

1. 会議を始めるにあたって

会議の冒頭においてオーガナイザーである Emily Shacter (FDA) により本会議の概要について説明がなされた。

1.1 Emily Shacter の発表の要約

① FOB のガイドラインは規制当局におけるこれまでの経験、最新の分析及び製造科学に基づいて作成中である。

② FOB を開発する製造業者は一連の分析方法を用いてたん白質の一次及び高次構造を分析する必要がある。

③ FOB 製品と先発の製造業者の製品を分子レベルにおいて相互比較することは、翻訳後修飾、高次構造及び会合を含むたん白質構造の多様性により複雑になっている。

1.2 Emily Shacter の発表の詳細

本会議の目的は、たん白質の特性解析及び比較に利用可能な最近の技術のレベルを中心として議論を行うとともに、そのような技術により可能なたん白質の特性解析の範囲を判断することである。

政府機関だけでなくたん白質性医薬品に関連した分析に従事している業界及び大学の研究者は、生物学的製剤の安全性及び有効性、そしてその利用が可能であることを保証する使命がある。

FOB に対する FDA の期待は、製品の安全性、有効性、品質が開発する製造業者により保証されているという点で、他の医薬品と変わらない。高い品質を保証するためには、原料物質、最終製品だけでなく GMP 上の厳しい基準、関連する分析法、製造工程の管理が適用される。

最近の FDA のガイドラインによると、申請前に製造工程を変更する製造業者は、製造の変更が製品の品質特性、更に安全性と有効性に及ぼす影響を調査し、その結果を示さなければならない。その場合、製造工程だけでなく発現系も先発の製造業者とは異なり、その違いは極めて顕著である場合が多い。したがって、FOB を開発する製造業者は定められた条件を厳密に順守して製造を行うことが要求される。

FOB が直面する極めて重要な科学的問題は、製品を先発製品と比較する際に重要となる特性及び特性の比較を行う上で最も適した分析方法の選択である。FOB は通常注射剤であるため、その承認におけるハードルは極めて高い。FOB が先発製品と類

似していることを示すには、基礎研究で用いるたん白質よりもはるかに厳密な特性解析が必要となる。類似性は以下の二種類に分けられる。一つは代替可能な製品であり、その場合、化学的、構造的、機能的に現在市販されている製品と同等であることを意味する。例えば、認可を受けた製造業者が新しい製造工程を用いて製造したジェネリック医薬品あるいは製品がそれに当てはまる。科学者によってはこれらを同等な製品と呼ぶ場合もある。重要な点は、これらたん白質は化学的及び構造的に非常に類似している必要はあるが、必ずしも同一である必要はないということである。分析方法により違いが検出された場合は、構造活性相関などの研究によりその違いが製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないことを示す必要がある。

対照的に、二つ目の代替できない製品とは基本的に構造上の特徴は同じであるが、安全性、有効性及び安定性を改善するため多少の改変を行ったものである。代替できない製品の例としては、本来のたん白質に対し、それをポリエチレングリコール(PEG)残基により化学的に修飾したものである。FDA は既に多くの PEG 修飾治療薬(例 IFN α , G-CSF)を認可しており、それは市場で多くの売り上げがある。

FOB の概念が規制当局により認められた場合には、FOB の製造業者は市場に供給できる製品を生産するという課題に最終的に直面する。市場に供給する製品の製造では、リバース・エンジニアリングのプロセスが必要となり、それはある程度可能である。更に、安全性、純度、有効性だけでなく化学的及び生物学的に先発製品との類似性を示すことができるかどうかという問題に直面する。この仕事はどれだけ困難であるかは、比較となる先発製品のたん白質及び処方複雑性、適切に利用可能な分析方法、標準物質、絶対的及び相対的な特性について判定基準となる妥当な値を設定できるかどうかによって異なる。

しかし、以下に述べるように様々な因子により直接的な比較が困難になっている。不確実性はすべての医薬品の開発に共通の問題であり、FOB の場合も例外ではない。製造業者は、製造工程が製品に及ぼす影響、各製造工程の厳密なコントロール及び維持により最小限にできるリスクの範囲に対する理解

が不完全である場合が多い。完全なデータを得ることはできないので、不確実性が常に存在する。これまでの医薬品の開発において、臨床効果でさえも有効性の目標値が0.05の有意水準で任意に定められている。更に、医薬品の製造業者は時間と資源が限られているので、安全性を確認するためのデータをすべての点で典型的な患者からなる母集団によって得ていることはほとんどない。しかし、その不確実性についてはリスク/ベネフィットの観点で取り扱い、完璧でないことは承認の妨げにはならない。

FDAによる最近のリスクに基づいた指導では、FOBを開発する製造業者が不確実性の存在を認め、それに対処することを認めている。その場合、原因を特定し、不完全な理解から生じる可能性のあるシナリオ及び危険性を推定し、情報の追加あるいは裏づけとなる情報の入手により、リスク/ベネフィットの比を低下させる努力が必要である。

FOBの開発、製造及び承認は科学に根差した方法に従うことが重要である。アダムスミスによると、科学は情熱と盲信という毒に対する強力な解毒剤である。FOBの利害関係者のすべては科学的、客観的な視点から事実を見つめる必要がある。船に例えると中心部を縦貫している龍骨を支えることにより、この道を前に進めるよう一致協力して取り組む必要がある。

2. 活性を有する成分の分子レベルにおける不均一性を調べる分析技術

2.1 発表の要約

①発現されたすべての構成成分についてたん白質の構造の面から、FOBと先発製品とを比較する機会は非常に多い。

②たん白質の骨格に対する翻訳後修飾は組み合わさって作用し、同じ基本たん白質から数百から数千の変異体が生成される。

③たん白質のグリコシル化を特性解析する技術は広範囲に及ぶ研究により発達しており、たん白質の配列、翻訳後修飾までほとんど解析可能である。なお、グリコフォームの多様性及びそれぞれの構造についてはある程度の解析は可能であるが、まだ困難な課題が残されている。

2.2 発表の詳細

最初のグループの発表者はたん白質製剤の不均一

性を定量する分析技術について発表を行った。生化学的には、不均一性とはある程度非類似性と変異体を意味し、特定の製剤に含まれる異なった型のたん白質の数と種類を指している。すべてのたん白質製品はある程度不均一である。

会議のオーガナイザーの一人であるDavid Bunk (NIST)は一次構造(アミノ酸配列プラス翻訳後修飾)、二次構造(α ヘリックス、 β シート、ターン、ねじれ、回転、ループのような三次元的な特性)、三次構造(サブユニットの三次元構造)そして高次構造(たん白質サブユニットの空間的配置及び並び方、たん白質同士の相互作用)を含むたん白質の構造を構成する要素について概説した。どの構造領域においても、違いが生じた場合には生化学的な不均一性が増加する。規制及び科学的な観点からすると、反論すべき特定の証拠がない場合は、類似していないことによりたん白質の安全性及び有効性が影響を受けると考える必要がある。

更に、彼は翻訳後修飾の重要性について概説した。この場合、翻訳後修飾とは、それぞれの発現系において得られる固有のたん白質の一次構造に対する化学的な付加であり、その中でたん白質の化学的、生物学的及び治療上の性状に影響を与えるものを指している。最も一般的な翻訳後修飾はグリコシレーション(糖を含む分子の付加)、アセチル化(アセチル基)、メチル化(メチル基)、リン酸化(リン酸基)である。自然環境において、生物はこのような修飾を用い、その結果、たん白質の性状が変化する。バイオ製品の製造環境では、培養細胞は自分自身の必要性に応じて翻訳後修飾を行う。Follow-onを開発する製造業者はこのような修飾及びたん白質の性状に影響を及ぼすその他多くの因子について知っておく必要がある。

続いて、四人の発表者が特に翻訳後修飾に関するたん白質の構造の解明に用いるmass spectrometry (MS)の有用性について示した。MSは分子の分子量及び化学構造の決定に用いる分析技術である。MS分析には多くの種類があり、フラグメントイオンより翻訳後修飾のような局所における化学的修飾に関する情報が得られる。MSは小さな質量の変化も高い感度で検出が可能なため、翻訳後修飾のパターンの解明において有用である。

翻訳後修飾には非常に多くの組み合わせが考えら

れるため、その分析は困難となっている。Donald F. Hunt (バージニア大学) は翻訳後修飾を受けたたん白質及びペプチドの MS による比較分析について発表を行った。MS を用いてヒストン H3 の N 末端を分析すると、アセチル化、リン酸化、アルギニン及びリジンにおけるモノ、ジ、トリメチル化を含むものすごい数の翻訳後修飾が検出される。そのすべてを合計すると、ヒストン H3 全体で 50000 以上の型の存在が予想される。しかし、異なるフラグメンテーションの技術と最新のタンデム MS を用いて一連の体系的な分析を行えば、このように解析が困難と思われるたん白質においてもすべての異性体についてその全一次構造を解明することは可能である。

ヒストンは核で検出されるたん白質であるが、N 末端が特異的に修飾されることにより細胞におけるたん白質の産生は活性化あるいは不活性化される。例えば、アセチル化により DNA から RNA への転写が活性化され、メチル化によりこのプロセスは不活性化される。タンデム MS によりこのようなたん白質構造におけるかすかな変化を拾い上げることが可能である。

翻訳後修飾には莫大な組み合わせが考えられるが、特定のたん白質における翻訳後修飾の数は予想よりはるかに少ない場合がほとんどである。このような翻訳後修飾を受けたたん白質を MS により分析するには、あらかじめ精製する必要がある。その際、例えば、たん白質が有する様々な化学構造を利用して特定の樹脂に結合させ特定のたん白質を精製する方法であるクロマトグラフィーを用いる。William Hancock (ノースイースタン大学) はクロマトグラフィーの技術について発表を行った。彼は、たん白質変異体の解明について、クロマトグラフィーを単独あるいは MS と連結して用い、目的とするたん白質成分を精製し、それを MS で解析する方法について紹介を行った。その中で、彼は生化学において一般的に用いられている精製法及び精製において効果的であるレジンの化学的修飾を含め、数種類のクロマトグラフィーについて示した。

Jonathan Amster (ジョージア大学) は fourie-transform MS (FTMS) について発表を行った。FTMS は、高分解能 (m/Z 1000 当たり 1,000,000 以上)、百万分の一の MS の精度に加え、イオン化

及びフラグメンテーションに用いる多くの一般的な方法と適合性があるため、極めて優れた分析技術と考えられる。比較的最近までは、FTMS はあまりにも複雑なため工業レベルでは用いられていなかった。その理由は、必要なコンピュータ及び機器の設置にかなりの労力がかかり、製造施設が対処するには負担が多すぎたことによる。しかし、ハードウェアとソフトウェアが進歩し、FT 法は分析技術の主流として使用されるようになってきた。その中で注目すべき進歩としては、14 テスラまでの超伝導磁気技術、特に FTMS と electrospray ionization (ESI) のような高圧源をカップリングさせた外部イオン源、ハイブリッド四重極 MS/FTMS 及び電子捕獲解離、赤外多光子解離、衝突解離のようなイオンフラグメンテーション技術があげられる。更に、イオン解離法は相乗的に組み合わせることが可能であり、follow-on たん白質製品における重要な構造について詳細に解析できる。

グリコシレーションによるたん白質の不均一性については長年にわたり数え切れないほどのたん白質分析プロジェクトで解析が試みられたが失敗に終わった。Vernon Reinhold (ニューハンプシャー大学) は自動化グリコプロテオミクス分析について発表を行った。全たん白質の半分以上はグリコシル化されているため、糖鎖構造の解明はゲノム機能の解明の次のステップと考えられている。グリカンが付加した構造についての理解を高めるには、糖鎖のエピトープの特異的な機能の評価に基づいて行う必要はあるが、糖鎖の配列解析について包括的な戦略を設定することは現時点では困難である。

たん白質と遺伝子については熱狂的な関心が寄せられたが、糖についてはほとんど関心が寄せられなかった。ヒト遺伝子プロジェクトが開始される以前でも、精製の困難さ、取り扱いが困難な化学構造、分岐パターン、糖鎖同士そしてたん白質及び遺伝子に対するものも含め糖鎖の型がほとんど無限の組み合わせを有することから、糖鎖を研究する化学者はほとんどいなかった。一方、たん白質のグリコシレーション経路においては一個の遺伝子が変異しても、オリゴ糖がたん白質に付加する最終的なパターンは大きく影響を受け、その変異は生物が作り出すすべての糖たん白質に対して増幅される。現状として、糖鎖構造の成分を解明するための選択的な戦略のほ

とんどは、調和の方向に向かって進んでいない。

彼のアプローチは多段階分解、メチル化した多糖類のイオンラップMSに基づいている。高いエネルギー状態の環境下で、糖鎖は体系的かつ予想通りにフラグメント化される。これらのフラグメントについて多次元MSを用いた解析を行うことにより、質量と数が決定される。糖鎖のイオンフラグメントライブラリーからの入力、関連するハイスループットな分析方法、糖を含む分子がMSフラグメンテーションのパターンのどこに位置するかを相関させる数学式により、たん白質から除去されたグリコフォームは同定される。彼はこのアプローチに洗練されたデータ解析手段と多次元MSを組み合わせ、単一糖たん白質から複数のグリコフォームの構造を解明できることを示した。

3. 二次及び三次構造

3.1 発表の要約

①たん白質医薬品が遭遇するどのような条件及び環境も二次、三次、四次構造のような高次構造に影響を与える。

②高次構造の変化が治療上の有効性及び安全性に及ぼす影響は予測不能であり、測定するのが困難である。

③二次及び三次構造を決定するための戦略としては複数の直接的な方法を用いることが必要である。

3.2 発表の詳細

類似していると考えられる二つのたん白質を比較する場合、翻訳後修飾を含む一次構造は複雑性の一面を示しているにすぎない。翻訳後修飾を含む一次構造の主要な決定要因が、組換え遺伝子、発現系、培養条件であるような状態では、治療用たん白質の製造において遭遇するすべての操作及び条件によりたん白質の高次構造が大きく影響を受ける可能性がある。

Russ Middaugh (カンサス大学) は多次元相平衡状態図のアプローチによるたん白質の二次元及び三次元の解析について発表を行った。例えば、CD、蛍光、フーリエ変換赤外線、ラマンスペクトル、光散乱、熱量測定のような分解能が低い技術を単独で用いただけでは、二つのたん白質間における構造の一致を示すには不十分である。

最近、多次元によるデータ解析が行われ、部分的

ではあるがこの問題の解決に寄与している。彼は自分が適用している多次元法について、実験に基づいた相平衡図という言葉を用いた。実験に基づいた相平衡図では相の境界を越えた可逆性は必要ではないが、熱力学的相平衡図では必要であるという点で両者は異なっている。実験に基づいた相平衡図では、熱力学的な相の挙動としてデータを示す代わりに、紫外、赤外、蛍光分光法のような各技術を用いてpHあるいは温度変化のような複数の条件で、更にはこのような分析技術を組み合わせ、たん白質の性状を視覚化した状態でデータ化する。

彼は、実験に基づいた相平衡図を構築するため、非常に高度な次元の空間においてたん白質をベクトルとして示した。この場合、ベクトルの構成因子は数千あるいは数万の測定に基づいたそれぞれのスペクトルの値である。それぞれのベクトルは視覚化して示され、二つのたん白質は生データを参照しないで並んで比較される。これらのアプローチにより、吸収分光法のような単一の技術でもその威力を劇的に増加させることができる。例えば、たん白質の近紫外スペクトルの六あるいは七つの派生するピークを用いることにより、ベクトルが生成されるとともにたん白質に広く分布したトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの環境を同時に測定できる。これらのベクトルに対して、温度、pH、イオン強度、還元電位、攪拌、凍結融解のストレスのような溶液における適切な変数を関数として作成すると、たん白質の詳細について視覚化された図面が得られ、その内容は個々の分析方法から集めた情報あるいはその単純な合計よりも大きい。FOBについて実験に基づいた相平衡図を適切に適用させるためには、生物学的高分子の構造に関する情報が何であるかを明確にする必要がある。そうすることによりFOBを開発する製造業者はたん白質の同一性を確信できるようになる。

有機化学者は30年間有機化合物の単純な結合性の測定にNMRを用いてきた。長年の間、NMRは大きく複雑な分子に対応できるほどの分解能がないことから、たん白質の構造上における差異を見分けることは不可能と考えられてきた。まだ専門的な領域ではあるが、コンピュータの能力の指数関数的な向上及び機械自体の着実な改善により、たん白質のNMRが可能になってきた。

Daren Freedberg (FDA) は FOB の特性解析における NMR の能力と適用について発表した。たん白質の特性解析において、NMR は MS, CD, ラマン及び赤外分光法と同様な定量的な分光学的方法の一つである。このような技術と同様に、NMR の長所は、破壊することなく広い範囲の高分子及び材料、要素、原料、成分、内容物、構成要素に適用可能であり、その分解能は原子レベルであることである。NMR の主な欠点は、たん白質の測定における大きさの一般的な限界が約 30 kDa であることだが、方法の改善により、測定可能な上限値は大きくなってきている。

典型的な NMR の解析では、化学物質内の原子(通常、水素、炭素、窒素、リン)は励起されたエネルギー状態に上昇される。原子が基底状態に戻る時、放出されるエネルギーは 100 万分の 1 の単位でスペクトルとしてプロットされる。これらのエネルギーの値はそれぞれの原子における化学的な環境及び結合に対応する。

たん白質は非常に大きくかつ多くの原子を含むため、NMR スペクトルは非常に複雑であり直接解析することはできない。したがって、研究者は多次元技術を適用し、緩和の間に一原子から放出されるエネルギーが原子間における距離を関数として近くの原子に対してエネルギー変化を引き起こす。たん白質のいわゆる多次元 NMR は、一つのたん白質で数日、場合によっては数週間かかるが、他の方法では入手が困難な結合と化学環境に関する情報が入手できる。

Keith Oberg (マンカインド社) は二つのたん白質の同等性を示す場合における光学的方法の有用性について発表を行った。光学的方法は軽微な構造変化に対して感度が高い。光学的方法により製造工程におけるたん白質の違いが検出できれば、適切な製品を製造する工程における変化を示すことができる。同様に、光学的方法は製造後において特性解析を目的とした品質の設定に用いることができる。

最も普通に用いられる光学的方法は紫外、蛍光分光法、CD 及び赤外分光法である。光学的方法の長所は、感度が高いこと、操作が容易であること、低コストであること、生物学的医薬品の開発と製造プロセスに適用できることなどである。一方、短所は、NMR と比較すると分解能があまり高くないこと、

単独では特性解析の方法としての信頼性が低いことなどである。このような短所があるにもかかわらず、光学的方法はたん白質の高次構造に関する情報を得るうえにおいて有用であり、開発の初期及び製造段階において生じる問題を明らかにする手がかりになる。複数の異なった光学的方法を併用することにより、製造方法が異なる二種類の実薬あるいは製剤における軽微なコンフォメーション及び安定性の違いを比較できる。

Curtis Meuse (NIST) は三次構造の解析について、特に光学的方法の適用範囲及び溶液における構造について発表を行った。たん白質は三次元の形態を用いて分子を認識するため、たん白質のアミノ酸配列及び原子の組成のみでは他のたん白質との類似性の証明、それに伴う安全性及び有効性に関する情報としては不十分である。更に、高次構造を形成するために必要な情報はアミノ酸配列に含まれている。したがって、分析の観点から三次構造の解析により一次及び二次構造に関する情報についても入手できる。

クロマトグラフィー及び熱量測定のような理化学的方法を含む分析法のほとんどは三次構造を理解するうえで有用である。スペクトルあるいはクロマトグラフを単独あるいは組み合わせることにより構造を詳細に理解するには、コンピュータを用いた分析が必要となる。サンプル調製における制限、三次構造の性状の複雑性、アミノ酸置換による比較的小さな変化の検出の必要性、翻訳後修飾、賦形剤による妨害、研究室間で用いる方法の不統一、類似性及び違いを定量する困難さ、これらすべてが三次構造の解析を困難なものにしている。それにもかかわらず、たん白質のフォールディングの研究に用いる光学的方法は、部位特異的突然変異が構造に及ぼす影響を解明するために長い間用いられてきた。このような光学的方法を用いたたん白質のフォールディングの研究は、FOB の比較を考える場合においても必要である。

Frederick Schwarz (NIST) は熱量測定によるたん白質性医薬品の熱力学的な解析について発表を行った。この技術は、ある分子がストレスにより変化を受けた場合に吸収あるいは遊離される非常に小さな熱量を測定するものであり、たん白質における軽微な変化を容易に測定できる。彼は、たん白質の

結合、変性、凝集などが熱量測定によりどのように解析できるかを示した。熱量測定のような直接的な分析方法は光学的方法における欠点を補うものとして有用である。

分離用クロマトグラフィーを用いてたん白質の親和性と挙動を演繹的に予測することは、たん白質製造業者における長年の目標であった。Steve Cramer (レンセラーポリテクニク研究所) は疎水相互作用クロマトグラフィー系を用いてたん白質の親和性を予測する定量的な構造物性関係モデルについて発表を行った。定量的な構造物性関係モデルは、化学的あるいは分子における物性と予想される物性あるいは挙動を数学的に関連付けるものである。彼はクロマトグラフィーにおいてたん白質の挙動を規定している因子を解明するための手段として定量的な構造物性関係モデルを取り上げ、たん白質の配列と結晶構造のデータから重要な特性を直接予測する方法を示した。彼は、保持値、等温線パラメータなどを従属変数として用いた実験データを最初に入手し、各たん白質について一連の実験データから数多くの分子物性を計算し、実験の反応と最も一致する特性を選択することにより、定量的な構造物性関係モデルを最終的に構築した。彼は練習用の分子でそのモデルを評価した後、新しい分子でそれを試験した。

4. たん白質間の相互作用：四次構造

4.1 発表の要約

①凝集体は、強い免疫反応、場合によっては危険な免疫反応を惹起する傾向があるため、治療用たん白質においては非常に好ましくない。

②凝集の測定には、光散乱、分析用超遠心、field-flow fractionation (FFF) (場流動分画)、原子間力顕微鏡のような精度の高い方法がある。

③臨床的には、凝集体に対する免疫反応は分子の構成成分により引き起こされ、非たん白質性物質がアジュバントとしてヒトにより異なる免疫反応と相互作用し、その結果、免疫反応が促進される。

4.2 発表の詳細

たん白質間相互作用に関するセッションは、たん白質の凝集と四次構造を中心とした発表が行われた。Amy Rosenberg (FDA) は凝集の背景及び凝集が治療用たん白質の安全性に及ぼす影響について概説した。

たん白質の凝集体は可溶性あるいは不溶性で存在し、製造から製品の力価更には安全性まで広範囲にわたりたん白質製品に影響を及ぼす可能性がある。たん白質の二量体、三量体、高次の凝集体は単量体に比べて免疫反応を引き起こしやすく、治療用たん白質の品質に大きな影響を与える。ヒト成長ホルモン、IL-2 及び様々な血漿たん白質におけるこれまでの経験から示されるように、免疫反応に及ぼす影響は予測できない。免疫原性が生じる主な機構は特異的あるいは非特異的な抗原提示活性の増強及びB細胞の活性化である。

ヒトの免疫系は侵入してきた危険物質に対する反応により惹起される。このような危険物質の中には高次構造がたん白質の凝集体と似ているものもある。微生物とバクテリアの危険性はたん白質、複合多糖、脂質のパターン及び構造により規定される。高分子量という特徴及び繰り返しの立体構造エピトープがたん白質の凝集体とバクテリア及びウイルスとでどこまで似ているかにより、凝集体による抗体産生機構の活性化能が規定される。

しかし、凝集体だけを取り上げて考えることは間違いである。多くの製品及び宿主関連因子も免疫系の惹起において極めて重要な役割を果たしている。凝集体に含まれる不純物がその中で最も重要である。すなわち、凝集体が外来性のものかあるいは内因性のたん白質の類似物から形成されたものであるか、そして例えばグリコシレーション、新しいエピトープのような製品に本来備わっているものが重要である。患者に関連した免疫原性を決定する因子には、投与量、投与頻度、免疫能、投与ルートがある。

たん白質治療薬の製造業者のほとんどは、凝集体のタイプ及び濃度を限外ろ過クロマトグラフィーに基づいた一種類のアッセイしか用いて分析していない。限外ろ過クロマトグラフィーでは大きさに基づいて分子が分析される。二量体、三量体の質量は単量体の分子量の倍数であるため、これら多量体は元のたん白質から分離される。先発製品においては、凝集体のプロファイルと臨床試験を行った患者における結果との関連性は既に明らかになっている。したがって、先発の製造業者は特定の凝集体プロファイルから予想される臨床結果を知っている。Follow-on における同等性の解析には、follow-on 製品と先発製品の凝集体の相対的な定量がある程度

は要求される。

精製ステップ、ウイルス除去法、原料物質、セルラインの変更を含む元の製造操作から逸脱が起こると、ほとんどすべての場合において凝集プロファイルが影響を受ける。例えば、複数投与量バイアルから単回投与シリンジへの変更のようなことでも、凝集体の量及びタイプが変化を受ける。シリンジ製品の場合では、シリンジから金属あるいは加硫剤が浸出し、その結果、凝集あるいは予期しない免疫活性が引き起こされた例がある。

凝集体及び製品におけるその他の特性が臨床効果に及ぼす影響については臨床的に解明されていない。したがって、高いリスクの製造変更を行った場合は、臨床研究を要求することが多い。

凝集の理想的な分析方法とは、特に製剤において現在利用可能な技術を向上させることにより、非常に大きな分子量の凝集体のすべてを捕捉するとともに可逆的及び不可逆的な凝集体を区別し、分析を自動化することにより定量的かつハイスループットに行えるものである。

John Carpenter (コロラド大学) は、水溶液におけるたん白質の凝集の原因となる重要な因子について発表を行った。たん白質の凝集は、製造、出荷、貯蔵、治療用たん白質のデリバリーを含むすべてのプロセスで起きる可能性がある。製造者はたん白質凝集体のなかで、外来粒子による不均一な核生成から生じる凝集について特に配慮する必要がある。製造工程における最後の操作である充填において、容器、ふた、充填ポンプも凝集の原因となる可能性がある。凝集体の形成は、ストレスだけでなく、ストレスがない状態でもたん白質自体が凝集体を形成しやすい性質を有している場合は誘導される。逆に、熱力学的及びコロイドの安定性を最大限にすると凝集を低下できる。

治療用たん白質におけるほんのわずかな量の凝集体でも免疫反応からアナフィラキシーショックまで患者に有害効果を引き起こす。更に、凝集が患者の健康に及ぼす影響は予測するのが困難である。

Karin Cadwell (ウプサラ大学, スウェーデン) はたん白質の分離と特性解析における FFF について発表を行った。FFF とは分子と粒子をサイズ(流動 FFF) 及び質量(沈降 FFF) に基づいて分離する技術であり、分析用クロマトグラフィーの代わ

りに用いることができる。

分離は開放系のチャンネルの中で起きる。サンプルは、注入部位から移動層の流れに従って輸送される。FFF の分離度は移動層だけでなく、垂直に加えた場の大きさに依存する。例えば、高い分解能で分離するには、フローあるいは沈降タイプを用いる。バッファーは一般的なものを用いることができる。サンプルは剪断力が低い状態で移動し、チャンネルの壁とサンプルの接触は最小限になるよう設定されている。このような効果により、サンプルの変性を最小限にした状態において、高い回収率でサンプルを分取できる。FFF における大きさに基づいた分離能はダイナミックレンジが 10 の四乗と非常に高い。複雑なたん白質凝集体の混合物でも例えば単量体、二量体、三量体、四量体として容易に分離できる。更に、FFF を光散乱法と組み合わせると質量/大きさに関する情報をリアルタイムで入手できることから、特に凝集体の検出に適している。

Ewa Folta-Stongiew (イェール大学) はたん白質の凝集体を評価する道具としての光散乱について発表を行った。光散乱の測定には静的及び動的の二種類のタイプがあり、それぞれ長所と短所がある。静的な光散乱では凝集体の重量平均分子量が測定できるが、用いる溶媒が限定され、レーザー光を吸収する凝集体に対して適合できるように設定する必要がある。動的な光散乱では流体力学的半径が測定できる。その測定は粒子の形状により影響を受けるが、形状の影響とオリゴマーの状態変化の区別はできない。

Roger Marchant (ケースウエスタンリザーブ大学) は原子間力顕微鏡を用いたたん白質のイメージングについて発表を行った。原子間力顕微鏡は通常物質の解析に用いられるが、三次元におけるたん白質のイメージング、原子間接着力の測定、表面とたん白質及びたん白質と細胞のダイナミクスの定量化にも用いることができる。

Thomas Laue (ニューハンプシャー大学) はたん白質製品の凝集状態を測定するための技術として分析用超遠心について発表を行った。

分析用超遠心は溶液における大きさと形状を特性解析するための技術である。分析用超遠心において特に優れている点は、どれだけ速く下方に移動するか、すなわち粒子の沈降速度が測定できることから、

標準物質を必要としないことである。超遠心はたん白質、ワクチン、ウイルス、凝集体の粒子サイズ分布を特性解析するうえで特に有用である。

沈降速度は境界における運動速度及び境界における拡散速度により決定される。そして沈降速度の測定により粒子サイズ分布、分子量、非対称、純度、溶解たん白質の溶液におけるコンフォメーション、凝集体についての情報が最高の分解能で得られる。沈降における分子成分の分解能は、ゲルろ過を含む大きさを基にしたどのクロマトグラフィー法よりも優れている。濃度に依存した沈降係数を用いることにより、分子の非対称も評価することができる。

超遠心の長所は、マイルドな方法であり、溶質/溶媒のタイプに影響を受けず、たん白質の修飾が必要なく、ランニングコストも低いことである。短所は、単独で用いた場合、分子量の測定における分解能は3%以内であり、MSの分解能より明らかに劣ることである。機械は高額で、超遠心を高い精度の技術として使用するには、優れたそして一定の操作が行える分析技術及び溶液の熱力学についての適度な理解が必要とされる。

Igor Kaltashov (マサチューセッツ大学) はたん白質の三次及び四次構造を特性解析するための技術としてESIとmatrix assisted laser desorption ionization (MALDI) MSについて発表を行った。この二つのMS法は非常に大きな質量の凝集体を分析することができ、凝集体構造が構成成分のたん白質へどのように分解されるかが測定できるため特に魅力的である。ESI MSではたん白質を溶液で直接解析できる。しかし、ESIと不適合な非極性溶媒の場合、たん白質はESIあるいはMALDIで解析する前に精製及び前処理する必要がある。

MSは高次構造を直接解析できるという点では多くの長所があるが、長所は同時に欠点にもなる。ESIを用いた緩やかなイオン化条件では弱い非共有結合の複合体が維持されるが、同様に非特異的な複合体も形成される。MSは高感度であるため希釈たん白質溶液の解析に特に適しているが、たん白質が高濃度の場合あるいは賦形剤が含まれている場合は分析が妨害される。

5. 製造工程が製品に及ぼす影響

5.1 発表の要約

①製造がたん白質の構造と品質に与える影響は大きい。

②小規模あるいはミクロスケールにおける最適化条件の検討結果は、製造スケールにおいて望ましい特性を有する製品を製造する場合、その目的にかなう最適なプロセスの条件を設定するうえで有用である。

③最適なクロマトグラフィー系を選択することにより、不純物の混入を最小限にし、望ましいたん白質と他の物質の分離を大きく改善することができる。

④圧力、更には化合物及びたん白質の添加によりたん白質の凝集を低下できる。

5.2 発表の詳細

Charles Cooney (マサチューセッツ技術研究所) は製造工程のデザインによる製品の規定について発表を行った。

最初に、彼は製造工程により製品の品質が規定されるという規制当局によるかねてからの独断的な見解に異議を申し立てた。製品の品質は製造工程により規定されるのではなく、むしろ製造工程により影響を受けると考えるべきである。設計品質として知られる製造工程を経ることにより、治療用たん白質の力価と安全性は最大限に引き出される。ここで重要な意味を持つ言葉はデザインであり、自分達が設定した環境における物の反応性についてよく考えた実行、前向きな考え方と定義できる。製造工程にとって重要なことは特定のたん白質プロジェクトにおいてその目標に関する知識である。それには、研究用の品質のたん白質、標準物質、治療用たん白質あるいはFOBについてのすべての品質、デザインに関連した分析に関する資料などが含まれる。設計品質には、あらかじめ定められた品質標準、製造工程の進行を測定できる分析法、製造工程などがあるがそのすべてが必要なわけではなく、その中で製品において重要となる性状に影響を及ぼすものについての理解が必要となる。その目標を見失わないことが重要である。

彼はFOBの必要性と目的を具体的に規定した。すべての利害関係者は、科学的に明確な基盤を持つとともに、生物学的治療用たん白質の類似性について特性解析しそれを示す方法にたどり着くためのロ

ードマップを手に入れることが重要である。この課題を実行するにあたって必要なことは、異なったプロセス、異なった会社及び異なった地域における生物学的な製品の製造に関連する不確実性を明らかにするとともに評価することである。FOB 製品を導入するためのワーキングモデルは他の国において既に存在する。世界中の異なった施設で複数の製造業者が、ヒト成長ホルモン、インターフェロン、生物学的治療薬の化学的改変体及びその他の biogeneric を既に製造している。follow-on の製品には、知的財産の問題、異なった分析方法の使用、新しいプロセス技術の導入、操作のスケールの変更、それまでの経験の導入といった問題があることから、この暫定的なモデルに必ずしも従う必要はない。異なるプロセスを用いて類似した製品を製造できるかについての答えは、分子の複雑性がたん白質の構造と機能に関連する場合においてその複雑性を測定できるかどうかにかかっている。この複雑性を理解できない原因は、分析方法の妥当性、プロセスにおいて製品が影響を受けやすいステップの認識、構造と機能の関連などに対する理解不足である。この問題を解決するには、生物による製造が本来有する不確実性に基いた適切なリスクの評価とマネジメントが必要である。リスクを負うことはかまわないが、何とか一歩ずつそれに対処することが必要である。

次に、彼はミクروسケールの反応装置技術に基づいたプロセスのデザイン及び最適化の戦略を示した。通常バイオ製造業者のモデルプロセスは容量として 100 L までの小さな反応槽であり、このスケールを用いて先に述べたような検討を行うには、多くの時間、バッファー、細胞及び研究室のリソースが必要となる。このマイクロ反応槽は、バイオプロセッサ社 (Woburn, MA) により製造され、マイクロ流体チャンネルを通じて栄養物、バッファーが供給される約 300 μ L の容器である。マイクロ反応槽と大規模の発酵槽におけるこれまでの検討結果はすべての点においてよく似ており、反応槽間の変動も非常に低い。

最後に、彼は製造業者、学者、規制当局といった利害関係者に対して新たな呼びかけを行った。Follow-on product の普及を促進させるために必要となる重要な分析及びプロセスとして以下の点があげられる。①産業界、規制当局、学者の間における

共通の言語、②絶対的そして相対的の両方の点でたん白質の性状の測定が可能な分析方法、③リアルタイムの分析、④臨床試験の必要性和プロセス及び製造科学の調和、④純度、構造及び有効性の解析に用いる標準物質に関する問題点の解決、⑤構造、有効性において許容できる不確実性、及び不純物、変異体、混入物の分析測定に対する理解、⑥リスクの連続にうまく対処する戦略、⑦一点に集中させた技術の構築、⑧製品とプロセスの改善を妨げる制約の回避。

Erick Fernandez (バージニア大学) は製品における不純物、凝集体、翻訳後修飾及びフォールディングの変異体などの様々なフォーム及び混入物のクロマトグラフィーにおける分離及び溶出の変動がたん白質製品の品質に及ぼす影響について発表を行った。バイオ製造業者はクロマトグラフィーにおける変動は示せるが、その傾向の多くは予測できない。したがって、クロマトグラフィーが製品の品質に及ぼす影響を解析できる新しい解析手段、最終的には、変動を予測できるような手段の開発が今後必要となる。

Sarah Harcum (クレムソン大学) は反応槽が製品の品質に及ぼす影響について製造工程を中心に発表を行った。今日非常に多くの発現系が組換えたん白質の発現に利用されているが、これらは神の恵みと同時にのろいでもある。そのような発現系には、大腸菌、酵母、昆虫細胞培養、トランスジェニック動物及び植物、哺乳類細胞培養系など非常に多くの種類がある。それぞれの系におけるたん白質の生産では、分解プロファイル、翻訳後修飾、構造特性が異なる。そのような違いのすべてがたん白質の類似性、最終的には安全性及び有効性に影響を及ぼす可能性がある。更に、細胞培養及びたん白質の製造に用いる装置には、バッチ培養、培地の供給を行うバッチ/灌流培養、持続培養など様々なタイプがあり、発現された製品のプロファイルはそれぞれの系において異なる。

製品の品質、特にグリコシレーションは温度、栄養物の供給の制限及び増加、pH、アンモニア濃度、二酸化炭素濃度、浸透圧のような環境条件により影響を受けやすい。したがって、細胞の中で起きていることについてあらかじめよく理解することが必要である。製品の品質は製造中に変化するので、再現

性のある品質を得るためには、一定に制御されたプロセスを確立することが必要である。

Francois Baneyx (ワシントン大学) はたん白質の再生及びフォールディングについて発表を行った。非常に複雑な細胞内の環境下で、たん白質のフォールディングが起きることは注目に値する。フォールディングは異性化あるいは一次反応のようなものである。非常にストレスのかかる条件ではフォールディングはエネルギー的に形成されにくい。

それにもかかわらず、フォールディングは、フォールディングの促進因子である分子シャペロンとフォールダーゼにより形成されやすくなり、実際 *in vivo* で容易に起きる。*in vitro* におけるフォールディングの形成機構は *in vivo* とは大きく異なっている。たん白質がフォールディングされた状態は熱力学的に安定であり、フォールディングに必要な情報はアミノ酸配列に備わっている。しかし、天然のシャペロンは製造、処方、パッケージングの操作において存在しない。更に、たん白質濃度が高い場合は、凝集が起りやすくなる。

したがって、製造業者は、アミノ酸、シクロデキストリン、界面活性剤のような凝集の抑制剤、糖、ポリオール、塩、グリシン及びアラニンのようなフォールディングの促進因子、自然界のシャペロンと同様な活性を持つたん白質の添加剤、ジスルフィド結合を促進する化合物あるいはたん白質の酸化還元剤を加えて凝集を抑制し、フォールディングの形成を促進する必要がある。部分的ではあるがフォールディングを回復させるためのアプローチとして、イオン交換、ゲルろ過、疎水性相互クロマトグラフィーのようなマトリックスを用いた再フォールディングがある。たん白質の濃度が1L当たり1gあるいはそれ以上の場合、たん白質を高い圧力で数時間あるいは数日の間処理することにより、再フォールディングが促進される。

6. 不純物と混入物

6.1 発表の要旨

①不純物を特性解析することは困難であるが、どのような生物学的な製品の承認においても不可欠である。

②不純物は先発の製品との同等性を示すうえにおいて重要な成分であるため、不純物のプロファイ

リングは follow-on 製品において特に重要である。

③プロテオミクス研究の技術は FOB の合理的な分析において重要な役割を果たしている。

6.2 発表の詳細

多くの因子、中でも製品の不純物のプロファイリングが FOB の考え方及びそれぞれの FOB を最終的に成功に導くポイントとなる。Kathleen Clouse (FDA) は主な混入物についてその由来及び重要性について概説した。

プロセスに関連する不純物は、様々な製造工程に由来するものと考えられる。培地の成分、化学物質の添加物、浸出物、細胞成分、外来性の病原菌などがある。製品に関連する不純物は副生成物と呼ばれるものと似ている。この場合、副生成物はたん白質製品と関連しているが、安全性及び有効性の観点で望ましい製品と同等である場合とそうでない場合がある。

不純物の特性解析は最も困難なことの一つである。特に、不純物が臨床に及ぼす作用について考える場合、不純物は製品の同一性あるいは類似性を判断するうえにおいて重要なポイントである。混入物の場合はなおさら厄介となる。血漿由来の製品の場合は不純物の混入が非常に微量の場合でも有害事象を起こす可能性がある。血漿由来製品は組換えたん白質に比べて、投与が高頻度でかつ高投与量の場合が多いため、不純物の影響は血漿由来製品において増強される傾向がある。

したがって、FOB の製造業者は問題となる不純物について、投与量、投与ルート、製品の品質及び安定性に及ぼす影響などを考慮にいれ、安全性、毒性、生物活性に基づいた規格を設定する必要がある。最終的に、FOB の製造業者は不純物及び製品類似物による有害効果を最小限にするため、製造工程は適切でかつ一定の品質が確保される製品が提供できるように設定する必要がある。

彼はプロセスのできるだけ初期において不純物として存在する可能性のある物質を明らかにするための案を示し、その中で、様々なレベルの混入物がもたらすリスクを明らかにすること、不純物を最小限にするための方策を設定すること、製造工程における不純物の除去についてその妥当性について検証することが重要であると指摘した。

しかし、分析により可能な不純物と製品の変異体

の区別の限界, 検出できない不純物の影響, 不純物が製品の複雑性に及ぼす影響, 不純物が望ましい製品の特性解析に及ぼす悪影響, などの問題は解決する方向に進んでいるが不明の点が多い。

Timothy Veenstra (SAIC-Frederick 社) は不純物による治療用たん白質の確認の妨害について発表した。彼は間質性膀胱炎に関与するたん白質の解析において, 分子量 10 kDa 限外ろ過膜の素通り分画にたん白質の活性を発見した。しかし, MS の断片化パターンからペプチドには 200 個のグルタミン残基が含まれることが示唆された。その推定分子量は 10 kDa よりはるかに大きく, 先の限外ろ過膜の結果と矛盾した。最終的に, MS で検出されたものは葉酸の構成成分であるポリグルタミン酸であることが明らかとなり, 葉酸の混入により目的たん白質の検出が妨害されていたことが示された。その他, たん白質溶液にグリセロールやテレフタル酸ポロエチレンが含まれている場合, MS 値にその値も反映される。ケラチンは手や毛髪に含まれており, たん白質の不純物として検出される代表的なものである。電気泳動において単一のバンドとして検出される場合でも, 目的たん白質以外に複数のたん白質が検出される場合がある。

生物学的製剤の製造において残念な点は, 完全に精製することができないということである。Nadine Ritter (生物学的製剤のコンサルティンググループ) は製品から除去できなかった host cell protein (HCP) の分析に用いるイムノアッセイについて発表を行った。望ましい製品とともにフィルター及びクロマトグラフィーのカラムを通り抜ける HCP については, 免疫原性の観点から注意深い評価が要求される。生物学的製剤における不純物の試験の多くの場合と同様に, HCP はイムノアッセイにより正確に測定できるとはいえない。一般的に, HCP の混入は通常 ppm のオーダーにおいて可能な範囲でかつできるだけ最小限に抑えるべきである。しかし, HCP の正確な上限は, 投与量と投与頻度そして生産プロセスの違いにより確立されていない。したがって, 製造業者が HCP の測定にイムノアッセイを用いる場合, 製品と一緒に精製される可能性のある様々な大きさの HCP がそのアッセイによりどの程度まで定量できるかを評価し, ゲル及びイムプロットを用いた抗体反応の妥当性について検証する必要

がある。各製造業者は独自に開発あるいは特注した一種類のイムノアッセイを用いて HCP を測定している場合が多いが, 市販されているイムノアッセイと併用することにより, HCP の混入についてより詳細な情報が得られる。

7. バイオアッセイと力価

7.1 発表の要約

①バイオアッセイはたん白質性治療薬の非臨床活性と力価を決めるうえで最も根本的な方法である。

②同等性とは同じ会社により製造されたたん白質間における類似性を指す。FOB において有効な用語は類似性である。

③バインディングアッセイと機能的なアッセイはそれぞれたん白質の特性解析において重要な役割を果たしている。

7.1 発表の詳細

Steven Kozlowski (FDA) は治療用たん白質の生物活性を評価するためのバイオアッセイと力価について概説した。

生物学的製剤の製造業者は製品に関する山のよう多くの理化学的な情報を入手する。これまで理化学的な分析方法の有用性について多くの発表があったが, それだけで高次構造の全体像を把握することは困難である。しかし, 分子の生物活性から高次構造と機能との関連について推測できる。この場合, 分子の生物活性とは特定の望ましい生物学的な効果であり, その効果の定量的な測定として力価で規定される。

FOB を開発する製造業者は先発の製造業者が行ったように, 生化学的な, 組織, 動物, あるいは細胞をベースにしたアッセイを組み合わせを行い, 活性/力価を示すことが必要である。

力価の最初の測定として, 従来からの細胞を用いたバインディングアッセイを行うことが適切な場合もある。結合の測定に, 表面プラズマ共鳴, 超遠心のような理化学的な方法及び熱量測定を用いるたん白質の化学者が急増している。ある特定の濃度におけるバインディングアッセイからは一種類のデータしか得られないのに対して, これらの技術からは多くの情報が得られる。例えば, 表面プラズマ共鳴では一分子における一回の実験から複数の結合が測定できる。

FOBを成功させるコンセプトとして、力価の測定はFOBの開発のどの段階においても不可欠である。開発初期において、研究所のレベルで有用なアッセイを用いることにより、製品において予測される活性及び毒性の問題に関する情報を得ることができる。開発後期においては、力価のアッセイは妥当性が検証されていること、妥当性が証明された標準物質を用いていること、規格値の変動は妥当性に基づいて設定されていることが必要である。力価のアッセイについて妥当性が検証されていない場合は、製品の承認が困難となる。最終的に、アッセイは、工程内試験、安定性の検証プログラムそして製造工程の変化のモニタリングに用いられ、開発における後期の段階及び製品の出荷ステージを円滑に進めるうえで重要な役割を果たす。

同等性と類似性という言葉は多くの場合ほとんど同じ意味で用いられているが、微妙な違いがある。同等性とは、通常同一製造業者により例えば12日の発酵を15日の発酵に置き換えるような、異なったプロセスを用いて製造されるたん白質の場合を示す。生物学的医薬品においては、二つの製品が品質、安全性、有効性において有意な違いがない場合に同等という言葉を用いる。類似性は二つの異なった製造業者からの製品に用いられる点以外は同等性と本質的に同じ意味である。FDAは同等性に関するガイドラインは公表したが、類似性についてのガイドラインはまだ公表していない。FOBの開発業者が妥当な科学的原則を適用して類似性を示す場合、少なくとも同等性と同一ような厳密な基準に基づいている必要がある。

Lauren Little (バイオクオリティ) は酵素治療薬の特殊なケースについて発表した。一方、C. Jane Robinson (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)) はバイディングアッセイと機能的なバイオアッセイとの比較について発表した。

生物学的医薬品の試験に関するICHQ6Bガイドラインにおいて、力価とは適切で定量的な生物学的アッセイを用いた生物活性の測定と定義され、生物活性とは製品が明確な生物学的効果をもたらすことができる固有の能力として定義される。しかし、バイディングアッセイでは、製品と受容体、抗体、あるいは他の分子との結合は評価できるが、バイ

ディングによりどの場合でも機能的な反応が誘導されるとは限らない。バイディングアッセイにより力価に関する情報を得られるかどうかはそれぞれの製品とアッセイにより異なる。

FOBあるいはbiosimilarが先発の製品と同様な臨床効果及び安全性プロファイルを有していることを示そうとする場合、機能的なバイオアッセイとバイディングアッセイの両方が有用である。バイディングアッセイでは、特定のバイオアッセイにより決められる力価には影響を及ぼさないが、分子のエピトープが免疫原性のような臨床に関連した性質に影響を及ぼす可能性のある場合はその違いを示すことができる。

生体分子の特性解析の目的が同等性あるいは類似性の検証である場合、バイディングアッセイ及び機能的なバイオアッセイの両方も有用である。バイオアッセイでは、機能的な反応、生物活性及び力価が測定され、その結果に基つき他の異なったバイオアッセイ系における力価を予測することができる。機能的なバイオアッセイでは、あるエピトープが受容体に対するバイディング及びサブユニットの結合に関与し、その関与がシグナル伝達及び反応に影響を与える場合、そのエピトープの違いも感度よく検出できる。

対照的に、バイディングアッセイでは、必ずしも生物学的な反応には関与しないが、あるエピトープと複数の関連する生物学的な分子の会合が一般的に測定され、特定の相互作用に関与するエピトープの違いを感度よく検出できる。特定の機能的なバイオアッセイとバイディングアッセイの相関はそれぞれの製品及びアッセイにより異なる。最も完璧に分析しようとする場合、両方のアッセイが必要となる。

David Bunk (NIST) は力価を決定するうえでポイントとなるたん白質濃度の測定法について発表を行った。彼は標準的な測定法として重量測定、ケルゲール法、色素を用いた測定、紫外吸収スペクトル、イムノアッセイ、アミノ酸分析について概説し、その中でアミノ酸分析が精度の高さ及び妨害物質による影響の受けにくさから標準法として最も適切であることを指摘した。次に、たん白質濃度の測定例として、SRM-2921とよばれるヒト心臓成分複合体の標準品の作成プロセスを示した。最後に、たん白質の酵素消化により得られたペプチドのMS分析

によりたん白質の定量が行える可能性を指摘した。ペプチドの配列はそれぞれのたん白質で異なっているため、本法は他の方法と比べて特異性が高く、ヒトの組織のような非常に複雑な混合物におけるたん白質の含量測定にも応用が可能である。本法は酵素消化を必ずしも完全に行うことができないため定量性に問題があるが、アイソトープで標識した標準品を内部標準として用いることにより解決できる。

8. 活性成分の類似性を評価する

8.1 発表の要旨

① Follow-onを開発する製造業者はその製品を比較する標準品を入手することが困難である

② たん白質に用いる多くの分析技術では相対的な測定結果しか得られないので、標準物質との比較は不可欠である。

③ 開発業者は従来からのたん白質分析技術以外の技術にも着目し、そのような技術を積極的に取り入れることによりたん白質性医薬品の分析がより信頼できるものになるよう努力するべきである。

8.2 発表の詳細

Emily Schacter (FDA) は標準品の重要性について概説した。

たん白質で用いる分析技術のほとんどでは絶対的な値が得られないので、FOBがその品質、有効性などにおいて先発製品と類似しているかどうかを判断するには妥当性が検証された標準品と比較する必要がある。これらの技術を用いた結果は、アッセイを行うオペレーターにより強く影響を受けるので、比較となるものがない状態で行ってもその結果を客観的に評価することは困難である。しかしそこには頭の痛い問題がある。それはFOBを開発する製造業者は処方されたものしか先発医薬品を入手することができないため、比較分析を行うことは本質的に困難であるという点である。最終製剤には賦形剤、界面活性剤、たん白質、化学的な安定剤、糖、緩衝液が含まれており、そのすべてにより特性解析が妨害される。一方、これらの成分を除くとたん白質が理化学的な変化を受け、比較すること自体が無意味になってしまう。そこで開発を行う製造業者は処方をリバース・エンジニアリングし自社の製品を先発の製品とそっくりまねる。その場合でも、出荷される製品に用いられているものと同一なバイオアッセ

イについての情報及び不純物の測定に用いる標準物質を入手することはできない。異なったアッセイを行えば、そのエンドポイントも異なる。

その解決は標準品と標準物質である。Adrian Bristow (NIBSC) はバイテク製品の標準物質を開発する試みについて発表をした。

World Health Organization (WHO) は広範囲の生物学的製品について400種類の標準品を保存、維持、整備しており、その総数は200万本以上である。これらはこれまでに紹介のあった広い範囲の生物学的及び理化学的分析法において標準品として用いられている。二番目に重要な国際標準物質は局方の標準品であるが、その標準品は局方の各条に記載されている分子に限定されている。

WHOのエリスロポエチン標準品は含量が国際単位で規定されており、1アンブル当たり1 μ g以下という非常に低濃度で配布され、たん白質の賦形剤が含まれている。一方、ヨーロッパ薬局方のエリスロポエチン標準品にはたん白質の賦形剤が含まれておらず、1アンブル当たり250 μ gで配布される。したがって、ヨーロッパ薬局方のエリスロポエチン標準品は理化学的な分析に多く使用されている。その二つも含めたどの標準品も今後数年のうちに急増することが予想されるFOBに対して十分対処することはできない。

方法に依存しない標準品の開発及び製剤と同じ処方をした標準品の開発が今後の課題である。更に重要なことはFOBの利害関係者が分子的及び生物学的に最も重要となる性状を規定し、この特性を示せる分析論を定めることである。

彼は最後にプロテオミクスの研究者に対し以下のような提言を行った。我々は本当に素晴らしい科学を見てきた。しかし、我々は彼らに対して適切とは思えない問題を解決するようお願いしたかどうか分からない。彼らが分子に対する軽微な修飾を見つけ出す機会がますます増えている。しかし、そのような修飾は無視できるほど少なく、臨床との関連を証明するのは非常に困難であり、問題とすべきかどうか正視する必要がある。彼らは血清1mL当たりナノグラムのたん白質を対象とし、その分析技術を開発することについて議論しているが、そのようなことはどうでもいい。ぜひ製剤でやるべきである。その場合、技術的には恐らくそれほど問題にならない

いと思われる。

9. 結論

会議を終えるにあたって Emily Shacter (FDA) は会議の内容を要約した。

たん白質製品の構造、機能、純度を明らかにするには、一連の直接的な分析方法を用いる必要がある。FDA としては、第一義的な試験結果だけでなく、アルゴリズムによる様々な試験結果の比較に基づいた類似性に関する検討結果に興味がある。行う試験の種類が多ければ多いほど、類似性の程度に関して出される結論に確信が持てるようになる。

続いて Steven Kozlowski (FDA) は将来の課題について概説した。

彼はバイオテクノロジーについて遺伝的な操作により超強力な細菌が生み出されると恐れられていた初期から、一般的に受け入れられている今日までの歴史的な流れについて示した。彼は我々が望ましい製品について見ることができる範囲という表題をつけ、出荷試験、特性解析、製造工程から構成される生物学的製品について望ましい製品を氷山に例えたモデルを示した。特性解析の技術は進歩していることがこの会議で示された。たん白質の複雑性を含め氷山は大きくなっているが、一方、製造工程はより細分化されてきている。しかし、同時に FDA は別の方向から製造工程において何が重要であるか理解することを奨励したい。望ましい製品を得るための地図を入手し更に製造工程をより優れたものに改善するには、製品にとって重要な特性を規定するとともに、製品の製造において重要となる工程に目標を定め、更には不適切な変異体を規定することが必要である。それにより製造工程がより良いものになるとともに、製造工程に柔軟性を持たせることができ

る。その達成は非常に困難ではあるが、我々が心から希望することである。

おわりに

以下に今回のワークショップ及びそれに関連する話題について私見を述べる。これまでもアメリカにおいて 2004 年 9 月及び 2005 年 2 月に FOB に関するワークショップが開催されたが、臨床試験を含めた承認申請に至るプロセスの簡略化の是非について先発の製造業者と FOB を開発する製造業者の意見が鋭く対立し、進むべき方向性を見出すことはできなかった。今回のワークショップは、臨床試験の必要性について議論する前に、科学的な観点から FOB と先発品の類似性を示すためのより適切な方策について議論することを目的として開催されたものと思われる。そのような観点では本ワークショップは分析手法を中心とし多岐にわたる科学的観点から FOB と先発品の類似性を示すための方策についてその現状と問題点の詳細を再認識できた点で非常に有意義であった。今回のワークショップで示された方向性については参加者より特に異論はなかったように思われる。最近、ヨーロッパ及びアメリカにおいて相次いで FOB に該当する医薬品の第一号として成長ホルモンである Omnitrope が認可された。このような医薬品の日本における承認申請が行われる日もそう遠くないように思われる。今回議論された内容は日本において同様な問題に対処する際にも参考となると考えられる。

謝辞

本報告は厚生科学研究費補助金特別研究事業 (H17-特別-030) として実施されたものである。

血管新生療法の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 日向 昌司*, 野間 誠司**,
川西 徹*, 早川 堯夫***

(受付:平成18年5月16日, 受理:平成18年8月30日)

State and Perspective of Therapeutic Angiogenesis

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*, Masashi HYUGA*, Seiji NOMA**,
Toru KAWANISHI* and Takao HAYAKAWA***

はじめに

血管系は我々の体の中で最も大きな組織であり、角膜と軟骨など一部の組織を除きすべての組織に存在する。そのため、多くの組織における血管の損傷は様々な疾患の原因となっている。実際、心臓や脳の大動脈あるいは中動脈におけるアテローム性動脈硬化症による閉塞が生じることで脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。これらの疾患はいずれも血管の機能が失われ虚血となることで発症するもので、先進国に共通する致命的な疾患の一つとなっている。現在、その治療法の開発が重要な課題となっている。

虚血性疾患の一つである虚血心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率及び死亡率が高く、米国の場合その患者数は1000万人以上であり世界全体では数億人にも達する¹⁾。

虚血心臓病の症状は、心筋の損傷がない労作性狭心症から、左心室において可逆的及び非可逆的な障害のある心筋虚血の段階、非可逆的な心筋障害の段

階、鬱血性心不全に至る壊死まで幅広い。その進行速度は主として動脈硬化性プラークの成長あるいは一過性の破裂に依存している。このような症状が進行すると慢性的な安定狭心症あるいは心筋梗塞を含む急性冠状動脈症候群になり、心外膜冠動脈において血流が障害される。その結果、冠動脈血液により酸素が必要量供給されない場合、心臓組織が虚血になり冠状動脈の灌流が心筋の酸素要求性に対応できなくなる。虚血組織に対して血液の供給を回復させるには、冠状動脈灌流を改善させる必要がある。その戦略として従来から用いられてきた治療法は、冠動脈バイパスあるいは冠動脈血管形成術のような外科的に障害が起きた心筋に対して血流を物理的に回復させる方法、亜硝酸や β -ブロッカーのような薬物を投与することで心筋の酸素要求性を低下させ灌流の供給/需要のバランスを回復させる方法などがある。

しかし、従来の治療法では改善されない症例は少なくなく、虚血心臓病は増加の一途を辿っている。また、侵襲的な治療法では効果的な再血管形成が期

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都中央区日本橋小伝馬町 13-4 共同ビル 4 階
(〒103-0001)

The Japan Health Sciences Foundation, Kyodo Bldg. 4F, 13-4 Nihonbashi, Kodenma-cho, Chuo-ku,
Tokyo 103-0001, Japan

*** 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

待できない、いわゆる選択肢のない末期の冠状動脈疾患の患者の存在も無視できない^{2,3)}。これらの患者は一般的に高齢で、瀰漫性冠状動脈疾患、末梢小血管、高コレステロールレベル、糖尿病などの合併症を有していることが特徴で、このような状態では生体に本来備わっている虚血に対する血管新生及び動脈形成能そのものが低下している⁴⁻⁶⁾。したがって、このような状態の患者は、従来の血管再生術による治療が困難となる。今後、高齢化に伴いこのような症例が増加することが危惧される。冠状動脈アテローム性動脈硬化症もこのような症例の一つである。虚血性疾患の原因となる冠状動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。その発症率は65歳以上では1000人当たり10人であるが、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合において大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていない。しかし、侵襲的な治療では血管は再形成されない³⁾。更に、鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人(165%の増加)と年々増加しており問題となっている¹⁾。

このような疾患に対して、血管新生療法は既存の血管から新しい血管を再生させるものであり、罹患した動脈の機能を再建することが部分的ではあるが可能である。実際、血管新生療法に関する動物モデルを用いた研究及び前臨床試験では血管の成長促進(血管新生)は標的器官の灌流と機能を改善する上で効果的であることが示唆されている。

本稿では、これまで試みられてきた血管新生療法として、たん白質製剤を用いた療法、遺伝子治療、細胞治療を取り上げ、その現状及び今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基本となる血管成長の生物学的プロセスに関する最近の知見について概説する。

1. 血管新生“neovascularization”の生理的な概念

血管発生“vasculogenesis”、狭義の血管新生“angiogenesis”、動脈新生“arteriogenesis”は理論的

に異なったプロセスであり、これらのプロセスを経て広義の血管新生“neovascularization”が起きる⁷⁾。なお発生学の観点からは、広義の血管新生“neovascularization”は血管発生と狭義の血管新生“angiogenesis”に大別される。なお、特にことわらない限り本稿において血管新生と述べるときは狭義のものでangiogenesisを指す。

血管発生とは内皮前駆細胞“endothelial progenitor cell”(EPC)からの*in situ*における血管形成のプロセスである。また、血管は既存の血管から発芽するか、あるいはトータルとして血管新生に分類されるプロセスである。内皮及び造血幹細胞は共通の幹細胞である血管芽細胞に由来する⁸⁾。卵黄嚢において血管芽細胞は細胞集合体あるいは血島を形成し、それらの中心部に位置する造血幹細胞は血球系に、辺縁部に位置するEPCは内皮細胞にそれぞれ分化する。EPC及び血管芽細胞が末梢血から分離されてEPCが活発な血管新生部位の中に見出されるまでは¹⁰⁻¹²⁾、これらの細胞は胎児の発達のみに関与すると考えられていた。血管発生は狭義の血管新生とともに、成人組織における広義の血管新生に寄与すると考えられている^{13,14)}。また、組織虚血によりEPCが新生血管へ強制動員されて取り込まれるという知見がある^{15,16)}。しかし、EPCの新生血管への取り込みを否定する知見もあり¹⁷⁾、統一した見解は得られていない。EPCと造血幹細胞の表面マーカーはFlk-1, Tie-2, c-Kit, Sca-1, CD133, CD34のように同じものが多く、マーカーにより単純にEPCを規定することはできない。EPCにはVE-カドヘリンそしてAC133も発現する。AC133はEPCに特異的に発現するオーファンレセプターであり、EPCが成熟内皮細胞に分化すると発現は消失する¹⁸⁾。EPCの前駆細胞としては、造血幹細胞、サイドポピュレーションの細胞(CD34⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺)¹⁹⁾及び多能性成人幹細胞あるいはmultipotent adult progenitor cell(MAPC)(CD34⁻, CD45⁻, c-Kit⁻, GlyA⁻)^{20,21)}のような骨髄由来幹/前駆細胞がある。

血管新生とは後毛細血管細静脈からの新しい毛細血管の発芽である。それには、内皮細胞の活性化、細胞外マトリックスの分解、増殖、遊走更には周皮細胞そして平滑筋細胞の強制動員に依存した新しい血管壁の安定化のプロセスが関与している²²⁾。血管

新生の促進は、生理的及び病的条件下において低酸素状態あるいは虚血により起こる。なお、虚血における生体の反応を Fig. 1 に示す。

転写活性化因子である“hypoxia-inducible factor 1” (HIF-1) は、恒常的に発現する HIF-1 β サブユニットと酸素により調節される HIF-1 α サブユニットのヘテロダイマーである^{23,24)}。HIF-1 α は低酸素により起きる血管新生の促進において中心的な役割を果たしている。HIF-1 α は VEGF, Flt-1, neuropilin-1, “angiopoietin-1” (Ang-1), Ang-2, PDGF, “placental growth factor” (PlGF) のような各種血管新生メディエーターの発現を調節する^{25-28,29)}。更に、HIF-1 α の Ang-1 及び Ang-2 に対する作用は細胞により異なり、活性化因子あるいは抑制因子として作用し、内皮細胞の増殖あるいは内皮細胞-平滑筋細胞の相互作用を調節する²⁷⁾。HIF-1 α の活性化は TNF- α , IL-1³⁰⁻³²⁾, PR39³³⁾ のような炎症性サイトカインにより誘導される。

内皮細胞の遊走及び増殖は毛細血管の管腔形成に必要であるが、これらの作用は“plasminogen activator” (PA)/プラスミン系のプロテアーゼ, MMP, ヘパリナーゼにより調節される。プラスミノゲンは様々な部位に存在する血漿たん白質であり、PAである u-PA 及び t-PA によりプラスミンに転換される。プラスミンは特定の“matrix metalloprotease” (MMP) により活性化され、ファイブロンectin, ラミニン, プロテオグリカンのような細胞外マトリ

ックスたん白質を分解する。また、その分解は“tissue inhibitor of metalloprotease” (TIMP) 及び“plasminogen activator inhibitor-1” (PAI-1) により阻害される。

新しい血管の成熟には、PDGF, TGF- β , Ang-1 による未熟な内皮細胞ネットワークの安定化が関与していると考えられている。また、その安定化のプロセスには、周皮細胞/平滑筋細胞の増殖及び分化の促進、内皮管への強制動員及び内皮細胞の再プログラミングが含まれる。この期間において、動脈あるいは静脈のどちらに分化するかの決定及びその発達も決まる場合がある。著しく障害された動脈が再形成されるためには血管が外側へ向かってリモデリングされる過程が必須である。そのプロセスは側副の形成あるいは動脈形成と必ずしも同一ではないが、基本的な機構は類似していると考えられている。一方では、EPC が血管新生と動脈形成の両方に関与するともいわれている^{34,35)}。

動脈形成は成熟のプロセス、あるいは恐らく側副導管の *de novo* の成長のプロセスであり、有効に血流を運ぶことのできる血管を産生する^{36,37)}。動脈形成の促進には、閉塞した動脈に近接した部位における剪断応力の増加、及びその後起きる血液由来の単核球細胞の蓄積が重要と考えられている。また、動脈形成の促進因子には CXC ケモカイン, FGF, PDGF, VEGF など数多くの増殖因子が関与している³⁷⁻⁴¹⁾。動脈形成の重要な点は、側副の発達が

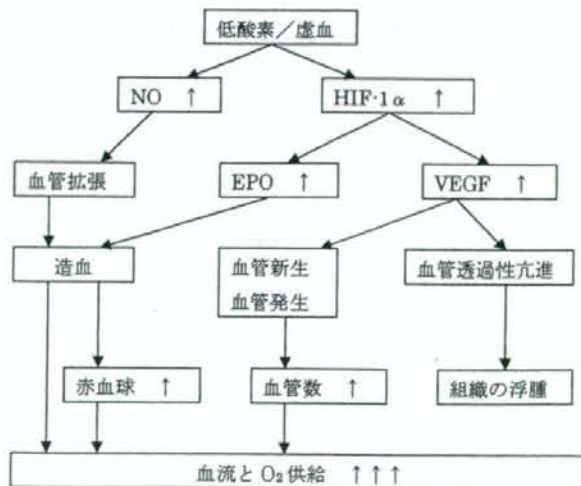


Fig. 1 虚血に対する組織の反応

血管新生と同様に漏れが生じている血管において *de novo* で起きるか、あるいは既存の血管が再構成されて肥大化により起こるからである。既存の側副の広さは種間において大きく異なり、関与するその他の因子について解明が不十分である。したがって、このような側副の発達プロセスが実際に起きているかどうかについてはよくわかっていない。げっ歯類の後肢虚血モデルでは既存血管が再構成される。既存の側副の数及び成長は遺伝的な因子に影響され、種内及び種間で変動すると考えられる³⁷⁾。

血管新生が開始された後、どのようなプロセスを経て動脈のネットワークが効率的に形成されるかについては不明の点が多い。例えば、血管新生が体系的に起こり、その結果として動脈及び静脈が形成されるプロセスに関する分子及び血流力学的な機構に関する研究は始まったばかりである。動脈-静脈を規定する因子に関する知見は、ゼブラフィッシュの研究がほとんどである。血液循環が始まる前の段階で、VEGF, Notch-Jagged, Ephrin が動脈-静脈を規定すると考えられる⁴²⁾。

2. 血管新生療法において有望な増殖因子

2.1 VEGF

VEGF ファミリーは現在研究が最も進んでいる血管新生促進因子であり、その中で典型的なものは VEGF-A である。少なくとも四種類のアイソフォームの VEGF-A が選択的スプライシングの結果として生成され、121 (VEGF₁₂₁), 165 (VEGF₁₆₅), 189 (VEGF₁₈₉) 及び 206 (VEGF₂₀₆) がある⁴³⁾。VEGF₁₄₅ のような他のアイソフォームも知られているが、その意義については不明である⁴⁴⁾。VEGF のアイソフォームにはヘパリン結合能における差異があり、また血管新生能も異なる。VEGF₁₆₅ と VEGF₁₂₁ はヘパリンには結合せず、血液循環中で検出される。しかし、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ と異なり他の細胞表面受容体である neuropilin-1 に結合し、neuropilin 結合領域の欠損した VEGF₁₂₁ に比べて活性が高い⁴⁵⁾。VEGF₁₆₅ の血管新生能は VEGF₁₂₁ に比べてはるかに高い。一方、VEGF₁₈₉ と VEGF₂₀₆ はヘパリン硫酸に対する親和性が高いため、細胞あるいはマトリックスに結合したままの状態が存在する。VEGF ファミリーは他に VEGF-B (VEGF-3), VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D,

VEGF-E 及び PIGF が知られている。VEGF-E はウイルスたん白質であり、そのホモログは哺乳類に存在しない。VEGF は三種類のいずれかあるいはすべての種類の VEGF 受容体チロシンキナーゼ、flt-1 (VEGFR-1), KDR/flk-1 (VEGFR-2), flt-4 (VEGFR-3) に異なった親和性で結合する。VEGFR-2 はその中でも血管新生のシグナルトランスダクションを最も強く活性化し、また、VEGFR-2 ほどではないが VEGFR-1 も PIGF 及び VEGF-D が結合することにより同様に活性化し、VEGF-D は VEGF ファミリーの中で骨格筋における血管新生及びリンパ管新生の最も強力な誘導因子である⁴⁶⁾。

VEGF は内皮細胞に対して血管新生促進を促進し、それには遊走促進、透過性促進、生存促進、PA 及び間質性コラーゲナーゼの生成促進などが関与している^{47,48)}。VEGF は平滑筋の遊走は促進するが、平滑筋細胞及び繊維芽細胞の増殖は促進しない⁴⁹⁾。VEGF は血管パターンの形成に至る血管芽細胞の成長及び形態形成を誘導する⁵⁰⁾。VEGFR-3 の役割については十分解明されていないが、リンパ管新生に関与していると考えられている⁵¹⁾。PIGF は後肢及び心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁵²⁾。

VEGF-A はその他に以下のような様々な血管新生促進作用を示す。①内皮細胞の培養において管様構造を誘導する。② *in vivo* マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミングを促進することから、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。

VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈ のノックアウトマウスは虚血系心筋を発症し、心筋血管新生障害による心臓疾患のため、生後 14 日以内に死亡する⁵³⁾。VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈ の欠損により誘導される致死性のフェノタイプは、VEGF₁₄₅ と VEGF₁₂₀ が発現してもレスキューされない。三種類の VEGF 受容体のどれかを破壊すると胎生致死になる。最も顕著なフェノタイプは VEGFR-2 の欠損であり、血管形成が完全に障害される⁵⁴⁾。ホモ接合性 VEGFR-2 遺伝子欠損では血管の形成が不十分で、胎生 8.5 日で死ぬ⁵⁵⁾。

VEGFR-3の欠損では胎生9.5日後初期血管叢の再構成が障害され循環不全となる⁵⁶⁾。したがって、血管の初期における発達にはすべてのVEGFRが協調的に発現する必要がある。

2.2 FGF

FGFには酸性FGF (FGF-1)及び塩基性FGF (FGF-2)だけでなく21種類の構造が関連したポリペプチド増殖因子が含まれる^{57,58)}。FGFはチロシンキナーゼファミリー細胞表面受容体及び非チロシンキナーゼ受容体syndecan-4に結合し、生物学的な作用を示す^{59,60)}。FGFはVEGFと同様に、内皮細胞の増殖、遊走及びPA及び間質性コラーゲナーゼの生成を促進する⁶¹⁾。また、FGFはVEGFと異なり、中胚葉及び神経外胚葉由来のほとんどの細胞、例えば周皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖を促進する⁶¹⁾。FGF-4は後肢虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁶²⁾。FGF-2は胎児及び培養系においてウズラの上皮の体節に作用し血管芽細胞への分化を誘導する⁶⁰⁾。

2.3 PDGF

PDGFはPDGF-AからDより構成されるファミリーのメンバーであり、VEGFと構造的に類似している⁶³⁾。その中でもPDGF-BBが最も作用が顕著であり、血管成長促進活性を示すと共に、周皮細胞による新しく形成された血管構造のコアティングを促進することにより、動脈形成を促進及び安定化する^{64,65)}。更に、PDGF-BBは側副を誘導する⁶⁶⁾。

2.4 その他の増殖因子

G-CSF, GM-CSF及びMCP-1は単核球の流入を促進することにより、動脈形成を促進する。HGF⁶⁷⁾、IL-6⁶⁸⁾、MCP-1⁶⁹⁾は内皮細胞培養系において管腔構造を誘導し、血管新生因子として作用すると考えられている。また、これら因子は*in vivo*マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する⁶⁹⁾。HGF⁷⁰⁾及びIL-6⁷¹⁾は内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周囲あるいは中へのホーミングを促進し、成人における血管発生も誘導する。VEGFの過剰発現により炎症が誘導されるが⁷²⁾、HGFはその誘導を抑制する⁷³⁾。一般的に、血管新生促進作用を有する増殖因子はラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する⁷⁴⁾。Ang-2のみが発現した状態では、

内皮細胞同士の結合が緩みアポトーシスが誘導されるが、VEGFの共存下では内皮細胞の生存に必要なシグナルが生じ、細胞の解離により増殖及び遊走が起きる⁷⁵⁾。一方、Ang-1は静止状態に発現するが、血管透過性の減少、内皮細胞の結合及び内皮細胞周囲の細胞の動員による血管安定化といった作用が示唆されている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。Ang-1は静止状態をより安定化させることが示唆されているが、単独あるいはVEGFと組み合わせて過剰発現すると血管新生及び動脈形成を促進する^{80,81)}。Ang-1は後肢及び心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁸²⁾。TGF- β はマウス胎児の外側の中胚葉に作用し卵黄囊の血管発生を誘導する⁸³⁾。更に、“nerve growth factor” (NGF)、“neuropeptide Y” (NPY)をはじめとする様々な因子が虚血組織において新しい血管の成長を誘導することがみつまっている^{84,85)}。

なお、各因子が広義の血管新生“neovascularization”と狭義の血管新生“angiogenesis”のどの段階に作用するかについて、Table 1及び2にまとめて示す。

3. 内皮が増殖因子による血管新生促進に及ぼす影響

冠動脈疾患に対する動脈形成反応が弱い患者から取り出した単球は、低酸素刺激によるVEGFのアップレギュレーションが低下する⁸⁶⁾。同様に、高齢あるいは糖尿病ウサギの下肢において、低酸素刺激によるHIF-1 α たん白質の誘導、及びDNA結合能の増加が低下し、その結果、VEGFのアップレギュレーションが低下する⁸⁷⁾。血管新生の要求が高まる時期において、HGF/SFも不足する。閉塞性動脈の患者では低酸素の期間、血管におけるHGF産生はダウンレギュレーションされる⁸⁸⁾。同様にc-met受容体もダウンレギュレーションされる⁸⁹⁾。興味深いことに、低酸素の期間におけるHGFのダウンレギュレーションは抗TGF- β 抗体⁹⁰⁾及びFGF-2の遺伝子導入⁹¹⁾により抑制されることから、TGF- β 及びFGF-2はHGF産生においてそれぞれ抑制及び促進因子として作用することが示されている。対照的に、心筋梗塞の患者では、HGFは顕著に増加する⁹²⁾。高齢のレシピエントマウスに移植された心臓における血管新生反応は低下するが、その原因と

Table 1 増殖因子が血管新生“neovascularization”の各プロセスに及ぼす作用

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

Table 2 増殖因子による血管新生の調節

血管新生のプロセス	血管新生のプロセスで生じる現象	血管新生のプロセスに関する増殖因子
血管新生の開始	周皮細胞の脱離, 基底膜の分解	Hif1- α , VEGF, Ang-2
新しい血管の形成	内皮細胞の増殖と遊走	VEGF, FGF
組織の要求に対する適応	流れの不足あるいは増殖因子の存在による新しい血管の退縮	Ang-2
成熟	周皮細胞の結合, 基底膜の沈着	PDGF, Ang-1

して PDGF-AB の強制動員の低下との関連が考えられる⁹³⁾。したがって、PDGF-B あるいは A 鎖の補充により、病態が改善される可能性がある。これに関連し、動物を用いた血管新生療法において有効性が示されている研究のほとんどすべては、正常で若い動物が用いられている。一方、「はじめに」の項で述べたように、臨床試験では進行したアテローム性動脈硬化症の患者で主に高齢者が対象となる。年齢の上昇に伴い、増殖因子による治療効果が低下し、その結果、臨床試験が失敗する可能性も場合によっては否定できない⁹⁴⁾。この可能性は、ApoE^{-/-}マウスにおいて血管新生促進因子の効果があまりよくないという知見からも示唆されている⁹⁵⁾。

4. 血管新生増殖因子たん白質を用いた血管新生療法の概要

血管新生療法の最終目的は重篤な作用部位において血管新生増殖因子のレベルを増加させることであり、そのための様々なデリバリーの方法が考えられる。正攻法としては組換えたん白質を局所あるいは組織にデリバリーすることである。このようなたん白質は静脈、動脈内特に冠動脈内、心筋内、心膜内に対するアプローチを用いて投与できる。その場合、デリバリーのタイプにかかわらず、理論的に正確な

用量反応性に関するデータは入手可能である。たん白質治療の場合は細胞への遺伝子導入、ウイルスあるいはプラスミドの転写、目的遺伝子のたん白質への翻訳が必要ない。たん白質治療の最大の問題点は血管新生反応の誘導に要する期間において治療効果を示す有効な濃度を維持することが必要ということである。なお、その期間はケースバイケースで異なり一概に定めることはできない。たん白質が新しい血管の成長を直接促進させる場合、新しい血管の成長の開始だけでなく、新しく形成された血管を安定化し成熟させるためには持続的に存在することが必要となるので、必要な期間は数週間の場合もある⁹⁶⁾。他方、「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、GM-CSF, G-CSF, PlGF, MCP-1 は単核球の強制動員を介して血管の成長及び安定化を促進することから、その期間はさほど長くなくてもよいのかもしれない。

5. 血管新生増殖因子たん白質を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究としてたん白質治療が用いられている (Table 3)。FGF-1 (10 μ g/kg) についてはその安全性が冠動脈 CABG バイパスグラフト “coronary-artery bypass graft” を受けた三枝冠動脈疾患の 20 人の患者で最初に示