のアプローチでは特別な器具は必要としない。組換え FGF-2 を用いた検討では静脈内投与は有効ではないが、冠動脈投与は有効であることが示されている。内皮はタンパク質およびウイルス粒子の障壁である。bFGF の組織分布を動脈内あるいは静脈内投与で調べると、¹²⁵I 標識した bFGF のそれぞれ 0.88% および 0.26% が心筋に見つかっている。

治療薬は血管周囲の組織にもデリバリーできる。心膜内のアプローチではベクターは心臓周囲の心膜内にデリバリーされる。心内膜および心外膜に対する導入効率は良好であるが、側副へのかん流では治療効果はみられていない。高濃度の治療用タンパク質が心嚢液で産生されるが、心筋を貫通することができず、成長している側副血管に到達できない。注射針付きのカテーテルを用いることにより効率よく局所にデリバリーできる。血管周囲で局所的にタンパク質濃度が高くなっても血管新生反応が起こるのは主として血管の外膜であり、血管壁を貫通できない。

心筋内遺伝子導入では標的部位にベクターを直接デリバリーできる。心筋内への直接投与は従来の外科的処置と組み合わせる。侵襲的な外科的処置および増殖因子の局所的なデリバリーができないような障害の程度が高い患者には、NOGA およびステレットの注入カテーテルのような経皮的な技法を用いた心筋内への直接投与が適している。さらに、臨床試験において不可欠である治療効果および副作用の可能性は、大動物モデルで容易に評価できる。ヒトの治療用に開発された技術は大動物モデルにおいても適用でき、その結果に基づき臨床試験に使用される段階に移行する。

(13) 遺伝子治療においてどのような遺伝子導入ベクターを選択するか

遺伝子治療において遺伝子導入に用いるベクターの選択も重要なポイントである。急性心筋梗塞後の治療と慢性心筋虚血とでは遺伝子発現のタイムコースを変える必要がある。同様に、慢性虚血において閉塞性動脈疾患の進行が緩やかで、その際酸素圧の低下がみられるような比較的健康的な心筋と梗塞後に障害を受けた心筋とでは形成される微小環境は異なる。増殖因子をコードする遺伝子は非ウイルスプラスミド構成体あるいはウイルスベクターを用いてデリバリーできる。プラスミドは安全であり作成も容易ではあるが、心筋における導入効率は非常に低いのが欠点である。なお、リボソームを用いることによりその導入効率が顕著に改善できるという報告もある。

遺伝子治療を目的とした新しいウイルスが開発され、既存のベクターも改変により改善されていることから、ウイルスベクターが多く用いられるようになってきている。遺伝子治療における理想的なウイルスベクターとは導入効率が低い、毒性が低い、免疫原性が無い、長い遺伝子が挿入できる、標的とする細胞だけに遺伝子が発現できる、遺伝子発現が調節できるといった特徴を有してい

る必要があるが、このような特徴の全てを有するベクターはまだ開発されていない。遺伝子導入のベクターを臨床適用する場合、品質が最も重要な選択基準となる。心筋梗塞後において局所組織かん流のサルベージが起きるには、短時間高い効率で導入する必要がある。アデノウイルスは利用頻度が最も多く研究も進んでいる遺伝子導入ベクターの一つである。アデノウイルスの長所は導入効率が高い、導入遺伝子の発現能が比較的高い、高いタイターで産生できるという点である。正常の免疫系を有する大動物における導入遺伝子の発現は一過性で2-3週間続き、その期間内で毛細血管ネットワークの形成、組織かん流の増加は十分起きる。

側副血管の成長および新生血管の動脈形成には数週間から数ヶ月までとより長い発現が必要である。このような長期間の発現にはエピゾームベクターあるいは宿主細胞染色体に組み込む可能なベクターを用いる。AAV (Adeno-associated vector) アデノ随伴ウイルスはアデノウイルスより導入効率は低いが、筋肉組織に対して指向性を有し、遺伝子発現は導入後1年間持続する。AAV に導入できる DNA の長さは最大5kb であり、ほとんどの増殖因子の遺伝子は導入可能である。しかしながら、場合によってはそれ以上の長さの遺伝子を導入する必要があることから、この導入能力の低さが開発の妨げとなっている。レンチウイルスはもっと長い遺伝子が導入可能であり、静止期および増殖期の細胞に導入できる。宿主染色体へ組み込まれるため安全性が懸念されるが、その解決法として数々の発現調節系が開発されている。また、心臓血管へのアプローチにおける欠点は導入効率の低さとウイルス標品のタイターの低さである。

(14) 遺伝子治療において治療薬をどれだけデリバリーするか

遺伝子治療のアプローチに限った話ではないが、この場合も治療濃度域がある。治療濃度域とは、最大限の治療効果と最小限の副作用の両方が得られる濃度域を指す。増殖因子を同じ量投与しても患者により作用発現の強さは変動するが、遺伝子治療の場合はそれに加えて導入効率およびタンパク質産生レベルも患者によりかなり変動しうる。したがって、ウイルスデリバリーのアプローチでは最適量の増殖因子が産生されるウイルスの濃度および投与した組織環境下において増殖因子が標的とする組織にうまく分布できるかどうかのポイントとなる。

従来の薬理学的アプローチでは、薬は通常様々な組織に分布される。遺伝子治療は治療タンパク質を局所にデリバリーできるという利点があるが、それは逆に正確な投与量の算定、さらにデリバリー自体も難しくなるという欠点にもなる。血流における薬の濃度は決めるのは容易であるが、大動物において局所タンパク質濃度が最適になるようなウイルス投与量を正確に決めるには、通常よりはるかに多くの前臨床試験が必要である。治療効果は標的組織におけるウイルス溶液の拡散、導入効率、導入細胞によるタンパク質の発現レベルおよび増殖因子の溶解性など様々な因子により総合的に決定される。

大部分の前臨床遺伝子治療実験はマウスモデルで行われている。マウスモデルは遺伝子導入および遺伝子ノックアウト実験、増殖因子の作用の検討では非常に有用であるが、小動物で得られた実験結果を基にしてヒトの治療を行おうとする場合は十分注意する必要がある。マウスにおけるウイルスの投与量、タンパク質濃度の実験結果はヒトへそのまま外挿できない場合がある。例えば、マウス尾静脈への投与においてウイルス粒子として 1.0×10^{11} 個および容量として 3ml 用いる場合、その値をそのままヒトに外挿すると、それぞれ 1.0×10^{14} 個および 7L になる。また、小さな組織では増殖因子の効力および正確な投与量を決定は困難である。マウスでは数回の投与で心筋の全体をカバーするのは容易だが、マウスより数百倍大きい豚の心臓をカバーすることははるかに難しい。筋肉内注入により起こる注射針の痕跡のようなことでもマウスではヒトと全体的に占める割合が異なる。例えば、28-G の注射針では筋肉組織で約 500 μ m の幅の壊死した痕跡が起きる。そのような状態では筋肉の炎症性細胞および障害筋細胞が自ら増殖因子を供給するようになる。その注射針の痕跡の大きさはマウスでは左心室筋肉の 1/8 であるが、ヒトでは左心室筋肉のわずか 1/200 にしかならない。

(15) 血管新生増殖因子タンパク質を用いた治療におけるリスクと何か

VEGF による透過性の増加のような特異的な有害作用と、腫瘍の成長、糖尿病性網膜症の悪化、アテローム性動脈硬化のような血管新生に直接関連した有害作用は区別できる。VEGF/VPF (血管透過性因子) の血管透過性を促進する活性は、ヒスタミンに比べて 50000 倍以上高い。他の可能性も除外できないが、この効果は内皮開窓の誘導によると考えられる。

腫瘍成長と糖尿病性網膜症は血管新生と血管新生促進因子に依存することが多くの研究で示されている。しかし、投与した増殖因子により腫瘍成長および網膜症の悪化が実際に促進されるという知見はほとんどない。顕性腫瘍および糖尿病性網膜症の患者は臨床試験において除外されているが、現在、血管新生促進因子のタンパク質あるいは遺伝子治療を受けている 1000 人以上の患者において、この二つの疾患の合併症の患者は見つかっていない。特に VEGF の動脈硬化促進作用がアテローム性動脈硬化の前臨床モデルで試験されている。VEGF を投与すると、プラークの形成が促進されるが、flt-1 をブロックすると動脈硬化の形成が低下した。これと一致して、TNP40 あるいは Ang のような一般的な血管新生阻害剤により実験的アテローム性動脈硬化症が低下する。しかし、VEGF 遺伝子治療の臨床試験では VEGF の動脈硬化の形成促進作用を裏づけることができなかった。同様に、アテローム性動脈硬化症の大動物モデルで、FGF-2 を冠動脈ステント移植しても、作用が示されなかった。このような統一的な見解が得られない状況において、限られた数の試験において示された、血管新生促進作用を有する増殖因子による動脈の形成促進作用と臨床との関連の有無については判断できない。したがって、将来の臨床試

験では、アテローム性動脈硬化症の進行を第一に注意する必要がある。

(16) 遺伝子治療におけるリスクとは何か

遺伝子治療の副作用はデリバリーのプロセス、ベクターあるいは遺伝子産物そのものにより起き得る。遺伝子治療の最終目標の一つは選択枝のない患者に適した治療法を提供することである。遺伝子治療ベクターのデリバリー自体可能な限り非侵襲的でリスクが低い必要がある。したがって、外科的アプローチおよび長期間にわたるかん流の繰り返しは、心筋の血管新生において临床上適切なデリバリー戦略とは言いがたい。インビボにおいてウイルスおよび非ウイルスを用いた遺伝子デリバリーにより、有害効果が起き得る。高投与量の裸の DNA は壊死と炎症を起こすとの報告もある。ほとんどのウイルスは免疫反応を惹起し、その結果、一過性の体温上昇から敗血症性ショックまで一連の臨床症状が起きる。宿主染色体へベクターが組み込まれる場合はガン遺伝子の活性化、正常な遺伝子発現の妨害、宿主染色体の変異促進が起きる可能性がある。

小動物を用いた侵襲的なアプローチでは心臓において血管新生分子に特異的な有害作用は表に出てこない。したがって、大動物およびヒトにおける有害作用の立証は不十分である。また、小動物を用いた研究ではその後のフォローアップの期間は非常に短い。血管新生遺伝子治療では導入組織における過剰血管成長、いわゆる血管腫あるいは糸球体硬化形成が懸念される。しかしながら、そのような構造は通常血流により再構成され、血管は正常に構築される。遺伝子治療により増殖因子を標的組織以外にも発現させた場合、他の組織に対して腫瘍の成長促進、網膜症、関節炎のような有害な副作用が起きるかも可能性がある。このような有害作用は組織特異的なプロモーターあるいは低酸素状態の条件で発現が促進されるようなベクターを用いることにより克服できるかもしれない。VEGF の副作用は血管透過性の亢進と浮腫であるが、心臓におけるそのような兆候、すなわち心膜液貯留という副作用は用量が多すぎる場合に起きることが最近になって示された。このように、可能性のある副作用について総合的に評価するためには、大動物において、最適投与量およびベクターと遺伝子のそれぞれに組み合わせにおいてデリバリーの戦略を決める必要がある。

C. 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

組換えタンパク質医薬品は、高度な生物活性を持つ医薬品として現代の医療に欠かせない存在となっている。組換えタンパク質医薬品の魅力の一つは、アミノ酸配列や修飾構造の改変によって、望ましい薬効/体内動態プロファイルを目指して、合理的アプローチによる改良を進められるところにある。これまでにインスリンやインターフェロン等で改変型医薬品が開発され、患者の quality of life の向上にも大きく貢献してきているが、今後は、疾患関連タンパク質の同定や、分子進化法などによる人工タンパク質作製技術の開発、医薬品としての有効性・安全性を向上させるためのタンパク質体

内動態制御技術の進歩等を背景に、改変型タンパク質性医薬品の創出がこれまで以上に加速されると予想される。

従来、タンパク質性医薬品は、生体由来試料から精製されて用いられていた血液凝固因子や、組換え医薬品として最初に承認されたインスリンのように、生体が本来発現しているものを補うためのものであった。天然に存在するタンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質医薬品では、その作用プロファイルはほぼ明らかであり、一定の品質が確保されていれば、生体内に存在する濃度における一定の安全性も確保できると期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ改変型タンパク質性医薬品では、改変の目的とした機能以外の特性にも変化がおよび、安全性への影響が生じる可能性も考えられることから、品質および安全性の確保においては、特段の配慮が必要になると考えられる。本研究では、改変型タンパク質医薬品の品質・安全性確保における課題を考察するため、開発の国際的動向として、日米 EU 三極における改変型タンパク質医薬品承認の動向と、それぞれの品目の特性に関する調査を行った。

ところで、遺伝子組換え技術を応用して製造されるタンパク質が天然のものと比較して完全に同じ構造を持つということは、糖鎖を持たない単純タンパク質においてのみ考えることである。医薬品として用いられているタンパク質の多くは糖タンパク質であるが、糖タンパク質の場合は、タンパク質を発現する細胞の種類によって付加される糖鎖の構造が異なる上に、糖鎖の構造に著しい不均一性が存在するため、生体由来タンパク質と組換えタンパク質で、糖鎖を含めた構造が完全に一致することは現実的には有り得ないことと考えられる。しかしながら、このように、組換えタンパク質において機能的差異を目的とせず生じる天然のタンパク質との差異は、本研究では改変として取り扱わないこととする。本来は糖タンパク質であるものを、機能的差異が生じないという根拠に基づいて糖鎖非修飾体として製造して用いる場合も、改変体としては取り扱わないこととする。また、天然のものと同等の活性を期待する場合でも、特許対策や技術的理由によりいくつかのアミノ酸残基が置換あるいは付加されている場合もあるが、そのような場合も機能的改変を意図していないと考えられることから、改変体としては取り扱わないこととする。つまり、本研究では、改変型タンパク質として、機能的改変を意図してアミノ酸あるいは修飾構造を変化させたタンパク質を取り扱うこととしたい。また、改変型タンパク質の代表例の1つであるヒト化モノクローナル抗体やその修飾体については、現状と問題点に関して、本研究班の平成 15 年度報告書で詳細な内容が報告されているため割愛した。

C.4.1 改変型タンパク質開発の国際的動向

これまでに、米国、EU、あるいは日本で承認された改変タンパク質医薬品を、アミノ酸置換型、糖鎖改変型、ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol: PEG) 結合型、融合タンパク質に分類し、それぞれの名称、各極で承認された時期、改変部位の特徴、改変の目

的、適応疾患などについて Table 17 にまとめた。

Table 17 にあげた 20 種類のうち、米国では 17 種類、EU では 15 種類、日本では 10 種類が承認されている。我が国でのみ承認されているものとして、改変型 t-PA のパミテプラーゼ、改変型 G-CSF のナルトグラスチムの 2 種類があるが、欧米でのみ使用されていて我が国では未承認のものは 10 種類であった。欧米で承認され、その後我が国でも承認された 8 品目について、欧米での承認後に我が国での承認までに要した年数は平均 3.75 年であった。

タンパク質に改変が施される場合、目的は大きく 2 つあると考えられる。1 つは、pharmacodynamics に関わる改変、すなわち、標的分子との親和性や特異性の上昇、特定の機能の分離など、薬効に関わる機能そのものの改良。もう 1 つは、pharmacokinetics に関わる改変、すなわち、血中滞留性の改善や、標的指向性の付与など体内動態の改良である。これまでに承認された改変型タンパク質医薬品では、後者の体内動態制御に関わる改変が施されている例が多く、融合タンパク質を含めた 20 種類のうち 18 種類では、体内動態の制御に関する機能が付与されていた。タンパク質の体内動態を制御することにより有効性・安全性の向上を期待する試みが、これまでのタンパク質改変の主要な目的であったことが推察される。

実際の例として、アミノ酸配列を改変した速効型あるいは持続型のインスリン、PEG 結合型インターフェロンなどは、ドラッグデリバリーシステム的な改良を加えることで患者の QOL 向上やコンプライアンスの改善に大きく貢献している。糖鎖構造を改変したイミグルセラゼは、改変によって初めて標的細胞内へのタンパク質の送達が可能になり、医薬品として応用された例である。新たなタンパク質医薬品として設計された融合タンパク質においても、標的細胞へのターゲティングや血中濃度維持のためのタンパク質ドメインが用いられており、これらも DDS 的な機能付与が改変型タンパク質医薬品の新規開発において重要であることの表れであると考えられる。

以下、それぞれの改変型タンパク質医薬品の特性について述べる。

C.4.2 アミノ酸改変体

(1) 改変型インスリン

<速効型インスリン>

インスリンは、生理的濃度 (10^{-10} M) では単量体で存在しているが、製剤中の濃度 (10^{-3} M) では主として二量体あるいは六量体となっている。皮下あるいは筋肉に投与されたインスリンが血中に移行するには、多量体から解離して単量体になる必要があるため、患者は食事の 30 分以上前にインスリンを打つことを余儀なくされていた。食事時間を常に事前に確定させることは社会生活を送る上では困難な場合も多く、また、投与後に予定どおり食事がとれない場合は低血糖に陥る危険などがあるため、食事の直前或いは直後に投与可能な速効型インスリンの開発が望まれていた。

インスリン分子同士の会合に関わる部分は B 鎖の C 末端付近であるため、この領域のアミノ酸を改変するこ

とで、投与後速やかに血中に移行することのできる速効型のインスリンが開発できると考えられた。しかし、この領域のアミノ酸を置換する当初の試みは成功せず、insulin like growth factor-1 (IGF-1) の構造にヒントを得て、最初の改変インスリンが生まれている。IGF-1 はその名のとおりインスリンに類似した構造を持ち、IGF-1 の A 鎖 B 鎖に存在するアミノ酸の 50% は対応する位置のインスリンのアミノ酸に一致している。しかし、IGF-1 はインスリンのように分子間で会合体を形成しない。そこで、インスリン B 鎖の 28 番目の Pro と 29 番目の Lys が IGF-1 では逆になっている点に着目し、B28Pro と B29Lys を逆にしたインスリン (B28Lys, B29Pro) が作製されたところ、速効性の血糖降下作用を示すことが分かった。こうしてできたのが、最初の改変型インスリン Insulin lispro である。

Insulin lispro インスリン リスプロ

改変部位: B 鎖 28 番目 Pro → Lys, B 鎖 29 番目 Lys → Pro

製造用宿主: 大腸菌

特徴: 食事の直前に投与される速効型インスリン。多量体形成が抑制される結果、投与後に速やかに血中に以降する。多量体形成の抑制は、プロリン残基を移動させることにより、分子間の疎水結合形成が減ったためと考えられる。

Insulin Aspart インスリン アスパルト

改変部位: B 鎖 28 番目 Pro → Asp

製造用宿主: 酵母

特徴: 食事の直前に投与される速効型インスリン。インスリンリスプロと同様、B 鎖 28 番目の Pro を置換することにより分子間の疎水の相互作用が抑制され、多量体形成が抑制される結果、速やかな血中への移行を実現した改変体。

Insulin Glulisine

改変部位: B 鎖 3 番目 Asn → Lys, B 鎖 29 番目 Lys → Glu

製造用宿主: 大腸菌

特徴: 多量体形成の抑制により、血中への速やかな移行が可能な速効型インスリン。

<持続型インスリン>

健常人では、インスリンは血糖値の上昇に応じて分泌されるのみでなく、定常的に低濃度のインスリンが分泌されている。従って、糖尿病の治療においては、健常人でみられるベースラインレベルのインスリンを維持するために、速効型と持続型のインスリンの併用が行われる。インスリンの持続性を増すためには、製剤に亜鉛やプロタミンを添加する手法が用いられてきたが、血中インスリンレベルの推移が一定でなくピークが存在することや、患者間での吸収のばらつきが大きいといった問題があった。これらの問題を解決すべく、等電点の変化による投与部位からの徐放、あるいはアルブミン結合性の付与により投与部位からの徐放と血中濃度の持続を実現した改変体が開発されている。

Insulin Glargin インスリン グラルギン

改変部位: B鎖のC末端に Arg2 個付加、A鎖のC末端の Asp→Gly

製造用宿主: 大腸菌

特徴: アミノ酸置換により等電点がインスリンの pH 5.4 より中性側 (pH 6.7) にシフトしている。製剤の pH が 4.0 であるため製剤中では Insulin Glargin は完全に溶解しているが、皮下投与されると pH が 7.0 まで上昇するために投与部位にインスリンの微細な沈澱が生じる。個々のインスリン分子は、その沈澱からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンを持続的に供給することが可能となっている。

Insulin Detemir インスリン デテミル

改変部位: B鎖 30 番目 Thr 欠損、B鎖 29 番目 (C末端) Lys の ε アミノ基に C14 脂肪酸 (ミスチン酸) が結合

製造方法: 酵母で生産されたタンパク質に、化学修飾によりミスチン酸を結合

特徴: 分子間会合による多量体形成とアルブミンへの結合のために投与部位から血中に徐放される。また、アルブミンとの結合のために、血中滞留性が向上している。比活性はインスリンの 1/4。

(2) 改変型 tissue-plasminogen activator (t-PA)

天然の t-PA は、血管内皮細胞から産生されるセリンプロテアーゼであり、限定分解により plasminogen を活性化して、fibrin 分解活性を持つ plasmin を生成させることにより血栓溶解反応を開始させる。t-PA は、Finger ドメイン (フィブリンへの高親和性結合に関与)、Protease ドメイン (プラスミノゲンの特異的な切断に関与)、EGF ドメイン (肝臓にある受容体との結合とそれによる血中からの消失に関与)、Kring1 ドメイン (肝臓への結合に関与)、Kring2 ドメイン (フィブリンに促進されるプロテアーゼ活性に関与) の 5 つの機能ドメインを有している。天然型 t-PA の血中半減期は約 3 分と非常に短いために、点滴による持続投与が必要であるのに対して、血中半減期の長い改変体では、単回投与が可能となっている。天然の t-PA は糖鎖修飾されており、糖鎖は肝臓への取り込み、血中からの消失に関わっている。

Reteplase

改変部位: t-PA のドメインのうち、Pドメイン (プロテアーゼドメイン) と K2ドメイン (Kring2 ドメイン) の 2 つのドメインのみからなる。

製造用宿主: 大腸菌

特徴: 糖鎖がないこと、および、EGF ドメイン、K1 ドメインがないことにより、血中半減期が 90 分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、F1 ドメインの欠損によりフィブリン親和性が減少する結果、本薬が血栓の奥まで浸透できるようになり、血栓の速やかな溶解が可能となった。

Tenecteplase

改変部位: Pドメインと K1ドメインに 3 箇所のアミノ酸置換

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: 血中半減期の長い改変型 t-PA。フィブリン親和性および、t-PA の阻害因子 plasminogen activator inhibitor-1 への抵抗性が上昇している。

Pamiteplase パミテプラゼ

改変部位: K1ドメインを欠損させ、天然型 t-PA で N末端から 275 番目の Arg を Glu に置換

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用はフィブリンにより顕著に増強される。天然型 t-PA と比較して血中半減期が延長されている。

(3) 改変型インターフェロン

Interferon alfacon-1 インターフェロン アルファコン-1

改変部位: ヒトインターフェロンアルファの 12 種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置の出現頻度が最も高いアミノ酸に置換。

製造用宿主: 大腸菌

特徴: インターフェロンアルファに比較して高い抗ウイルス活性、NK 細胞およびマクロファージ活性化などの免疫賦活作用、腫瘍細胞の増殖抑制作用を示す。

(4) 改変型顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

Nartograstim ナルトグラステム

改変部位: N末端側から 1、3、4、5、17 番目のアミノ酸が Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に置換されている。

製造用宿主: 大腸菌

特徴: 非改変型の G-CSF と比較して、約 3 倍の比活性を示す。また、In vitro 試験により、血漿中での安定性が天然型 hG-CSF (糖鎖非結合) と比較して高いことが示されており、N末端の置換により立体構造が安定化した結果、プロテアーゼに対して耐性になったものと考えられている。

C.4.3 修飾構造改変タンパク質

アミノ酸置換による改変の他、いわゆる Post-translational engineering も盛んに試みられている。タンパク質に化学修飾を行うもの、糖鎖部分の構造を改変したもの、アミノ酸置換により糖鎖修飾部位を増やした改変体などが開発されている。PEG 化や糖鎖修飾部位の増加により血中半減期が延長された改変型タンパク質では、改変を加えないものと比較して投与回数を減らすことができ、患者の負担軽減やコンプライアンス改善に貢献している。

C.4.3.1 糖鎖構造改変型

(1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

Imiglucerase イミグルセラゼ

改変部位: グルコセレブロシダーゼの糖鎖末端のシアル酸を除去

製造方法: CHO 細胞で生産された組換えタンパク質を

エキソグリコシダーゼで処理

特徴:ゴーシェ病は、糖脂質分解に関わるリソソーム酵素グルコセレブロシダーゼ活性の遺伝的な欠損によるものであり、組織性マクロファージに変化が最も顕著に現われる。グルコセレブロシダーゼをエキソグリコシダーゼで処理することにより、糖鎖末端のシアル酸を除去し、マンノース残基を露出させる結果、マクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介してマクロファージに取り込まれ、細胞内に薬が送達される。改変していないグルコセレブロシダーゼを投与した場合は、肝臓に取り込まれ、血中から速やかに消失する。

(2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ

改変部位:アミノ酸置換により、ヒト erythropoietin (EPO)に N 型糖鎖結合部位を新たに2つ導入した改変体。

製造用宿主:CHO 細胞

特徴:非改変型の EPO と比較して N 型糖鎖結合部位が2箇所多く、5本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が結合している。糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、週1回の投与が可能となった。

C.4.3.2 PEG 結合型

(1) PEG 結合型インターフェロン

インターフェロンの血中半減期は3~5時間程度である。インターフェロン療法では週2回の投与が必要であったが、PEG化により血中半減期が24時間程度にまで延長され、週1回の投与が可能になった。

Peginterferon alfa-2a ペグインターフェロン アルファ-2a

構造:インターフェロンアルファ-2a のリジン残基(主な部位:第31位、第121位、第131位、第134位)の1箇所に、1分子の分枝ポリエチレングリコール(分子量約40kDa、2つの約20kDaのモノメキシポリエチレングリコール鎖がカルボキシリジンに結合したもの)が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約60K)。

製造方法:組換えタンパク質を化学修飾

特徴:血中半減期が非PEG修飾型インターフェロンの約10倍に延長され、投与頻度を減らすことが可能となった。

Peginterferon alfa-2b ペグインターフェロン アルファ-2b

構造:インターフェロンアルファ-2bのアミノ酸残基(Cys¹, His⁷, Lys³¹, His³⁴, Lys⁴⁹, Lys⁸³, Lys¹¹², Lys¹²¹, Tyr¹²⁹, Lys¹³¹, Lys¹³³, Lys¹³⁴, Ser¹⁶³及びLys¹⁶⁴)の1箇所に1分子のメキシポリエチレングリコール(平均分子量:約12K)がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約32K)。

製造方法:大腸菌で生産された組換えタンパク質を化学修飾

特徴:PEG修飾により高分子化されることによって、主として腎からの排泄が抑制され、生体内での保持時間

が長くなることにより持続的な体内動態を示す。非PEG修飾型インターフェロン製剤と比べて投与回数を減らすことが可能。

(2) PEG 結合型 G-CSF

Pegfilgrastim

構造:フィルグラスチムのN末端アミノ酸に、20kDaのメトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが1分子結合。

製造方法:大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾
特徴:PEG化によってフィルグラスチムの腎クリアランスを減少させることにより、持続性とした改変体。

(3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

Pegvisomant ペグビソマント

構造:Human growth hormone (hGH)のアミノ酸配列を9箇所置換し、アミノ酸残基(Phe¹, Lys³⁸, Lys⁴¹, Lys⁷⁰, Lys¹¹⁵, Lys¹²⁰, Lys¹⁴⁰, Lys¹⁴⁵, Lys¹⁵⁸)にhGH誘導体1分子あたり、4~6個のPEG(分子量5K)が結合している。

製造方法:大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾
特徴:Human growth hormone (hGH)のアミノ酸配列を9箇所置換し、hGH受容体への結合能を有するものの細胞内応答は惹起しない誘導体にPEG化を施した改変体。内因性hGHの受容体への結合を阻害する。hGH誘導体1分子あたり、4~6個のPEG(分子量5K)がLys残基に結合しており、PEG化により血中半減期の延長が図られている。hGHの過剰分泌が原因でおこる内分泌疾患である先端巨大症に用いられる。

C.4.4 融合タンパク質

複数のタンパク質ドメインを融合させた人工タンパク質は、新しい作用機構を有する医薬品として、いわゆるrational approachにより創出された医薬品と言える。これまでに4種類が医薬品として承認されているが、いずれも、2種類のタンパク質ドメインのうち、1つのドメインが薬効を担い、もう1つのドメインが主に体内動態制御に関わっている。

Denileukin Diftitox

構造:Interleukin2 (IL-2)の一部(2-133アミノ酸)とdiphtheria toxinの一部(細胞傷害性ドメインと細胞内移行ドメイン1-386、484-485アミノ酸)の融合タンパク質。分子量58K。

製造用宿主:大腸菌

特徴:IL2由来ドメインにより標的細胞(IL2受容体発現リンパ腫細胞)へのターゲティングが行われ、細胞に結合した後、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。ジフテリアトキシンによるタンパク合成阻害によって、細胞死が誘導される。

IL-2受容体として機能するCD25が発現している非ホジキン型リンパ腫の一種である皮膚T細胞リンパ腫に用いられる。副作用として、IL2受容体を発現している活性化B細胞やT細胞、マクロファージにも作用してしまうため、感染症が起こる場合がある。

Etanercept エタネルセプト

構造: ヒト Tumor necrosis factor(TNF)受容体 p75 の細胞外のリガンド結合ドメインとヒト IgG の Fc 部分の融合タンパク質。分子量 150K。

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: 細胞表面の TNF 受容体への TNF の結合を拮抗的に阻害することにより、炎症性サイトカインである TNF α の阻害剤として働く。薬効を担うのは、TNF α への結合性を有する TNF 受容体由来ドメインで、Fc 部分は血中半減期延長の役割を持つ。関節リウマチに用いられる。

Alefacept

構造: ヒト leukocyte function antigen 3 (LFA-3)の細胞外領域である CD2 結合ドメインとヒト IgG1 の Fcドメインの融合タンパク質。分子量 91.4K。

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: CD2 抗原を表面に発現している T リンパ球に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。T リンパ球の細胞数減少も認められるが、その機構としては、Alefacept の Fc 部分が NK (Natural Killer) 細胞など Fc 受容体を有する細胞傷害性の細胞と T 細胞を架橋するためと考えられている。中程度から重症の乾癬に用いられる。

Abatacept

構造: ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインと IgG1 の Fcドメインの融合タンパク質。分子量 92K。

特徴: 抗原提示細胞上に存在する CD80/CD86 分子に結合することにより、CD28 分子を介した T 細胞の活性化が阻害される。T 細胞の機能抑制効果を有する新しいタイプのリウマチ治療薬であり、2005 年 12 月に米国で承認された。TNF α 阻害剤などこれまでの治療薬が効かない症例での効果が期待されている。

C.4.5 考察

C.4.5.1 改変型医薬品の品質・安全性確保

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、および、生物学的性質と免疫原性の評価の重要性を取り上げ、以下に考察する。

(1) 化学修飾工程を有する場合

タンパク質医薬品の品質・安全性は製造方法の影響を大きく受ける。従って、遺伝子組換え、細胞培養、タンパク質精製からなる通常の組換えタンパク質の製造工程に加えて、PEG 化、脂質修飾などの化学修飾工程が加わる場合は、修飾に関連する項目についての評価が品質・安全性確保のポイントとなると思われる。ここでは PEG 化を例に、化学修飾工程を有する場合の品質・安全性確保について考察する。

PEG 化反応はタンパク質の部位特異的なものではなく、1 種類あるいは数種類のアミノ酸に PEG が導入されるものである。従って、PEG 化反応後のタンパク質は PEG 化された部位、導入された PEG 分子数のいずれにおいても異なる構造を持つ分子種の混合物となり、

分子量などを指標に精製された画分についても、PEG 修飾位置異性体の混合物となる。従って、物理的・化学的性質として、分子量、PEG 結合分子数、PEG 結合部位、PEG 修飾位置異性体の構成比などを解析し、目的物質や目的物質関連物質の構造を明確にすることが重要になると思われる。生物学的性質の点では、PEG 修飾位置異性体ごとの生物活性や体内動態、PEG 非修飾体との比活性の比較も、明らかにすべき特性である。不純物については、製造工程由来不純物として、PEG 化反応の工程で用いられる試薬を評価項目に加え、目的物質由来不純物としては、PEG 非結合型となった遊離のタンパク質や、生物活性の異なる PEG 修飾位置異性体を評価すべきであると思われる。修飾反応条件が、修飾部位異性体の構成比に大きく影響し、原薬の生物活性にも影響を与えると予想されることから、製品の品質の一定性を確保するためには、PEG 化反応の条件、精製工程などが厳密に管理されなければならないと考えられる。また、工程管理の中では、PEG 化反応に用いられる各種試薬の品質管理なども必要であろう。

(2) 生物学的性質等

改変型タンパク質医薬品が単純タンパク質あるいは糖タンパク質であり、特別な加工工程を経ない場合、その物理的・化学的性質については、通常の組換えタンパク質と同様の特性解析を行うことで評価が可能であると考えられる。しかし、改変型タンパク質医薬品の生物学的性質に関しては、改変目的とされた機能以外にも変化している可能性が十分あり、安全性に影響がおよぶ場合もあると考えられるため、生物活性、体内動態、がん原性などについて、できる限り詳細な解析が必要であると考えられる。

一例を挙げると、持続型のインスリン改変体であるインスリン グラルギンでは、インスリン受容体との親和性はインスリンと差異がないものの、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体との結合親和性がインスリンの 6~8 倍であると報告されている。げっ歯類を用いた 24 ヶ月間反復投与の発がん性試験により、インスリン グラルギンは発がん性を有しないと判断されており、IGF-1 受容体への高親和性結合と安全性との関連は明らかでないが、このような特性をもつタンパク質の場合は、市販後調査等により長期投与の安全性について検証する必要があると思われる。

一方、医薬品ではないが、B 鎖 10 番目の His を Asp に置換し、インスリン受容体との親和性が亢進した改変インスリンでは、ラットで乳腺腫瘍の発生が報告されている。1 アミノ酸の置換により発がん性が生じることを示す例であり、改変による生物学的性質の変化が安全性に大きく影響する場合があることを認識する必要があると思われる。生物活性の評価は、評価項目ごとに試験の設定が必要であるが、想定外の変化がある場合も予想されることから、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの網羅的解析手法を用いた評価も有用と考えられる。

(3) 免疫原性

アミノ酸置換などにより改変を加えた場合に必ず懸念されるのが、免疫原性の問題である。しかし、タンパク質医薬品の免疫原性は、タンパク質の一次構造のみで決定されるわけではなく、製剤中の目的物質の凝集体や製造工程由来不純物、添加物、投与経路、投与量なども影響する。また、癌患者のように免疫機能の低下した患者では抗体が出現しにくく、免疫機能の亢進した患者では抗体が産生されやすい、血友病患者のように遺伝子に欠損のある場合は対応するタンパク質の抗体が産生されやすい、といった患者側の要因も変動要素として加わる。さらに、ヒトに対する免疫原性は動物実験で評価することができず、臨床試験に入ってから評価となる、といった事情により、タンパク質医薬品の免疫原性は予測が難しく、医薬品開発の早い段階での評価が困難になっている。しかし、天然型の組換えタンパク質医薬品においても免疫原性が問題になる例もあり、天然にはない構造を持つ改変型のタンパク質医薬品では、免疫原性に十分な注意を払う必要があると考えられる。これまでの事例で特に目立った免疫原性が報告されているのは、菌体由来タンパク質であるジフテリアトキシンのドメインを持つ Denileukin Diftitox で、3 回目の投与後には 97% の患者で抗体が検出され、抗体の影響により当該タンパク質のクリアランスが亢進していると報告されている。

タンパク質医薬品の免疫原性の問題が難しい原因の一つは、先に述べたような免疫原性を決定する要因の複雑さにあるが、無視できないのが評価系の問題である。抗体の存在は、RIA (Radioimmunoassay) や ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) のような免疫学的測定法や、目的タンパク質に対する中和活性を評価するバイオアッセイを用いて評価されるが、抗体陽性患者の割合に関するデータは、アッセイ系の感度と特異性に依存する。また、血中に残存する医薬品タンパク質や、サンプリングの時期、サンプルのハンドリングなどにも影響を受けるため、異なるラボや異なる臨床試験の結果を相互比較することは容易ではない。独立して行われた試験で明らかにされた抗体出現率を比較して、タンパク質ごとの免疫原性の強弱を論じることも難しいと考えられる。

投与したタンパク質医薬品に対して抗体が産生された場合、中和抗体は目的タンパク質の効果を減弱させ、その他の抗体は目的タンパク質の体内動態に影響する。改変型タンパク質ではなく、エリスロポエチンやトロンボポエチンの例であるが、産生された抗体が、投与されたタンパク質と同様の構造を持つ生体内タンパク質の作用や体内動態にも影響を与えて深刻な副作用を起こす事例が報告されており、免疫原性の問題はやはり重要であると思われる。ヒトでの免疫原性の予測についての方法論の確立、抗体出現を適切に評価するための方法の標準化や標準物質の策定などが望まれる。文献からは、米国で抗体検出法の標準化に向けた検討が行われている様子が伺われるが、古くて新しい問題と言われるタンパク質の免疫原性について、評価方法の開発・標準化に関する国際的動向を今後もフォローしていきたい。

C.4.5.2 今後の開発動向

これまでに承認されている改変型タンパク質では、点突然変異導入法により天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列を一部置換したものや、タンパク質の大きなドメインを用いたものであった。今後は、今までの方向の延長での開発が進められる他、分子進化法などを用いて、より人工的なタンパク質も創製されてくると予想される。

アミノ酸改変体では、特定部位のアミノ酸配列を個別に置換していく従来の手法とは異なり、ファージディスプレイ法、リボゾームディスプレイ法などの分子進化法により、特定の結合特異性を示す分子をスクリーニングすることによって、新たな機能性人工タンパク質を創製しようとする試みが進められている。ファージディスプレイ法を用いてスクリーニングされた改変型 TNF では、部位特異的 PEG 修飾を可能とする Lys 欠損型改変体や、高比活性を示す改変体が創出されている。リボゾームディスプレイ法では、アンキリンリピートを基本とした人工タンパク質分子の作製に成功した例が報告されており、より人工的な構造を持つタンパク質医薬品が開発されていく可能性が感じられる。

近年は糖タンパク質糖鎖の構造・機能解析研究の進展が著しく、糖鎖含有タンパク質医薬品の有効性・安全性の向上を目指して、タンパク質の糖鎖を改変する試みが進んでいる。抗体に結合している N 結合型糖鎖のフコース含量と抗体の細胞傷害活性 (Antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC 活性) に逆相関があることが明らかになり、フコース低減により ADCC 活性を増強した糖鎖改変型抗体の開発が進められている。また、糖鎖合成関連遺伝子を組み換えた酵母を用いて、高い ADCC 活性を持つ抗体の生産に成功した例も報告されており、糖タンパク質生産の新技术という側面とも合わせて興味深い。

新たな医薬品タンパク質のデザインとしては、Fc ドメインを融合させたタンパク質が既に 3 品目承認されており、Fc ドメインをタンパク質の血中濃度維持のために利用する方法の有用性が確立されつつある。これを改良して、2 種類のサイトカイン受容体と Fc ドメインを融合させることにより、サイトカインとの高親和性結合を実現したサイトカインの阻害タンパク質 (サイトカイントラップ) も報告されている。

Fc 含有タンパク質の血中半減期が他のタンパク質と比べて長い理由は、Fc 受容体 FcRn を介したリサイクリング機構にあるとされているが、FcRn は IgG (Fc 含有タンパク質) の血中濃度維持の他、局所でのタンパク質輸送にも関わっていることが報告されている。これを利用して、Fc 融合タンパク質の経肺投与が可能であることが報告されており、注射以外での投与が可能で注目される。

タンパク質医薬品はこれまでの実績の上でバイオ医薬品の中核となるものであり、今後もその位置付けには変わりがないと思われる。それを裏付けるように、米国研究製薬工業協会 (The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; PhRMA) に加盟している企業が開発中のバイオ医薬品 324 品目のうち、11 品目が遺伝子治療薬、14 品目が核酸医薬品で、その他、

すなわち開発品目全体の 9 割はタンパク質性医薬品であると報告されている。ゲノミクス、プロテオミクス、グライコミクス等の進展を背景に、機能的改変を施したタンパク質医薬品は、今後さらに増加することが予想される。タンパク質の持つ力に人の知恵を加えた改変型タンパク質医薬品が、多くの患者への福音となり、健康的な生活が実現するよう、品質・安全性確保に関連する行政支援研究の課題を今後も考えていきたい。

C. 5 細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準についての国際動向の研究

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細胞研究・再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に直接投与する細胞組織利用医薬品の開発が急速に進展している。このような先端医薬品を用いることにより、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。我が国においても、様々な形での細胞組織利用医薬品の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。

細胞組織利用医薬品の開発が世界的な広がりを見せているが、承認にまで至っている製品はそれほど多くない。わが国においてもいくつかの製品が治験前の確認申請の手続きが出され、審査の結果食品薬事審議会の承認を受けて、治験に入るところである。また、承認申請にまで至った製品は一つだけである。一方で、大学や病院等で多岐にわたる細胞治療の臨床研究が行われているが、このような臨床研究の成果なかなか細胞組織利用医薬品の開発に結びついてはいない。その一つの要因として、このような臨床研究が治療薬開発を視野に入れた研究となっていないことや、企業が臨床研究の成果を細胞治療薬開発につなげようとする際にどのようなデータが治験申請やさらには承認申請に必要なものが十分に理解されていないということもあげられる。

このような状況を踏まえ本研究では、細胞組織利用医薬品に関して克服すべき問題点を明らかにする目的で、細胞組織利用医薬品や遺伝子治療薬の規制に関する国際動向の調査・研究を行った。FDA の細胞治療 IND に関するガイドライン案及び欧州医薬品庁 (EMA) の異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための留意事項について調査・研究した。

C.5.1 FDA の細胞治療 IND ガイドライン案に関する調査研究

FDA の細胞治療 IND ガイドライン案は、審査官が体細胞治療薬の新薬治験申請を審査する際に、「化学、製造及び品質管理」の観点からどのような点を審査すべきか、申請者にどのようなデータを提出させ、また審査のどのような結果を審査報告書に記載すべきか、さらには治験開始までに、あるいは治験のどの段階までにどのようなデータの提出が必要かについて書かれている。従って、審査官への指針との書き方をしているが、

体細胞治療薬の新薬治験審査を行う際に、必要なデータ、規格試験の設定など、その品質、安全性の確保に加えて、治験プロトコルデザインをどのように設定すべきかについても書かれており、申請者に必要な情報が盛り込まれている。このガイダンスの詳細を調査することは、FDA における体細胞治療薬の治験申請に当たっての、製造方法を含めた安全対策、品質確保のための施策を理解するのに非常に有用である。

以下に、FDA の細胞治療 IND ガイドライン案の調査結果を示す。

C.5.1.1 FDA の細胞治療 IND ガイドライン案

I. 審査報告書に記載すべき行政情報

最初に、審査管理官がヒト体細胞治療薬の新薬治験申請の「化学、製造及び品質管理」審査に当たっての求められる事項や、審査報告書への記載事項、申請者に明らかにさせるべき事項や対応の期限等申請者へ通知しておくべき事項等を明らかにしておくことが細胞治療 IND ガイドラインの目的であることが記載されている。細胞治療 IND ガイドラインは、基本的には現在まで FDA から出されている細胞治療薬や IND に関するガイドラインを参照することとされており、細胞治療薬特有の問題点等を抽出したものといえる。さらに、細胞治療 IND ガイドラインには審査報告書に記載すべき行政上の必要事項についても述べられている。

II. 製造工程及び製品に関する情報

審査官は調査報告書の中に細胞治療用医薬品をどこでどのように製造するかについて記載しておく必要があるとされている。また、用いる細胞、細胞バンクシステム、試薬、添加剤等の細胞治療用医薬品の製造に用いられる全ての要素や試薬等についても記録も必要とされている。さらに、製造における全ての工程の記載やその妥当性を評価しておく必要性が述べられている。製造工程欄には、細胞や組織をどのように採取し加工するのか、細胞の純化法や調製法、さらには最終製品での製剤化も含まれる。審査に当たっては、「ヒト体細胞治療及び遺伝子治療に関する指針」、「新薬の第1相治験申請の内容とその書式」、「バイオテクノロジー応用医薬品を含む新薬の第2相及び第3相治験申請；化学、製造方法、および治験コントロールの内容と書式」の通知案を参照することとされている。さらに、審査報告書を提出する前に、FDA が発出している全ての関連通知や基準を参考にすべきとされている。

III-1. 製造工程—原料や試薬等

審査官は細胞組織利用医薬品の製造に用いる全ての細胞や試薬等について審査報告書に記載することが求められている。また、細胞や試薬をどのような原材料から得たのかについて記載するとともに、細胞や試薬等の受け入れ試験についても概要を作成しておくことが求められている。

III-1.1. 細胞

a. 細胞の由来としての同種や自己の違い

審査報告書には以下の点について記載しておく必要があるとされている。

- 細胞原料:組織や細胞の種類(例えば、結腸細胞、血液細胞、神経細胞、T細胞)。
- 細胞誘導の方法:in vivo でドナー細胞を誘導したり、活性化するような方法を用いているかどうか。
- 細胞の採取方法:細胞を採取する方法(手術を行うのか白血球分取(可能であれば用いる機器についても)などの方法を用いるのか)や採取を行う施設の名前と所在地。
- ドナースクリーニングの方法:ドナースクリーニング法の十分な安全性を担保できるか評価するとともにまたその試験方法について記載すべきとされている。FDAではこれに関連して、「クラスII 特別規制ガイダンス文書:ヒト硬膜」、「クロイツフェルトヤコブ病及び「ヒト細胞組織由来製品における変異型クロイツフェルトヤコブ病のリスク低減化のための防御手段」、そして「ヒト細胞組織利用医薬品のドナー適正」についてのガイドライン案がすでに出されており、これらを参照することが求められている。最終的にドナースクリーニング法を設定する場合には、IND に記載されたドナーの品質基準が新しいこれらのガイダンスに適合しているかあるいはその要求されている点に答えられているかを評価することが求められている。

①自己由来細胞を用いる場合

ドナーが特別な感染因子(例えばヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス)の検査やドナースクリーニングが行われていない場合、製品を製造に用いられる培養工程が、治療を受ける患者以外の人に対してウイルスあるいは他の感染因子の増幅や拡散を引き起こさないか考察するべきとされている。

②同種細胞を用いる場合

HIV-1、HIV-2、HBV(表面抗原及びコア抗原に対して)、HCV、ヒトT細胞白血病ウイルス1型及び2型(HTLV-1、HTLV-2)、CMV、EBV、あるいは適切な他のウイルス等の感染性因子に関するドナースクリーニングと試験についての関連情報についての記載が求められている。これらの試験においては、FDAが承認あるいは許可した試験試薬キットを用いて行うべきとされている。またドナーに関する血清学的あるいは診断履歴、医療履歴(病歴)等についても報告書に記載するべきとされている。必要に応じて遺伝的多型性や主要組織適応抗原の一致についてデータを求めることも考慮すべきとされている。臍帯血や他の分娩由来原料を用いる場合はドナーの母親での試験を行うことが求められている。ドナー細胞の臨床履歴や試験に関連する全ての事項について臨床審査官と議論をすべきとされている。

b. 細胞バンクシステム

フィーダー細胞として動物由来細胞を用いる場合には、異種移植に関するガイドラインを参考にするように要請されている。審査官は製品の製造に用いる細胞バンクシステムについて、その履歴、どのような原料から得たのか、どのような誘導法を用いたのか、特性解析結果、各 MCV や WCB の試験法と試験のタイミング等に関する情報を明らかにしておくべきとされている。自己由来細胞製品などのように細胞バンクを用いない場合には、次のような試験の適用は難しいかもしれないと

している。

① マスターセルバンク

審査官は安全性、同一性、純度、安定性を確保するための試験法を含む MCB の特性解析についてその妥当性を評価するべきとされている。また次のような事項について試験が適切に行われているかについて明らかにさせるべきとされている。

(ア) 製品の微生物汚染についての事項、この中には無菌性やマイコプラズマや in vivo、in vitro ウイルス試験も含まれる。

(イ) 特定の感染因子の汚染がないことの確認。自己細胞以外のヒト由来細胞は CMV、HIV-1 と 2、HTLV-1 と 2、RBV、HBV、HCV などについて試験を行うべきである。牛やブタ由来の添加因子(血清やトリプシン等の血清由来成分)による牛やブタ由来の感染因子が細胞に汚染されていないか試験を行い、試験結果に基づいて評価。

(ウ) 細胞の生理的あるいは生化学的特性解析を通じた目的細胞の同定のための試験方法を含めた細胞の同一性確認試験。

(エ) バンク細胞の純度:これには混入している目的外細胞の同定や混入比率も含まれる。

(オ) 細胞の活性(活性化リンパ球、ドーパミン分泌能、インスリン分泌能など)や細胞の機能成熟(網状細胞など)。

(カ) 審査官は、可能であれば製品の安全性において重要な他の工程についても記載しておくこと。これには、次のような項目が含まれる。

② 全ての培地の詳細や製造に用いる試薬や添加剤を含めた培養条件。また試薬等の保証書のコピーを含む。

③ 細胞濃度、保存したバイアル数、保存温度、細胞バンクを保存している施設の所在など、関連する情報を含めた MCB の凍結方法、保存方法、解凍方法。

④ 凍結保存後の継代数を重ねた時の MCB の遺伝的あるいは表現形質の安定性や細胞の生存率に関する情報。

II-1.2. 試薬

審査官は製造に用いる全ての試薬をリストアップし記載しておくことが求められている。FDA の細胞治療 IND ガイドライン案では、リストアップすべき試薬としてあげられるのは、細胞の増幅、分化、選択、精製、さらには他の重要な製造工程において必須に要素が含まれるが、最終製品には含まれないものとされている。例えば、胎児牛血清、トリプシン、成長因子、サイトカイン、モノクローナル抗体、抗生物質、細胞分離装置、培地、さらには培地成分があげられている。これらの試薬は、最終製品の安全性、力価、純度に影響するものであり、特に感染性因子の迷入には特段の注意を払う必要があると考えられている。

a. 製造に用いる試薬の一覧

審査報告書の中には培養液に添加するものを含め製品の製造中に用いる全ての試薬をリストアップすることが求められている。用いる試薬について以下の点を

明らかにしておく必要があるとされている。

① 用いる試薬の濃度。

② 試薬供給業者／生産者。

③ 試薬の原料:用いる試薬の原料がヒト由来である場合には、製品の製造や調製に用いる全てのロットの安全性が保証できるような適切な方策がとられているかを明らかにしておく必要がある。全ての動物由来試薬に関しては、由来となる生物の種類、その供給者／生産者、それらを得た国、どのような製法で作られているのかについてのデータベースを提出することを求めるべきとされている。ブタ由来試薬を用いる場合は、ブタ原料での試験結果に基づいて化学、製造及び品質管理基準に則りブタパルボウイルスの混入がないことを明らかにするべきとされている。反芻動物由来原料を用いる場合は、BSE 発生国あるいは BSE リスクの高い国由来のものでないことを明らかにしておくことが必要とされている。もし、申請者が BSE リスクの高い国由来の原材料を用いようとしている場合には、他の原材料由来のものを用いることを求めるべきとされている。BSE 問題に関する臨床審査官の意見や、FDA の BSE に関するページを参照するべきとされている。

④ 試薬の品質:それぞれ用いる試薬等は FDA が承認したものであるかどうか審査報告書で明らかにするよう求めている。もし試薬等が生物薬品、医薬品あるいは医療用具として規制を受けるものである場合には、専門の審査官との相談審査を行う必要性を考慮すべきとされている。相談審査の手続きに関しては、「細胞組織利用医薬品と同時に用いるもの」項に関する項を参考にすべきとしている。また、「ヒト治療用モノクローナル抗体の製造と試験法における考慮事項」(11)に関する指針を参考にすることも必要とされている。

⑤ 「化学、製造及び品質管理」あるいは「相互参照文書」:もし申請者が製造工程一部で、FDA で承認されていない研究用レベルの試薬を使用しようとしている場合は、その試薬の使用に当たってその原材料の品質や安全性に関する情報を「化学、製造及び品質管理文書」として提出するが必要とされている。あるいは、試薬製造業者規制ファイルが FDA に提出されている場合には、申請者からの「相互参照文章」を治験申請として提出することも可能とされている。「化学、製造及び品質管理文書」の作成では、行われた試験が妥当かどうか、また試薬に関する試験に不十分な点がないかを評価しておくことが求められている。「相互参照文書」の作成では、規制ファイルコードが含まれている必要があり、また何らかの安全上において問題になる点や特別な配慮を払うべき点がないかについて相談審査を行っておく必要性も考慮すべきとしている。

b.品質管理プログラム

用いる試薬が FDA の承認を得ていないものである場合には、試薬の安全性や品質確保のための追加試験が必要となるであろう。安全性試験(無菌性、エンドトキシン、マイコプラズマ、ウイルス等)、機能解析、純度、有害物質(残存溶媒試験)の否定試験を含む品質管理プログラムを適切に行われているかを審査報告書に明記すべきとされている。どの程度の試験を行うべきか

については製造工程において対象となる試薬がどこで使用するかによるとされている。

c.最終製品における試薬の残存性の確認

審査報告書には最終製品への試薬等の残存量を検出する規格試験を記載すべきとしている。用いる試薬に既知の毒性が知られている場合には、治験に当たって、最終製品でその試薬が十分に除去されていることを示すデータが申請者から提出されているかを明確にさせることが必要とされている。

d. 他の問題点

ベータラクタム系の抗生物質(例えば、ペニシリン、セファロスポリンやこれらの誘導体)が製造に用いられている場合には、適切な除去基準の設定や投与する患者への問診も含めて、臨床審査官と相談することが必要とされている。あるいは、他の抗生物質に変更を要求することも考慮すべきとされている。

II-1.3.複合製品

この審査官向け指針の目的とする複合製品とは、ヒト体細胞利用医薬品と CBER の所管することの医薬品や医療用具とを組み合わせた最終製品を指すとされている。組み合わせる医薬品や医療用具は FDA の市販の承認を受けたもののあるかもしれない(新薬承認申請(NDA)、市販前承認申請(PMA)、あるいは一定の要件を満たした医療用具の市販の届け(510(k))、治験中(新薬治験申請(IND)、医療用具治験届け(IDE))のものや、初めてヒトへの治験を行うことになるものも想定される。審査官は、審査管理官ないしは申請者と協議して使用される医薬品や医療用具が承認申請上どの段階に当たるものなのかを分類しておくことが求められている。もし当該当該医薬品や医療用具が承認されているものである場合には、審査報告書にそのことを記載しておくべきとされている。殆どのケースで、CDER や医療用具・放射線医薬品審査センター(CDRH)との相談あるいは共同審査が必要となると考えられている。そのようなケースでは、すでに承認を受けている医薬品や医療用具を用いる場合でも同様のことが必要とされている。なぜならば、当該製品にこれらの医薬品や医療用具を用いる場合、新たな目的、新たな用量、あるいは異なる投与方法であるとか、医療用具の場合には新たな使用方法、使用目的となるなど、承認されていない目的に用いることが多いと想定されているためである。審査官は申請された製品が協議審査あるいは共同審査が必要かどうか不明の時は、上司と協議するべきとされている。

もし、複合製品の医薬品成分や医療用具の部品が FDA にすでに承認申請が出されている場合には(例えば、治験申請、医療用具治験届けあるいはマスターファイルとして)、複合製品の申請者は相互参照ファイルを提出することができる。相互参照ファイルは、複合製品の成分あるいは部品として医薬品や医療用具を用いる時の安全性を担保するために、「化学、製造及び品質管理基準」に従って、使用される成分や部品の審査する CBER の許可を与えるものである。審査官は審

査報告書の中に当該製品のなかの医薬品成分あるいは医療用具の部品に関する相互参照ファイルが存在することを明記し、そのファイルに含まれるべき必要な情報の妥当性を明らかにしておくことが必要とされている。また、審査官は、協議審査官あるいは共同審査官に、その審査に役立つ相互参照ファイルに書かれている情報を提供することが求められている。

協議審査官あるいは共同審査官への要請は、「審査センター間での協議審査及び共同審査手順」(12)に書かれている標準審査手順及びその考え方に書かれていることに従って行われるべきとされている。要請に際しては、問い合わせたい治験申請の当該箇所を明らかにしたうえで答えを得るまでのスケジュールを明示して、相手の審査官に相談することが求められている。相談したい審査結果を受け取りたい日程は、法律で定められている審査のデッドライン、相談したい審査の重要度、さらにはその相談された審査の内容がどの程度の時間を必要としているかに依存するとされている。上司の審査管理官は、決められた標準審査手順及び必要な様式に従って書類をもって、適切と考えられるセンターあるいは審査部門へ相談審査あるいは共同審査の要求することになる。IND 審査では厳格な時間的制約があるため、時間内に審査を終了させるためには相談すべき審査官を決めるための種類を送る前に審査管理官と相談し、担当センターないしは部局とコンタクトをとることが重要とされている。また依頼した審査の進行状況を適切に把握していくために、「標準審査手順及びその考え方」に従って複合製品を審査するオフィスにどのようなことを相談し、また何を共同で審査したいのかを書いたコピーを送っておくべきとされている。担当審査官ないしは審査管理官は基本的な関連する文書が相談審査の要請書とともに相手にわたっているか確認するために複合製品の審査オフィスと緊密に連絡をとることが求められている。もし相談審査中に審査スケジュールに影響を与えるような問題が起こった場合には、審査官は上司に複合製品審査オフィスとその点についてどのような報告をしておくべきか議論すべきとされている。この複合製品審査オフィスはセンター間の相談審査や共同審査に関して責任を持つ部署であり、審査のモニターやその効率を管理すべき部署である。

a. 医療用具の審査

審査官は医療用具・放射線医薬品センターの審査官に医療用具材料が複合製品の中でどのように使われているのか、適切な生物学的同等性あるいは一般的な医療用具としての試験が充分に行われているか、用いる基材やその基材を動かすためのソフトウェアの試験が適切に行われているかについて意見を求めるべきとされている。審査官は、医療用具・放射線医薬品センターの医療用具材料に関する審査結果を提出する報告書に沿って、特に重要な問題点を申請者に伝えなければならないとされている。審査官は、複合製品の医療用具材料に関する情報として医療用具の名前、製造者やどこから得たか、使用目的、どのような申請段階にある製品か、さらには簡単な医療用具の説明を記載しておくことが求められている。

b. 医薬品成分

医薬品成分が含まれる製品の相談審査や共同審査では、審査官はその複合製品の中で医薬品成分がどのように使われているのか、また申請書のどこに情報があるかを伝える必要があるとされている。用いられている医薬品成分が承認されているか申請中のものでも、新規の投与方法で用いたり、異なる用量、あるいは新しい薬効を目指している場合がある。審査官は医薬品審査センターの相談担当審査官にどのようにその医薬品成分が最終製品の中で使われるのか、製造方法の評価、医薬品原液あるいは製剤として適切な試験結果が得られているかを確認してもらうようにすべきとされている。医薬品成分に関連する審査官の基本的情報についても審査報告書に記載することが求められている。このような情報には、医薬品の名前、製造者やどこから得たか、使用目的、どのような申請段階にある製品か、さらには簡単な医薬品成分に関連する申請の内容についての説明が求められている。審査官は、医薬品審査センターでの医薬品成分に関する審査結果を提出する報告書に沿って、特に重要な問題点を申請者に伝える必要があるとされている。

II-1.4. 必要事項の要約

製品成分の審査において問題となった箇所について要約の作成が求められている。問題となる箇所については申請者との議論やレターでの通知することが必要とされている。

II-2. 製品製造—製造工程

審査報告書の「製造工程」の項には、細胞治療薬製品の製造と精製を通じて用いられる全ての工程についての詳細な情報が含まれていなければならない。製造及び精製工程や製造工程管理試験や製品での試験に関する概略図を添付することは非常に有用である。そのような概略図が申請者から提出されていれば審査報告書にそれを添付するべきである。

II-2.1. 自己または非自己ヒト由来細胞の調製

審査官は調査報告書に以下の点について記載することが求められている。

a. 細胞の採取／加工方法及び培養条件

調査報告書には採取した細胞浮遊液の量と細胞数の記載が必要とされている。また、採取に当たっての機械的、酵素的な処理方法や細胞採取に用いる機器や用具について記載も必要とされている。これらには、細胞を分離するための密度勾配遠心法や磁気ビーズ、あるいは蛍光励起細胞分離装置 (FACS) の情報が入る。また、フラスコ培養やバック培養などの細胞培養系について用いる培養系が閉鎖系になっているのか開放形なのかについての情報も含まれる。また、全ての工程管理試験について記載が求められている。

b. 細胞の投与前照射

自己あるいは非自己ヒト由来細胞を投与まえに放射

線照射するのであれば、細胞の増殖能が喪失させられていることを示す申請書のデータを記載しておくが必要とされている。また、放射線照射後も細胞の治療目的とされる機能が維持されていることを示す証拠について十分に審査し、その結果の記載が求められている。細胞放射線照射装置の照射線量の校正に関する情報も必要とされている。

c. 工程スケジュールと中間製品での保管

審査官は細胞の採取からハーベストまでの各ステップで必要な時間経過の記載が求められている。必要に応じて、各ステップでどのような試験がいつまでに行われなければならないかを明らかにしておく必要があるとされている。また人に投与するまでに凍結保存するのであれば、その前後での安定性のデータの記載も求められている。細胞の採取からハーベストまでの間に細胞を保存するタイミングやその保存条件の記載も同様である。保存に当たってバルクハーベストの安定性を担保するために十分な方策がとられているかを明確にすることが求められている。

II-2.2. 最終ハーベスト

最終ハーベストの段階で細胞を製剤化するために遠心操作を行うかどうかについての記載も必要とされている。またこれには遠心操作における細胞の洗浄条件や用いる洗浄液についても含まれる。細胞は製剤化ご凍結保存されるのかあるいはすぐに患者に投与されるのかについて明らかにする必要があるとされている。最終ハーベスト細胞を保存するのであれば、保存方法、保存期間の記載が必要とされている。

II-2.3. 製剤化

審査報告書の中に製剤化の詳細についての記載が求められている。また、製剤化する際に成長因子やヒト血清アルブミン等の添加剤が含まれているかについて、またそれをどのような原料から得たのかについても明らかにすることが必要とされている。これにはタンパク質成分をどの供給者から得ているのか、用いている濃度が含まれる。さらに、最終製品での細胞密度等についての記録が必要とされている。また、投与の行われる医療機関に凍結して送付される場合は、どのような条件で輸送されるのか、一定した解凍条件を保證するデータがあるかについて審査報告書に記載する必要があるとされている。

II-2.4. 記載しておく必要がある製品の製造に当たっての注意事項

審査官は最終製品の製造工程に関する審査において特に重要と思われる箇所についての要約の作成が必要とされている。重要と思われる箇所については申請者と議論するかレターでの通知等が求められている。

III. 製品の試験

細胞治療薬の製剤の試験には安全性確保の観点から微生物試験(無菌試験、マイコプラズマ試験、迷入

ウイルス試験)や確認試験、純度試験(エンドトキシンを含む)、生存率試験、力価等の製品の特性を評価するための試験が必要とされている。またこれ以外の試験が必要になることも想定されている。申請者が、セルバンクの作製や製造工程そのものの評価、さらには各製品のロットごとの品質や製品の一定性を確保するために、製造工程を通じて適切な試験を設定しようとしているかを明らかにするように求めている。製造工程が適切にコントロールできていない場合には、ロットごとの製品の恒常性を担保することは困難である。このような場合は、目的とする臨床効果を得るための製造における重要なパラメータを設定することも困難になるとされている。審査官は「バイオテクノロジー医薬品を含むヒト生物由来製品の同一性、同質性を保証するための FDA 指針」(13)を参考にすべきとされている。新薬治験審査に当たっては、中間製品や最終製品の基準に用いられている規格を明記させることが必要とされている。この規格には製品の品質や製造に用いる原料の確認を含めた品質基準(すなわち試験法、工程管理、受け入れ試験)が含まれる。受け入れ基準は、採用しようとしている試験の限度値やその幅、あるいは他の規格値が含まれる。審査官は申請者から提出された試験結果に基づいて採用されている受け入れ基準が適切かどうかを評価すべきとされている。また、開発段階でのデータに基づいて申請者が採用しようとしている規格の適切性についても評価すべきとされている。なぜならば、出荷基準は製品の承認に向けた製品の開発過程で確立していく必要のあるものであるかに他ならない。出荷基準と規格には次のようなものが含まれるとされている。

III-1. 微生物試験

申請者が、微生物試験を細胞バンク、中間工程、最終製品の各段階で適切に実施しようとしているかを評価することが必要とされている。

III-1.1. 無菌性試験(細菌及びカビの試験)

無菌試験に関して次のような情報が提供されているかどうか。

a. 試験方法

申請者が最終製品で無菌試験を実施しようとしていることの確認。適切な試験法としては FDA の生物製剤基準 21CFR610.12 に記載されている試験法や米国薬局方に記載されている試験法(14)があげられている。もし申請者が他の方法を採用している場合には 21CFR610.12 に記載されている方法との同等性を評価しておくか、「試験や工程の同等性」に関する生物学的製剤基準 21CFR610.9 に従った承認が必要とされている。もし、製造に抗生物質を用いている場合には試験に先立って抗生物質が除去されていなければならない。抗生物質の除去が不可能な場合には米薬局方に従って静菌作用や静カビ作用についてあらかじめ評価しておくことが求められている。このような評価により、製品の中に含まれる残存抗生物質が無菌試験の結果に及ぼす妨害作用がないことを担保することができる。