

200838002B 1/2

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品等の品質・安全性に係る
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成18～20年度 総合研究報告書

1/2

研究代表者 新見伸吾

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品等の品質・安全性に係る
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成18～20年度 総合研究報告書

1/2

研究代表者 新 見 伸 吾

平成21(2009)年 4月

目 次

I.	総括研究報告	
	医薬品等の品質・安全性に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究	1
	新見 伸吾	
	参考資料 1 FDA. Guidance for industry : Drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals. [cited: Available from: http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf	
	参考資料 2 EMEA. Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/ CHMP/BWP/48316/2006) . [cited: Available from: http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606enfin.pdf	
	参考資料 3 Q-IWG on ICH Q8/Q9/Q10, Questions and Answers – Vol 1	
	参考資料 4 「ICH Q8、Q9 及び Q10 ガイドラインの運用に関する質疑応答集 (案)」に関するご意見の募集について	
	参考資料 5 First ICH Quality Guidelines Q8, Q9, Q10 Seminar, Opportunities and Challenges Related to Implementation.	
	参考資料 6 APEC 主催による ICH に関するワークショップ、発表スライド	
II.	分担研究報告	
1.	新規医薬品の品質基準の評価、特性・品質解析等に関する研究	324
	—抗血管新生治療法の現状と展望—	
	—RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望—	
	早川 堯夫	
2.	医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究	409
	川西 徹	
3.	生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究	419
	川崎 ナナ	

4. トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究	445
---	-----

石井明子

5. バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究	526
--------------------------	-----

山口照英

6. 遺伝子治療薬の品質・安全性評価に関する研究	558
--------------------------	-----

内田恵理子

7. 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向とありかたに関する研究	597
------------------------------------	-----

檜山行雄

参考資料3 Q-IWG on ICH Q8/Q9/Q10, Questions and Answers – Vol 1

参考資料4 「ICH Q8、Q9及びQ10ガイドラインの運用に関する質疑応答集(案)」に関するご意見の募集について

参考資料5 First ICH Quality Guidelines Q8, Q9, Q10 Seminar, Opportunities and Challenges Related to Implementation.

参考資料6 APEC主催によるICHに関するワークショップ、発表スライド

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	641
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	652
-----------------	-----

医薬品の品質・安全性に係わる国際的動向を踏まえた評価に関する研究

主任研究者 新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第三室長

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

- 1) 抗血管新生療法の現状と展望として、タンパク質単独あるいは化学療法剤との併用、遺伝子治療、細胞治療を用いた抗血管新生療法に関する現在の状況や今後の課題を明らかにするとともに、腫瘍における血管新生の機構および役割、腫瘍血管の構造と機能などに関する最近の知見について明らかにした。
- 2) タンパク質単独、核酸、細胞以外の抗血管新生療法の現状と展望として、低分子化合物の分子標的治療薬を用いた抗血管新生療法に関する現状および今後の課題を明らかにした。
- 3) RNA interference (RNAi) を用いた医薬品の開発の現状と展望として、RNAi を用いた医薬品の動物モデル及び臨床試験における有効性及び安全性に関する最近の知見および今後克服すべき問題点を明らかにした。現在 RNAi を用いた治療法が有用であることが動物モデルで示されておりすでに数種類の臨床試験が進行中である。今後、RNAi が新しい治療法として利用するには off-target 効果、1 型インターフェロン反応の惹起、細胞内 RNAi コンポーネントとの競合、*in vivo* のデリバリーの問題を克服する必要がある。
- 4) 薬品の製造方法の評価に関する研究として、FDA の提唱によって始まり、現在医薬品規制国際調和会議(ICH)でもテーマになっているリスク管理に基づく新しい医薬品製剤開発・品質管理システムの考え方 (QbD アプローチ) について医薬品原薬、特にバイオテクノロジー応用医薬品原薬において同様なアプローチの応用について考察した。化成品原薬については、QbD アプローチによる開発は比較的容易と思われるが、バイオテクノロジー応用医薬品原薬の場合、有効成分においても分子多様性ゆえに品質特性を特定する要素が多く、デザインスペースの設定は限られたものになると思われる。一方リアルタイムモニタリング等の PAT は品質の一定性確保に有効と考えられるので、方法の開発を含めて積極的な応用が望まれる。
- 5) 医薬品の製造方法の評価に関する研究として、FDA の提唱によって始まったリスク管理に基づく新しい医薬品品質管理システムの考え方についてまとめるとともに、バイオ医薬品への適用について考察した。バイオ医薬品では従来から同様な品質管理手法が採用されてきており、基本原理には共通部分は少なくない。しかし規制上のフレキシビリティをもたせるために重要なデザインスペースについては、バイオ医薬品の場合、製法変更の安全性、有効性への影響の評価はケースバイケースで複雑なため、実際の製品における適用は極めて困難と思われる。
- 6) バイオテクノロジー応用医薬品原薬の製法開発における QbD アプローチの適用に関する国際動向を調査すると共に、適用の可能性について考察を行った。QbD アプローチは一般的な概念としてはバイオテクノロジー応用医薬品の製法開発においても共通して適用できるものであるが、

タンパク質性医薬品原薬の品質特性を構成する要素は化成品に比較して複雑であり、品質特性と工程パラメーターの関係の解析によりデザインスペースの定義が可能であるケースは限定的であることが予想される。

7) INN 収載品目の中から、グリコフォームの違いから名称が異なる品目が存在する6種類の糖タンパク質を選び、基原及び糖鎖構造等に関する文献調査を行った。さらに、分担研究者らが開発した糖鎖プロファイリング法を用いて、糖鎖の違いが明らかにされていない Follitropin Alfa 及び Beta の糖鎖プロファイリングを行い、両品目の糖鎖は類似していることを明らかにした。以上の結果から、糖タンパク質のグリコフォームを定義することの難しさが明らかになった。

8) バイオテクノロジー応用医薬品等の一般的名称申請書もしくは届出書作成にあたって、本質、アミノ酸配列等、及び分子式・分子量の記載に関して考慮すべき事項や要素について考察した。

9) 低分子量ヘパリンの類似性を確認する方法、及びその他のムコ多糖類の混入を評価する方法として、酸加水分解により低分子量ヘパリンを単糖及びオリゴ糖とし、HPLC を行う方法を検討した。その結果、低分子量ヘパリンを酸加水分解した後、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーパルス電気化学検出法 (HPAEC-PAD) を行うことにより、低分子量ヘパリン間の還元末端及び非還元末端の構造、平均分子量に関する類似性を評価できること、並びにコンドロイチン硫酸エステル/デルマトン硫酸エステル等の混入を検出できることを見出した。

10) トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究として、FDA および EMEA より公表されているガイドライン案について調査を行い、トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質・安全性確保のための課題を検討した。

11) トランスジェニック植物を用いて生産した組換えタンパク質に付加される可能性のある植物特異的糖鎖の免疫原性に関する検討を行った。植物由来成分にアレルギー反応を示すヒトの約20%では血中に植物糖鎖に対する IgE が検出されるが、植物糖鎖に対する IgE の存在はアレルギー症状との相関が低いとされている。しかし、植物糖鎖を持つ組換えタンパク質をヒトに投与した場合、IgE を持つヒトでアレルギー反応がおこる可能性は否定できず、非経口投与される製品も含めた種々の組換えタンパク質性医薬品の生産宿主としてトランスジェニック植物を利用するためには、植物特異的な糖鎖を付与しない発現系の開発が必要であると考えられた。さらに、ヒト型糖鎖を付与できるトランスジェニック植物の開発に関する調査を行い、その国際的動向を明らかにした。

12) トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品について、開発状況を調査するとともに、品質・安全性の評価に関する規制環境整備の国際的動向を明らかにするため、EMEA から公表されたガイドラインに関する検討を行った。さらに、トランスジェニック・バンク作製および出発原料調製に至る工程について、適格な出発原料の供給のために求められる要件を考察した。

13) EMEA の「開発バイオ治験薬のウイルス安全性評価指針案」を中心に調査研究を行った。臨床開発中に求められるウイルス安全性評価試験や、ウイルスパリテーション試験の基準と範囲について、用いる細胞の特性や使用実績、製造メーカーの製造細胞や製造工程の経験も考慮して、開発のステージに応じたデータを得ることを求めていることが明らかになった。本指針案は、ウイルス安全性試験の新たな技術の活用など、承認申請でのウイルス安全性確保においても有用な情報が得られた。

14) CD28 に対するアゴニスト抗体 TGN1412 を含め、リスクの高いバイオ医薬品の開発における要件やヒト投与に当たって求められる対応について検討を行った。従来のバイオ医薬品に無いような新規の薬理作用を持つ製品、特にアゴニスト作用を持つ抗体等の開発では、より慎重な特性解析、基礎及び非臨床試験での生理作用の解明、ヒトでの初期投与量設定の新たな基準の採用などが必要であることを明らかにした。

15) バイオテクノロジー応用医薬品の一つとしてモノクローナル抗体医薬品を取り上げ、そのプラットフォーム技術の有用性を調査すると共に製法の確立や、品質特性解析、規格試験法の設定においてその技術をどのように適用すべきかについて明らかにした。

16) 細胞・組織利用医薬品の品質・安全性評価に関する研究 —臨床開発段階でのバイオ医薬品のウイルス安全性に関する国際的動向の研究— —EMA でのバイオ治療薬のウイルス安全性評価指針についての研究—として、遺伝子治療による遅発性の有害事象に関する被験者の長期フォローアップ観察について FDA のガイダンスを基に検討し、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスクの評価法と被験者の長期フォローアップ観察実施の判断、長期フォローアップ観察の実施において考慮すべき点などを明らかにした。

17) 遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの shedding(体外排出)試験の現状と、shedding のリスク評価について検討した。ベクターの種類や投与経路(投与部位)、投与量、投与計画により体内分布や shedding は大きく異なること、shedding のアッセイ法は PCR 法が頻用されているが、リスク評価には感染性粒子の排出に関するデータが重要であることを含め、shedding に関する非臨床試験計画や、臨床試験計画で考慮すべき事項及び問題点を明らかにした。

18) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、ICH 遺伝子治療専門家会議より発出された「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」を基に腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験や臨床試験で考慮すべき事項について検討した。

19) 医薬品規制国際調和会議(ICH)における Pharmaceutical Quality System(PQS 医薬品品質システム Q10)の議論に参加した。本ガイドライン導入により、企業に明確な経営者責任、製品ライフサイクルを通じた科学とリスクマネジメントをもって適切な品質保証を求めることになる。わが国において新薬はもとより既存製品に対する規制にも好影響を与えることが期待される。

20) ICH 医薬品品質システムガイドライン(Q10)作成の経過を述べ、Q8、Q9 ガイドラインとともに導入に際しての課題がどのような構図を持つかを考察した。今後、Q10 について医薬品品質保証のあるべき未来をガイドラインとして示すことが期待される。一方、品質システムを円滑に運営していくために、国際的には他の領域の品質の基準作成を進めることと国内においては基準の統一化が必要と考える。

21) ICH 医薬品品質システムガイドライン(Q10)作成の経過を精査し、Q8、Q9 ガイドラインとともに導入に際しての課題がどのような構図を持つかを考察した。医薬品品質保証のあるべき未来をガイドラインとして示すことが期待される。一方、品質システムを円滑に運営していくために、国際的には他の領域の品質の基準作成を進めることと国内においては基準の統一化が必要と考える。

分担研究者

早川 堯夫	近畿大学薬学部総合研究所 所長
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 部長
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第一室長
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
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長
内田 恵理子	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室長
檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第三室長

協力研究者

原園 景	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
多田 稔	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
鈴木琢雄	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
櫻井文教	独立行政法人 医薬基盤研究所

A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテクノロジー等の先端技術をより高度に応用した新規医薬品の研究開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開がわが国においても急速に進んでいる。また、これらの新規医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、より高度な品質・安全性評価法、品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進

する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著しい外国での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新規医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術・品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究と関連する評価技術開発を行うものである。平成 18 年から 20 年まで以下の項目について研究を行った。

- 1) 新規医薬品の品質基準の評価、特性・品質基準等に関する研究
- 2) 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究
- 3) 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究
- 4) トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究
- 5) バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究
- 6) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究
- 7) 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

B. 研究方法

B. 1 新規医薬品の品質基準の評価、特性・品質基準等に関する研究

B. 1. 1 抗血管新生治療法の現状と展望

これまで試みられてきた抗血管新生療法と

して、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療、VEGFR および EGFR を分子標的とした低分子化合物を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、抗血管新生療法の戦略基盤となる病的血管新生のプロセスについての最近の知見について、以下の参考文献を中心に調査および研究を行った。

B. 1. 2 RNAi を用いた医薬品開発の現状と展望

これまで試みられてきた RNAi を用いた治療薬の開発および今後の課題について、以下の参考文献を中心に調査および研究を行った。

- M. Benouchan, B.M. Colombo, Anti-angiogenic strategies for cancer therapy (Review), *Int J Oncol* 27 (2005) 563-571.
- J. Fayette, J.C. Soria, J.P. Armand, Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment, *Eur J Cancer* 41 (2005) 1109-1116.
- J. Harper, M.A. Moses, Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications, *Exs* (2006) 223-268.
- C.A. Hudis, Clinical implications of antiangiogenic therapies, *Oncology (Williston Park)* 19 (2005) 26-31.
- R.K. Jain, Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts, *Oncology (Williston Park)* 19 (2005) 7-16.
- H.J. Lenz, Antiangiogenic agents in cancer therapy, *Oncology (Williston Park)* 19 (2005) 17-25.
- M. Milkiewicz, E. Ispanovic, J.L. Doyle, T.L. Haas, Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation, *Int J Biochem Cell Biol* 38 (2006) 333-357.
- C.P. Neal, D.P. Berry, H. Doucas, M.M. Manson, W. Steward, G. Garcea, Clinical aspects of natural anti-angiogenic drugs, *Curr Drug Targets* 7 (2006) 371-383.
- A.R. Quesada, R. Munoz-Chapuli, M.A. Medina, Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials, *Med Res Rev* 26 (2006) 483-530.
- J. Rhee, P.M. Hoff, Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer, *Expert Opin Pharmacother* 6 (2005) 1701-1711.
- A. Zakarija, G. Soff, Update on angiogenesis inhibitors, *Curr Opin Oncol* 17 (2005) 578-583.
- R.C. Kane, A.T. Farrell, H. Saber, S. Tang, G. Williams, J.M. Jee, C. Liang, B. Booth, N. Chidambaram, D. Morse, R. Sridhara, P. Garvey, R. Justice, R. Pazdur, Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 7271-7278.
- K.T. Flaherty, Sorafenib in renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 13 (2007) 747s-752s.
- D.J. George, Phase 2 studies of sunitinib and AG013736 in patients with cytokine-refractory renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 13 (2007) 753s-757s.

- A. Sandler, R. Herbst, Combining targeted agents: blocking the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4421s-4425s.
- J.V. Heymach, M. Nilsson, G. Blumenschein, V. Papadimitrakopoulou, R. Herbst, Epidermal growth factor receptor inhibitors in development for the treatment of non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4441s-4445s.
- A.A. Adjei, Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4446s-4450s.
- S.R. Shah, T.M. Tran, Lenalidomide in myelodysplastic syndrome and multiple myeloma, *Drugs* 67 (2007) 1869-1881.
- G.A. Silvestri, M.P. Rivera, Targeted therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a review of the epidermal growth factor receptor antagonists, *Chest* 128 (2005) 3975-3984.
- M.H. Cohen, G.A. Williams, R. Sridhara, G. Chen, R. Pazdur, FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets, *Oncologist* 8 (2003) 303-306.
- E.P. Rock, V. Goodman, J.X. Jiang, K. Mahjoob, S.L. Verbois, D. Morse, R. Dagher, R. Justice, R. Pazdur, Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma, *Oncologist* 12 (2007) 107-113.
- D. Strumberg, J.W. Clark, A. Awada, M.J. Moore, H. Richly, A. Hendlisch, H.W. Hirte, J.P. Eder, H.J. Lenz, B. Schwartz, Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors, *Oncologist* 12 (2007) 426-437.
- M.H. Cohen, G.A. Williams, R. Sridhara, G. Chen, W.D. McGuinn, Jr., D. Morse, S. Abraham, A. Rahman, C. Liang, R. Lostritto, A. Baird, R. Pazdur, United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 1212-1218.
- P. Maione, C. Gridelli, T. Troiani, F. Ciardiello, Combining targeted therapies and drugs with multiple targets in the treatment of NSCLC, *Oncologist* 11 (2006) 274-284.
- P.G. Richardson, C. Mitsiades, T. Hideshima, K.C. Anderson, Lenalidomide in multiple myeloma, *Expert Rev Anticancer Ther* 6 (2006) 1165-1173.
- M.H. Cohen, J.R. Johnson, Y.F. Chen, R. Sridhara, R. Pazdur, FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets, *Oncologist* 10 (2005) 461-466.
- M. Ponz-Sarvise, J. Rodriguez, A. Viudez, A. Chopitea, A. Calvo, J. Garcia-Foncillas, I. Gil-Bazo, Epidermal

growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new?, *World J Gastroenterol* 13 (2007) 5877-5887.

- K.V. Rao, Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma, *Am J Health Syst Pharm* 64 (2007) 1799-1807.
- A. Morabito, E. De Maio, M. Di Maio, N. Normanno, F. Perrone, Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions, *Oncologist* 11 (2006) 753-764.
- P. Martin, C.M. Kelly, D. Carney, Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer, *Cancer Control* 13 (2006) 129-140.
- W.S. Siegel-Lakhai, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa), *Oncologist* 10 (2005) 579-589.
- C. Gridelli, P. Maione, F. Del Gaizo, G. Colantuoni, C. Guerriero, C. Ferrara, D. Nicoletta, D. Comunale, A. De Vita, A. Rossi, Sorafenib and sunitinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer, *Oncologist* 12 (2007) 191-200.
- A.R. de Fougerolles, Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*, *Hum Gene Ther* 19 (2008) 125-132.
- C. Huang, M. Li, C. Chen, Q. Yao, Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications, *Expert Opin Ther Targets* 12 (2008) 637-645.
- G. Liu, F. Wong-Staal, Q.X. Li, Development of new RNAi therapeutics, *Histol Histopathol* 22 (2007) 211-217.
- S. Akhtar, I.F. Benter, Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*, *J Clin Invest* 117 (2007) 3623-3632.
- A. de Fougerolles, H.P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 6 (2007) 443-453.
- T. Nguyen, E.M. Menocal, J. Harborth, J.H. Fruehauf, RNAi therapeutics: an update on delivery, *Curr Opin Mol Ther* 10 (2008) 158-167.
- P.Y. Lu, M.C. Woodle, Delivering small interfering RNA for novel therapeutics, *Methods Mol Biol* 437 (2008) 93-107.
- M. Ebbesen, T.G. Jensen, S. Andersen, F.S. Pedersen, Ethical perspectives on RNA interference therapeutics, *Int J Med Sci* 5 (2008) 159-168.
- A. Aigner, Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies *in vivo*, *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (2007) 9-21.
- T.I. Novobrantseva, A. Akinc, A. Borodovsky, A. de Fougerolles, Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics, *Curr Opin Drug Discov Devel* 11 (2008)

217-224.

- D.R. Corey, Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference?, *J Clin Invest* 117 (2007) 3615-3622.
- N. Hokaiwado, F. Takeshita, A. Banas, T. Ochiya, RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics, *IDrugs* 11 (2008) 274-278.
- D. Grimm, M.A. Kay, Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time?, *J Clin Invest* 117 (2007) 3633-3641.

B. 2 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

医薬品の品質に関連する既存の ICH 国際調和ガイドライン、米国 FDA の関連文書、EMEA CHMP の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国および欧州の関連情報、また医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見等を参考に、QbD アプローチをバイオテク応用医薬品の製法開発に適用する場合の可能性および問題点等を考察した。

B. 3 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究

B. 3.1 糖鎖構造の違いによって区別されている

医薬品に関する調査

以下を参考にした。

- INTERNATIONAL NONPROPRIETARY NAMES (INN) FOR BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL SUBSTANCES

(A REVIEW), INN Working Document 05.179, 08/11/2007,

<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRevforweb.pdf>

- pINN および rINN のリスト：
<http://www.who.int/druginformation/general/innlists.shtml>
- 日本医薬品一般名称データベース：
<http://moldb.nihs.go.jp/jan/Default.htm>
- 医療用医薬品の添付文書情報 (医薬品医療機器総合機構)：
http://www.info.pmda.go.jp/info/pi_index.html
- 医薬品一般名称辞典 JAN1996 (財)公定書協会(1996)
- FDA Drug information-Product approval: information-
<http://www.fda.gov/cder/drug/default.htm>
- 宮田直樹, 内田恵理子, 川崎ナナ: 薬の名前, ステムを知れば薬がわかる, 第 1~28 回, PHARM. TECH. JAPAN, vol.22 (2006)-vol.24 (2008)

B. 3.2 試薬

フォリトロピン アルファは市販のゴナールエフ (セローノ) を用いた。フォリトロピンベータは市販のフォリスチム (オレガノン) を用いた。

グルクロン酸 (GlcA) は和光純薬より、ガラクトサミン (GalN) 及びグルコサミン (GlcN) は生化学工業より、マンノサミン (ManN) はナカライテスクより、2,5-アンヒドロ-D-マンニトール (2,5anhMan-ol)、L-イズロン酸 (IdoA) はトロントリサーチケミカルより購入した。50 %水酸化ナトリウム溶液

及びトリフルオロ酢酸 (TFA) は、和光純薬より購入した。

パルナパリンナトリウムはローヘパ注(味の素)及びミニヘパ注(伊藤ライフサイエンス)、ダルテパリンナトリウムはダルテパリンナトリウム静注(メルク製薬)及びダルテパン静注(日医工)、レビパリンナトリウムはクリパリン注(アボット ジャパン)、並びにエノキサパリンナトリウムはクレキササン皮下注キット(サノフィー・アベンティス)を購入して使用した。

その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

B. 3. 3 フォリトロピン アルファ及びベータ糖鎖の精製

ゴナールエフ注射液(凍結乾燥品)と、凍結乾燥したフォリスチム注射液を、電気泳動用サンプリングバッファーに溶解後、15%泳動ゲル(80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 20 mA で泳動させた。分離されたフォリトロピン アルファ及びベータは、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて検出した。

SDS-PAGE ゲルよりフォリトロピン α 及び β サブユニットを含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片をアセトニトリルで脱水した後、アセトニトリルを除去し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 µl を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲ

ル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 µl を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、水でゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。さらにゲル片に PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 5 unit を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、200 µl を加え、37°C で一晩消化した。消化後、水 300 µl を加え、30 分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計 3 回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて乾固した後、0.25 M NaBH₄、200 µl を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco) を用いて還元化糖鎖を精製した。

B. 3. 4 LC/MS によるフォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖分析

HPLC :

装置 : NanoFrontier nLC (日立)

カラム : Hypercarb (0.075×150 mm, 5µ

□ThermoFisherScientific)

溶離液 A : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む
2%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

溶離液 B : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む
80%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~50% (110 分)

流速 : 200 nl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ-FT (ThermoFisher Scientific)

イオン源：nanoESI
キャピラリー温度：300°C
キャピラリー電圧：1.8 kV
スキャン範囲 (m/z)：600-2,000
衝突エネルギー：35%

測定方法：

- ① Full MS¹ scan
(positive ion mode, 分解能：50000)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan
(negative ion mode, 分解能：50000)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴ (negative ion mode)

B. 3. 5 低分子量ヘパリンの酸加水分解

100 IU 相当量の各低分子量ヘパリンをアセトン沈殿したのち、沈殿物を 400 μ l の 2 N TFA、2 N 塩酸又は 4 N 塩酸に溶解し、100°C で、指定した時間加熱した後、遠心減圧乾燥した。メタノールを 100 μ l 加え、遠心減圧乾燥した。水 400 μ l に溶解し、水で適当に希釈し、0.5 IU に相当する量を HPAEC-PAD に供した。

B. 3. 6 低分子量ヘパリン酸加水分解物の HPAEC-PAD

HPAEC-PAD 装置は、ICS-3000 ion Chromatography system (Dionex Co.) を用いた。カラムは CarboPac™ PA1 (Dionex Co., 4 x 250 mm) をガードカラム (4 x 50 mm) と共に使用した。試料はループを用いて 75 μ l 注入し、流速 1.0 ml/min で、20 分間 16 mM NaOH を用いてイソクラティック溶出した後、5 分かけて 100 mM NaOH へ変更し、その後 30 分間に酢酸ナトリウム濃度を 0 から 500 m

M に直線的に上げるグラジエント条件で溶出させた。5 分間 500 mM の酢酸ナトリウムを含む 100 mM 水酸化ナトリウムでカラムを洗った後、16 mM の水酸化ナトリウム溶液に戻し、20 分間平衡化した後、次の試料の測定を行った。

PAD の電圧の条件は、1 サイクルを 0.5 秒とし、0 から 0.4 秒まで 0.1 V とした後、0.41 秒に -2 V とし、-0.42 秒まで -0.2 V とした後、0.43 秒に 0.6 V と上げ、0.44 秒に -0.1 V とし 0.5 秒まで -0.1 V とした。電圧は直線的に変化させた。0.2 秒から 0.4 秒の間の電流を積分し、検出値とした。

B. 3. 7 ウロン酸の定量

カルバゾール硫酸法を用いた。

略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Man, マンノース; Hex, ヘキソース; HexNAc, *N*-アセチルヘキソサミン; NeuAc, *N*-アセチルノイラミン酸; GlcA, グルクロン酸; g GalN, ガクトサミン; GlcN, グルコサミン; ManN, マンノサミン; 2,5-anhMan-ol, 2,5-アンヒドロ-D-マンニトール; IdoA, L-イズロン酸

B. 4 トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究

製品開発状況に関しては、学術雑誌に掲載された論文 [1]、およびトランスジェニック植物で製造した組換えタンパク質性医薬品を開発している企業からの公開情報を参考に調査を行った。また、FDA/USDA から公表されたガイダンス案 "Guidance for Industry: Drugs, Biologicals, and Medical Devices Derived from

Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (参考資料1) および EMEA から公表されたガイドライン“Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/CHMP/BWP/48316/2006; 24 July 2008)”(参考資料2)をもとに、規制環境の整備に関する国際動向を検討した。バイオ医薬品の製造に関連する ICH ガイドライン (Q5A、Q5B、Q5D) も適宜参考にした。参考資料 1 FDA. Guidance for industry : Drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals. [cited; Available from: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf> 参考資料 2 EMEA. Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/ CHMP/BWP/48316/2006) . [cited; Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606enfin.pdf>

B. 5 バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究

B. 5. 1 EMEA でのバイオ治療薬のウイルス安全性評価指針についての研究

EMEA の「開発バイオ治療薬のウイルス安全性評価指針案」(EMEA/CHMP/BWP/398498/2005)を中心に調査研究を行った。また、関連する各種基準やガイドラインについても調査研究を行い、我が国と EU との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

B. 5. 2 抗体医薬品等の先端バイオ医薬品の安全確保に関する研究

TGN1412 の臨床試験に関しては既に多く

の専門家から解説がなされているが、本稿では、バイオ医薬品の特性と品質・安全性確保に関心を寄せている立場から、TGN-1412 の特性と他の抗体医薬品との比較に基づき、改めて TGN1412 の事故を振り返ると共に、TGN1412 による有害事象発生の原因検証とその後の議論をもとに欧州医薬品庁から公表された“ヒト初回投与試験におけるリスク要因の同定およびリスク低減のための方策に関するガイドライン”を紹介し、この事故を教訓にした今後の非臨床・臨床試験のあり方を考察した。

B. 5. 3 抗体医薬品の品質・安全性確保のための規制動向に関する研究

抗体医薬品に関する品質特性解析や、共通する基盤技術を中心に調査研究を行った。

B. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究

B. 6. 1 遺伝子治療による遅発性の有害事象に関する被験者の長期フォローアップ観察に関する研究

FDA から 2006 年 11 月に製薬業界に向けて発出されたガイダンス「Guidance for Industry : Gene Therapy Clinical Trials – Observing Subjects for Delayed Adverse Events (製薬業界へのガイダンス：遺伝子治療臨床試験－遅発性の有害事象に関する被験者の観察)」[1]及び関連する各種基準やガイドライン[2-18]についても調査研究を行い、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスク評価と被験者の長期フォローアップ観察の方法、わが国との違いなどを検討した。

B. 6. 2 遺伝子治療用ウイルスベクターの shedding (体外排出) のリスク評価に関する

研究

遺伝子治療臨床試験におけるウイルス排出試験データについてまとめた論文[19]、日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)遺伝子治療専門家会議により開催されたウイルス/ベクター排出に関するICHワークショップ(2007年10月30日)の概要資料[20]、及び日本版バイオセーフティクリアリングハウス[21]で公開されている、日本で承認された遺伝子治療用ウイルスベクターの第一種使用規程・生物多様性影響評価書を中心に、遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの排出試験の現状とウイルス排出のリスク評価において考慮すべき事項を検討した。

B. 6.3 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保に関する研究

2008年11月13日付けで発出された「ICH見解：腫瘍溶解性ウイルス」(ICH considerations: Oncolytic Viruses) [22]及び腫瘍溶解性ウイルスに関する論文や関連資料を基に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保のあり方、特性解析、非臨床試験、臨床試験において考慮すべき事項について検討した。

B. 7 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

B. 7.1 ICH Pharmaceutical Quality System (PQS、医薬品品質システム Q10)の専門家会議の議論の進捗を調査および考察した。

B. 7.2 ICH Pharmaceutical Quality System (PQS、医薬品品質システム Q10)のステップ2文書にいたる専門家会議の議論および意見聴取の概略を報告し考察した。

B. 7.3 ICHQ10の最終合意と日本への導入の課題、並びに Q8-Q10 導入に係わる議論の進捗を報告し考察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、調査研究およびヒト由来サンプル及び動物を使用していない研究であるので倫理面での問題はない。

C. 研究結果及び考察

C. 1 新規医薬品の品質基準の評価、特性・品質基準等に関する研究

・抗血管新生治療法及びRNAiを用いた医薬品開発の現状と展望の現状と展望

C. 1.1 腫瘍の進行における血管新生の役割

成人において、正常におきる新血管形成は女性の生殖器官および創傷治癒に主に限定される。そうでない場合、成人における新血管形成は癌のような病理的な状況になる。腫瘍の成長は最初の段階において正常血管の吸収により支持されるが、腫瘍血管が発達する前では腫瘍は休眠している。血管新生が起きるには、血管新生促進因子の効果が抗血管新生因子の効果を上回らなければならない。そのバランスが血管新生促進に傾くと、新しい血管の発達を促進し、腫瘍の進行を確保させる血管新生スイッチと呼ばれるものを腫瘍が受ける。

一旦血管が発達すると、腫瘍は転移の表現系に向かって急速に増殖し進行する。最近のデータによると、腫瘍において新しく形成された血管系に取り込まれる循環内皮細胞および内皮前駆細胞および腫瘍細胞は、腫瘍細胞が利用する増殖因子、サイトカイン、ホルモンおよび浸潤の促進に関与するタンパク質分解活性を有する因子の供給源としても機能することが示唆されている。さらに、腫瘍の血管系において

は、これら細胞が新生血管を介して血管内に入り、その後離れた毛細血管から定着した転移性病巣に対して遊出する際、転移性癌細胞播種のルートを提供する。血管新生が癌の進行において果たす重要で病的な役割は、腫瘍内の微小血管密度、一定の領域における血管の数がある種の腫瘍型において予後因子となるだけでなく転移の発達とも相関することを示す研究から示されている。

C. 1. 2 腫瘍における血管新生の機構

腫瘍の血管形成は、少なくとも吸収、重積、発芽（血管新生）、脈管形成という四種類の機構により起こる。腫瘍細胞は既存の血管を吸収してその周りで増殖し、血管周囲にカフを形成する。しかし、重要な栄養物が限界以上に拡散するとカフは成長できず、腫瘍細胞の成長により生じる圧縮力により血管が崩壊する。あるいは、腫瘍により放出される増殖因子による既存の血管の肥大、間質組織柱の肥大した管腔における成長、管腔の分割といった一連のプロセスにより拡大した血管ネットワークが形成される。このような重積した微小血管の成長は腫瘍の成長、創傷治癒でも観察される。

血管形成のなかで最も広く研究されている分野は、恐らく血管新生の機構であろう。血管新生の間、既存の血管は正常細胞あるいは癌細胞から遊離される増殖因子に反応して透過性が亢進し、基底膜および間質マトリックスの分解、周皮細胞の血管からの解離、内皮細胞の遊走および増殖による配置あるいは芽の形成が起き、管腔は芽の中で形成される。芽の集合および吻合により枝およびループが形成され、血流が形成される。これら未熟な血管は基底膜および周皮細胞に注ぎこまれる。このプロセスはカナリゼーションと呼ばれる。正常な生理学的

な血管新生の間では、これら血管は成熟細動脈、毛細血管、小静脈に分化する。一方、これら血管は腫瘍において未熟のままである。最終的に、未発達の血管叢が内皮前駆細胞から形成される際、胎児の発育中に脈管形成が起こる。骨髄あるいは末梢血から動員される循環内皮前駆細胞は腫瘍および他の組織における生後の脈管形成にも寄与する。しかし、最近のデータによると腫瘍の血管新生におけるこれら細胞の重要性および役割について疑問が投げかけられている。腫瘍の治療における最近の課題は腫瘍の形成に対する血管新生促進の四つの機構それぞれについて相対的な役割を明確に理解し、癌の抗血管新生治療を最適化することである。

C. 1. 3 腫瘍血管の構造と機能

腫瘍の成長と転移において血管が重要な役割を果たしているが、腫瘍血管系の構造および機能は異常である。その内皮内面は不完全であり、開窓および細胞間接合が喪失している。基底膜は不連続なものとして存在するかあるいは消失し、周囲の周皮細胞は欠如している。組織化された血管ネットワークの構造は消失している。血管ネットワークにおいてははっきりとした細動脈、小静脈、毛細血管が欠如しており、血管の間のつながりが不完全な場合がある。血管には拡張および収縮した領域があり、構造上、それらは曲がりくねって横に広がり不規則な形をしている。また異常な分岐およびブラインド様の末端をしている。内皮細胞の配置は異常であり、一つの位置に広い隙間で分かれているか近くでお互い積み重ねられている。内皮細胞は共通の内皮マーカーに対する反応性が消失している。同様に、壁細胞のパターンおよび機能も異常である。腫瘍に関連した周皮細胞は

異常なタンパク質発現と形態を示す。興味深いことに、異常な周皮細胞は内皮細胞と弱く結合しており、高い血管透過性の原因となっている。

このような血管の異常により、腫瘍のかん流は一樣でなく腫瘍の間質液圧は高くなる。高い間質液圧は腫瘍血管の透過性亢進の原因の一つともなる。通常、血管は血管内から外側へ液圧の勾配を維持することができるが、腫瘍ではこの勾配が消失して血管壁の外側と内側の圧力が同じになる。同様に、正常組織では、血管内の膠質浸透圧が外側に比べてはるかに高くなるが、腫瘍では血管の透過性亢進によりほとんど等しくなる。血管と腫瘍の間におけるこれら勾配圧力の欠損により、腫瘍に対する高分子量治療薬のデリバリーが損なわれる。腫瘍のかん流が一樣でないことにより、化学療法剤だけでなく酸素、栄養物を含む全ての血液により運ばれる分子のデリバリーは損なわれる。腫瘍血管の障害および先に述べた血管構造の異常により、腫瘍血管の透過性が亢進し腫瘍における血流が緩やかになる。その結果、低酸素とアシドーシスが起きる。低酸素は活性酸素種のアペイラビリティを減少させ、薬物および放射線療法に対する抵抗性が増加する。さらに、遺伝子の不安定性が誘導され、血管新生および転移に関与する遺伝子がアップレギュレートされる。さらに、腫瘍に侵入する免疫細胞の細胞傷害性効果が損なわれる。このようにして、病理的な腫瘍血管系により細胞傷害性治療および宿主の免疫細胞から腫瘍が防御される。

C. 1. 4 VEGF の腫瘍における発現

結腸直腸、肝細胞、肺、胸部、子宮内膜癌および急性骨髄白血病を含む多くの癌で VEGF およびその受容体が過剰発現することがわかっているが、その意義については十分な理解が

なされていない。VEGF の発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞および非小細胞肺癌の患者におけるネガティブな予後因子であることが示されている。他方、胃癌および子宮内膜腺癌の患者における研究では VEGF 発現と予後に相関はみつかっていない。

C. 1. 5 タンパク質、核酸、細胞を用いた血管新生阻害剤

C. 1. 5. 1 抗 VEGF 抗体

Kim らはマウス神経芽種モデルにおける腫瘍の成長を抗 VEGF 中和抗体が完全に阻止することを初めて示した。マウスにおける腫瘍異種移植に対してモノクローナル抗体 (2C3) が抗腫瘍活性を有することが示された。2C3 は VEGFR1 ではなく VEGFR2 と VEGF の相互作用をブロックすることが示された。その後、2C3 の抗腫瘍活性がいくつかの腫瘍モデルにおける非臨床試験で広く示された。これらの研究から、齧歯類モデルに異種移植された多くのヒト腫瘍セルラインについて、2C3 がその腫瘍の増殖を抑制することが示された。なお、その抑制効果は投与ルートあるいは腫瘍の位置に関係なかった。アッセイした腫瘍型には横紋筋肉腫、グリア芽腫、平滑筋肉腫、結腸腺癌、肝芽腫、ウィルムス腫瘍、卵巣、前立腺、乳腺の癌が含まれる。一方、セルラインを用いた *in vitro* の研究では 2C3 は腫瘍細胞の増殖には影響を示さなかった。このことから腫瘍の抑制は血管新生の阻害を介していることが示唆された。また、肝臓に転移性の直腸癌のマウスモデルの評価において、2C3 は肝臓に転移した癌の数および大きさの両方を阻害することが示された。同様な転移抑制がその他にもいくつか報告されている。

C. 1. 5. 2 VEGF-Trap

*in vivo*における半減期を延長しながら、高い親和性を維持するために要求される事柄を決定することにより、薬物学的な性質を顕著に高める非常に強い親和性の VEGF ブロッカーが作られた。VEGF-Trap(Aventis 社、Regeneron 社)は VEGFR1 の誘導体であり、VEGFR1 と VEGFR2 両方の細胞外ドメインを IgG の Fc フラグメントに融合したものである。したがって、ヒトにおける免疫原性の可能性は最小限に抑えられている。ペバシズマブのように、この分子は細胞表面受容体から VEGF を遮蔽するが、ペバシズマブよりも VEGF に対する親和性ははるかに高い。VEGF-Trap はその高い親和性と *in vivo*における長い半減期から、最も強力で効果的な VEGF ブロッカーの一つであり、マウスおよびヒト VEGF に対する親和性はピコモルである。VEGF-Trap の投与によりマウスメラノーマ、ヒト横紋筋肉腫およびラットグリオーマを含む様々な腫瘍セルラインの増殖および血管新生が顕著に阻害される。神経芽細胞腫の異種移植モデルにおいて、高投与量の VEGF-Trap で処理すると腫瘍の成長が阻害された。腫瘍にはほとんど血液が供給されておらず、非常にまれにしか糸球体が存在しない。実際、最も阻害された腫瘍では基本的に血管がなかった。この知見から VEGF-Trap による血管系の退行は選択的であることが示唆される。この腫瘍成長の阻害は同じ腫瘍の治療に効果的でもある VEGFR2 の中和抗体である DC101 よりも 10 倍低い投与量で得られた。

これら最初の知見は他の腫瘍系で VEGF-Trap の効果を研究している多くの報告で確かめられた。VEGF-Trap はマウス異種移植モデルで神経芽腫の阻害に効果的であり、そ

の効果は VEGF のモノクローナル抗体における治療効果よりも大きかった。VEGF-Trap は既存の腫瘍血管系を縮小させる、定着した原発性腫瘍と転移性腫瘍が完全に縮小した。

注目すべきことに、VEGF をブロックすると播種性の卵巣癌における血管の劇的な再構成、腹水の蓄積の阻止がおき、播種性の癌の増殖が抑制される。データの中には VEGF のブロックは血管新生の阻止により癌の進行を遅らせるだけでなく、腫瘍の退行も引き起こす可能性を示唆するものもある。VEGF-Trap は生着した異種移植における成熟した既存の血管系を消失させる。血管系の根絶に伴い肺の微小転移巣も含め腫瘍が顕著に退縮する。そのような結果により、VEGF の強力なブロックが転移性の微小残存癌病変だけでなく巨大な癌の患者の治療に効果的であることも示唆された。

C. 1. 5. 3 可溶性 VEGF およびアンジオポエチン-1 受容体

先に述べた VEGF-Trap と基本的に同様な戦略が他にも行われている。EGFR2、Tie-2 の細胞外領域をラット皮膚の腫瘍ウインドーチャンパーに投与すると腫瘍細胞のコンディショニング培地により誘導される角膜の血管新生が強く抑制され、乳腺腫瘍の増殖および血管新生が減少した。なお、EGFR2 の細胞外領域は *in vitro*において高い親和性で VEGF に結合し、濃度依存的に受容体の活性化をブロックし、VEGF による増殖と遊走の誘導を阻害した。可溶性 VEGFR1 をコードするアデノウイルスベクターを導入した癌細胞を免疫不全マウスに移植すると、腫瘍の増殖は有意に抑制された。また、微小血管密度も有意に低かった。さらに、VEGFR1 の全細胞ドメインを発現するアデノウイルスを骨格筋に注射後感染肺癌細胞を皮

下注射すると、可溶性受容体が循環血液に検出された。これに伴い、腫瘍の増殖が停止し、その後腫瘍の大きさが低下した。組織学的な観察によると、腫瘍内血管新生は顕著に抑制され、アポトーシスが促進された。これらの結果は遠く離れた器官における可溶性 VEGFR 受容体のアデノウイルスを介した過剰発現は、癌の治療において効果的な戦略になる可能性が高いことを示唆している。なお、本戦略における欠点はこれらタンパク質の半減期が短いことである。

C. 1. 5. 4 VEGFR 抗体

VEGFR1 を標的とする MF-1 および 6.12 の両方の抗体はあらかじめ生着した異種移植リンパ腫の増殖を抑制する。bFGF あるいは VEGF に富むマトリゲルプラグあるいはアルギニンに封入された腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、VEGFR2 に特異的な抗体 (DC101) は血管新生を減少させた。また、マウスにマトリゲルを埋め込んだ後 DC101 で処置し、その後除去した腫瘍には血の気がないことから、血管新生および血管の透過性が低下していることが示された。その他様々な腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおいて DC101 は腫瘍の増殖を阻害することが示された。また、抗 VEGFR1 と抗 VEGFR2 抗体 (6.12 および DC101) を組み合わせると単独と比較して異種移植した腫瘍の増殖が大きく阻害された。この結果は二つの VEGFR により開始される固有の血管新生促進シグナルがあることを示唆している。

ヒト化抗 VEGFR2 IMC-1C11 (イムクロン社) は内皮細胞表面の VEGFR2 細胞外ドメインに特異的に結合し、VEGF との相互作用をブロックし、細胞内チロシンキナーゼ系の

VEGF による活性化を阻止する。IMC-1C11 は *in vitro* において VEGF により促進されるヒト内皮細胞の増殖および VEGFR2 陽性の白血球細胞の遊走を阻害する。*In vivo* で投与した場合、これらの抗体は VEGFR2 陽性ヒト白血球細胞を接種した NOD-SCID マウスの生存率を有意に延長した。IMC-1121B は第二世代の医薬品として作成された VEGFR2 を標的とする完全ヒトモノクローナル抗体であり、VEGFR2 に高親和性で結合して VEGF との相互作用を効果的にブロックする。IMC-1121B は VEGF により促進される VEGFR の活性化、内皮細胞の遊走および増殖も抑制する。

VEGFR2 に特異的な IMC-1121B および EGFR3 に特異的な hF4-3C5 の可変領域遺伝子を用いて二重特異性抗体、diabody が最近構築されている。diabody は VEGFR2 および VEGFR3 両方に対して濃度依存的に結合し、これら受容体と VEGF の相互作用をブロックする。*In vitro* のアッセイにおいて、diabody は VEGF により促進される内皮細胞の遊走、内皮細胞の受容体と p42/p44 マップキナーゼの活性化を中和した。これらの結果から、VEGFR2 と VEGFR3 両方の二重ブロックが効果的な癌治療のより有力なアプローチとなることが示唆される。

C. 1. 5. 5 毒素を VEGF あるいはその受容体に結合したキメラ分子

毒素を VEGF あるいはその受容体に結合したキメラ分子の開発に取り組む試みがいくつかなされている。標的毒素は組換え法により VEGF165 あるいは VEGF121 をジフテリア毒素に融合することにより開発され、血管平滑筋細胞および増殖している内皮細胞に対して極めて強い毒性を示すことが明らかになってい