

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))
肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発
分担研究報告書

ALSを対象とする第II相臨床試験開始に向けた非臨床安全性試験、
原薬製造、原薬・治験薬関連試験、デバイス関連試験の実施

研究分担者： 安達喜一(クリングルファーマ株式会社 事業開発部長)
共同研究者： 阿部哲士(クリングルファーマ株式会社 医薬開発部長)
福田一弘(クリングルファーマ株式会社 研究開発部長)
井上逸男(クリングルファーマ株式会社 品質保証部長)

研究要旨

肝細胞増殖因子(HGF)は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデル動物(マウス、ラット)において運動ニューロン保護、生存延長効果をもつことが報告されている。数ある神経栄養因子の中でも、このように変異*SOD1*トランスジェニック動物によるALSモデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性をALS患者に臨床応用する医学的、社会的意義はきわめて大きい。本研究グループは、世界に先駆けてALS患者を対象とする第I相試験を実施し(平成23~26年度)、HGFを脊髄腔内投与したときの安全性と薬物動態を確認した。本分担研究では、第I相試験に引き続いてALS患者での有効性を検証する第II相試験を実施するために必要となる非臨床安全性試験、原薬製造、原薬・治験薬関連試験、デバイス関連試験を実施した(平成24~26年度)。

ALS第II相試験では、HGFを長期間脊髄腔内に投与することを想定し、サルを用いた慢性毒性試験、ラットおよびウサギを用いた生殖発生毒性試験を行い、安全性に関するデータを拡充した。また、ALS既存薬であるリルゾールとHGFの薬物相互作用がないことを確認した。原薬・治験薬関連では、各種の規格・分析試験によりCMCデータを蓄積するとともに、脊髄腔内投与用デバイス(カテーテルとポート)の改良を行い、第II相試験で使用するプロトタイプを作製した。一方、原薬製造を行い、第II相試験の治験薬製造に必要な原薬量を確保した。さらに、第I相試験で得られた臨床データに基づいて、第II相試験のプロトコル案を策定した。以上により、第II相試験を実施するための要件整備は概ね終了した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は全身の筋萎縮が進行し呼吸筋麻痺から死に至る過酷な疾患でありながら、有効な治療法のない神経難病の象徴的疾患とされている。肝細胞増殖因子(HGF)は我が国で発見された神経栄養因子であり、運動ニューロンに対

する強力な保護作用が知られている。HGFによるALSの新規治療法を開発することは、医学的にも社会的にも大きな意義があり、アカデミア創薬を実践している点で厚生労働省の難治性疾患実用化研究事業の中でも中核となるプロジェクトである。

本研究では、組換えHGF蛋白質の脊髄腔

内投与による ALS 治療法開発を第 II 相試験へと進めるため、必須となる非臨床安全性試験、原薬製造、原薬・治験薬関連試験、デバイス関連試験を行う。また、第 I 相試験で得られた臨床データに基づいて、第 II 相試験のプロトコル案を策定する。以上により、研究期間（平成 24～26 年度）内に、第 II 相試験を実施するための要件を整備することを目標とする。

B. 研究方法

1) 非臨床安全性試験

第 II 相試験では、組換え HGF 蛋白質を脊髄腔内に長期投与することを計画している。そこで、カニクイザルを用いた慢性毒性試験を行い、第 II 相試験を開始する前に長期投与の安全性を十分に確認しておく。予備試験を 2 回実施し、条件検討をした上で GLP 準拠による本試験を開始する（分析用試薬の調整・安定性試験を含む）。また、生殖能や次世代の発生に関する安全性を評価するための生殖発生毒性試験を実施する。すなわち、ラットおよびウサギを用いた胎児試験（セグメント 2）の予備試験と本試験（申請資料の信頼性の基準）を実施する。さらに、ALS の唯一の既存薬であるリルゾールと HGF の薬物相互作用を調べるため *in vitro* での試験（予備試験、本試験および追加試験）を行う。

2) 原薬製造

慢性毒性試験および第 II 相試験の治験薬製造のために必要な HGF 原薬を GMP 基準により製造する。製造工程は培養工程と精製工程から成る。培養工程では、はじめに HGF 産生 CHO 細胞株のワーキングセルバンクを融解し、三角フラスコに播種する。三角フラスコの本数を増やすことで拡大培養した細胞を培養槽に播種し、通気攪拌培養を行いながら培養規模を順次拡大し、最

終的に生産培養を実施する。培養液はろ過によって細胞を除去した後、精製工程に移行する。

精製工程では多段階のカラムクロマトグラフィーを実施する。工程中にはウイルス不活化工程およびウイルス除去工程を挿入し、最終的に限外ろ過によって濃度調整した後、小分けして HGF 原薬とする。

3) 原薬・治験薬関連試験

HGF 原薬の品質保証のための CMC 試験（規格・分析試験等）として、宿主由来蛋白試験（HGF 蛋白質を発現させる CHO 細胞由来の蛋白質を測定する試験）、および HGF 蛋白質の糖鎖構造解析、ジスルフィド結合解析、逆相クロマト試験、CD スペクトル分析、ペプチドマップ試験。純度試験（SDS-PAGE 試験、等電点電気泳動試験等）を行う。

第 I 相試験で使用している治験薬（凍結製剤）の予備安定性試験を継続して行う。安定性試験は日米欧医薬品規制調和会議（ICH）のガイドラインに則って実施する。

4) 投与デバイス改良研究

脊髄腔内投与用デバイス（カテーテルとポート）の将来の承認申請を見据え、改良研究を行う。承認申請に必要なデータを整備するための調査研究を行うとともに、第 II 相試験で使用する改良品のプロトタイプを作製する。

5) 第 II 相試験プロトコル作成

第 I 相試験の反復投与群に一群追加し、中用量群と高用量群の 2 用量で反復投与を実施する。第 II 相試験の用量用法設定に必要な臨床データを取得する。第 I 相試験の臨床データに基づいて第 II 相試験のプロトコル案を策定する。

(倫理面への配慮)

本研究において、動物を用いた実験はすべて研究委託施設である(株)新日本科学の動物実験倫理規定に基づいて施行し、また利用動物数を極力減らすように努め、動物愛護面に十分配慮した(新日本科学はAAALAC International(国際実験動物管理公認協会)の完全認証取得施設である)。また組換えDNA実験はすべて実施施設の組換えDNA実験安全管理規定に基づいて施行された。本研究で実施する慢性毒性試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(H9.3.26 厚生省令第114号)(GLP省令)に従い行う。また、本研究でのHGF原薬製造は、「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(H16.12.24 厚生省令第179号)(GMP省令)に従い行う。

本研究で実施する治験は「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(H9.3.27 厚生省令第28号)(GCP省令)に従い行う。第II相試験は医師主導治験として実施する予定であり、第II相試験を実施する際には、東北大学病院の治験審査委員会(IRB)での審査を行い、承認を得る(平成27年度を予定)。その際、プロトコルの他に、治験薬概要書、被験者への同意説明文書案なども添付して審査を受ける。その承認後に薬事法第80条の2第2項及び第80条の3第4項に従い、治験計画届を医薬品医療機器総合機構(PMDA)に提出する(平成27年度を予定)。治験中に、治験薬による副作用などが起こった場合には、薬事法第80条の2第6項に従い、副作用報告を同機構に提出する。

C. 研究結果

1) 非臨床安全性試験

- ・ カニクイザルを用いた慢性毒性試験：試験の実施に必要なサル脊髄腔内へ

のカテーテルの長期留置のための術式検討試験および投与デバイス内の安定性試験を終了し、予備試験を2回行った(平成24、25年度)。予備試験による条件検討を基にGLP本試験を実施し(平成25、26年度)、長期投与の安全性を検討した。

- ・ 生殖発生毒性試験：ラットおよびウサギを用いた胎児試験(セグメント2)の予備試験(平成24、25年度)を経て、本試験(申請資料の信頼性の基準)を実施した(平成25、26年度)。ラットおよびウサギの胚・胎児発生への影響は認められなかった。
- ・ リルゾールとの薬物相互作用試験：in vitroの実験系で、予備試験(平成24年度)、本試験(平成25年度)、追加試験(平成26年度)を行った結果、HGFとの相互作用はないと考えられた。

2) 原薬製造

慢性毒性試験および第II相試験の治験薬製造のために必要なHGF原薬を製造した(平成25、26年度)。培養工程および精製工程において、異常または重篤な逸脱は発生せず、製品標準書に則ってHGF原薬のGMP製造を終了した。

3) 原薬・治験薬関連試験

- ・ HGF原薬のCMC試験(規格・分析試験等)：宿主由来蛋白試験(平成24~26年度、継代培地への馴化とセルバンク作製まで)およびHGF蛋白質の糖鎖構造解析、ジスルフィド結合解析、逆相クロマト試験、CDスペクトル分析、ペプチドマップ試験。純度試験(SDS-PAGE試験、等電点電気泳動試験等)を終了し(平成24~26年度)、第II相試験の治験届に含めるCMCデータを得ることができた。
- ・ 治験薬の予備安定性試験：長期試験を実

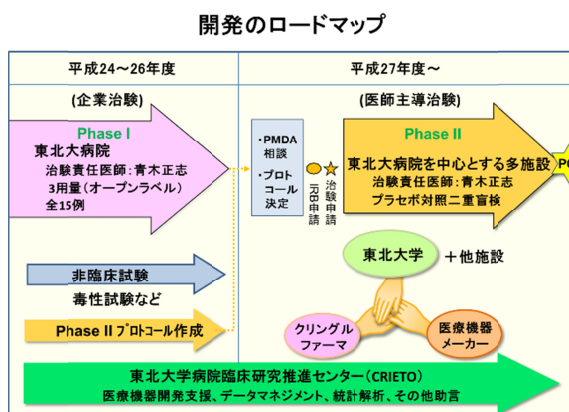
施し（平成24～25年度）、第I相試験が終了するまで治験薬の安定性に問題がないことを確認した。

4) 投与デバイス改良研究

脊髄腔内投与用デバイス（カテーテルとポート）に求められる性能および仕様を調査し、改良品のプロトタイプを作製した。あわせて第II相試験の治験機器概要書案を作成した（平成26年度）。

5) 第II相試験プロトコル作成

第I相試験では、中用量群と高用量群の2用量で反復投与を実施し、試験を終了した。第I相試験で得られた臨床データに基づいて、第II相試験の用法用量設定を行うとともにプロトコル案を策定した（平成24～26年度、平成27年度にPMDA相談を開始予定）。第II相試験（医師主導治験）は、統計学的な有意差を検出できる症例数のALS患者を対象とし、プラセボ対照二重盲検試験として多施設で実施することにより有効性を確認する計画である。開発のロードマップを次の図に示す。



D. 考察

カニクイザルを用いた慢性毒性GLP試験は、2回の予備試験により条件検討を行った後、平成26年度に本試験を終了することが

できた。また、ラットおよびウサギを用いた胚胎児試験（セグメント2）の本試験（申請資料の信頼性の基準）も、平成26年度に終了した。

原薬製造については、GMP準拠による原薬製造を終了した。これにより、第II相試験の治験薬（凍結乾燥製剤）製造に関連するHGF原薬を確保することができた。

原薬・治験薬関連試験は、平成24～26年度中に予定していた試験を全て終了し、第II相試験に向けて、品質保証のためのCMCデータを拡充することができた。

投与デバイス改良研究については、脊髄腔内投与用デバイス（カテーテルとポート）の改良品のプロトタイプを作製することに成功し、第II相試験で使用する目処が立った。

ALS患者を対象とする第I相試験（於東北大学病院）は、3用量（低・中・高用量）による単回投与群（第一、第二、第三コホート）および中用量・高用量による反復投与群（第四、第五コホート）から成り、平成26年度に終了した。第I相試験で得られた安全性と薬物動態に関する臨床データから、第II相試験の用法用量を含めたプロトコル案を策定することができた。

研究期間全体（平成24～26年度）の開発成果を下図に示す。第II相試験を実施するための要件整備は概ね終了したと考える。

開発成果

項目	H24年度	H25年度	H26年度
安全性試験	慢性毒性予備試験 生殖毒性予備試験 予備試験 リルゾールとの薬物相互作用	慢性毒性予備試験2 生殖毒性本試験 (Seq II) (ウサギ、ラット) 本試験	慢性毒性GLP試験 追加試験
原薬・製剤関連 CMC試験	治験薬の安定性試験	宿主由来蛋白試験、規格・分格試験	
原薬製造		原薬製造	原薬製造
投与デバイス 改良研究			改良デバイスプロトタイプ製造
臨床試験	ALS 第I相試験		
	ALS 第II相試験計画とプロトコル作成		

E. 結論

ALSを対象とする第II相試験を開始するために必要となる非臨床安全性試験、原薬製造、原薬・治験薬関連試験、デバイス関連試験を終了した。また、第II相試験のプロトコル骨子を固めた。今後、速やかにPMDA相談を行い、第II相試験を開始する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

「筋萎縮性側索硬化症治療剤」（ALSに関する用途特許）：平成25年度に日本、カナダで権利化することができた。

2. 実用新案登録

該当なし