

適切な標準物質を作成することが有効であると思われる。

1.3.3. TGN1412のMABEL算出

MABEL (Minimal Anticipated Biological Effect Level) は、ヒトで最小限の生物学的影響が生じると予想される用量、すなわち、ヒトでの用量反応曲線の下限のところに対応する用量であり、ヒト初回投与量を MABEL 以下に設定することで、初回臨床試験における有害事象発生を極力避けることができると考えられる(図8)。以下に、専門家グループからの報告書を参考に、TGN1412のMABELについて述べる。

(1) 標的占有率

MABELの算出には、標的占有率が重要な指標の一つとなる。専門家グループからの報告書では、図9に示したとおり、CD28のターンオーバーがない、血液以外への抗体の分布や消失がない、投与後速やかに結合が平衡に達する、という前提のもと、0.1 mg/kgのTGN1412を投与されたヒトでは投与直後のCD28の占有率

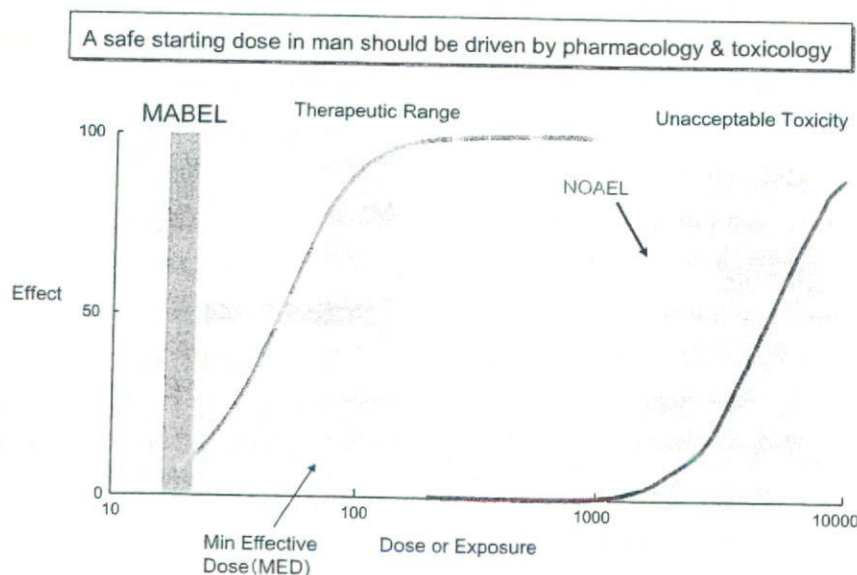
が90.6%になると算出されている。このように高い標的の占有率を示す状態では、薬理作用は最大限に生じていたものと考えられる。TGN1412のようなアゴニスト活性を持つ医薬品では、初期の標的占有率が低いレベルにとどまるよう、用量を設定すべきであろう(図10)。標的占有率が5~10%になるTGN1412の用量は、0.001 mg/kg程度となる⁴⁾。

(2) ヒト細胞を用いた試験の結果

TGN1412と同じ相補性決定領域を持つマウス抗ヒトCD28抗体5A.11を用いた実験では、ヒトT細胞の増殖が認められる最小濃度が0.1 µg/mlであった³⁶⁾。これは、ヒトの血漿の総量を2.5 L、体重を70 kgとすると、約0.0036 mg/kgを投与した時の濃度に対応する。

(3) 動物を用いた試験の結果

マウス抗ラットCD28抗体JJ316を用いた実験では、NOEL (No Observed Effect Level) が< 0.3 mg/kg、薬理活性を示す至適濃度が1~5 mg/kgとされている。したがって、この試験系では、生物学的影響が認められる最小用量は、0.3~1 mg/kgであると考えられる⁴⁾。



EMA Workshop on the Guideline for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products. 12 June 2007
Dr. J. Sims (Astra Zeneca) の発表スライドをもとに作成

図8

TGN1412によるCD28占有率の算出

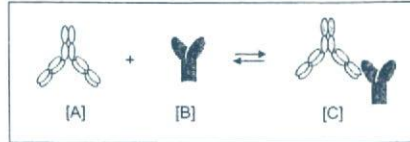
Data

Dose TGN1412 : 0.1 mg/kg
 Body weight : 70 kg
 Molecular weight TGN1412 : 150,000
 Blood volume : 5L , Plasma volume : 2.5L
 T lymphocyte count at baseline (before dosing) : 1.3×10^9 cells per L blood
 CD28 receptors per T cell : 150,000 (Bryl et al. J. Immunol. 167, 3231, 2001)
 Kd : 1.88 nM (TeGenero, information in public domain)

Binding affinity (Kd) = $[A][B]/[C]$

[A] = free mAb
 [B] = free ligand
 [C] = mAB-ligand complex

AB/C = 1.88



Calculation

Total TGN1412 concentration in plasma immediately post-dosing
 = $0.1 \times 70 / 150,000 / 2.5 \times 10^6 = 18.7 \text{ nM}$ (A + C)

Total ligand (CD28) concentration exposed to plasma at baseline
 = $1.3 \times 10^9 \times 150,000 \text{ (receptors/cell)} \times 5 / Na \times 1/2.5 \times 10^9 = 0.648 \text{ nM}$ (B + C)

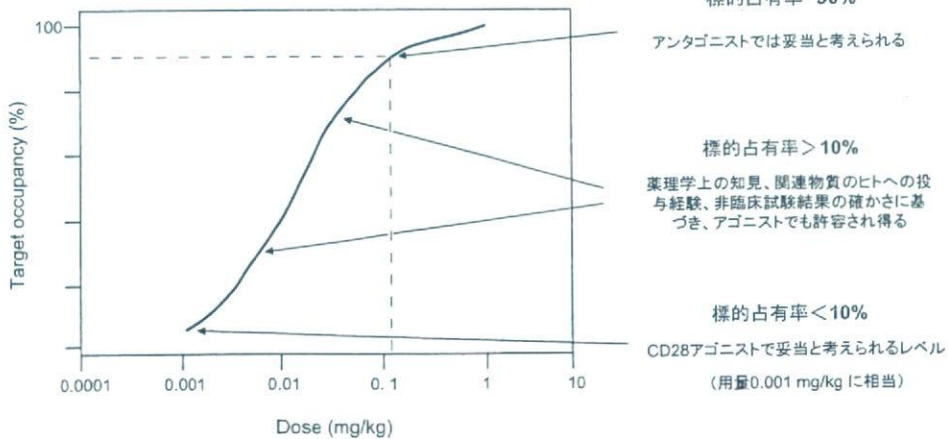
⇒ Drug-ligand concentration (C) immediately post-dosing = 0.587 nM

⇒ Percentage CD28 receptors occupied by TGN1412 = 90.6%

<Expert Scientific Group Final Report (P.29)をもとに作成>

図 9

許容される標的占有率



EMA Workshop on the Guideline for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products. 12 June 2007
 Dr. J. Sims (Astra Zeneca) の発表スライドをもとに作成

図 10

図9のように標的占有率を求めるためには、標的分子の濃度が既知でなければならないが、標的分子が組織や、容量が一定でない滑液などに存在する場合は、それは容易ではない。そこで一般的に、抗体の標的分子の濃度が投与された抗体の濃度より十分低いと仮定できる場合は、以下の式により標的占有率を概算できるとされている（図11：図中の解釈は本稿の著者によるもの⁴⁾。

$$Ro = 1 / (1 + Kd [nM] / (187 [nM/mg/kg] \times Dose [mg/kg]))$$

例えば、Kd[nM]の200分の1の値に対応する量[mg/kg]を投与された場合、初期の標的占有率は約50%となる。

標的占有率の概算

抗体の濃度が標的分子(受容体)の濃度より十分高いと考えられる場合は、用量と結合定数から、以下の式により標的占有率を概算することができる。

$$\text{Fractional ligand occupancy (Ro)} = 1 / \left(1 + \frac{Kd [nM]}{187 [nM/mg/kg] \times Dose [mg/kg]} \right)$$

Body weight : 70 kg
Molecular weight : 150,000
Blood volume : 5L, Plasma volume : 2.5L



$$AB/C = Kd$$

$$A+C = Dose [mg/kg] \times 70 [kg] / 150,000 / 2.5 \times 10^6 \\ = 187 [nM/mg/kg] \times Dose [mg/kg]$$

$$Ro = C / (C+B) \\ = 1 / (1+B/C) \\ = 1 / (1+Kd/A) \\ \approx 1 / (1+Kd/(A+C)) \\ = 1 / (1+Kd/(187 \times Dose))$$

A >> B のとき、A >> C と考えられるので、A ≈ A+C

<Expert Scientific Group Final Report (P.30)をもとに作成>

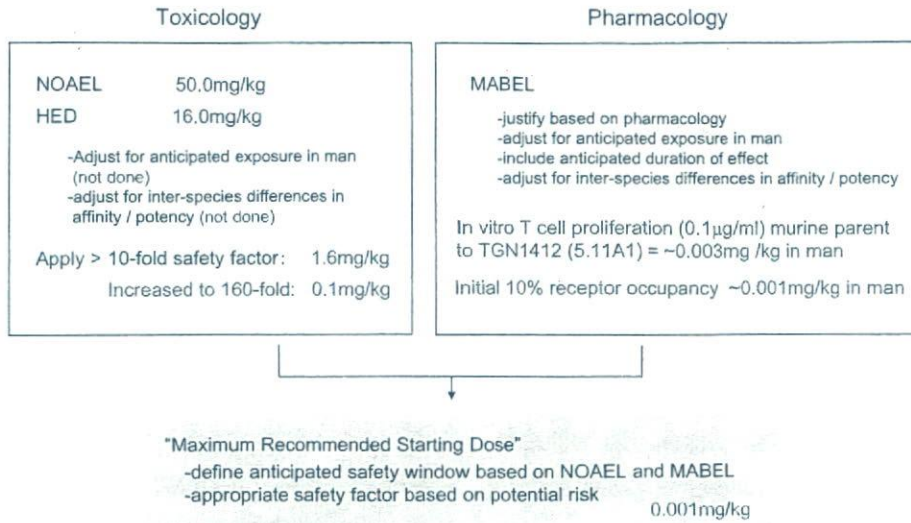
図11

これらの結果から、TGN1412のMABELは0.001 mg/kg程度と考えられる。したがって、ヒト初回投与量として許容される上限は、NOAELを基準に求められた0.1 mg/kgと比較して低い方の用量である0.001 mg/kgであったと考えられる（図12）。

TGN1412のヒト初回投与量は、カニクイザルに投与された最高用量である50 mg/kgをNOAELとして算出されたが、IL-6などのサイ

トカイン放出が薬理作用か有害作用かの見極め次第で、この判断の妥当性が異なってくる。MABELを指標とする場合は、検出された作用が薬理作用であるか有害作用であるかの区別は不要であるので、薬理作用と有害作用の区別が難しい場合は、MABELを基準にすることで、適切な用量設定を行うことができると考えられる。

TGN1412: MABEL dose calculation



EMA Workshop on the Guideline for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products. 12 June 2007
 Dr. J. Sims (Astra Zeneca) の発表スライドをもとに作成

図 12

1.4. TGN1412 事故が薬の開発 (臨床・非臨床) に与えたインパクト: まとめ

TGN1412 の臨床試験は、リスクの高い医薬品の非臨床・臨床試験をどのように行うかを議論する契機となった。臨床における安全性確保のためには、ヒト初回投与試験で有害事象が生じるリスク要因の見極め、非臨床試験系の妥当性の検証、ヒト初回投与量の算出などに関して、個々の医薬品の開発段階での判断を適切に行うことが重要であると考えられる。TGN1412 の事故を受けて作成された EMEA のガイドラインは、非臨床試験から臨床試験への移行にあたって特段の注意を要するのはどのような医薬品か、また、ヒトで有害事象が発生するリスク要因があると考えられる医薬品の非臨床試験をどのように実施し、臨床試験をどのようにデザインするかを考える上で、今後の参考になるものと思われる。

本稿で考察した事項に関連して、TGN1412 事故を教訓に今後考えるべきこととして、以下

のようなことが挙げられる。

(1) サイトカイン放出症候群に関して:

- ・リンパ球の活性化あるいはエフェクター細胞の活性化作用を持つ抗体医薬品では、常にサイトカイン放出症候群に対する十分な注意が必要である。

(2) 非臨床試験に関して:

- ・ヒトでの作用を予測し得るヒト細胞/組織を用いた試験系の開発を推進すべきである。
- ・ヒト由来細胞と動物由来細胞の反応性の比較を行うことは、非臨床試験系の妥当性を評価する上で有用であると思われる。
- ・TGN1412 と類似した作用機構を持つ抗体医薬品では、抗体のドライコーティングや血管内皮細胞との共培養系を用いてヒトリンパ球の反応を解析することにより、ヒトでの反応の予測に有用な知見が得られる可能性が考えられる。
- ・ヒトの組織・細胞パネルを用いた抗体医薬品の交差反応性の検証は、安全性に関する

重要な情報を与え得るため、非臨床試験の一つとして推奨されるものであると考えられる。

- ・目的外の作用も含めた医薬品の影響を評価するためには、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどのOmics解析も有用であると思われる。

(3) 新しいコンセプトに基づく医薬品の開発に関して：

- ・CD28のように複雑な作用を持つ分子を標的とするには、適切な用法用量の設定が必須であり、病態の理解を深め、個々の患者がどの状態にあるかを見極める診断方法の開発も必要であると思われる。

1.5. 今後の展望

TGN1412は、T細胞に発現するCD28を標的とするモノクローナル抗体であり、免疫調節作用により、関節リウマチやB細胞慢性白血病に用いることが考えられていた。その開発は前述のような結果に終わったが、抗体医薬品やその他のバイオ医薬品には、現在開発中のものも含めて、免疫制御を目的としたものが多い。これらの開発が進んだ結果、自己免疫疾患である関節リウマチのように、バイオ医薬品が治療に不可欠な存在となっている疾患もある。我が国においても、関節リウマチの治療に、キメラ型抗TNF α 抗体Infliximab、あるいは可溶性TNF受容体とFcの融合タンパク質Etanerceptが使用できるようになり、既存の薬物療法では難しかった寛解を導くことも可能になったとされている³⁷⁾。その他に、ヒト抗TNF α 抗体、抗IL-6受容体抗体、抗CD20抗体、抗RANKL抗体などの抗体医薬品や、CTLA4とFcの融合タンパク質なども関節リウマチの治療に有効であることが期待されており、関連領域で有用なバイオ医薬品は今後も増えると予想される。

2007年までに22品目のモノクローナル抗体が治療用医薬品として上市され(表5)、現在も多くの抗体医薬品の開発が精力的に進められ

ている。その多くが免疫系に作用するものであるが、その他のバイオ医薬品にも、インターフェロン類、G-CSFやIL-2などのサイトカイン類のように、免疫系に作用するものが多い。これらは、高い標的特異性を持ち疾病治療に有用である一方で、その使用に伴い、TGN1412で生じたようなサイトカイン放出症候群のみならず、感染症や悪性腫瘍といった様々な有害事象が生じることも報告されている。免疫抑制作用を持つ医薬品では感染症が生じるリスクは避け得ないが、TNF α 阻害薬で報告されているB型肝炎の再燃や結核のように、臨床で使用されて初めて明らかになる重篤なものもあることから、安全性評価には市販後調査なども含めた対策が必要と考えられる。また、免疫抑制作用を持つバイオ医薬品であるEfalizumab(抗CD11抗体)、Infliximab(抗TNF α 抗体)、Adalimumab(抗TNF α 抗体)、Etanercept(TNF受容体とFcの融合タンパク質)、Alefacept(LFA3とFcの融合タンパク質)、Abatacept(CTLA4とFcの融合タンパク質)では、いずれも悪性腫瘍の発生が報告されており、免疫抑制作用を持つバイオ医薬品では、悪性腫瘍の発生に常に注意が必要であろう。

現在、抗体医薬品の開発に多くの企業が注力している理由としては、これまでに抗体の医薬品としての価値が実証されてきたこと、また、抗体医薬品の開発の成功率が高いという近年の医薬品開発の実績があると思われる(米国において、第I相臨床試験が行われたもののうち上市されたものの割合は、低分子化合物では約5%であるのに対して、抗体医薬品では約20%であると報告されている)³⁸⁾。抗体作製の技術革新もこの動きを後押ししており、ファージディスプレイ法やヒト抗体遺伝子導入マウスを用いてヒト抗体を作成する技術が開発され、さらに、低分子化あるいはバイスペシフィック化した抗体など、改変型の抗体の開発も進められている。抗体以外にも、融合タンパク質や、アミノ酸配列改変型、修飾構造改変型などの各種の改変型

表5

これまでに認可された抗体医薬品および融合タンパク質医薬品

名称	商品名	種類	構造	標的	主な適応疾患	承認年		
						US	EU	Japan
Muromonab-CD3	Olithoclone OKT3	マウス抗体	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991
Abciximab	ReoPro	キメラ抗体	IgG1 (Fab)	GP1Ib/IIIa	心筋虚血	1994	NA	NA
Rituximab	Rituxan, MabThera	キメラ抗体	IgG1 κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
Daclizumab	Zenapax	ヒト化抗体	IgG1 κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
Basiliximab	Simulect	キメラ抗体	IgG1 κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
Palivizumab	Synagis	ヒト化抗体	IgG1 κ	RSV F protein	RSウイルス感染	1998	1999	2002
Infliximab	Remicade	キメラ抗体	IgG1 κ	TNF α	関節リウマチ	1998	1999	2002
Trastuzumab	Herceptin	ヒト化抗体	IgG1 κ	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	ヒト化抗体	IgG4 κ (カリケアマイシン結合)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	NA	2005
Alemtuzumab	Campath, MabCampath	ヒト化抗体	IgG1 κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
Adalimumab	Humira	マウス抗体	IgG1 κ	TNF α	関節リウマチ	2002	2003	NA
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	ヒト化抗体	IgG1 κ (Y-90標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	NA
Omalizumab	Xolair	ヒト化抗体	IgG1 κ	IgE	喘息	2003	2005	NA
Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	マウス抗体	IgG2a λ (I-131標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
Efalizumab	Raptiva	ヒト化抗体	IgG1 κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
Cetuximab	Erbix	キメラ抗体	IgG1 κ	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	NA
Bevacizumab	Avastin	ヒト化抗体	IgG1	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
Natalizumab	Tysabri	ヒト化抗体	IgG4 κ	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
Tocilizumab	Actemra	ヒト化抗体	IgG1	IL-6R	キヤスルマン病	NA	NA	2005
Ranibizumab	Lucentis	ヒト化抗体	IgG1 κ (48Kフラグメント)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	NA
Panitumumab	Vectibix	ヒト抗体	IgG2 κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	NA	NA
Eculizumab	Soliris	ヒト化抗体	IgG2/4 κ	C5a	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA
Denileukin Diftitox	Ontak	融合タンパク質	IL-2 + Diphtheria toxin	IL-2受容体	皮膚T細胞リンパ腫	1999	NA	NA
Etanercept	Enbrel	融合タンパク質	TNFR + Fc	TNF	関節リウマチ	1998	2000	2005
Alefacept	Amevive	融合タンパク質	LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA
Abatacept	Orencia	融合タンパク質	CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	NA	NA

NA: not approved

Reichert JM et al. Nature Biotech. 23, 1073, 2005 をもとに作成

タンパク質性医薬品、さらにタンパク質性医薬品以外に視野を広げれば、siRNAなどの核酸医薬品、細胞組織利用医薬品、遺伝子治療薬の開発においても、実用化に向けた研究が進められており、構造の面でも作用の面でも新規性が高く、非臨床・臨床試験での評価が難しい医薬品は今後も増え続けると予想される。

臨床での安全性確保のため、新たな非臨床試験系の開発や、非臨床試験の妥当性検証を十分に行う努力が必要であることは言うまでもなく、本書で紹介されているような、毒性試験に追加されつつある新たな基礎技術などは、極めて有効な手段となるであろう。しかし、ヒトとモデル動物では生物学的にも生活環境の面でも違いがあることを考えると、非臨床試験ですべてを明らかにすることは困難である。バイオ医薬品の安全性確保の上で最も重要な懸念事項の一つであるヒトに対する免疫原性は、現状では臨床試験に加えて市販後の調査を経て評価されている。リスク低減のための対処法を考慮した上で、有用な医薬品開発にあたっての合理的な規制環境の整備が求められる。

1.6. おわりに

TGN1412の事故を教訓に、今後、主として医薬品の開発側には、臨床試験の安全性を担保するための新たな試験法の開発や、非臨床試験系の妥当性に関するより確実な検証が求められ、規制側には、被験者の安全を確保しつつ、新薬創出の妨げとならないよう、非臨床・臨床試験に求められる要件を整理していくことが望まれる。その際には、非臨床試験ですべてを明らかにすることは困難であること、医薬品のヒトにおける有効性・安全性は臨床試験を経て明らかにされるものであり、市販後調査なども含めた総合的な対応が必要であることを再確認しておきたい。

国立医薬品食品衛生研究所の生物薬品部／遺伝子細胞医薬部が事務局となっているバイオリジクスフォーラムでは、2003年以降、年1回

の学術集会を開催して、バイオリジクスの品質・安全性確保に関して産官学の関係者による議論の場を設けている。また、医薬品医療機器総合機構では、2006年度から国際バイオリジクスフォーラムが開催され、バイオリジクスについての国際的な情報交換、あるいはバイオリジクスに関する適正な規制の在り方をめぐる共通の認識を深めるための場が提供されている。さらに、2007年には日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会が主催する医薬品評価フォーラムが発足し、第1回の集会ではバイオ医薬品の開発と評価がテーマとして取り上げられた。このような議論を通じて医薬品開発の実情に則した規制環境が整備され、有用な新薬が安全かつ速やかに、社会に送り出されることが期待される。

参考文献

- 1) 早川堯夫: バイオテクノロジー応用医薬品. 内藤周幸編. 臨床試験 2003. 薬事日報社: 155-79, 2003.
- 2) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価. Available from: http://www.pmda.go.jp/ich/s/s6_00_2_22.pdf
- 3) Early stage clinical trial taskforce; Joint ABPI/BIA report. Available from: http://www.abpi.org.uk/information/pdfs/BIAABPI_taskforce2.pdf
- 4) Expert group on phase one clinical trials: Final report. Available from: http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_063117
- 5) Breslin, S.: Cytokine-release syndrome: overview and nursing implications. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 11(1 Suppl): 37-42, 2007.
- 6) Tuma, R.S.: Phase I antibody risks, trial safety examined. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(14): 956-8, 2006.

- 7) Sharpe, A.H., and A.K. Abbas: T-cell costimulation -biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England Journal of Medicine*. **355**(10): 973-5, 2006.
- 8) Beyersdorf, N., Hanke, T., Kerkau, T. and T. Hunig: Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **64** Suppl 4: iv91-5, 2005.
- 9) Margulies, D.H.: CD28, costimulator or agonist receptor? *The Journal of Experimental Medicine*. **197**(8): 949-53, 2003.
- 10) Investigator's Brochure; TGN1412; Humanized Agonistic Anti-CD28 Monoclonal Antibody. Available from: http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&ssDocName=CON2023515&ssTargetNodeId=389
- 11) Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S. Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D. and N. Panoskaltis: Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *The New England Journal of Medicine*. **355**(10): 1018-28, 2006.
- 12) Kenter, M.J.: Cohen AF. Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet*. **368**(9544): 1387-91, 2006.
- 13) Saio, T.: TGN1412 clinical trial -The truth is still shrouded in mystery-. *Clinical Evaluation*. **34**, Suppl XIV: 13-22, 2006.
- 14) Foon, K.A., Schroff, R.W., Bunn, P.A., Mayer, D., Abrams, P.G., Fer, M., Ochs, J., Bottino, G.C., Sherwin, S.A., and D.J. Carlo: Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **64**(5): 1085-93, 1984.
- 15) Ferran, C., Bach, J.F. and L. Chatenoud: In vivo T cell activation properties of anti-T cell monoclonal antibodies. *Experimental Nephrology*. **1**(2): 83-9, 1993.
- 16) Norman, D.J., Vincenti, F., de Mattos, A.M., Barry, J.M., Levitt, D.J., Wedel, N.I., Maia, M. and S.E. Light: Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors. *Transplantation*. **70**(12): 1707-12, 2000.
- 17) Wilde, M.I. and K.L. Goa: Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection. *Drugs*. **51**(5): 865-94, 1996.
- 18) Xu, D., Alegre, M.L., Varga, S.S., Rothermel, A.L., Collins, A.M., Pulito, V.L., Hanna, L.S., Dolan, K.P., Parren, P.W., Bluestone, J.A., Jolliffe, L.K. and R.A. Zivin: In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cellular Immunology*. **200**(1): 16-26, 2000.
- 19) Orthclone OKT3 prescribing information. Available from: http://www.orthobiotech.com/common/prescribing_information/OKT3/PDF/OKT3_PI.pdf
- 20) Chatenoud, L., Ferran, C., Legendre, C., Thouard, I., Merite, S., Reuter, A., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P. and J.F. Bach: In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation*. **49**(4): 697-702, 1990.
- 21) Wing, M.G., Moreau, T., Greenwood, J., Smith, R.M., Hale, G., Isaacs, J., Waldmann, H., Lachmann, P.J. and A. Compston: Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *The Journal of Clinical Investigation*. **98**(12): 2819-26, 1996.
- 22) Winkler, U., Jensen, M., Manzke, O., Schulz, H., Diehl, V. and A. Engert: Cytokine-release

- syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*. **94**(7): 2217-24, 1999.
- 23) リツキシマブ (遺伝子組換え) 添付文書. Available from: http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/4291407A1027_2_07/
- 24) Label for Alemtuzumab. Available from: <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2006/103948s5065lbl.pdf>
- 25) Hsu, D.H., Shi, J.D., Homola, M., Rowell, T.J., Moran, J., Levitt, D., Druilhet, B., Chinn, J., Bullock, C. and C. Klingbeil: A humanized anti-CD3 antibody, HuM291, with low mitogenic activity, mediates complete and reversible T-cell depletion in chimpanzees. *Transplantation*. **68**(4): 545-54, 1999.
- 26) TGN1412; Investigational Medicinal Product Dossier. Available from: http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&ssDocName=CON2023515&ssTargetNodeId=389
- 27) Suntharalingam G, Panoskaltsis N. TGN1412: What happened? (Presentation in EMEA workshop on the Guideline for the first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products). Available from: http://www.emea.europa.eu/pdfs/conference/flyers/first_in_man/01-G_Suntharalingam&N_Panoskaltsis.pdf
- 28) Stebbings, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., Fox, B., Tarrant, G., Robinson, J., Meager, T., Dolman, C., Thorpe, S.J., Bristow, A., Wadhwa, M., Thorpe, R. and S. Poole: "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics. *J Immunol*. **179**(5): 3325-31, 2007.
- 29) Manger, B., Weiss, A., Imboden, J., Laing, T., and J.D. Stobo: The role of protein kinase C in transmembrane signaling by the T cell antigen receptor complex. Effects of stimulation with soluble or immobilized CD3 antibodies. *J Immunol*. **139**(8): 2755-60, 1987.
- 30) Mori, A., Kaminuma, O., Miyazawa, K., Ogawa, K., Okudaira, H. and K. Akiyama: p38 mitogen-activated protein kinase regulates human T cell IL-5 synthesis. *J Immunol*. **163**(9): 4763-71, 1999.
- 31) Nguyen, D.H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P. and A. Varki: Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(20): 7765-70, 2006.
- 32) Bour-Jordan, H., and J.A. Blueston: CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology*. **22**(1): 1-7, 2002.
- 33) Garber, K.: Make or break for costimulatory blockers. *Nature Biotechnology*. **22**(2): 145-7, 2004.
- 34) Guideline on requirements for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products. Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/2836707en.pdf>
- 35) Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/2836707enfin.pdf>
- 36) Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K.M., Guntermann, C., Muller, I., Winkler, E.,

Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S.J., Hanke, T. and T. Hunig: Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *The Journal of Experimental Medicine*. 197(8): 955-66, 2003.

37) Tanaka, Y.: [Biologics: current therapeutic

strategies for rheumatoid arthritis]. *Nippon Rinsho*. 65(7): 1179-84, 2007.

38) Chapman, K., Pullen, N., Graham, M. and I. Ragan: Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nature Reviews*. 6(2): 120-6, 2007.

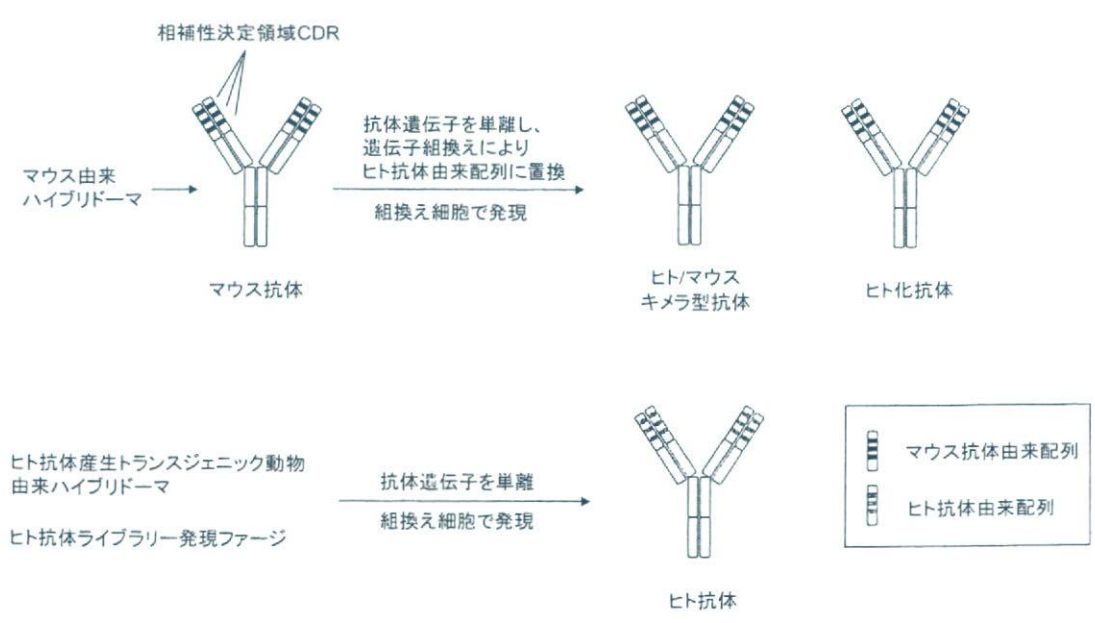
注1：バイオ医薬品

遺伝子組換え技術や細胞培養技術などのバイオテクノロジーを用いて製造される医薬品。組換えタンパク質医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療薬、細胞治療薬等が含まれる。狭義には、バイオテクノロジーを応用して製造されるタンパク質性医薬品を指し、インスリン、成長ホルモン、エリスロポエチン、インターフェロン類、サイトカイン類、モノクローナル抗体などが代表例。

注2：ヒト化抗体

マウスに抗原を免疫して得た脾細胞とマウスミエローマを融合させたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体はマウス抗体であるため、ヒトに投与すると、抗原性を示す、血中半減期が短い等の問題があり、医薬品としては適していない場合が多い。これらを解決するために、目的の抗体を産生するハイブリドーマから単離した抗体遺伝子を改変し、抗原決定に関与しない部分をヒト抗体に置き換える“抗体のヒト化技術”が開発された。マウス抗体遺伝子の不変領域をヒト抗体遺伝子に置換して作製した抗体を「キメラ型抗体」、不変領域に加えて、相補性決定領域 (complementarity determining region : CDR) のみを残して可変領域もヒト抗体遺伝子に置換して作製した抗体を「ヒト化抗体」という (注2-図)。最

ヒト型抗体の作成



注2-図

近では、ヒト抗体遺伝子を導入したマウスやファージディスプレイ法を用いてヒトモノクローナル抗体を取得する技術が開発、実用化され、既に上市されたヒト抗体もある。

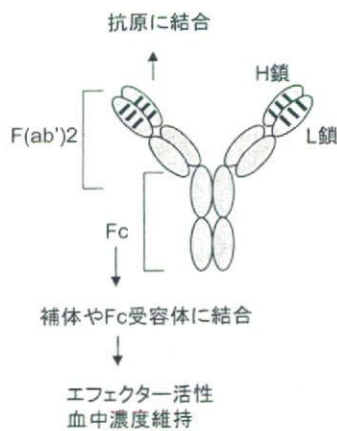
TGN1412の開発過程では、ラットCD28に対するマウスモノクローナル抗体JJ316が作製されて疾患モデルにおけるCD28アゴニスト抗体の有用性が明らかにされ、続いて、ヒトCD28に対するマウスモノクローナル抗体5.11A1が作製された。5.11A1抗体遺伝子の改変によりヒト化を行い、作製されたものがTGN1412、あるいは、そのIgG1バリエーションTGN1112である。

注3：抗体の構造と機能

抗体は、相同な2本の重鎖（H鎖）と相同な2本の軽鎖（L鎖）がS-S結合で結ばれた構造を持つ。抗体の機能としては、第一義的には可変領域の抗原結合部位を介して抗原に結合することであり、さらに、Fc部分を介してFc受容体あるいは補体と結合し、抗体依存性細胞障害（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC）や補体依存性細胞障害（Complement Dependent Cytotoxicity: CDC）により抗原を発現する細胞を障害するエフェクター機能を有している（注3-図）。

抗体には、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEの5つのクラスが存在するが、これまでに医薬品として開発されたモノクローナル抗体は、すべてIgGである。ヒトIgGには、IgG1～4の4つのサブクラスが存在し、サブクラスごとにエフェクター機能等に差があることが知られている（Filpula D. *Biomol. Eng.* 24: 201, 2007）。組換え抗体医薬品では、目的とする医薬品の特性に応じたサブクラスが選択される。これまでに開発されている組換え抗体医薬品では、サブクラスがIgG1のものがほとんどであり、エフェクター機能により標的分子を発現する細胞を障害する効果が期待できる。IgG2はエフェクター機能が低い。IgG3はヒンジ領域が長いと他のサブクラスと比較して分子量が大きく、エフェクター機能は高い。凝集体を形成することがあるとされている。IgG4は補体結合能を持たないことが特徴である。生体内のIgG4では、重鎖+軽鎖の交換が起こり、バイスベシフィックな分子にもなることが知られている（Aalberse RC et al., *Immunol.* 105: 9, 2002）。

抗体の構造と機能



IgG各サブクラスのFc受容体および補体との結合

		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
単球	FcγRI	++	-	+++	++
	FcγRIIa	+	(+)	++	-
	FcγRIIIa	+	-	+	-
好中球	FcγRIIa	+	-	+	-
	FcγRIIIb	+	-	+	-
補体		++	+	+++	-

<多田富雄監訳 免疫学イラストレイテッドより改変>

注3-図

注4：抗体医薬品の品質

抗体医薬品は、作製した抗体遺伝子をCHO細胞、あるいは、Sp2/0細胞、NS0細胞などに導入して細胞の培養上清中に抗体を分泌させ、その培養上清から目的の抗体を精製することにより生産する。(TGN1412はCHO細胞で製造された。)したがって、最終的に得られる抗体医薬品の品質(有効成分の構造・組成、物理化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質などの特性の他、目的物質由来不純物、製造工程由来不純物、混入汚染物質の存在等も含めて評価される)は、生産細胞の特性や培養条件、あるいは精製工程などの製造工程に大きく影響を受ける。そのため、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の品質・安全性確保においては、目的産物の特性解析を詳細に行い、望ましい有効性・安全性プロファイルの得られる目的物質の品質を規定する方法(規格および試験方法)を明らかにすると共に、製造ロットごとに品質の差が生じないように、製造工程を厳密に管理することが重要である。

バイオ医薬品の品質・安全性確保に関しては、日米欧でこれまでに議論された結果が国際調和ガイドラインとしてまとめられている(注4-表(1))。我が国においては、バイオ医薬品の承認申請に際して申請者がどの程度のレベルでどの程度の量のデータを蓄積すればよいかなどを示すため、注4-表(2)のようなガイドラインが定められている。

注4-表(1)

バイオ医薬品の品質・安全性確保に関するICHガイドライン

- Q5A ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価
Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin
(2000.2.22) 【厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第329号】
- Q5B 組換えDNAを応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析
Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products
(1998.1.6) 【厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第3号】
- Q5C 生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験
Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products
(1998.1.6) 【厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第6号】
- Q5D 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)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析
Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products
(2000.7.14) 【厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第873号】
- 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
Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process
(2005.4.26) 【厚生労働省医薬食品局審査管理課長 薬食審査発第0426001号】
- Q6B 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)の規格及び試験方法の設定
Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
(2001.5.1) 【厚生労働省医薬局審査管理課長 医薬審第571号】
- S6 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価
Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals
(2000.2.22) 【厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第326号】

国際合意に達したICHガイドラインの内容は、国内におけるバイオ医薬品の試験や評価を行う際の基本となり、そこに記載されている内容については遵守する必要がある。合意された各ICHガイドラインの内容については国内版が作成され、国内通知として出されている。

注4-表(2)

我が国におけるバイオ医薬品関連ガイドライン

バイオ医薬品の承認申請に関して、申請者が、どの程度のレベルでどの程度の量のデータを蓄積すればよいかなどを示すために、我が国では以下の3つのガイドラインが公表されている。

- (1) 薬審第243号通知(昭和59年3月30日)
「組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」
- (2) 薬審1第10号通知(昭和63年6月6日)
「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」
- (3) 都道府県衛生主管部(局)薬務主管課宛事務連絡(平成元年5月)
「薬審1第10号通知に関する質疑応答について」

注5：サイトカイン放出症候群に関する添付文書上の記載

医薬品添付文書においては、サイトカイン放出症候群は、“薬剤投与中または投与開始後24時間以内に多く現れる有害反応の総称”である infusion reaction に含めて記載されている場合が多い。例えば Rituximab の場合は、infusion reaction とサイトカイン放出症候群を臨床上、厳密に区別することが困難であること、また、薬剤投与に伴って認められる有害事象に対して2つの異なった用語が用いられることにより、対処方法が異なる印象を与え、臨床現場に混乱を来す可能性が懸念されるとして、infusion reaction

注5-表

サイトカイン放出症候群に関連する医薬品添付文書中の記載概要(抜粋)

	Muromonab-CD3 (抗CD3抗体)	Rituximab (抗CD20抗体)	Alemtuzumab (抗CD52抗体)
日本	<p>【重要な基本的注意】 投与初期に発熱等のインフルエンザ様症状があらわれるので、その旨を患者にあらかじめ説明しておくこと。また、その間は患者を厳密に観察すること。</p>	<p>【重要な基本的注意】 本剤の初回投与中又は投与開始後24時間以内に多くあらわれるinfusion reactionが約90%の患者において報告されている。</p> <p>【警告】 本剤の投与開始後30分～2時間よりあらわれるinfusion reactionのうちアナフィラキシー様症状、肺障害、心障害等の重篤な副作用により、死亡に至った例が報告されている。</p>	未承認
US	<p>【警告】サイトカイン放出症候群 ほとんどの患者で、活性化リンパ球または単球からのサイトカイン放出に起因する急性の臨床症状(サイトカイン放出症候群)が生じる。</p> <p>【有害事象】サイトカイン放出症候群 腎移植の急性拒絶反応の治療で、最初の2回の投与後に、2%以下の患者で致死的なレベルの肺浮腫が報告されている。</p>	<p>【有害反応】Infusion reactions 大部分の患者で初回投与時に、発熱や悪寒/硬直などの軽度～中程度のinfusion reactionが生じた。</p> <p>【挿付き警告】Fatal infusion reactions: 投与24時間以内の死亡例が報告されている。</p>	<p>【警告】Infusion-related events: 低血圧、硬直、発熱、気管支痙攣、悪寒などのinfusion-related eventsが生じている。</p> <p>【挿付き警告】Infusion reactions: 重篤な、時に致死的なinfusion reactionが生じ得る。</p>
EU*	未承認	<p>【投与方法】 サイトカイン放出症候群の発生に備え、患者を注意深くモニターすること。</p> <p>【特別な警告と使用上の注意】 重篤なサイトカイン放出症候群が生じるリスクの高い腫瘍細胞数の多い患者では、他の治療法がない場合にのみ、特別な注意のもとに使用すること。</p>	<p>【副作用】Infusion-related reactions: 非常に一般的に報告された反応(サイトカイン放出に起因する)は、発熱、硬直、悪心、嘔吐等の急性のinfusion-related reactionsであった。</p> <p>稀に、サイトカイン放出に伴って気管支痙攣、低酸素などの重篤な反応が起こり、致死的な結果となる例があった。</p>

EU*: Summary of product characteristicsより抜粋。
いずれも、患者用添付文書ではinfusion reactionとしての記載のみ。

に統一されている（衛研発第 2458 号 審査報告書：http://211.132.8.246/shinyaku/g0106/04/38010100_21300AMY00273_110_1.pdf）。注 5 - 表に Muromonab CD3、Rituximab、および Alemtuzumab の日米欧における添付文書中のサイトカイン放出症候群に関連する表現を記載した。これらの医薬品では、サイトカイン放出症候群の発生を防ぐために、解熱薬や抗炎症薬の前投与が推奨されている。

Infusion reaction の原因としては、アナフィラキシー反応がよく知られているが、アナフィラキシー反応と比較して、サイトカイン放出症候群は抗体医薬品の初回投与時に起こる頻度が高いことが特徴である。これは、生体内の標的分子数が初回投与時に最も多く、2 回目以降は初回に投与された抗体の効果により標的分子を発現する細胞が減っていることが原因であると考えられている。

☆コラム「生殖発生毒性の理解に役立つホームページ」コラム☆

最近では生殖発生毒性のみを専門にしている毒性研究者は少なくなりました。一般毒性も生殖発生毒性も兼任されている方や特殊毒性すべてを担当されている方もいます。若い方では実際に動物室でラット新生児の性別を見分けたり、胎児の骨格を染色して観察をした経験がなく、報告書の評価をされている人もいと聞きます。もちろん、教科書等でしっかり勉強されておられるのですが、現実感がわからないのも無理のないことかも知れません。

そんな専門ではないが、生殖発生毒性に関係しなくてはならなくなった方へ、

私がお勧めするホームページは「おくすり 110 番」の中の「妊娠とくすり」のページです。このページは一般の妊婦さんのために書かれたもので、非常にわかりやすい言葉で書かれています。内容は包括的かつ専門的なものを含んでいます。また、臨床の立場で書かれていますので、非臨床に身を置く者にとって大局的な目を見開かされることもあります。また、薬剤ごとの妊婦における危険度がリストされていますので、自分の担当する薬剤の類薬における生殖発生毒性を調べる際にも役に立ちます。生殖発生毒性でなにか疑問に感じた時、ぜひともアクセスしてみてください。

http://www.okusuri110.com/kinki/ninpukin/ninpukin_00top.html

(下村 和裕)

A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor–Induced Endothelial Cell Migration

Martin K.C. Ng, Jenny Wu, Edwin Chang, Bing-yin Wang, Regina Katzenberg-Clark, Akiko Ishii-Watabe, John P. Cooke

Objective—An endothelial nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) participates in atherogenesis and tumorigenesis by promoting neovascularization. To date, the mechanisms of nAChR-mediated angiogenesis and their relationship to angiogenic factors, eg, VEGF and bFGF, are unknown.

Methods and Results—Nicotine induced dose-dependent human microvascular endothelial cell (HMVEC) migration, a key angiogenesis event, to an extent which was equivalent in magnitude to bFGF (10 ng/mL) but less than for VEGF (10 ng/mL). Unexpectedly, nAChR antagonism not only abolished nicotine-induced HMVEC migration but also abolished migration induced by bFGF and attenuated migration induced by VEGF. Transcriptional profiling identified gene expression programs which were concordantly regulated by all 3 angiogens (nicotine, VEGF, and bFGF), a notable feature of which includes corepression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP), endogenous inhibitor of the redox regulator thioredoxin. Furthermore, TXNIP repression by all 3 angiogens induced thioredoxin activity. Silencing thioredoxin by small interference RNA abrogated all angiogen-induced migration while silencing TXNIP strongly induced HMVEC migration. Interestingly, nAChR antagonism abrogates growth factor (VEGF and bFGF)–mediated induction of thioredoxin activity.

Conclusions—Nicotine promotes angiogenesis via stimulation of nAChR-dependent endothelial cell migration. Furthermore, growth factor–induced HMVEC migration, a key angiogenesis event, requires nAChR activation—an effect mediated in part by nAChR-dependent regulation of thioredoxin activity. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:106-112.)

Key Words: nicotine ■ angiogenesis ■ endothelium ■ vascular endothelial growth factor ■ fibroblast growth factor

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is a pentameric ligand-gated cationic channel.¹ The nAChR was first described in neurons, but has recently been identified in many cell types including endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells.² Intriguingly, ECs also synthesize and store acetylcholine.³ Recently, we serendipitously discovered that nAChR activation causes ECs to form capillary tubes in vitro, and promotes angiogenesis in vivo.^{4,5}

Pathological as well as physiological forms of angiogenesis are mediated by EC nAChRs. For example, by activating the EC nAChR, nicotine accelerates tumor angiogenesis and tumor growth in a murine Lewis lung cancer model.⁴ The acceleration of tumor growth by environmental tobacco smoke is also mediated by nAChR-induced angiogenesis.⁶ Furthermore, nAChR activation by nicotine stimulates the neovascularization and progression of atherosclerotic plaque.⁴ On the other hand, activation of the nAChR in a murine model of diabetic ulceration enhances wound angiogenesis and healing.⁷

To date, the mechanisms of nAChR-mediated angiogenesis and their relationship to established angiogenic growth factors, such as VEGF and bFGF, are unknown. We therefore sought to study and compare the effects of nAChR activation on EC migration, a key event in angiogenesis, alongside those induced by VEGF or bFGF. In this article, we report an unexpected observation: pharmacological antagonism of the nAChR fully blocks bFGF-induced EC migration, and substantially suppresses the endothelial response to VEGF. Furthermore, by microarray analysis, we identify gene expression programs which are concordantly regulated by nicotine, VEGF, or bFGF, and confirm the role of one of these genes in the cholinergic component of growth factor–induced endothelial cell migration.

Methods

For Methods, please refer to the Data Supplement, available online at <http://atvb.ahajournals.org>.

Original received April 6, 2006; final version accepted October 16, 2006.

From the Department of Medicine (M.K.C.N., J.W., E.C., B.-y.W., R.K.-C., A.I.-W., J.P.C.), Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, Calif; and the Department of Cardiology (M.K.C.N.), Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, NSW, Australia. M.K.C.N. and J.W. contributed equally to this work.

Correspondence to John P. Cooke, Falk Cardiovascular Research Center, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305-5406. E-mail john.cooke@stanford.edu

© 2006 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000251517.98396.4a

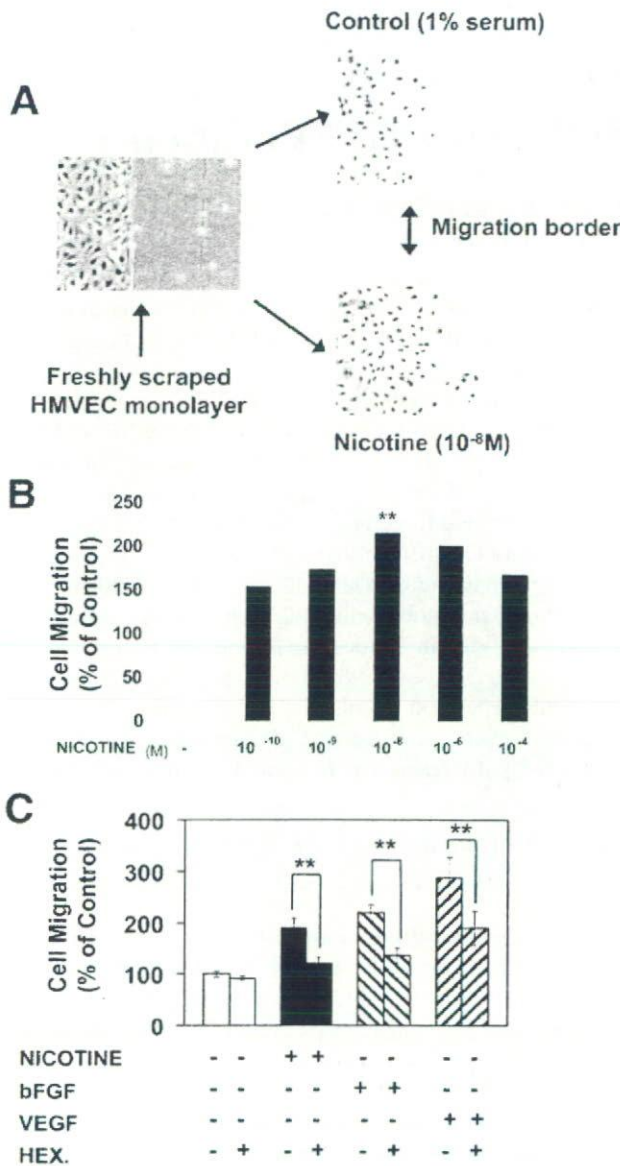


Figure 1. Role of nAChR in human microvascular endothelial cell (HMVEC) migration. A, Representative microphotographs of the HMVEC migration assay: after wounding of the monolayer with a razor blade, HMVECs migrate into the denuded area. B, Nicotine stimulates dose-dependent HMVEC migration which is maximal at a nicotine concentration of 10⁻⁸ mol/L (*P*<0.001 vs control). C, Effects of hexamethonium (HEX), a nAChR antagonist, on HMVEC migration induced by nicotine (10⁻⁸ mol/L), VEGF (10 ng/mL), and bFGF (10 ng/mL). Values are expressed as a percentage of migrating cells per high-powered field in vehicle-treated wells. ***P*<0.001.

Results

A Cholinergic Component of Growth Factor-Mediated Endothelial Cell Migration

The effects of nicotine on human microvascular endothelial cell (HMVEC) migration were studied using standard wounding migration assays. Figure 1A depicts typical microphotographs of in vitro HMVEC migration in the presence of vehicle or nicotine. Nicotine stimulated EC migration in a dose-dependent manner with maximal stimulation at 10⁻⁸

mol/L, producing cell migration that was 216±9% that of vehicle-treated ECs (*P*<0.001 versus control; Figure 1B). Stimulation with VEGF or bFGF also induced EC migration with maximal effects at 10 ng/mL (data not shown). Nicotine-induced EC migration at 10⁻⁸ mol/L was equivalent in magnitude to that observed for bFGF (10 ng/mL) but less than for VEGF (10 ng/mL; *P*=NS for nicotine versus bFGF; *P*<0.01 for nicotine versus VEGF; Figure 1C). To further investigate the effects of nAChR-dependent pathways on EC migration, we studied the effect of the nAChR antagonist, hexamethonium (HEX, 10⁻⁴ mol/L), on EC migration induced by nicotine, VEGF, and bFGF. Hexamethonium abrogated nicotine-induced EC migration (Figure 1C). Unexpectedly, in addition to abolishing NIC-induced EC migration, HEX abolished migration induced by bFGF (*P*=NS versus control) and reduced migration induced by VEGF (*P*<0.01 for VEGF+HEX versus VEGF alone; Figure 1C). Similar results were observed with the nAChR antagonist, mecamylamine (10⁻⁶ mol/L; supplemental Figure 1). The nAChR-related effect was dose-dependent: in the case of VEGF, cell migration was attenuated by 26±12%, 43±9%, and 52±12% by HEX concentrations of 10⁻⁸ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, and 10⁻⁴ mol/L, respectively (*P*<0.05 for trend). Nicotinic receptor activation is known to stimulate EC proliferation.⁴ Interestingly, nAChR antagonism also significantly attenuated VEGF- and bFGF-mediated EC proliferation as assessed by bromodeoxyuridine incorporation (supplemental Figure II). The nAChR antagonist-related effects were not the result of cellular toxicity as addition of hexamethonium or mecamylamine alone did not induce cell death as examined via 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assays, nor did mecamylamine or hexamethonium induce apoptosis in VEGF- or bFGF-treated cells as assessed by annexin V staining (data not shown).

Previous in vitro and in vivo data have implicated a central role for the α7-nAChR isoform in mediating nAChR-induced neovascularization.⁵ Consistent with this, selective inhibition of the α7-nAChR isoform by α-bungarotoxin (10⁻⁹ mol/L) abrogated nicotine effects (*P*=NS versus control) and significantly attenuated bFGF and VEGF-induced EC migration by 50±11% and 38±13%, respectively (*P*<0.05 for stimulus versus stimulus + α-bungarotoxin; Figure 2A). We also studied HMVEC α7-nAChR mRNA expression in response to nicotine, VEGF, and bFGF over a 24-hour time course. At 1 hour, nicotine, VEGF, and bFGF all induced >10-fold downregulation of α7-nAChR expression compared with vehicle-treated conditions (*P*<0.05 versus control for all angiogens; Figure 2B). However, by 6 hours, there was significant upregulation of α7-nAChR expression by nicotine (12±0.8-fold), VEGF (11±1.3-fold), and bFGF (4±0.2-fold; *P*<0.001 versus control; Figure 2B). By 24 hours, HMVEC α7-nAChR expression in all conditions had returned to levels similar to control (*P*=NS versus control). These data suggest that nicotine, VEGF, and bFGF induce acute stimulation of α7-nAChR with subsequent early downregulation of α7-nAChR expression by negative feedback followed by upregulation at 6 hours. These findings are consistent with a role for nAChR in growth factor signaling pathways.

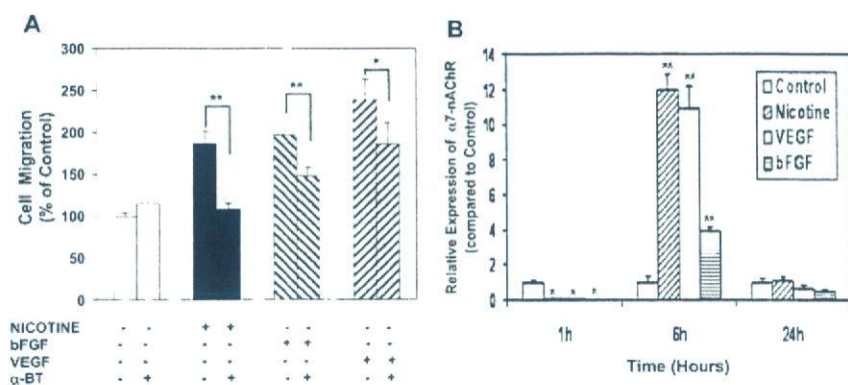


Figure 2. Role of the $\alpha 7$ -nAChR isoform in growth factor-mediated EC migration. A, Effects of α -bungarotoxin (α -BT), a specific inhibitor of the $\alpha 7$ -nAChR isoform, on EC migration. Coadministration of α -BT (10^{-9} mol/L) abrogated the migragenic effects of nicotine (10^{-8} mol/L; $P=NS$ vs control) and significantly attenuated the effects of bFGF (10 ng/mL) and VEGF (10 ng/mL). B, Effects of nicotine, VEGF, and bFGF on EC $\alpha 7$ -nAChR expression at 1, 6, and 24 hours as assessed by relative real-time RT-PCR. * $P<0.05$; ** $P<0.001$ compared with control.

Identification of Shared Transcriptional Responses to Nicotine, bFGF, and VEGF by Microarray Analysis

To further evaluate a cholinergic contribution to growth factor-induced EC migration, and to identify commonly regulated genes that may be required for HMVEC migration, we performed microarray analysis of HMVECs after expo-

sure to nicotine, VEGF, or bFGF. At 24 hours after treatment, each of these stimuli induced profound transcriptional changes in HMVECs (Figure 3), resulting in differential expression of a total of 3072 genes uniquely identified by UniGene, as well as 312 expressed-sequence tags, all of which were represented by 4070 nonredundant cDNA clones. To study relationships between gene expression programs

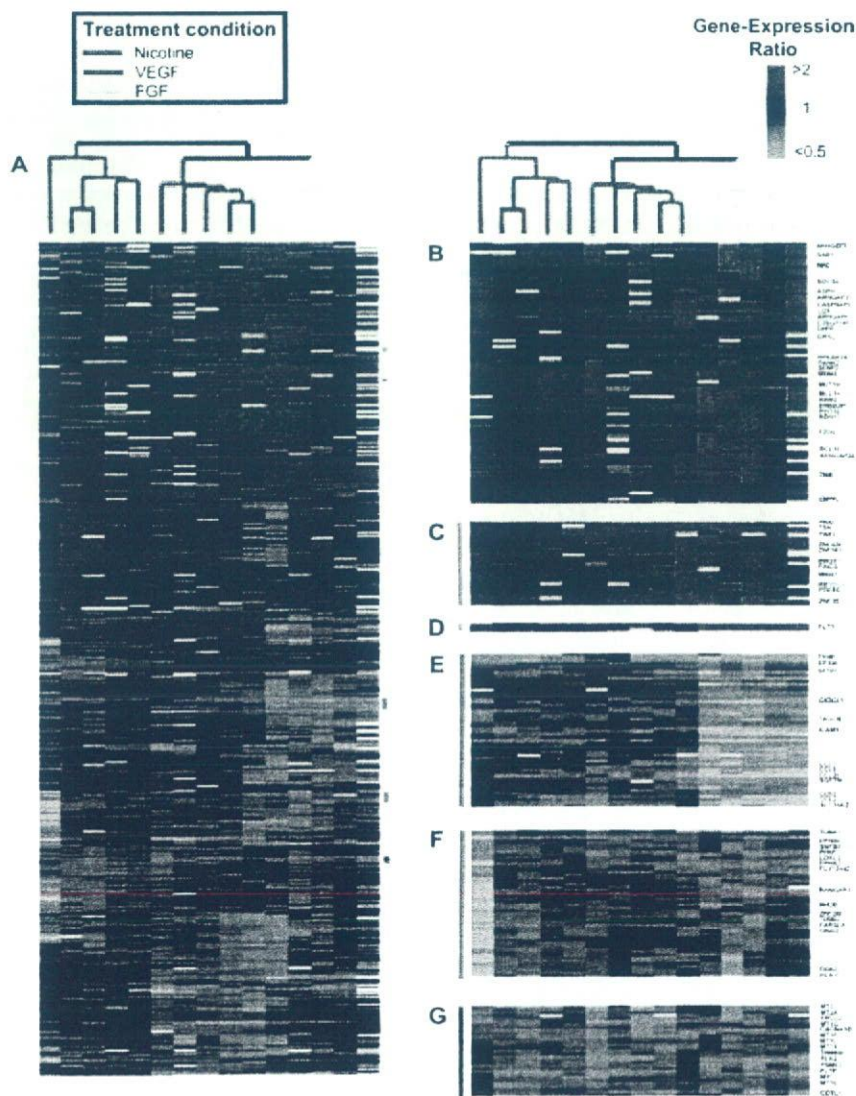


Figure 3. Hierarchical cluster analysis of transcriptional effects of nicotine, VEGF, or bFGF in human microvascular endothelial cells at 24 hours. A, Overview of the two way (genes against conditions) hierarchical cluster of 15 experiments (each condition was studied in quintuplicate) and 4070 nonredundant cDNA clones with significant change in expression at 24 hours. Data from individual elements or genes are represented in rows and experiments in columns. Red and green denote expression levels greater or less, respectively, than control values. Gray denotes technically inadequate or missing data. The intensity of the color reflects the magnitude of the change from baseline. The dendrogram above the matrix represents similarities in patterns of expression between experimental samples. B through G, Zoom boxes of concordantly expressed gene clusters, whose location are indicated by vertical colored bars adjacent to the dendrogram. Owing to space limitations, only genes discussed in the text are indicated by UniGene symbol.

induced by nicotine, VEGF, or bFGF, data for all differentially expressed genes at 24 hours were hierarchically clustered by gene and by array, thereby organizing genes and experimental samples on the basis of similarity of expression patterns (Figure 3A through 3F).⁸ The cluster dendrogram shows that all 3 stimuli induced distinct transcriptional signatures which cluster within 3 distinct groups, but there is a closer relationship between the VEGF- and bFGF-induced expression profiles, which cluster together on the same dendrogram branch (Figure 3A).

Within the distinct transcriptional profiles induced by nicotine, VEGF, or bFGF, we identified 6 clusters with concordant gene expression (3 clusters of commonly activated and 3 commonly corepressed genes; Figure 3B through 3F). The characteristics of these clusters provide insights into shared cellular processes that may be requisite for angiogen-induced cell migration. The first activation cluster (Figure 3B), the "migration cluster," was enriched for genes associated with cytokinetic processes including migration-associated G protein signaling (Rho GTPase regulatory proteins and RIN2), integrin binding (ERBB2IP and ADAM9), cell cycle regulation and proliferation (RRM2, MDM2, AHR, MLLT4, and MUTYH), NF- κ B activation (BCL10 and CASP8AP2), and migration-associated oxidoreductase activity (LOX and ASPH). Significantly, three Rho GTPase activating proteins (GAPs) including ARHGAP5, ARHGAP21, and ARHGAP24 and one Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF), ARHGEF7, were concordantly upregulated in this cluster. Rho GEFs and GAPs, by respectively controlling the activation and inactivation of small Rho GTPases (Cdc42 and Rac), regulate the orchestration of cytoskeletal and adhesive changes during cytokinesis.⁹

A smaller second coactivation cluster (Figure 3C) includes the p21-activated kinase PAK1, an effector for the Rho GTPases Rac and Cdc42, that facilitates cell migration by coordinating formation of new adhesions at the leading edge of the cell with detachment at the trailing edge.¹⁰ Other genes in this activation cluster comprise zinc finger proteins and genes involved in nucleic acid metabolism. Interestingly, all three angiogens induced activation of the VEGF receptor, FLT1, an effect that was stronger for bFGF-treated cells than for nicotine or VEGF (Figure 3D, which contains 3 nonredundant cDNA clones for FLT1). In addition to the coinduction of FLT1 by all three stimuli, we found that several isoforms of nAChR subunits are upregulated by VEGF at 24 hours (supplemental Table 1), suggesting other potential synergistic interactions between VEGF and cholinergic signaling pathways.

The first repression cluster (Figure 3E) contains genes that are strongly downregulated by bFGF, many of which are also concordantly repressed by nicotine and VEGF. A dominant theme among concordantly repressed genes is the downregulation of chemokine genes (principally of CC class) involved leukocyte chemotaxis (CCL2, CCL7, CCL8, CCL20, and CX3CL). Another prominent feature is the robust repression of thioredoxin interacting protein (TXNIP) (Figure 3E), a protein that binds and inhibits thioredoxin, a major intracellular antioxidant. Other corepressed genes in this cluster have been implicated in apoptosis (TNFRSF1B, EP300), signal transduction (CD53, SQSTM1), and cell adhesion (ICAM1). The second

repression cluster (Figure 3F) included two Ephrin receptors: EPHB4, a marker of venous differentiation and EPHA2, an inhibitor of cell migration which suppresses integrin function. Other genes within this group were associated with tumor suppression, microtubular polymerization, and signal transduction. The striking feature of the third cluster of corepressed genes is a strong enrichment for metallothioneins (MT1E, MT1F, MT1G, MT1L, MT1X, MT2A, and MT3; Figure 3G). Metallothioneins (MTs) comprise a superfamily of small cysteine-rich proteins with high affinity for metal ions and antioxidant activity. By serving as a cellular reservoir for zinc and copper, MTs regulate the function of proteins requiring these metals such as DNA and RNA polymerases, zinc finger transcription factors, and p53.¹¹ Other genes in this cluster are involved in diverse functions including cell proliferation/apoptosis (MYC, ERCC2), lipid transport (PTLP), calcium ion transport (CACNA1D), and actin binding (COTL1).

In summary, the transcriptional signatures of nicotine, VEGF, and FGF, while distinct, demonstrate many overlapping features. By hierarchical cluster analysis, we have identified a series of shared angiogen-dependent EC transcriptional programs, with implications for understanding shared mechanisms in EC migration/angiogenesis.

Role of Thioredoxin Interacting Protein in the Cholinergic Contribution to Growth Factor-Induced EC Migration

As nAChR antagonism modulates VEGF- and bFGF-dependent EC migration, we hypothesized that some of the transcriptional effects shared by nicotine, VEGF, and bFGF may be nAChR-dependent. Thioredoxin interacting protein (TXNIP), a gene not previously associated with EC migration, was downregulated by all three angiogens. TXNIP is the endogenous inhibitor of thioredoxin. Thioredoxin is a major redox regulator of protein function increasingly implicated in tumorigenesis.¹²⁻¹³ In microarray data from 3 nonredundant cDNA clones for TXNIP, nicotine, VEGF, and bFGF consistently decreased TXNIP expression—a finding confirmed by RT-PCR, which demonstrated decreased expression by 42±4%, 33±6%, and 26±7% relative to control, respectively ($P < 0.001$ for all stimuli; Figure 4A). As *in vivo* reduction of TXNIP expression in the order of 30% to 40% has been associated with >3-fold increases in thioredoxin activity,¹⁴ we hypothesized that TXNIP downregulation may influence thioredoxin activity and play a role in angiogen-mediated EC migration.

Using a standard assay for thioredoxin activity,¹⁵ we found that addition of nicotine or VEGF induced thioredoxin activity significantly above vehicle-treated cells ($P < 0.001$ versus control for all stimuli; Figure 4B). The addition of bFGF induced a less robust ($P < 0.05$ versus control) but significant increase in thioredoxin activity (Figure 4B). Notably, coadministration of hexamethonium inhibited nicotine-, VEGF-, or bFGF-induced thioredoxin activity (Figure 4B; $P < 0.001$ for each stimulus versus stimulus + hexamethonium). Hexamethonium alone had no significant effect on thioredoxin activity. Consistent with these results, nAChR antagonism abrogated nicotine, VEGF, and bFGF-mediated repression of TXNIP mRNA expression ($P = NS$ versus control for each stimulus + hexamethonium; Figure 4A). Transfection of small interference RNA (siRNA)

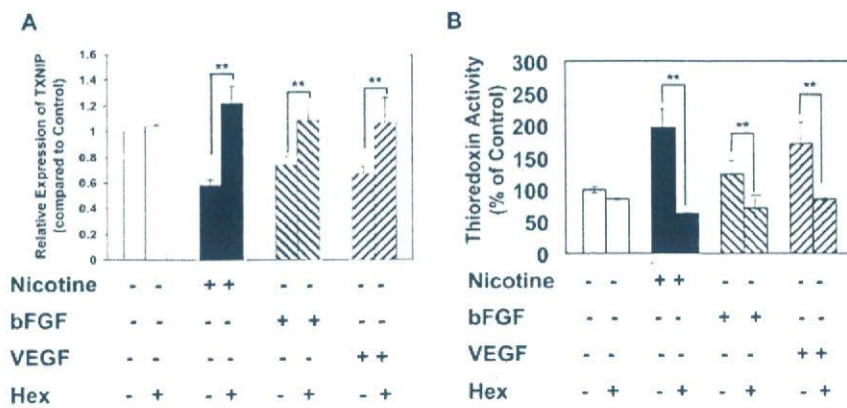


Figure 4. Role of nAChR in growth factor-mediated regulation of TXNIP expression and thioredoxin activity in ECs. Effects of nicotine (10⁻⁸ mol/L), VEGF (10 ng/mL), and bFGF (10 ng/mL) with/without coadministration of hexamethonium (10⁻⁴ mol/L) on TXNIP expression (A) and on thioredoxin activity (B) in human microvascular endothelial cells. Values for thioredoxin activity are expressed as a percentage of control (vehicle-treated cells). **P<0.01.

against thioredoxin abrogated nicotine-, VEGF-, or bFGF-induced thioredoxin activity and abolished cell migration induced by nicotine, VEGF, or bFGF (P=NS versus control for each stimulus + siRNA; Figure 5A and 5B). Furthermore, in the absence of angiogenic stimuli, siRNA against TXNIP significantly stimulated thioredoxin activity (P<0.0001 versus control; Figure 6A) and strongly stimulated HMVEC migration (Figure 6B, P<0.0001 versus control). These studies indicate that inhibition of TXNIP by cholinergic or growth factor activation promotes endothelial cell migration, via derepression of thioredoxin activity. Furthermore, VEGF- or bFGF-mediated regulation of TXNIP expression is dependent on activation of nAChR (Figure 4A).

Discussion

We report a cholinergic contribution to growth factor-induced endothelial cell migration. The salient observations are that: (1) activation of nAChR induces EC migration similar in magnitude to that observed for bFGF or VEGF; (2) antagonism of nAChR markedly attenuates the migragenic effects of bFGF or VEGF on ECs; (3) the nAChR-dependent effects of bFGF and VEGF on EC migration are due, in large part, to activation of the α7-nAChR isoform; (4) nAChR activation induces a transcriptional profile that has many overlapping features to those induced by bFGF or VEGF, particularly for genes involved in EC migration; (5) downregulation of TXNIP with subsequent induction of thioredoxin activity is shown to be important to the migragenic effects exerted by each of the stimuli; (6) antagonism of the nAChR abrogates VEGF- or bFGF-mediated regulation of TXNIP expression. In toto, our findings identify a novel role for

the nicotinic cholinergic pathway in growth factor-mediated EC migration, a critical event in angiogenesis.

Previous studies have demonstrated that ECs synthesize, store, and release acetylcholine¹⁶ and express functional nAChRs.² Increasing evidence suggests that such nonneuronal nAChRs are involved in the regulation of vital cell functions, such as mitosis, differentiation, organization of the cytoskeleton, cell-cell contact, locomotion, and migration.¹⁷ Thus, acetylcholine, originally identified as a neurotransmitter, may function as an autocrine factor that modulates migration of endothelial cells. We and others have previously shown that exogenous nicotine, at pathophysiologically relevant concentrations, promotes angiogenesis in a number of in vivo settings, including inflammation, wound healing, ischemia, tumor, and atherosclerosis.^{4,7,18} Furthermore, inhibition of nAChR, in the absence of exogenous nicotine, reduces the angiogenic response in vitro and in vivo, indicating that there exists an endogenous cholinergic pathway for angiogenesis.⁵ In contrast, recent work has shown that VEGF and FGF, originally identified as angiogenic growth factors, exert neurotrophic effects and promote neurogenesis.^{19,20} These and other data suggest that there may be interdependence between “vascular” and “neuronal” factors and processes.

In this study, we found that nicotine induced dose-dependent nAChR-mediated EC migration which was maximal at concentrations consistent with those found in moderate smokers (10⁻⁸ mol/L). Surprisingly, coadministration of nAChR antagonists, hexamethonium, or mecamylamine, significantly attenuated the migragenic response of ECs to both VEGF and bFGF. Although several nAChR isoforms exist, we have previously identified a principal role for the α7-nAChR isoform in nAChR-mediated

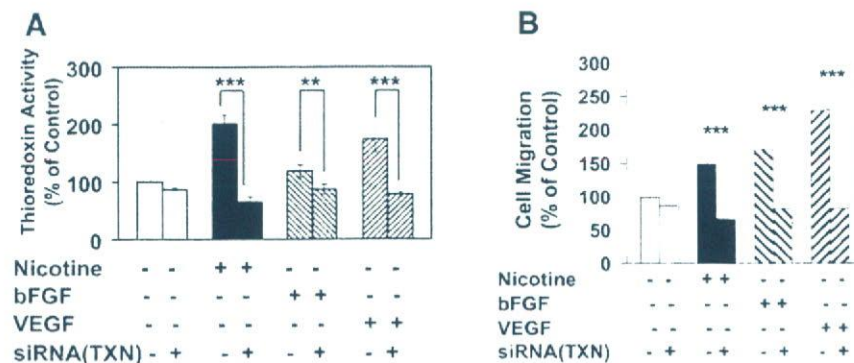


Figure 5. Effects of gene knockdown of thioredoxin by small interference RNA (siRNA) on induction of thioredoxin activity in human microvascular endothelial cells (HMVECs) by nicotine (10⁻⁸ mol/L), VEGF(10 ng/mL), or bFGF (10 ng/mL) (A) and HMVEC migration induced by nicotine, VEGF, or bFGF (B). Scrambled (randomly arranged) siRNA had no effect on thioredoxin activity or HMVEC migration (data not shown). Values for thioredoxin activity and migration are expressed as a percentage of control (vehicle-treated cells). TXN indicates thioredoxin. **P=0.01; ***P<0.001.

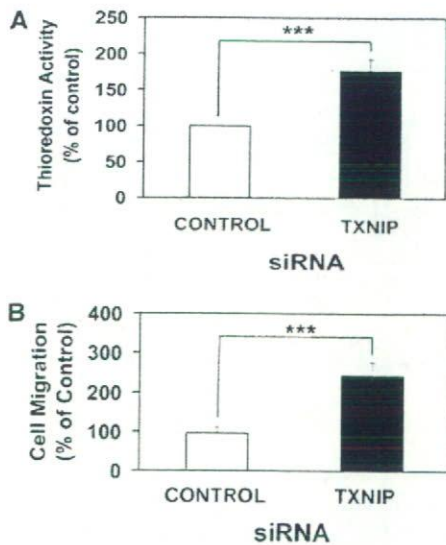


Figure 6. Effects of gene knockdown of thioredoxin interacting protein (TXNIP) by small interference RNA (siRNA) on thioredoxin activity (A) and human microvascular endothelial cell (HMVEC) migration (B). Scrambled (randomly arranged) siRNA had no effect on thioredoxin activity or HMVEC migration (data not shown). Values for thioredoxin activity and migration are expressed as a percentage of control (vehicle-treated cells). *** $P < 0.0001$.

angiogenesis in vitro and in vivo.⁵ Consistent with these findings, we now find that VEGF and bFGF both induced changes in $\alpha 7$ -nAChR expression consistent with activation of $\alpha 7$ -nAChR. Moreover, the $\alpha 7$ -nAChR selective antagonist, α -bungarotoxin, attenuated VEGF and bFGF-induced EC migration to a similar extent as for the nonselective antagonists, hexamethonium, and mecamylamine. These latter findings suggest that nAChR-dependent pathways, particularly via $\alpha 7$ -nAChR activation, are involved in the modulation of growth factor-induced EC migration.

To study the relationship between nicotine and angiogenic growth factors at a genomic level, microarray analysis was performed after HMVEC exposure to nicotine, VEGF, or bFGF. By hierarchical clustering, we found that each stimulus induced distinct but overlapping transcriptional responses, with concordant gene expression being concentrated within six largely functionally coherent gene clusters. A major functional theme among concordantly expressed genes was the coregulation of cell motility-related processes by all three angiogens. In particular, a "migration" cluster of concordantly activated genes was strongly enriched for genes involved in cytokinetic-related processes such as the Rho GTPase cell motility pathways, integrin binding, cell cycle regulation, and NF- κ B activation. Our findings with regard to activation of Rho GTPase pathways by VEGF and bFGF are consistent with previous studies²¹ and reinforce the central role of Rho-related regulation of actomyosin cytoskeletal organization EC migration during angiogenesis. We previously demonstrated that nAChR-dependent endothelial tube formation in vitro is dependent on NF- κ B activation.⁵ The migration cluster included two genes associated with NF- κ B activation: BCL10, an important activator of NF- κ B downstream of protein kinase C, and CASP8AP2 (aka FLASH), which coordinates downstream NF- κ B activity via a TRAF2-dependent pathway.²² In addition, many genes within the migra-

tion cluster have been implicated in oncogenesis (MDM2, ADAM9, BCL10, etc), a finding pathogenetically consistent with the role of angiogenesis in cancer.

The majority of concordantly regulated genes revealed by our microarray analyses have not been previously associated with angiogenesis. These include the p53 inhibitor MDM2 (activated by all three stimuli) and TXNIP, C-C chemokines, and metallothioneins (repressed by all three stimuli). These concordant transcriptional profiles provide further evidence for a cholinergic component of the angiogenic pathways. For example, our findings of coinduction of FLT1 by all three stimuli, and of nAChR subunit induction by VEGF are consistent with interaction between the signaling pathways.

Of the coregulated genes identified by hierarchical clustering, we focused our attention on TXNIP. Originally identified in HL-60 leukemia cells treated with 1,25 dihydroxyvitamin D₃ (and previously known as Vitamin D₃ upregulated protein 1), TXNIP is an endogenous inhibitor of the ubiquitous redox protein thioredoxin.¹² Thioredoxin, a major redox regulator of protein function and signaling via thiol redox control, has been implicated in the regulation of cellular responses to oxidative stress and apoptosis.²³ Thioredoxin selectively regulates the activity of DNA-binding proteins; for example, two transcription factors concordantly regulated by the three stimuli, NF- κ B, and p53, require thioredoxin reduction for stimulation of DNA binding.^{23,24} Increasing evidence implicates TXNIP and thioredoxin in tumorigenesis. Thioredoxin expression is increased in several human primary cancers, whereas TXNIP is strongly downregulated in human tumor tissues.^{13,25} Inhibition of thioredoxin signaling with experimental antitumor agents such as PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) and pleurotin reduces tumor cell production of HIF-1 α and VEGF in vitro and inhibits tumor angiogenesis in vivo.²⁶ We hypothesized that repression of TXNIP may play a role in mediating growth factor-mediated EC migration.

In the present study, we found that nicotine, VEGF, and bFGF stimulated thioredoxin activity—a finding consistent with their common suppression of TXNIP. Gene knockdown of thioredoxin by siRNA reversed the effect of growth factor stimulation and abrogated the effect of nicotine, VEGF, or bFGF on EC migration. These findings are consistent with a critical role for thioredoxin in mediating growth factor-induced EC migration. Interestingly, the increase in thioredoxin activity induced by each of the three stimuli could be blocked by nAChR antagonism. Finally, gene knockdown of TXNIP alone, without addition of growth factors, induced EC migration. Our findings indicate that TXNIP, by regulating of thioredoxin activity, may play an important role in angiogenesis mediated by growth factor receptors or nAChRs. The mechanism whereby thioredoxin mediates EC migration is poorly understood but may involve stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), a transcription factor that plays a central role in mediating the angiogenic response to hypoxia. Overexpression of thioredoxin in a variety of malignant cells has been shown to induce HIF-1 α expression and VEGF production.²⁷ Induction of HIF-1 α in human endothelial cells upregulates the expression of multiple angiogenic factors including the angiopoietins which are potent stimulators of cell migration via Tie-2 signal transduction pathways.²⁸ Moreover, as cellular redox state is an important determinant of Rho