

Ca-regulatory protein and efforts have concentrated on identifying naturally occurring mutations in the human PLN gene, which may perturb its activity and contribute to dilated cardiomyopathy (DCM). Indeed, three mutations in the coding region of the human PLN gene have been identified that are associated with familial cardiomyopathy [Haghighi et al., 2003, 2006; Schmitt et al., 2003]. However, parallel studies on genetic variants in the PLN promoter region, which may alter its expression levels, are limiting.

The PLN gene is located on human chromosome 6 [Fujii et al., 1991] and the 200bp of its 5' flanking region exhibits significant sequence homology between human, rabbit, rat, and mouse [Fujii et al., 1991; Haghighi et al., 1997; McTieman et al., 1999a, 1999b]. Importantly, this segment of the 5' upstream region of the human PLN gene contains conserved consensus motifs for GATA, CP1/NF- γ , M-CAT, and E-box elements, which are also found in other mammalian species [Haghighi et al., 1997; McTieman et al., 1999a]. However, the importance of these elements in regulation of PLN gene expression under physiological and pathophysiological conditions remains uninvestigated. Indeed, most studies indicate that cardiac PLN expression levels are maintained under stress and remodeling conditions, including pressure overload, hypertrophy, and failure [Ito et al., 2001; Kogler et al., 2003; Mills et al., 2006]. A recent study reported the presence of a rare human mutation in this highly conserved PLN promoter region (A>G at -77 bp), which was associated with increased PLN (1.5-fold) expression [Minamisawa et al., 2003]. This variant was found in 1 out of 87 hypertrophic cardiomyopathy patients, suggesting a role of the PLN promoter mutant in depressed Ca cycling, leading to hypertrophy.

In this study, we sought to identify naturally occurring PLN promoter mutations in nonfamilial heart failure patients. A novel point genetic variant (A>C) at position AF177763.1:g.203A>C (at -36bp relative to the PLN transcriptional start site: -36A>C) in the 5' UTR region of the PLN gene was detected only in the heterozygous state in 22 heart failure patients and one normal subject. In vitro studies on the functional significance of this genetic variant revealed that it increases PLN expression levels by altering glucocorticoid nuclear receptor (GR)-mediated regulation of transcription.

MATERIALS AND METHODS

Mutation Identification

Informed consent was obtained from participating subjects. All protocols were approved by the institutional review board of the Onassis Cardiac Surgery Center (Athens, Greece) or the University of Cincinnati College of Medicine, (Cincinnati, OH). Genomic DNA was isolated either from whole blood or from paraffin blocks containing heart tissue. The genomic reference with GenBank accession number AF177763.1 was used to retrieve the PLN sequence corresponding to proximal promoter and exon 1. A 600-bp fragment of the PLN gene, containing the PLN promoter region was amplified by PCR, using 60 ng of genomic DNA and a high-fidelity *Taq* polymerase. The primers were: sense, 5'CTAAGCCTGAAGATGC3' and antisense, 5'CCAGTAACCA GGATC3', tagged with M13 forward and reverse primer sequences, respectively. The conditions were: one cycle at 94°C for 3 min, linked to 30 cycles at 94°C for 1 min, 47°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by one cycle at 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, and 72°C for 10 min. The gel purified PLN DNA fragment was sequenced using automated dye-primer chemistry. The generated sequences were compared with the reported human PLN sequences by a computational method and the electropher-

ograms were inspected individually for confirmation. The GenBank accession number AF177763.1 was used as a reference for numbering the PLN promoter polymorphism.

Echocardiography

Comprehensive 2D and Doppler echocardiography was performed according to the recommendations of the American Society of Echocardiography [Levy et al., 1990]. Left ventricular dimensions (interventricular septum end-diastolic thickness [IVEDT], left ventricular posterior wall end-diastolic thickness [PWEDT], left ventricular end-systolic and end-diastolic diameter [LVESD and LVEDD]) were measured with M-mode echocardiography, using the left parasternal window. Left ventricular volumes and ejection fraction (LVEF) were determined by apical two- and four-chamber views using the modified Simpson rule [Levy et al., 1990].

Cloning of the Human PLN Gene Promoter-Reporter Constructs

A PCR-based strategy was employed using high-fidelity DNA polymerase to amplify the mutant region from human PLN genomic DNA, comprising the upstream PLN promoter. A 510-bp DNA fragment was PCR-amplified from normal and DCM genomic DNA utilizing the primers 5'-TACCTGTGTTTATTTTCTC-3' and 5'-AAGAAGAATTACCAAAGTCAGC3'. To facilitate cloning, Kpn I and Xho I sites were added to the beginning of the primers. The 510-bp fragment containing the engineered Kpn I and Xho I sites was subcloned into the pBlueScript vector (Stratagene, La Jolla, CA). The upstream PLN promoter region was verified by DNA sequence analysis. Then, the PLN promoter fragment containing either the nucleotide transition, -36A>C, or the wild type sequences of the PLN gene was digested with Sac I and Pst I, and cloned into pGL3-Basic (Promega, Madison, WI) to create the PLN promoter-luciferase reporter constructs.

About 600 bp of 5' upstream of the PLN gene sequences were scanned for putative transcription factor binding sites, using public domain software (Transcription Element Search Software; www.chil.upenn.edu/tess; TFBLAST of TRANSFAC 6.0; BioBase Corporation, Beverly, MA; www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/tfblast/tfblast.cgi).

Cardiomyocyte Culture, Transient Transfection, and Luciferase Assays

Ventricular myocytes were isolated from 1-day-old Sprague-Dawley rats and cultured as described [Minamisawa et al., 2003]. For promoter-reporter studies, after 24 hr incubation with serum-free medium, the myocytes were transiently cotransfected with 300 ng of each PLN luciferase test plasmid and 75 ng of pRL-TK control plasmid (Promega). The cells were harvested in Passive Lysis Buffer (Promega) 48 hr after transfection, and were stored at -80°C until processed for the luciferase assay. The cells were allowed to grow in the absence or presence of 3 μ M dexamethasone for the last 45 hr of the 48-hr incubation period. Luciferase assays were performed according to the protocol of the Dual Luciferase Assay System (Promega). Each data point represents the mean and the standard error of the mean (SEM) of seven experiments.

Electrophoretic Mobility Shift Assays

Nuclear extracts from ventricular tissue samples were prepared as described previously [Brown et al., 2005] with modifications. Briefly, ventricular tissue was pulverized at liquid N₂ temperatures, homogenized at low speed in buffer containing 10 mM HEPES

(pH 9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mM sodium orthovanadate, and 0.1% (vol/vol) Triton X, then vortexed and incubated on ice for 10 min. After centrifugation (5,000 g for 10 min), the pellet was suspended in solution containing 20 mM HEPES (pH 7.9), 25% (vol/vol) glycerol, 0.6 M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 0.5 mM DTT, 25 µg/ml leupeptin, and 0.2 mM sodium orthovanadate, and then vortexed. This suspension was incubated on ice for 40 min with rigorous vortexing every 10 min. After centrifugation (10,000 g for 15 min), the supernatant was retained as a crude nuclear extract. Protein concentrations were determined using a Bio-Rad (Hercules, CA) protein assay with bovine serum albumin as a standard.

A double-stranded 20-bp oligodeoxynucleotide, containing the PLN promoter wild type (5'-CCTCCCTAG){A}{ACACTTTTTC-3'; underlined, glucocorticoid binding element) or mutant form (5'-CCTCCCTAG){C}{ACACTTTTTC-3'; bold, mutated nucleotide) was end-labeled using [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (Promega), and was purified using a G-50 Sephadex column (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The binding reactions were performed in a final volume of 10 µl that contained 20 µg of nuclear protein, 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 4% glycerol (vol/vol), and 1 µg of poly(dI-dC). After a 10-min preincubation at room temperature, the labeled probe (1 × 10⁵ cpm/reaction) was added to each reaction and the reactions were incubated for an additional 20 min at room temperature. The DNA-protein complexes were separated on 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 1 × Tris borate-EDTA buffer. Gels were vacuum-dried and exposed to X-ray film at -20°C, using intensifying screens. Competition assays with 100-fold molar excess of unlabeled consensus oligodeoxynucleotide or control nonspecific oligodeoxynucleotide were performed to ensure that the signal was specific. The commercially available oligonucleotide containing the common glucocorticoid consensus, 5'-GACGGTACAAAATGTTCTAGG-3' (Active Motif, Carlsbad, CA) and antiglucocorticoid antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used for specific binding activity confirmation. A double-stranded 22-bp oligodeoxynucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') containing a consensus nuclear factor-κB (NF-κB) binding site (underlined) was used as positive control.

Statistics

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test. A P value of <0.05 was considered statistically significant. The agreement with the Hardy-Weinberg expectations (HWE) of genotype frequencies was determined using the chi-squared test based on the number of observed and expected heterozygotes and the exact test based on the number of observed and expected genotypes [Guo and Thompson, 1992].

RESULTS

Clinical History

A total of 381 DCM patients and 296 normal subjects without any known cardiomyopathy history were recruited from the University Hospital, Cincinnati Heart Failure/Transplant Program (Cincinnati, OH) and the Onassis Cardiac Surgery Center (Athens, Greece). The clinical characteristics and the demographic data for the DCM populations are summarized in Table 1.

TABLE 1. Clinical Characteristics of the United States and Greek DCM Patients With Heart Failure

	Ethnicity	
	United States	Greek
n	163	218
Age (years)	44.95 ± 3.3	40 ± 6.2
Gender (%)		
Male	72	82
Female	28	18
Etiology (%)		
Dilated cardiomyopathy	94.27	100
Ischemic cardiomyopathy	5.76	—
Functional class (% NYHA III/IV)	67.2	70.6
LVEF (%)	23.6 ± 8	26.4 ± 6

DCM, dilated cardiomyopathy; LVEF, left ventricular ejection fraction; NYHA, New York Heart Association Classification.

Comorbid conditions in the cohorts included: hypertension (8%), diabetes (6%), hypercholesterolemia (12%), and atrial fibrillation (12%). The medications used by the DCM patients were angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (97%), diuretics (94%), digoxin (98%), beta blockers (75%), Ca-channel blockers (12%), and antiarrhythmics (45%).

Identification of a Genetic Variant in the Human PLN Promoter Region

In the initial discovery study, the PLN gene promoter region 600 bp upstream from the transcriptional start site [McTiernan et al., 1999a] was sequenced in 40 unrelated Greek DCM patients. The sequencing of this region identified a single nucleotide transition from A>C at position AF177763.1:g.203A>C (at -36 bp relative to the PLN transcriptional start site: -36A>C) (Fig. 1A). We subsequently screened an additional 178 Greek DCM patients to determine the frequency of this PLN genetic variant. The -36A>C substitution was found in another 15 patients (16/218 total) and it was only present in the heterozygous form, reflecting an allelic frequency of 3.66% in the Greek DCM population. To confirm the presence of this novel PLN promoter variant in a different heart failure population, 163 Caucasian DCM patients (University Hospital, Cincinnati Heart Failure/Transplant Program, University of Cincinnati, OH) were also screened. The -36A>C variant was found in the heterozygous form in six patients, reflecting an allelic frequency of 1.84%. The characteristics of the patients with the identified transition in the PLN gene in the two cohorts were similar (Table 2). The PLN -36A>C variant carriers presented with heart failure symptoms and were diagnosed with cardiomyopathy at ages ranging from 18 to 44 years. Echocardiography studies indicated severe left ventricular dilatation and systolic dysfunction (e.g., ejection fraction of 22 ± 9%). Their symptoms remained under control with drug treatments. However, some patients' symptoms progressively deteriorated (New York Heart Association [NYHA] Classification, NYHA class III), leading to the death of one patient at the age of 48 years and heart transplantation in another patient at the age of 46 years. The promoter variant -36A>C was found in only 1 normal control subject out of 296 screened. There were no departures from Hardy-Weinberg equilibrium for allelic frequencies in either DCM or control populations.

The promoter region of the human PLN gene, containing the genetic variant is a highly conserved region among species (Fig. 1B) [McTiernan et al., 1999a]. Therefore, it was hypothesized that this change in nucleotide sequence might alter PLN

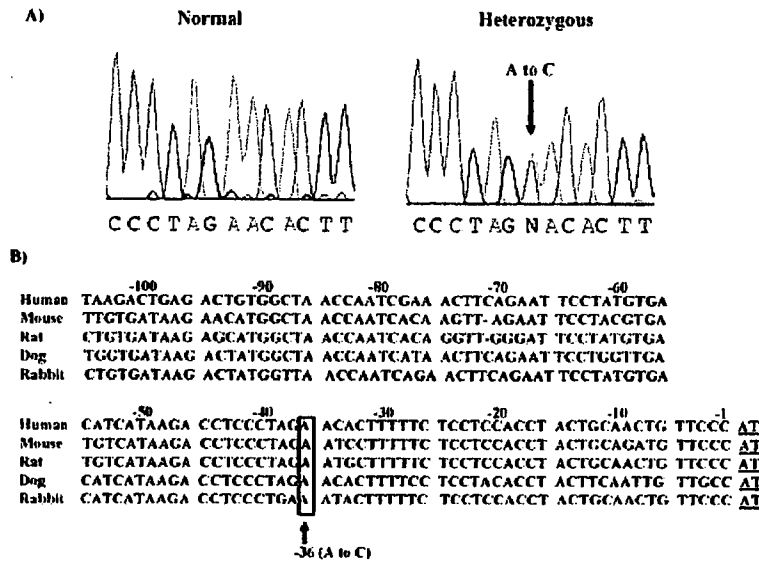


FIGURE 1. Genomic DNA sequence analysis of the PLN promoter region. **A:** Partial nucleotide sequences of the PLN promoter region in normal subjects and DCM patients heterozygous for the AF177763.1:g.203A > C (at -36 bp from transcriptional start site: -36A > C) substitution. **B:** Sequence comparison of the proximal mammalian PLN promoter sequences was performed by the FASTA program (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml) (GenBank reference sequence numbers AF177763.1, AF037348.1, L03381.1, and M63600.1). The numbers correspond to human nucleotides upstream of exon 1 (transcription start site, underlined). The position of the A > C transition (boxed) is indicated. Gaps are shown by dash. Polymorphism numbering is based on using the GenBank accession number AF177763.1 for human PLN sequence corresponding to proximal promoter and exon 1 and the transcription start site as a reference. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

TABLE 2. Clinical Characteristics of Dilated Cardiomyopathy Patients With the -36A > C Substitution in the PLN Gene*

	Wild-type allele	Mutant allele
n	359	22
Age (years)	42 ± 3.1	40 ± 6
Etiology (%)		
Dilated cardiomyopathy	94.27	100
Functional class (% NYHA III/IV)	67.2	66.66
LVEF (%)	24.5 ± 8	22 ± 9

*Polymorphism numbering is based on using the GenBank accession number AF177763.1 for human PLN sequence, corresponding to proximal promoter and exon 1 as a reference. DCM, dilated cardiomyopathy; LVEF, left ventricular ejection fraction; NYHA, New York Heart Association Classification.

promoter activity and consequently its regulation of SERCA2a, and thus contribute to the pathophysiology of heart failure.

In Vitro Assays of PLN Promoter Activity

To determine the potential functional importance of the identified genetic variation on PLN transcriptional regulation, we generated reporter constructs that expressed luciferase under the control of the putative promoter sequences from the human PLN gene. When neonatal rat cardiomyocytes were transiently transfected with luciferase reporters under the control of wild-type (PLN-WT) or "mutant" PLN (PLN-MT) promoters, the -36A > C transition resulted in a significant increase of 24% in transcriptional activity, compared to the wild-type promoter (Fig. 2A). To examine whether the -36A > C point transition in the PLN gene may alter regulation by any of the sequence-specific DNA-binding proteins, such as transcription factors, we performed a computer sequence search for putative regulatory binding sites.

We identified a potential sequence for the glucocorticoid response element (GRE) within the mouse PLN promoter (Fig. 2B). Our DNA scanning revealed that the -36A > C substitution was within the putative glucocorticoid receptor binding site of the PLN promoter gene. To further investigate the regulation of PLN gene expression by the glucocorticoid response element, the luciferase reporter constructs of PLN-WT and PLN-MT were transiently transfected into rat neonatal cardiac cells in the absence or presence of dexamethasone. The induced luciferase activity of PLN-WT was significantly increased when dexamethasone was present, while there was no effect of dexamethasone on the PLN-MT, compared to basal levels (Fig. 2A). The lack of luciferase activity induction in PLN-MT following stimulation of transfected cells by dexamethasone may indicate that the genetic variant abolished the direct or indirect mediation of the dexamethasone-mediated enhancement of the reporter gene activity.

To further examine the functional significance of the -36A > C PLN promoter variant, gel mobility shift assays were employed. Using nuclear extracts from mouse heart, the binding assays showed that both synthetic WT (Fig. 3; lanes 13 and 14) and MT (Fig. 3; lanes 11 and 12) oligonucleotides were able to form a DNA-protein complex, indicating transcription factor binding. However, stronger binding was observed with the PLN-MT oligonucleotide, demonstrating that this sequence has a higher affinity for transcription factor binding. Binding was completely blocked in the presence of 100-fold excess of the cold-labeled WT (Fig. 3; lanes 3 and 4) or MT oligonucleotide (Fig. 3; lanes 5 and 6), used as specific competitors. Nuclear lysate was used as a negative control and it did not form any complexes in the presence of either synthetic WT or MT oligonucleotide (Fig. 3; lanes 7-10). However, an oligonucleotide containing a consensus NF-κB binding site, used as a positive control for nuclear lysate activity, yielded DNA-protein complexes in the lysates. These findings

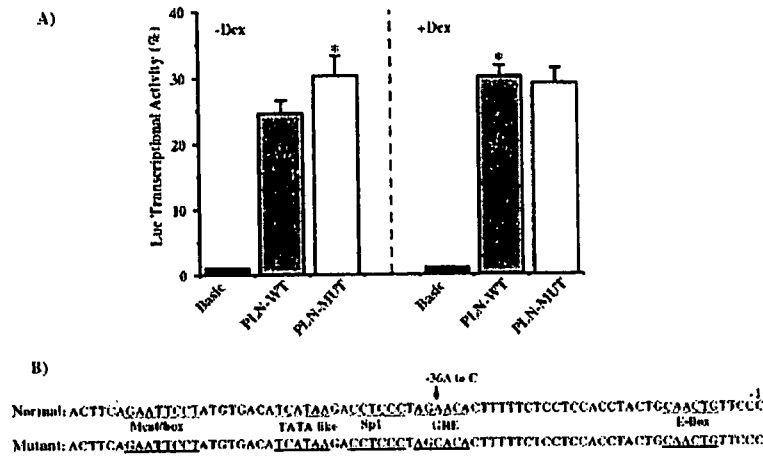


FIGURE 2. Effect of the -36A > C genetic variant on human PLN promoter activity. **A:** Rat neonatal cardiomyocytes were transiently transfected with a luciferase expression vector driven by PLN-WT or PLN-MT (-36A > C) promoters, and were cultured in the absence (left) or presence (right) of 3 μM dexamethasone (Dex) for 45 hr. Transcriptional activity of the promoters was defined as a ratio of firefly luciferase activity to Renilla luciferase activity in the same cells, and normalized to the mean basal transcriptional activity of the promoter-less pGL3-basic vector. **B:** Sequence alignment of the normal and mutant human PLN upstream promoter regions. The relative positions of the promoter starting site (-1) and of the potential regulatory sequences (underlined) are indicated. The values are expressed as means ± SEM (n = 7). *P < 0.05 vs. PLN-WT without Dex (two-way ANOVA and Student-Neuman-Keuls test). Polymorphism numbering is based on using the GenBank accession number AF177763.1 for human PLN sequence corresponding to proximal promoter and exon 1 as a reference.

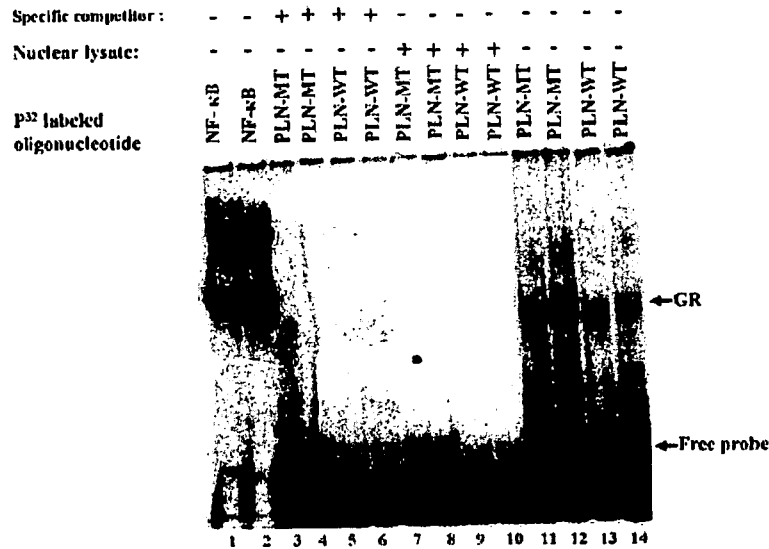


FIGURE 3. Electrophoretic mobility gel shift assay of wild-type and genetically-altered glucocorticoid elements in the PLN promoter sequences. Electrophoretic mobility gel shift assays were used to determine DNA-protein complex formation using nuclear extracts from mouse hearts. NF-κB was used as a positive technical control (lanes 1 and 2); nonlabeled wild-type (PLN-WT, lanes 3 and 4) and altered (PLN-MT, lanes 5 and 6) were used as specific competitors; and nuclear lysate as a negative control (lanes 7-10); PLN-MT oligonucleotide (lanes 11 and 12) and PLN-WT oligonucleotide (lanes 13 and 14). Duplicate samples were assayed for each treatment.

suggest that the quality of the nuclear lysates and the binding conditions were appropriate (Fig. 3; lanes 1 and 2).

To verify whether the binding activity from heart nuclear extracts reflects a specific interaction between the GR with the PLN-WT and PLN-MT probes, as predicted based upon computer searches, we employed a commercially available oligonucleotide, containing a known consensus GRE sequence. This oligonucleotide was used in DNA binding and competition studies, designed to assess specificity of our DNA-protein complexes. The GRE

consensus oligonucleotide displayed a strong DNA-protein binding complex in nuclear extracts (Fig. 4; lane 3). Furthermore, this commercially available oligonucleotide could completely block DNA-protein complex formation with PLN-WT, PLN-MT, and the GRE oligonucleotide in the nuclear extracts (100-fold excess; Fig. 4; lanes 4-6). The consensus GRE containing oligonucleotide and the PLN promoter-derived sequences (PLN-WT and PLN-MT) demonstrated identical migration of the DNA-protein complexes (Figs. 3 and 4). It was interesting to note that the

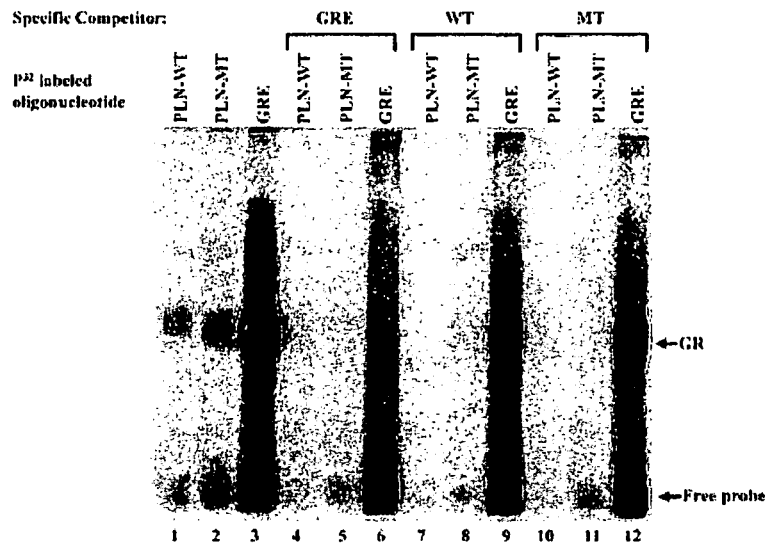


FIGURE 4. Electrophoretic mobility gel shift assay of the PLN wild-type and genetically-altered glucocorticoid element specificity in the presence of common glucocorticoid consensus. Consensus glucocorticoid receptor element (GRE), PLN-WT, and PLN-MT motifs were used to examine binding specificity in cardiac nuclear extracts from wild-type mice. Lanes 1–3: cardiac nuclear extracts reacted with radiolabeled oligonucleotides of PLN-WT, PLN-MT, and consensus GRE sequences. Lanes 4–6: consensus GRE oligonucleotides were used as specific competitor ($100 \times$ unlabeled GRE oligonucleotides). Lanes 7–9 and lanes 10–12: PLN-WT and PLN-MT oligonucleotides were used as competitors ($100 \times$ -fold unlabeled oligonucleotide), respectively.

PLN-WT or PLN-MT oligonucleotides could not completely compete with the common glucocorticoid consensus (Fig. 4; lanes 9 and 12). Taken together, these results indicate that the GR binds specifically to the PLN-WT and PLN-MT promoter sequences, albeit at lower affinity than the consensus GRE employed.

DISCUSSION

In this study, we identified a novel variant ($-36A > C$) in the human PLN promoter region in 22 heart failure patients and one normal subject, which appears to enhance promoter activity and alter the GR receptor binding element. Importantly, this PLN promoter variant was identified in two heart failure populations. The allelic frequencies in two ethnic populations and in controls were in Hardy-Weinberg equilibrium, indicating that this genetic variant is heritable and a combination of the $-36A > C$ PLN variant with other genetic and environmental modifiers may contribute to the time course of the disease in the patients. The identified nucleotide substitution is in close proximity to the putative TATA ($5'$ -TCATAA- $3'$) boxes at position -48 to -53 in an evolutionarily conserved PLN gene region between species, and may play a significant role in regulating PLN gene expression. Indeed, *in vitro* studies of this genetic variant indicated that it may increase PLN expression levels and consequently, depress SR Ca cycling associated with cardiomyopathy. The functional significance of increased PLN levels in cardiac muscle has previously been demonstrated through the generation and characterization of transgenic mouse models [Kadambi et al., 1996; Dash et al., 2001]. Consistent with findings in transgenic mice, an increase in the apparent stoichiometry of PLN to SERCA2a, as a result of the PLN promoter genetic variant, may contribute to the depressed Ca cycling and deterioration of cardiac function.

Recently, there has been a considerable upsurge of interest in the influence of *cis*-acting genetic variations on gene transcription. Furthermore, these mutations and polymorphisms, found in various gene promoter regions, have been reported to affect gene

expression and impact function [Collins et al., 2003; Hudson, 2003; Buckland et al., 2004; Guy et al., 2004; Schulz et al., 2006]. Importantly, the PLN promoter variant ($A > C$, underlined below), identified herein, was within a novel consensus sequence segment that matched a glucocorticoid receptor-binding site ($5'$ -AGAA-GA- $3'$). Previous studies have shown that thyroid hormone and glucocorticoids regulate the expression of several genes, including calcium cycling proteins [Kiss et al., 1994, 1998; Smith and Smith, 1994; Brittsan et al., 1999; Muangmingsuk et al., 2000]. Thyroid hormone was reported to mediate changes in PLN protein levels [Kiss et al., 1994, 1998; Brittsan et al., 1999] possibly through interaction with thyroid hormone elements residing in the PLN promoter region. Glucocorticoids downregulate Na-Ca exchanger mRNA levels and activity in aortic myocytes [Smith and Smith, 1994], while they increase expression of alpha-myosin heavy chain (MHC) and decreased expression of beta-MHC in neonatal rat cardiomyocytes [Muangmingsuk et al., 2000]. These changes suggest that, similar to thyroid hormone-mediated transcriptional activation, the glucocorticoid effects may also be mediated in part through transcriptional mechanisms. Indeed, the level of PLN transcripts was significantly decreased, when rat neonatal cardiomyocytes were treated with cytokines (interleukin [IL]- 1β , tumor necrosis factor [TNF]) [McTiernan et al., 1997], while dexamethasone significantly elevated the levels of PLN transcripts [McTiernan et al., 1997], indicating the direct effects of dexamethasone on PLN gene regulation. In this report, similar results were obtained with dexamethasone induction of PLN-WT promoter expression. In contrast, dexamethasone did not increase the luciferase transcriptional activity of the PLN-MT promoter, suggesting that the $-36A > C$ substitution may have abolished the interaction site for glucocorticoid receptor elements in the PLN gene.

The role of transacting elements in the transcriptional activity of the PLN gene remains poorly understood and the nuclear proteins involved in the regulation of the gene through binding to these elements are unknown. Our previous studies on

characterization of the mouse PLN promoter indicated that 200 bp proximal to the transcriptional initiation site is sufficient for moderate (40%) expression of PLN levels [Haghighi et al., 1997]. The dexamethasone-responsive PLN gene sequences are located within the 200-bp proximal promoter region of the mouse and human PLN gene, which are highly conserved between species [Haghighi et al., 1997; McTiernan et al., 1999a]. Increased luciferase activity in the promoter-reporter studies suggest that GREs within this region may contribute to the modulation of transcriptional regulation via DNA–protein interactions of the PLN gene as further supported by electrophoretic mobility gel shift assay studies. Obviously, the limitation of this study is that the upregulation of the PLN promoter activity presented here is primarily from *in vitro* studies; *in vivo* relevance of these finding could not be performed due to lack of cardiac biopsies from affected individuals.

The glucocorticoid receptor is a ligand-dependent transcription factor with both hormone and DNA binding domains, affecting the transcription of specific genes [Schoneveld et al., 2004]. Specifically, glucocorticoid hormones are the major mediators of systemic stress responses [Brent et al., 1991] and it has been suggested that they may regulate SR function and cellular calcium homeostasis in the myocardium [Rao et al., 2001; Aoyama et al., 2005]. The possible mechanisms may involve modulation of PLN phosphorylation through Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) [Rao et al., 2001]. Interestingly, the CaM kinase II dependent phosphorylation site of PLN, Thr17, has been implicated in stress responses of the cardiomyocytes [Hagemann et al., 2000; Zhao et al., 2004]. Therefore, under stress conditions, GR modulation of PLN activity and/or expression levels may influence SR Ca cycling and myocardial function, which may be beneficial during early cardiac remodeling but deleterious under pathophysiological conditions. However, the abolished PLN GRE site by the $-36A>C$ genetic variant eliminates the GR-mediated regulation, resulting in chronic increases in PLN expression levels and inhibition of SERCA activity, which may accelerate deterioration of function in DCM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients for their participation and we thank the physicians in the Department of Medicine at the University of Cincinnati, Cincinnati, OH, and the Onassis Cardiac Surgery Center in Athens, Greece, for their collaboration in this study. This research was supported by grants from the NIH (HL-77101 [to E.G.K. and G.W.D.]; HL-026057 [to E.G.K.]; HL-64018 [to E.G.K.]; and HL-52318 [to G.W.D.]) and from the Leducq Foundation (to E.G.K. and G.W.D.).

REFERENCES

- Aoyama T, Matsui T, Novikov M, Park J, Hemmings B, Rosenzweig A. 2005. Serum and glucocorticoid-responsive kinase-1 regulates cardiomyocyte survival and hypertrophic response. *Circulation* 111:1652–1659.
- Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. 1992. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85:1046–1055.
- Brent GA, Moore DD, Larsen PR. 1991. Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol* 53:17–35.
- Brittsan AG, Kiss E, Edes I, Grupp IL, Grupp G, Kranias EG. 1999. The effect of isoproterenol on phospholamban-deficient mouse hearts with altered thyroid conditions. *J Mol Cell Cardiol* 31:1725–1737.
- Brittsan AG, Carr AN, Schmidt AG, Kranias EG. 2000. Maximal inhibition of SERCA2 Ca affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem* 275:12129–12135.
- Brown M, McGuinness M, Wright T, Ren X, Wang Y, Boivin GP, Hahn H, Feldman AM, Jones WK. 2005. Cardiac-specific blockade of NF-kappaB in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H466–H476.
- Buckland PR, Coleman SL, Hoogendoorn B, Guy C, Smith SK, O'Donovan MCA. 2004. High proportion of chromosome 21 promoter polymorphisms influences transcriptional activity. *Gene Expr* 11:233–239.
- Chien KR. 2000. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 407:227–232.
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. 2003. A vision for the future of genomics research. *Nature* 422:835–847.
- Dash R, Kadamhi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Liggert SB, Lorenz JN, Dorn GW II, Kranias EG. 2001. Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation* 103:889–896.
- Franz WM, Muller OJ, Karas HA. 2001. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* 358:1627–1637.
- Fujii J, Zairin-Herzberg A, Willard HF, Tada M, MacLennan DH. 1991. Structure of the rabbit phospholamban gene, cloning of the human cDNA, and assignment of the gene to human chromosome 6. *J Biol Chem* 266:11669–11675.
- Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG. 1996. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 272:731–734.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Guy CA, Hoogendoorn B, Smith SK, Coleman S, O'Donovan MC, Buckland PR. 2004. Promoter polymorphisms in glutathione-S-transferase genes affect transcription. *Pharmacogenetics* 14:45–51.
- Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. 2000. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275:22532–22536.
- Haghighi K, Kadamhi VJ, Koss KL, Luo W, Harrer JM, Ponniah S, Zhou Z, Kranias EG. 1997. *In vitro* and *in vivo* promoter analyses of the mouse phospholamban gene. *Gene* 203:199–207.
- Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggert SB, Dorn GW II, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. 2003. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 111:869–876.
- Haghighi K, Kolokathis F, Gramolini AO, Waggoner JR, Pater L, Lynch RA, Fan GC, Tsiapras D, Parekh RR, Dorn GW II, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. 2006. A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1388–1393.
- Hasenfuss G. 1998. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37:279–289.
- Hudson TJ. 2003. Wanted: regulatory SNPs. *Nat Genet* 33:439–440.
- Ito K, Yan X, Feng X, Manning WJ, Dillmann WH, Lorell BH. 2001. Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res* 89:422–429.
- Kadamhi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW II, Walsh RA, Kranias EG. 1996. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest* 97:533–539.
- Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I. 1994. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75:245–251.
- Kiss E, Brittsan AG, Edes I, Grupp IL, Grupp G, Kranias EG. 1998. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban-deficient mouse hearts. *Circ Res* 83:608–613.

- Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen P, Schott P, Brodde OE, Hasenfuss G. 2003. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 93:230–237.
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castell WP. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322:1561–1566.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. 1994. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75:401–409.
- Luo W, Wolska BM, Grupp IL, Harrer JM, Haghghi K, Ferguson DG, Slack JP, Grupp G, Doetschman T, Solaro RJ, Kranias EG. 1996. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. *Circ Res* 78:839–847.
- MacLennan DH, Kranias EG. 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566–577.
- McTiernan CF, Bonnie H Lemster, Frye C, Brooks S, Combes A, Feldman AM. 1997. Interleukin-1 β inhibits phospholamban gene expression in cultured cardiomyocytes. *Circ Res* 81:493–503.
- McTiernan CF, Frye CS, Lemster BH, Kinder EA, Ogletree-Hughes ML, Moravec CS, Feldman AM. 1999a. The human phospholamban gene: structure and expression. *Mol Cell Cardiol* 31:679–692.
- McTiernan CF, Lemster BH, Frye CS, Johns DC, Feldman AM. 1999b. Characterization of proximal transcription regulatory elements in the rat phospholamban promoter. *J Mol Cell Cardiol* 31:2137–2153.
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. 1995. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92:778–784.
- Mills GD, Kubo H, Harris DM, Berretta RM, Piacentino V III, Houser SR. 2006. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H61–H70.
- Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, Fujino T, Imamura S, Uetsuka Y, Nakazawa M, Matsuoka R. 2003. Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 304:1–4.
- Muangmingsuk S, Ingram P, Gupta MP, Arcilla RA, Gupta M. 2000. Dexamethasone induced cardiac hypertrophy in newborn rats is accompanied by changes in myosin heavy chain phenotype and gene transcription. *Mol Cell Biochem* 209:165–173.
- Rao MK, Xu A, Narayanan N. 2001. Glucocorticoid modulation of protein phosphorylation and sarcoplasmic reticulum function in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H325–H333.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsas I, Martin I, Nordet P. 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93:841–842.
- Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE. 2003. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 299:1410–1413.
- Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. 2004. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* 1680:114–128.
- Schulz V, Hendig D, Henjakovic M, Szliska C, Kleesiek K, Gotting C. 2006. Mutational analysis of the ABCC6 gene and the proximal ABCC6 gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat* 27:831–844.
- Seidman JG, Seidman C. 2001. Genetic basis for cardiomyopathy from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104:557–567.
- Simmerman HK, Jones LR. 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921–947.
- Smith L, Smith JB. 1994. Regulation of sodium-calcium exchanger by glucocorticoid and growth factor in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 269:27527–27531.
- Zhao W, Uehara Y, Chu G, Song Q, Qian J, Young K, Kranias EG. 2004. Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 37:607–612.

細胞・組織加工医薬品の品質と 安全性確保への提言

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長

昨年、我が国初の細胞・組織加工医薬品となる培養皮膚製品の承認、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案の公表、そして、ヒト iPS 細胞作製の成功など、再生医療関連の大きなトピックが相次いだ。我が国では現在、骨、軟骨、角膜、心筋、血管、神経などの再生に関する臨床研究が精力的に行われている。また、樹状細胞や活性化リンパ球を用いたがん治療など細胞治療の臨床研究も活発である。これら臨床研究の成果が標準治療として広く一般に提供されていくためには、細胞・組織を含む製品を薬事法の規制下に医薬品として開発していくことにより、その品質・有効性・安全性を確保することが望まれる。本稿では、細胞・組織加工医薬品について、品質・安全性確保のための一般的な考え方と関連する規制状況等について海外での状況も含めて紹介する。

1 細胞・組織加工医薬品とは

細胞・組織加工医薬品等とは、ヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工して製造される医薬品又は医療用具と定義される。従って、細胞・組織加工医薬品は生きている細胞という刻一刻と変化する特性と、細胞という高度な有機体であるという特性を併せ持つことから、品質・安全性・有効性評価においてはこのような特性を充分に理解しておくことが必要となる。

細胞・組織の「加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、細胞・組織の活性化などを目的とした薬剤処理、生物学的特性

改変、非細胞・組織成分との組み合わせ、遺伝子工学的改変等を施すことを言う。したがって、いわゆる再生医療に用いられる細胞、例えば、軟骨細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、筋芽細胞等の他に、免疫療法などで用いられる細胞や ex vivo 遺伝子治療用の細胞等も細胞・組織等加工医薬品の範囲に含まれる。加工を経ずに移植に用いられる角膜、造血幹細胞などは細胞・組織加工医薬品には含まれず、移植医療と位置づけられている。我が国と異なり、欧米ではこのような移植医療も含めて細胞治療として品質・安全性・有効性確保の対策をとっており、例えばフランスでは、1996 年以降、細胞治療の 60% は造血幹細胞を用いたものといわれている。

2 細胞・組織加工医薬品の品質と 安全性確保 — 規制環境の整備

細胞・組織加工医薬品に関して、その開発を適正に推進することを目的に、品質・安全性確保に関する規制関連文書が各極で出されている（表 1, 2）。いずれにおいても、細胞・組織加工医薬品では医薬品としての性質や患者への適用方法が製品ごとに大きく異なり多様であるため、画一的な規制を行うのではなく、目的とする製品の特性に応じてケースバイケースで対応すべきであるという考えが基本にある。細胞・組織を利用した医薬品の品質・安全性確保に関するこれまでの国内通知等で最も重要なものは、平成 12 年に発表された医薬品第 1314 号通知

一別添 1「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」

一別添2「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針」である¹⁾。

別添1には、細胞・組織利用医薬品の製造にあたって、その採取行為から加工、製造における取り扱いや使用に際しての基本的要件が示されており、別添2には、ヒト由来細胞・組織加工医薬品について、その品質・安全性確保のために必要な基本的要件と、承認申請および治験前の「確認申請」に必要な資料の内容が示されている。

表1 細胞・組織加工医薬品に関連する指針や通知

◇ 細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について (医薬発第906号)
◇ 細胞・組織利用医薬品等の取り扱い及び使用に関する基本的考え方 (医薬発第1314号 別添1)
◇ ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針 (医薬発第1314号 別添2)
◇ 生物由来製品及び特定細胞由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について (医薬発第052001号)
◇ 生物由来製品に関する感染症定期報告制度について (医薬発第051508号)

表2 細胞・組織加工医薬品に関する海外の指針や通知

◇ Guidance for Industry : Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. FDA/CBER, 1998
◇ Suitability Determination for Donors of Human Cellular and Tissue-based Products. FDA/CBER, 1999
◇ Guidance for Reviewers : Instructions and Template for Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Reviewers of Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). (DRAFT) FDA/CBER, 2003
◇ Points to Consider on the Manufacture and Quality Control of Human Somatic Cell Therapy Medicinal Products. EMEA/CPMP/BWP, 2001
◇ Guideline on Human Cell-based Medicinal Product (DRAFT) EMEA/CHMP, 2007

「確認申請」とは、治験計画の届出を行う前に、厚生大臣に当該治験薬の安全性及び品質の確認を求める申請のことであり、細胞・組織加工医薬品と遺伝子治療薬について義務化されているものである。確認申請の目的は、当該医薬品等の治験を開始するに当たって支障となる品質及び安全性の問題が存在するか否かを確認することであり、未知・未経験の要素が多い細胞・組織加工医薬品の開発を安全に行うために設けられている制度であると言える。

一方、基本的考え方および指針が示されて7年余りが経過したが、これまでの細胞・組織加工医薬品の開発状況を見ると、次々に製品が市場に提供されるという状況ではなく、確認申請の段階でどの程度のデータが必要とされるのかが分かりにくいという指摘や、確認申請がなされてから承認までの期間が長いという指摘もあった。そこで、その後の科学的進歩や経験の蓄積に基づき、細胞・組織加工医薬品の適正な開発を推進するという立場から現在、第1314号通知の見直し作業が進められている。改訂後の指針はヒト自己由来細胞製品とヒト同種（他家）由来細胞製品に分けて作成されることとなっており、平成19年にはヒト自己由来細胞製品を対象に第1314号通知の改訂案として、

－「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方（案）」

－「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）」

が公表され、一般からの意見公募が行われた。

これらの製品の開発において、品質・安全性確保に必要なデータは非臨床試験のみならず臨床試験を通じて蓄積されていくという事実を踏まえ、改訂案では、確認申請の段階でどのようなデータが必要とされるか、すなわち治験を開始するために必要とされる要件にはどのようなものがあるかが改訂前より明確に示されている。またQ&Aとして、必要な背景説明もなされている。以下に、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）」（表3）の記載内容を中心に、細胞・組織加工医薬品の品質及び安全性確保のための方策について述べる。

表3 「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)」(平成19年8月28日)

第1章 総則
第1 目的
第2 定義
第2章 製造方法
第1 原材料と製造関連物質
1 目的とする細胞・組織について
(1) 生物学的機能等の特徴と選択理由
(2) ドナーの感染症に対する配慮
(3) 細胞・組織の採取・保存・運搬について
2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質
(1) 細胞の培養を行う場合
(2) 非細胞・組織成分と組み合わせる場合
(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合
第2 製造工程
1 ロット構成の有無とロットの規定
2 細胞・組織の加工方法
3 加工した細胞の特性解析
4 最終製品
5 製造方法の恒常性
6 製造方法の変更
第3 最終製品の品質管理
1 総論
2 最終製品の品質管理法
第3章 細胞・組織加工医薬品等の安定性
第4章 細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験
第5章 細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験
第6章 細胞・組織加工医薬品等の体内動態
第7章 臨床試験

3 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保 — その方策

細胞・組織加工医薬品の品質は、用いる細胞（自己由来製品では個別患者ごと）の適格性や原材料の品質管理等を含めた製造方法の恒常性確保と工程評価を含めた妥当性の検証、中間製品の品質管理、最終製品の規格及び試験方法の設定等を通じて担保される。原材料と最終製品の管理に加えて、製造工程の管理を行うことによって一定の品質を確保するという考えは、既に多くの製品が実用化されているバイオ医薬品（細胞基材由来タンパク質性医薬品）と共通である。しかし、細胞・組織加工医薬品は既存の医薬品にない複雑な構造特性や動的な特性を持つことから、従来の医薬品に適用されていた品質評価法をそのまま適用することはできない。従って、目的とする製品の使用方法や特性に応じて、品質管理手法を独自に確立していくことが必要になる。

3.1 ウイルス安全性

原材料から最終製品までの品質管理を通じて安全性確保のために最も重視されるのは、ウイルス等の感染伝播をいかに防止するかである。細胞・組織加工医薬品には滅菌や高度な精製といった処理ができないため、原材料や製造に用いられる試薬、血清等へのウイルス等の混入防止策が非常に重要な課題である。同種細胞由来製品の場合はドナー由来の感染リスクが最も懸念される事項となるため、ドナーとしての適格性に関連して各種感染症に対する試験や問診等の検査を十分に実施する必要がある。自己由来製品の場合も、製造工程での交差汚染や製造従事者の安全性確保、さらには培養等の工程により内在性ウイルスの増殖などのリスクが存在する。また、培養等に用いる培地や添加剤に由来する感染リスクがある。製品に感染性因子が混入した場合、患者ばかりでなく患者の家族や医療従事者等へも感染が広がる危険性があるため、公衆衛生の観点も含めて十分な対策が必要である。そのため、自己由来製品においても、B型肝炎、C型肝炎、ヒト免疫不全ウイルス感染症、成人T細胞白血病に留意すべきであるとされている。さらに、ウイルス汚染のリスクがある生物由来原料を製造工程で用いる場合や製造工程でのウイルスの増殖リスクがある場合には適切なウイルス試験の実施を考慮することとされており、中間工程や最終製品での適切な試験が必要な場合もあると考えられる。

欧米においても我が国と同様の考え方により、自己由来製品について、細胞の採取に当たってウイルス等の感染因子の試験を実施するように求めている。また、遅発性の感染症発症の監視として、フォローアップ体制の整備や検体の保管などの施策についても我が国同様の体制が取られている。

3.2 最終製品の品質管理

最終製品の品質管理では、表4に示すような品質試験を参考として、必要で適切な規格及び試験方法を設定、すなわち、試験法とその規格値／適否の判定基準を定め、その根拠を明らかにすることが求められる。最終製品の

規格及び試験方法の設定にあたっては、対象とする細胞・組織の種類及び性質、製造方法、各製品の使用目的や使用方法、安定性、利用可能な試験法等を十分に考慮する。ただし、表4にあげられた試験はあくまでも例示であり、感染性因子等に関する試験を除いて全てを規格及び試験方法として設定する必要は必ずしもない。

表4 最終製品の品質管理法

- | | |
|------|----------------------|
| (1) | 回収率ならびに生存率 |
| (2) | 確認試験 |
| (3) | 細胞の純度試験 |
| (4) | 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験 |
| (5) | 製造工程由来不純物試験 |
| (6) | 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験 |
| (7) | エンドトキシン試験 |
| (8) | ウイルス等の試験 |
| (9) | 効能試験 |
| (10) | 力価試験 |
| (11) | 力学的適合性試験 |

3.3 非臨床安全性試験

非臨床安全性試験では、製品の特性及び適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能であれば、科学的合理性のある範囲で、適切な動物種を用いた試験又は *in vitro* の試験を実施することとされている。ヒト由来の試験用検体は貴重であり、またヒト由来製品を実験動物等で試験して必ずしも意義ある結果が得られるとは限らないので、動物由来の製品モデルを作成し適切な実験動物に適用する試験系により試験を行うことで、より有用な知見が得られると考えられる場合には、動物由来製品モデルの利用にむしる科学的合理性があるとも考えられる。場合によっては動物細胞を用いる試験系も考慮し、そのようなアプローチにより試験を行った場合は、実施した試験の妥当性を明らかにすることが求められる。必要に応じて細胞由来の生理活性物質やサイトカイン等の産生量を測定し、生体への影響について考慮しておく。不純物については、動物を用いた解析よりも理化学的手法でその存在量を定量し、安全性確保を図ることが望ましい。

我が国においては開発しようとする製品と同様の細胞・組織を用いた再生医療・細胞治療の臨床研究が大学等で先行しているケースも多く、その研究結果を参照出来る場合には、動物を用いた試験は必ずしも必要とされないであろう。欧米のガイドラインでも従来のバイオ製品と異なり、細胞治療薬には必ずしも全ての非臨床試験が適用可能ではないことが指摘されており、科学的合理性を考慮して必要な試験を選択することが求められている。

治験計画届出の前に行う確認申請では、製品の臨床上の有用性や治験開始の必要度の高さとの関係において、確認申請までに得られている非臨床安全性試験のデータや当該製品に関する公開情報等に基づき、その必要度の妥当性を合理的に説明できることが重要である。開発側、審査側いずれにも挑戦的な領域であるので、医薬品医療機器総合機構との相談により適切な方向を議論することも有用であろう。

3.4 効力又は性能を裏付ける試験

効力又は性能を裏付ける試験では、技術的に可能かつ合理性のある範囲で、実験動物、細胞等を用い、適切に設計された試験により、細胞・組織加工医薬品等の機能発現、作用持続性、医薬品・医療機器として期待される効果を検討することが望ましい。細胞・組織加工医薬品を用いた医療では安全性面でも未知の要素が多いため、有効性を担保しリスクとベネフィットを明らかにする必要がある。ただし確認申請段階では、当該製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに勝れて期待できることが国内外の文献や知見等により合理的に明らかにされれば、詳細な実験的検討は必要とされない場合もある。

4 臨床研究と製品開発

現在我が国では、再生医療に関する多くの臨床研究が行われており、成果が新聞紙上等で報じられることもしばしばある。しかし、臨床研究は医師法の下に行われる医療行為に属するものであるため、用いられる細胞・組織はこれまで述べてきた1314号通知等による規制の対

象ではない。臨床研究では、基礎研究で得られた最先端の知見を迅速に医療に反映させられるという大きな利点がある反面、臨床研究が実施されている機関および時期でなければ治療を受ける機会がなく、患者側から見れば治療の機会が限られるという問題がある。また、施設が異なれば製造方法や製造された細胞等の特性も自ずと差異があると考えられ、同様の細胞を用いていても施設間でその品質・有効性・安全性が異なる可能性がある。

このような背景のもと、細胞治療臨床研究においても用いられる細胞の品質・安全性確保を図るという観点から、平成18年7月に厚生労働省から「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が出され、ヒト幹細胞臨床研究の実施に際して研究機関ごとの審査が開始された。この指針では、臨床研究に用いるヒト幹細胞（注）について、その品質管理に関しては1314号通知及び生物由来原料基準を準用した取り扱いを行うよう求めている。今後は、新たに開始されたヒト幹細胞臨床研究審査を通じて、臨床研究で用いられる細胞・組織についても一定の品質・安全性が確保されていくことが望まれる。

一方、欧米では我が国とは異なり、公的な研究機関等によって実施される細胞治療臨床研究もヨーロッパ医薬品庁 EMEA や米国医薬食品局 FDA による審査と承認を受けている。未知・未経験の要素の多い細胞治療に大きな期待を寄せる反面、感染症の伝播等について患者個人ばかりでなく公衆衛生の面からも十分な規制が必要との判断があると考えられる。

先にも述べたように、細胞治療・再生医療をより安全に広く国民が利用可能なものとするためには、薬事法の規制の下、有用性が期待される細胞・組織を品質・有効性・安全性を確保した細胞・組織加工医薬品として患者への提供が可能な状況にしていくことが望まれる。我が国の現状を考えたとき、細胞・組織加工医薬品の開発スキームとして臨床研究が先行して行われることはむしろ肯定的側面があると思われる。一方で、その臨床研究の成果を如何に標準的治療として一般化するかが大きな課題であり、製品化を目指した企業あるいは医師によって実施される治験によって、医薬品候補となる細胞・組織の有効性・安全性を検証し、承認申請を経て医薬品としての認可を受けていくようにすることが望ましいと考え

られる。改訂1314号においても、先行して行われた臨床研究の成果は、確認申請に置いて重要な参考情報となりうることに記されており、新たな製品開発の流れができることに期待したい。

しかし現状では、細胞治療・再生医療の臨床研究から医薬品開発へのパスウェイが必ずしもスムーズにいったいないことも事実である。様々な要因が考えられるが、大学等での臨床研究において製法の設定や製品としての品質管理が十分でなく、そのために得られたデータが臨床開発に活かされないことも大きな要因と考えられる。今後、ヒト幹細胞臨床研究の審査を通じて、製法の確立や恒常性確保、品質管理がより適切に行われることにより、医薬品としての開発によりスムーズにつながることを期待したい。

（注）指針の対象として規定されているヒト幹細胞とは、組織幹細胞（例えば、造血幹細胞、神経系幹細胞、間葉系幹細胞、角膜幹細胞、皮膚幹細胞、毛胞幹細胞、腸管幹細胞、肝幹細胞、骨格筋幹細胞）及びこれを豊富に含む細胞集団（例えば、造血系幹細胞を含む全骨髄細胞）をいい、血管前駆細胞、臍帯血及び骨髄間質細胞を含む。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。

5 細胞・組織加工医薬品の開発動向

2007年に我が国では初めての細胞・組織加工医薬品として、重症熱傷を対象に自己由来培養皮膚製品が承認された。これに続いて開発が進んでいる製品としては図1のようなものがある。確認申請された製品の中には、免疫制御による疾患治療を目的とした間葉系幹細胞等の細胞治療薬も含まれる。これらとは別に臨床研究では、自己骨髄細胞を用いた治療が多く試みられており、対象疾患は、軟骨損傷、変形性関節症、閉塞性動脈硬化症、褥創、心筋梗塞、歯周病など多岐にわたっている²⁾。しかし骨髄細胞はヘテロな細胞集団であるため、治療効果を担う細胞の種類や作用機構が十分明らかでない例も少なくない。品質・有効性・安全性の確保のためには、有効成分となる細胞の同定やその作用機構の解明がなされることが望まれる。

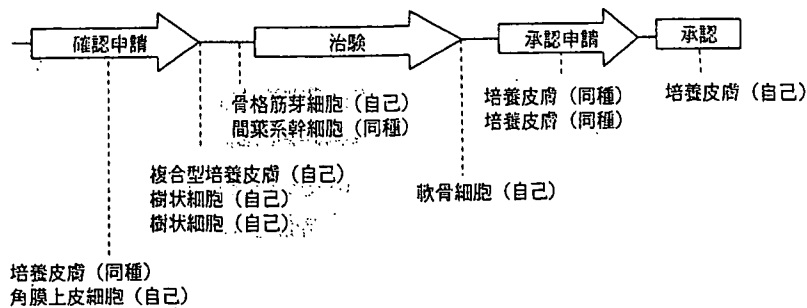


図1 我が国における細胞・組織加工医薬品の開発状況

米国では2001年までに自己軟骨細胞が1製品、同種培養皮膚が4製品承認されたが、その後は承認例がない。2003年にはFDA審査官を対象に、細胞治療薬の治験薬申請における品質評価に関するガイダンス案が公表されていること等から考えると、製品開発の動きが低調であるというよりは、細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する対応がより慎重になっているものと思われる。

EUでは、細胞・組織加工医薬品として治験が行われた製品のうち、4割近くが癌免疫療法を目的とした製品であることが特徴であり、心血管系疾患を対象とした製品がこれに続いている(表5)。医療機器に該当する細胞製品については、これまでEMAとしての審査は行われておらず域内各国の規制に委ねられていたが、今後、EMAの中央審査に移行される予定となっており、ここでも品質・安全性確保への対応強化に向けた取り組みが行われている。

表5 EUにおける細胞治療薬・組織工学製品の治験実施状況 (2004.8～2007.8)

治療目的	件数
細胞治療製品	121 治験 / 101 製品
癌免疫療法	39
心血管系	29
皮膚/肝臓/肺/糖尿病/腸/軟骨等	25
神経系疾患	5
リンパ組織球増多症	1
HIV	1
生殖	1

6 細胞・組織加工医薬品開発への期待と今後の課題

わずか4種類の遺伝子導入によって体細胞の初期化を実現したヒトiPS細胞作製成功のニュースが追い風となり、細胞・組織加工医薬品の開発は社会的にも関心の高い話題となっている。自己の体細胞から様々な細胞・組織を自在に作り出すことができれば、同種細胞・組織を用いることによる免疫拒絶の問題が解消され、真の意味での再生医療が可能となるかもしれない。しかし、細胞・組織加工医薬品の品質・安全性については、未知・未経験の要素が多く、開発側にも審査側にも答えのない模索が続く。幹細胞を用いる場合、異所性分化や癌化の懸念を完全に解消することは現状では難しい。遺伝的改変を施した細胞では、さらに高い安全性上の配慮が必要となるであろう。どのような試験系により評価を行うことが妥当であるか、蓄積された経験と最新の知見を元に、産官学が連携して課題解決にあたることにより、有効な細胞・組織加工医薬品がより安全に迅速に提供されることが望まれる。

参考文献および資料

- 山口照英 ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について BIO Clinica 22, 1087-1094 2007
 - 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 HP 内「日本で過去に実施された又は現在実施されているヒト細胞・組織利用医薬品等を用いた臨床応用の例」
http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/ct_prtcl/prtcl-j.html
- * 本稿で紹介した1314号通知の改訂案は、2008年2月8日に新指針として公表された。(薬食発第0208003号)