

Table 2 開発中の抗体医薬品 (2003 年 1 月時点)

段階	数					
	合計	キメラ抗体	ヒト化抗体	完全ヒト抗体	マウス抗体	その他
発売中	11	4	5	0	2	0
申請中	3	0	1	1	1	0
フェーズⅢ	20	1	9	2	8	0
フェーズⅡ	60	7	25	15	4	9
フェーズⅠ	35	5	13	6	6	5
合計	129	17	53	24	21	14

(文献 14 より許可を得て転載)

Table 3 ヒト抗体マウスの改良

	KM マウス (Kirin/Medarex 社)	TC マウス (Kirin)	HuMab マウス (Medarex 社)	通常マウス
重鎖遺伝子	ヒト V _H (81) 全種類	ヒト V _H (81) 全種類	ヒト V _H (4)	マウス V _H 全種類
軽鎖 κ 遺伝子	ヒト V _κ (38) 全種類	ヒト V _κ (76) 全種類 × 2	ヒト V _κ (38) 全種類	マウス V _κ 全種類
定常領域 サブクラス	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1	マウス定常領域 すべて
安定性	OK	軽鎖 2 番染色体断片が 不安定	OK	OK
ハイブリドーマ 取得効率	よい	ハイブリドーマが不安定なため, 取得効率低下	V _H が少数のため, 抗原への反応性弱い	よい

(文献 3 より許可を得て転載)

Table 4 抗体医薬品の製造技術

システム	抗体の型	回収源
トランスジェニック動物		
マウス	IgG	乳汁
ヤギ	IgG	乳汁
ニワトリ	IgG	卵
植物		
タバコ	sIgA, IgG	葉
メイズ (トウモロコシ)	IgG	種子
大豆	IgG	さや, 種子, 幹, 葉
米	scFv	種子
小麦	scFv	種子

(文献 41 より許可を得て転載)

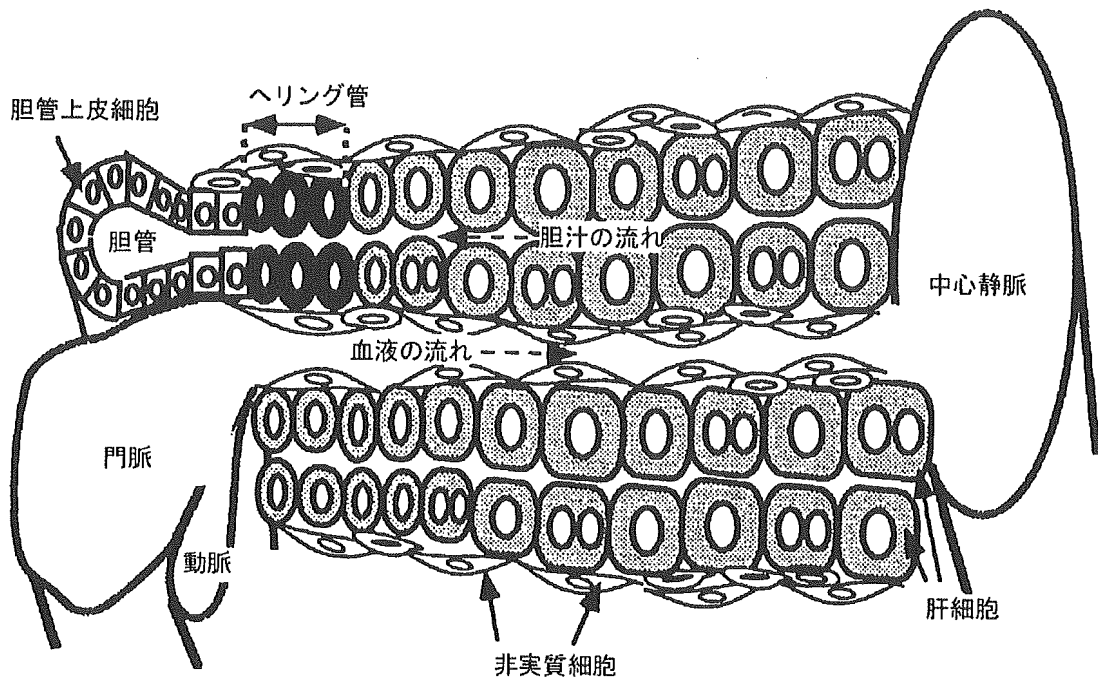


Fig. 25 ラット肝臓の模式図 (参考文献 63 より許可を得て転載)

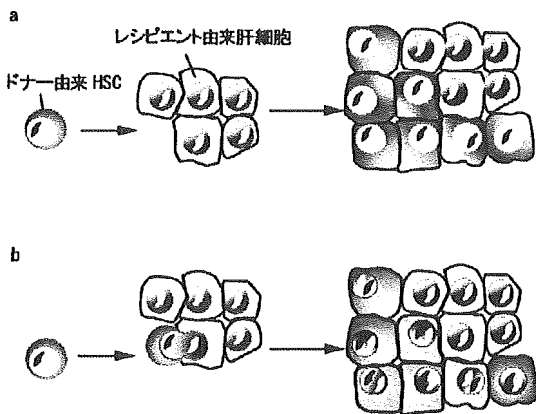


Fig. 26 HSC が肝細胞に分化する機構 (参考文献 64 を元に作製)

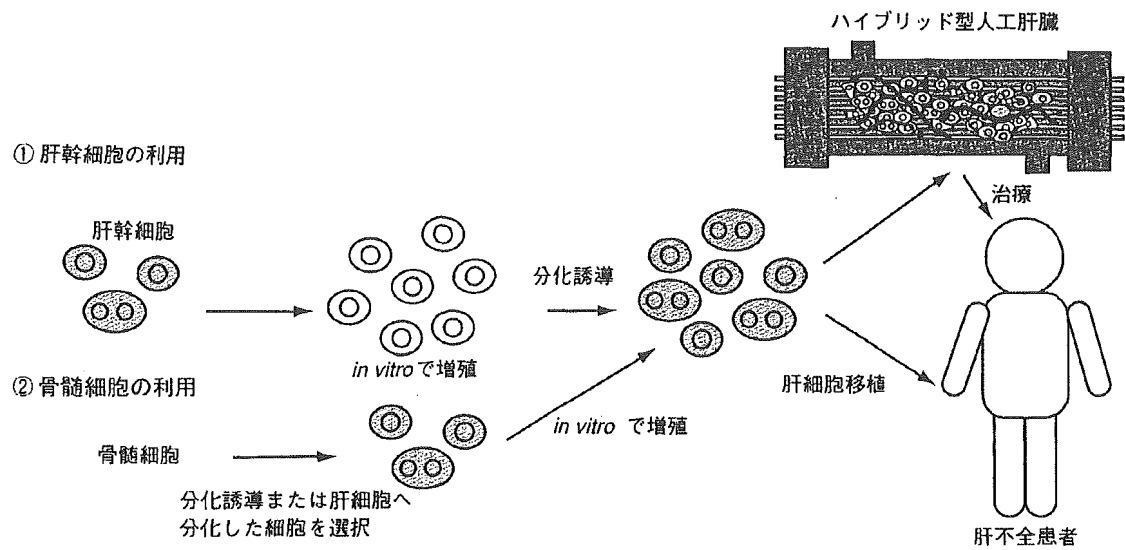


Fig. 27 肝幹細胞の臨床応用 (参考文献 65 より許可を得て転載)

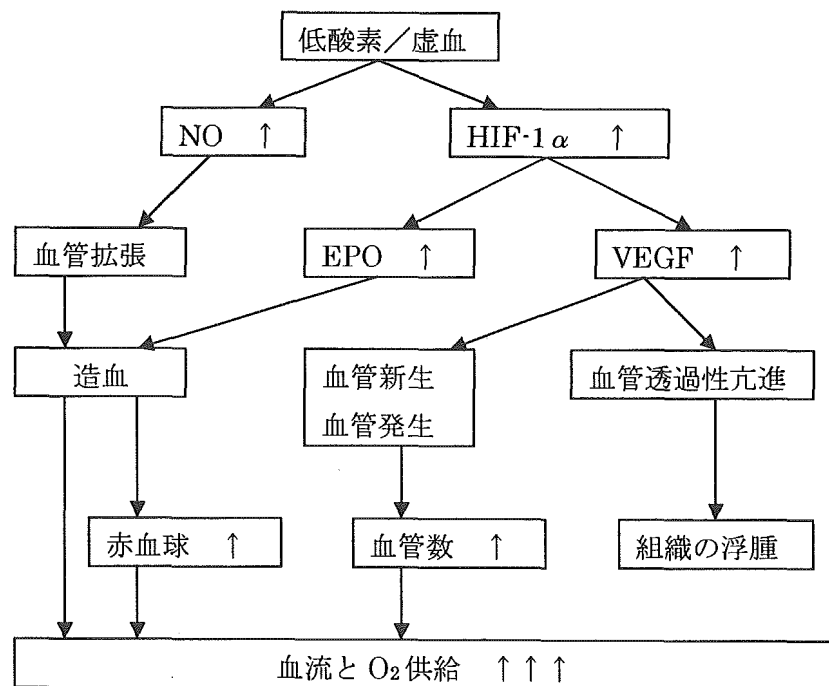


Fig. 28 虚血に対する組織の反応
(参考文献 68 を元に一部改変)

Table 5 oval cells、肝細胞、胆管上皮細胞のマーカ-

マーカ-	Oval cells	肝細胞	胆管上皮細胞
CK7	+	-	+
CK19	+	-	+
Albumin	±	+	-
CYP1A ₂	-	+	-
AFP	+	-	-
CK8	+	+	+
CK18	+	+	+
OV-6	+	-	+

“+”陽性、“-”陰性、“±”陽性及び陰性

Table 6 増殖因子が neovascularization (血管新生)の各プロセスに及ぼす作用

	血管新生	動脈形成	血管発生
VEGF-A	+	+	+
FGF-2	+	+	+
HGF	+	+	?
MCP-1	+	+	?
TGF-β	+	+	+
GM-CSF	?	+	+
PDGF-BB	+	+	?

(参考文献 68 を元に一部改変)

Table 7 血管新生療法としてタンパク質を用いた臨床試験

タンパク質	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果
FGF-1	フェーズ I OL	CABA 補助療法	20	IM 注射	安全、投与部位における毛細血管紅潮
FGF-2	フェーズ I OL	CABA 補助療法	8	ヘパリン・アルギン酸	安全
FGF-2	フェーズ I/II DBR	CABA 補助療法	24	ヘパリン・アルギン酸	虚血域サイズの低下、3年間効果持続
FGF-2	フェーズ I OL、投与量決定、 ブラセボコントロール	単独療法	25	IC 注入	耐性、低血圧
FGF-2	フェーズ I OL、投与量決定	単独療法	52	IC 注入	安全、高投与量で低血圧 狭心症、心筋かん流の改善
FGF-2	フェーズ II DBR	単独療法, FIRST 試験	337	IC 注入	ETT あるいは SPECT において安全/無効 ブラセボと比較し症状の短期間改善
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ I OL	単独療法	15	IC 注入	低投与量で低血圧、SPECT による障害サイズの低下
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ I OL	単独療法	14	IV 注入	安全、明らかに効果無し
VEGF-A ₁₆₅	フェーズ II DBR	単独療法 VIVA 試験	178	IC + IV 投与	コントロールと比較し、ETT、症状、SPECT における 改善無し
GM-CSF	フェーズ I/II DBR	単独療法	21	IC + IV 注入 2週間 注入	GM-CSF グループにおいて側副フローインデックス (流 動指数) の改善

(参考文献 66,67 を元に一部改変) IM (intramuscular)(筋肉内)、OL (open label) (非盲検)、DBR (double-blind randomized)(無作為二重盲検)、IC (intracoronary) (冠動脈内)、IV (intravenous) (静脈内)、SPECT (single photon emission computed tomography) (単光子放出コンピューター断層撮影)

Table 8 血管新生療法として遺伝子治療を用いた臨床試験

増殖因子	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果
VEGF	単独療法	フェーズ I	5	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、心筋かん流の改善
	単独療法	フェーズ I	20	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、症状の改善
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	13	プラスミド (VEGF ₁₆₅)、IM	安全、心筋かん流の改善
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	6	プラスミド (VEGF-2) IM	安全、実行可能
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I/II 決定、ブラセボコントロール	29	プラスミド (VEGF-2) IM	安全、狭心症のクラスの低下
FGF	CAGB 補助療法/単独療法	フェーズ I	21	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) IM	耐性、
	血管形成術およびステント挿入 KAT 試験に付随して実施	フェーズ II	103	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) あるいはプラスミド リポソーム (VEGF ₁₆₅) 局所 IC	安全、臨床的再狭窄率における違い無し、Ad-VEGF グループにおける心筋かん流の改善
	単独治療 AGENT 1 および 2 試験	フェーズ I DBR、漸増用量、ブラセボコントロール	131	アデノウイルス (FGF-4) IC	安全、副作用無し、ETT,かん流改善の傾向

(参考文献 67 を元に一部改変)

Table 9 血管新生療法として細胞を用いた臨床試験

細胞のタイプ	試験の種類	試験のタイプ	患者数	デリバリー	結果
自家未分画 BM 細胞	フェーズ I	CAGB 虚血心筋補助	5	IM	安全
	フェーズ I	選択の無い患者への単独治療	10	IM NOGA 法併用	実行可能
	フェーズ I 無作為コントロールと標準的な MI 治療との比較	単独治療 MI, ステントを用いた PCI BOOST 試験	60	IC	安全 LV 機能の改善
自家 BM 由来単核球細胞 (フィコールにより分画) CD133+, CD34+, CD45+, CD117+ その他の前駆細胞が混合された組成	フェーズ I、MI の標準治療に対する比較	単独治療 MI, PTCA	20	IC	安全、改善
	フェーズ I	単独治療 虚血心筋	8	IM NOGA 法併用	安全
	フェーズ I OL 非無作為コントロール	単独治療 虚血心筋	20	IM NOGA 法併用	安全、心筋かん流改善
	フェーズ I 非無作為コントロール	単独治療 MI、ステント血管形成術	20	IC	安全、改善
自家 BM 由来単核球細胞または循環血液由来前駆細胞	フェーズ I 非無作為コントロール	MI、ステント血管形成術 TOPCARE-AMI 試験	59	IC	安全、前駆細胞グループとの間において差無し
Ac133+BM 細胞	フェーズ I	CABG 補助	6	IM	安全

(参考文献 2 を元に一部改変) MI (myocardial infarction) (心筋梗塞) PCI (percutaneous coronary intervention) (経皮冠動脈インターベンション) PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) (経皮経管冠動脈形成術) LV (left ventricular) (左心室)

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

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長

タンパク質医薬品の有効性・安全性向上、あるいは、新たな作用機構を有する医薬品の創出を目指して、改変型タンパク質医薬品の開発が進められている。本研究では、改変型タンパク質医薬品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状況と、それぞれの品目の特性を調査した。これまでに、アミノ酸配列改変型、糖鎖改変型、ポリエチレングルコール結合型、融合タンパク質に分類される改変型タンパク質医薬品が日米 EU で合わせて 20 種類承認されており、そのほとんどには、体内動態制御を目的とした改変が行われていた。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考察した。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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 [1]、米国 Biotechnology Industry Organization [2]、欧州医薬品審査庁 EMEA [3]、European Commission – Enterprise and Industry DG – Pharmaceuticals [4]、医薬品医療機器総合機構[5]の医薬品に関するサイト、および、文献[6,7]を参考に、調査した。

C. 研究結果

C-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 1 にまとめた。

Table 1 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-2. アミノ酸改変体

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的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(ミリスチン酸)が結合

製造方法：酵母で生産されたタンパク質に、化学修飾によりミリスチン酸を結合

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。

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(プラスミノー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。

Retepase

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、プラスミノー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。

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。

改変型顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

Nartograstim ナルトグラスチム

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-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-3-1. 糖鎖構造改変型

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。

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-3-2. PEG 結合型

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、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 のモノメト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 分子のメト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。

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。

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. 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。

D. 考察

D-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。

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。

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

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ルルギンでは、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[8]。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、インスリングルルギンは発がん性を有しないと判断されており[9]、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[10,11]。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。

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[12]。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[13]、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[14]。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[15]、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[16]、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。

D-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[17]。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[18,19]、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[20-22]。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[23]、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[24]。

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を介したり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[25]。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[26,27]、注射以外での投与が可能なタンパク質として注目される。

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[28]。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。

E. 参考文献

- 1) http://www.fda.gov/cder/biologics/biologics_table.htm.
- 2) http://www.bio.org/speeches/pubs/er/approved_drugs.asp.
- 3) <http://www.emea.eu.int/index/indexh1.htm>.
- 4) <http://pharmacos.eudra.org/F2/register/alfregister.htm>.
- 5) http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/shinyaku_index.html.
- 6) Hayakawa, T., and Ishii, A. (2002). Trends and perspectives in development of Biologics produced by new technology (in Japanese). *IYAKUHIN KENKYU* 33: 693-729.
- 7) Walsh, G. (2004). Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 185-196.
- 8) Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 151-159.
- 9) http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/g031003/78006900_21500AMY00131_Q100_1.pdf.
- 10) Dideriksen, L., Joergensen, L., and Drejer, K. (1992). Carcinogenic effect on female rats after 12 months administration of the insulin analogue B10 ASP. *Abstract. Diabetes* 41: 143A.
- 11) Drejer, K. (1992). The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab Rev* 8: 259-286.
- 12) Schellekens, H. (2003). The immunogenicity of biopharmaceuticals. *Neurology* 61: S11-S12.
- 13) Schellekens, H., and Casadevall, N. (2004). Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *J Neurol* 251 Suppl 2: II4-9.
- 14) Anderson, P., Louie, J., Lau, A., and Broder, M. (2005). Mechanisms of differential immunogenicity of tumor necrosis factor inhibitors. *Curr Rheumatol Rep* 7: 3-9.
- 15) Schellekens, H. (2002). Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1: 457-462.
- 16) Mire-Sluis, A. R., et al. (2004). Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* 289: 1-16.
- 17) Yamamoto, Y., et al. (2003). Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21: 546-552.
- 18) Amstutz, P., et al. (2005). Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem* 280: 24715-24722.

- 19) Binz, H. K., et al. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22: 575-582.
- 20) Natsume, A., et al. (2005). Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded antibody comprising a single-chain antibody linked the antibody constant region. *J Immunol Methods* 306: 93-103.
- 21) Niwa, R., et al. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods* 306: 151-160.
- 22) Niwa, R., et al. (2005). Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res* 11: 2327-2336.
- 23) Li, H., et al. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*
- 24) Economides, A. N., et al. (2003). Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 9: 47-52.
- 25) Ghetie, V., and Ward, E. S. (2002). Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res* 25: 97-113.
- 26) Dumont, J. A., et al. (2005). Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J Aerosol Med* 18: 294-303.
- 27) Bitonti, A. J., et al. (2004). Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9763-9768.
- 28) van de Weert, M., Jorgensen, L., Horn Moeller, E., and Frokjaer, S. (2005). Factors of importance for a successful delivery system for proteins. *Expert Opin Drug Deliv* 2: 1029-1037.
- 348, 259-268 (2006)
- 2) 早川堯夫、石井明子 スタンダード薬学シリーズ 第8巻 医薬品の開発と生産 第13章 組換え医薬品 (SBO28 組換え医薬品の特色と有用性を説明できる、SBO29 代表的な組換え医薬品を列挙できる、SBO30 組換え医薬品の安全性を概説できる) (日本薬学会編、東京化学同人) P.98-P.103, 2005
2. 学会発表
- 1) 石井明子、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英、川西 徹：細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質の有用性評価 日本薬学会 第126年会 2006年3月 仙台
- 2) 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質のシグナル増強 Part3 日本薬学会 第126年会 2006年3月 仙台
- 3) 鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：Bioimaging of caspase activation during ER stress-induced cell death. 第79回日本薬理学会年会 2006年3月 横浜
- 4) 鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：小胞体ストレスによるカスパーゼ活性化のイメージング：第14回 日本バイオイメーシング学会 2005年10月 東京
- 5) Martin K Ng, Edwin Chang, Jenny Wu, Bing-yin Wang, Regina Katzenburg-Clark, Akiko Ishii-Watabe, John P Cooke : A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration - Novel Insights into Angiogenesis. American Heart Association Scientific Sessions 2005 Nov. 13-16, 2005, Dallas
- 6) 小林哲、河合洋、鈴木琢雄、石井明子、早川堯夫、川西 徹：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質シグナルの増強 Part2 質量分析総合討論会 2005年5月 埼玉

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説

- 1) Akira Harazono, Nana Kawanishi, Satsuki Itoh, Noritake Hashii, Akiko Ishii-Watabe, Toru KAWANISHI, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*,

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

Table 1 日米EUで承認されている改変型タンパク質医薬品

分類	一般名	承認年	適応疾患	改変部位	改変目的	付加された主な機能
アミノ酸配列改変型						
	Insulin Lispro	1996	糖尿病	B28Pro→Lys, B29Lys→Pro	PK	速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)
	Insulin Aspart	2000	糖尿病	B28Pro→Asp	PK	速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)
	insulin Glulisine	2004	糖尿病	B3Asn→Lys, B29Lys→Glu	PK	速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)
	Insulin Glargin	2000	糖尿病	A鎖のC末端のAsn→Gly, B鎖のC末端にArg2個付加	PK	持続性(中性pHでの溶解性低下による徐放化)
	insulin Detemir	2005	糖尿病	B30Thr欠損, B29LysにC14脂肪酸結合	PK	持続性(アルブミンとの結合による)
	Reteplase	1996	急性心筋梗塞	FDメイン, EGFDメイン, K1ドメイン欠損, 糖鎖なし	PK	血中半減期延長(3分→90分)、血栓溶解速度上昇
	Tenecteplase	2000	急性心筋梗塞	FDメインとK1ドメインの3アミノ酸置換	PK	ファイブリン結合特異性上昇, PAI-1抵抗性上昇
	Pamiteplase	-	急性心筋梗塞	K1ドメイン欠損, Arg275→Glu	PK	血中半減期延長
	Interferon alfacon-1	1997	C型肝炎	各サブタイプで出現頻度の高いアミノ酸に置換	PD	比活性上昇
	Nartogastim	-	好中球減少症	N末端付近57アミノ酸置換	PD	比活性上昇
糖鎖改変型						
	Imiglucerase	1994	ゴーシェ病	シアル酸を酵素的に除去し、糖鎖末端をマンノースに	PK	標的細胞(マクロファージ)への取り込み促進
	Darbepoetin alfa	2001	貧血	アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2箇所追加	PK	血中半減期延長
PEG結合型						
	Peginterferon alfa-2a	2002	C型肝炎	PEG修飾(40kDaの分岐型PEG, 1箇所, Lys)	PK	血中半減期延長
	Peginterferon alfa-2b	2001	C型肝炎	PEG修飾(12kDaのPEG, 1箇所, Lys他)	PK	血中半減期延長
	Pegfilgrastim	2002	好中球減少症	PEG修飾(20kDaのPEG, 1箇所, N末端)	PK	血中半減期延長
	Pegvisomant	2003	先端巨大症	97アミノ酸置換+PEG修飾(5kDaのPEG, 4-6箇所, Lys)	PD+PK	GHアンタゴニストとしての作用+血中半減期延長
融合タンパク質						
	Denileukin Diftitox	1999	皮膚T細胞リンパ腫	IL2 + Diphtheria toxin	PD+PK	IL2受容体に結合
	Etanercept	1998	関節リウマチ	TNFR + Fc	PD+PK	TNFiに結合+血中濃度持続
	Alefacept	2003	尋常性乾癬	LFA3 + Fc	PD+PK	CD2に結合+血中濃度持続
	Abatacept	2005	関節リウマチ	CTLA4 + Fc	PD+PK	CD80/CD86に結合+血中濃度持続

PD=pharmacodynamics:薬物に関わる機能を改変
PK=pharmacokinetics:体内動態を改変

遺伝子治療薬及び細胞組織利用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

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子治療薬及び細胞組織利用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、FDAの細胞治療新薬治験申請（IND）に関するガイドライン案、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、ICH 遺伝子治療専門家会議において検討されている「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」見解案等を調査・研究した。（1）FDAの細胞治療新薬治験申請（IND）に関するガイドライン案は細胞組織利用医薬品の新薬治験申請に当たって、どのようなデータを申請者に求め、さらに審査報告書に記載すべき事項や治験開始前までに確立しておくべき事項や他の審査官との協議すべき事項など、細胞治療薬INDを審査する審査官への手引き書の形をとっている。しかし、審査報告書への記載すべき事項としてまとめられている事項は、治験開始までに、あるいは治験最終段階までに整備されているべきデータや規格試験法の設定などが含まれており、IND申請を行おうとする開発者にとっても有用な情報が盛り込まれている。安全性面からは、BSEを含む感染因子の混入を防ぐ方策がどのようにとられているかを明らかにすることを求め、かつ製造に用いられる各種原材料からの混入防止策等について明らかにされている。また、用いる抗生物質や製造に用いた原材料の製品への混入や生細胞率の最低基準を示すことも行われている。製品の品質や安定性面から、特性解析をどのように行うべきか、安定性試験のプロコールについても明らかにされている。治験によって明らかにすべき有効性をどのように立証していくかに関連して、製品の生物活性や力価を設定についても詳細に書かれている。これらについてはINDのどの段階までに最終的な答えを出すべきかについてもふれられており、本ガイドライン案は日本における細胞組織利用医薬品のIND審査あり方に非常に参考になると考えられる。（2）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はEUにおいて異種細胞治療薬の承認申請に当たって必要とされる基本事項について書かれたものである。特に、異種細胞治療薬の安全性に関する最も重要な点として、感染性因子の伝播を如何に防止、あるいは潜在的な感染を含めて検出するかに力点が置かれている。また、感染症に関する安全性は患者のみならず、患者と密接な接触を持つ人や医療従事者、さらには公衆衛生の観点からも十分な対処を求めている。感染症の伝播に関連して、治療に用いた細胞等の検体の保管、記録の保管等に加え、感染性因子の動物を用いた検査を行っている場合に必要に応じてその試験に使用した動物の検体も保管することを推奨している。本留意事項文書では、異種細胞治療薬の基礎から前臨床開発、臨床開発、さらには市販後を含めたサーベランスの広範囲の事項について、基本的考え方が述べられており、我が国での異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための指針作成に非常に有用な情報を与えるものと考えられる。（3）「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ICH見解案は、遺伝子治療薬の生殖細胞への挿入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が含まれる予定である。特に、非臨床試験に当たって実施すべき試験を選択していくためのフローチャートが提案されており、遺伝子治療薬のリスクに応じた実施すべき試験の選択法が示されようとしている。今後、我が国においてもアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療や制限増殖能をもつウイルスベクター製品の開発も進んでいることから、本見解案が遺伝子治療薬開発における安全性評価に非常に有用であると考えられる。

A. 目的

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や遺伝子治療薬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や遺伝子治療薬の

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確認を受けて、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のかが十分に理解されていないといこともあげられる。

一方、遺伝子治療薬に関しては、先進国で承認された例はないが、米国では500プロトコル以上の臨床研究が実施され、ヨーロッパでも100プロトコル以上の臨床研究が実施されている。我が国の遺伝子治療薬開発は、欧米に比べて大きく遅れていたが、ここ数年単なるベクターの供給を受けた臨床研究ばかりでなく、独自に開発されたベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施が承認され、また申請されようとしており、新たな実用化の時代に入ってきている。

遺伝子治療では、フィラデルフィアでのアデノウイルスベクターを用いた臨床研究での死亡事故やフランスでのレトロウイルスベクターを用いたX-SCID治療における白血病の発症など重大な副作用の発症も報告されている。これらは、ウイルスベクターの適切な投与量の設定に問題があるケースやウイルスベクターそのものに内包される挿入変異に関する有害事象である。さらに、遺伝子治療においては相同組換えによる増殖性ウイルスの混入や、腫瘍溶解性ウイルスベクターのように増殖性を持つ製品の開発が進められており、このような増殖性ウイルスベクターの体外への放出の防止と、そのための検査手法の開発やリスク評価法のあり方など克服すべき点も多い。

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や遺伝子治療薬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、欧州医薬品庁(EMEA)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、ICH遺伝子治療専門家会議において検討されている「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」見解案等を調査・研究した。

B. 方法

本研究では以下の様な課題に関して調査・研究した。(1) FDAより審査官むけの細胞治療INDガイドライン案として発出された「細胞治療薬の新薬治験申請の審査方針及び審査報告書フォーマット」を中心に調査研究を行った。また、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、我が国やEU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。(2) EMEAの「異種細胞治療医薬品に関する留意事項」(28)を中心に調査研究を行った。また、関連する各種基準やガイドライン等(2-4)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。(3) 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伝達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EMEAのコンセプトペーパー(32)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。

C. 結果及び考察

C-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。

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(1-6)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」(1)、「新薬の第1相治験申請の内容とその書式」(2)、「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」(3)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」(4)、「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のための防御手段」(5)、そして「ヒト細胞組織利用医薬品のドナー適正」(6)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2つのガイドライン(9-10)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。これらの審査に当たっての情報として、「生物製品の製造に用いられる細胞ラインの特性解析に当たって考慮すべきこと」(7)やICHのQ5D文書「生物製品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」(8)についても参考にすべきとしている。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めて。

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、胎児仔牛血清、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。もし試薬等が生物製品、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いての考慮事項」(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sporin 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 の所管するところ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し（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