

201427034B

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品等規制調和・評価研究事業

革新的医薬品の開発環境整備を目指した  
レギュラトリーサイエンス研究

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 奥田 晴宏

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

革新的医薬品の開発環境整備を目指した  
レギュラトリーサイエンス研究

平成 24～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 奥田 晴宏

平成 27 (2015) 年 3 月

## 目 次

I.	総合研究報告 .....	1
	革新的医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究	
	奥田 晴宏	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	27
III.	研究成果の刊行物・別刷 .....	31

## 厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）

### 総合研究報告書

# －革新的医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究－

研究代表者：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）  
研究分担者：加藤 くみ子（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第四室長）  
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）  
井上 貴雄（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第二室長）  
阿曾 幸男（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第二室長）  
内田 恵理子（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長）  
野村 由美子（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部長）  
研究協力者：各年度の分担研究報告書に記載した。

#### 研究要旨

我が国で臨床応用が試みられつつある革新的医薬品製剤を中心に、以下の研究を行った：  
①医療応用を迅速に進める上で必要な規制ガイドライン案や評価法をリスト化する；②キーとなると考えられる評価手法を開発・標準化する；③必要に応じて規制ガイドライン等の作成、評価法策定を行う。本研究成果は以下の通りである。

#### (1) ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

ナノDDS製剤の特性、特に生体成分との相互作用に着目し、体内での挙動や安全性を予測しうる*in vitro*評価手法を構築してきた。即ち、経口固形製剤に含有されるシリカ粒子や酸化チタン等の添加物について、物理的・化学的特性（サイズ・凝集性）と腸管吸収・毒性について、人工腸液・人工胃液を用いた*in vitro*評価系を開発し、両特性の関連性を明らかとした。また、静脈注射ナノDDS製剤の血液適合性試験について、リポソーム製剤を対象に最適化し、確立した。さらに、核酸医薬品においては、共焦点顕微鏡を用い核酸（siRNA）等を搭載したナノ医薬品の細胞内動態評価法を構築した。ナノDDS製剤の開発に同等性／同質性の概念を適応することの適切性について考察し、厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー等の文書に反映させた。また、ナノ医薬品の分類に関する国際的な動向を調査するとともに、国際的な個別ナノDDS製剤の規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価にあたっての留意点及び評価手法の文書化に着手した。その他、HPでナノDDS製剤の情報発信に努めた。

#### (2) 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

本分担研究課題では、改変型抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤の開発環境整備を目的に、改変タンパク質製剤の開発初期からヒト初回投与試験（FIH）までの非臨床試験段階における留意事項の整理、及び、関連する評価法の開発とその有用性評価を行っている。平成24-26年度において、(1)表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いたFcγ受容

体結合親和性評価法、及び、Fc $\gamma$ 受容体発現レポーター細胞を用いたFc $\gamma$ 受容体活性化能評価系に関し、モデルとなる改変抗体やFc融合タンパク質の評価を通じて、抗体等改変タンパク質製剤の評価法としての有用性を明らかにした。また、(2)改変タンパク質製剤に求められる製品プロファイルや、FIH安全性確保に必要なヒトへの外挿性を考慮し、改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項をまとめた。

### (3) 核酸医薬品の評価に関するRS研究

核酸医薬品は化学合成医薬品であるが、低分子医薬品やバイオ医薬品をベースとした規制では対応できない核酸医薬品に特有の性質がある。その中で重要な課題の1つとされるのが、RNAを標的とする核酸医薬品による「ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果」であり、その評価法の確立や判断基準の設定が課題となっている。すなわち、相補的結合依存的オフターゲット効果は、①低分子医薬品等の開発で得られた知見／経験が応用できず全く新規の課題であること、②安全性評価の課題でありながら動物を用いた試験ができないことから、核酸医薬品開発の現場においても、その対応についてコンセンサスが得られていないのが現状である。以上の背景のもと、本研究ではオフターゲット効果の評価法の確立を念頭に、これに必要な基盤研究を遂行した。具体的には、1) 核酸医薬品のオフターゲット効果の評価法に関する調査および考察、2) オフターゲット候補遺伝子数の見積もりならびに抽出法に関する基盤研究、3) Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果の包括的解析、を行った。

### (4) タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

タンパク質性医薬品の品質確保のためには品質変化と関連する有効成分、添加剤の因子を明らかにし、その因子を評価し、コントロールする手法を開発することが不可欠である。特に、安定性を短期間に評価できる標準的な評価法があれば、安定な処方探索のための期間が短縮され、開発を促進するものと考えられる。タンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎを評価する手法（タンパク質の $\beta$ 緩和時間等を指標にした）として、 $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間の可能性について検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間によって評価できる可能性が示唆された。また、マイクロ熱量計によりタンパク質の分解に伴う熱を測定できること、熱の大きさが分解速度と関連することが示された。

### (5) 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

本研究は、遺伝子治療用医薬品（遺伝子治療用製品）の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究として、遺伝子治療用製品において整備が求められるガイダンスの検討や素案作成のための研究及び遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価手法に関する研究を行った。遺伝子治療用製品のガイダンス整備のための研究として、24年度は国内外の遺伝子治療用製品の開発動向の包括的調査及び規制ガイドラインの整備状況を調査するとともに、最近、特に活発に開発されているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター製品を取り上げ、その開発と品質、安全性確保における考慮事項を明らかにした。25年度は、染色体組込型ベクターの開発動向調査と染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題で

ある挿入変異やがん化のリスク管理法について考察した。26年度は遺伝子治療用製品の開発途中での製法変更や設計変更時の考え方をまとめた。一方、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価手法に関する研究としては、デジタルPCRの活用に関する検討及び*ex vivo* 遺伝子導入細胞へのベクターの残存性評価、次世代シーケンサーによるウイルスベクターの品質評価について検討した。本研究の結果は「遺伝子治療用製品の品質及び安全性の確保に関する指針」改正案及び「遺伝子治療臨床研究に関する指針」の品質・安全性評価項目案の作成に活用された。また、今後、遺伝子治療の個別の課題に関するリフレクションペーパーの作成や遺伝子治療の審査において活用の予定である。

#### (6) 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

日本発の新薬の開発を効率的・効果的に行うための取り組みの一環として、血糖降下薬について、既存の臨床評価ガイドラインでは言及されていない新規のインスリン製剤の臨床評価方法や経口血糖降下薬とインスリン製剤の併用時の臨床評価方法等について検討し、今後の臨床開発や承認審査に資するガイドライン改訂案を策定した。

#### A. 研究目的

我が国における医薬品開発環境の問題として、医薬品・医療機器に関する基礎研究レベルは高く医薬品・医療機器のシーズは数多く発見されているにもかかわらず、それらにみあった日本発の新薬・新医療機器の開発例は少なく、また医薬品・医療機器の実用化のスピードが欧米に比べ遅く、いわゆるドラッグラグあるいはデバイスラグが問題となっている。このような我が国における医薬品・医療機器の製品化のスピードの遅さの主要な原因の一つとして、承認・審査の過程のシステム整備が不十分であることが指摘されている。この状況を打破すべく、日本発の新薬・医療機器等の開発を効率的・効果的に行うためのレギュラトリーサイエンスを充実・強化し、医薬品・医療機器の評価、根拠に基づいた審査指針や基準策定等の作成の推進が、“科学技術基本計画、科学技術アクションプラン・資源配分方針”あるいは“医療イノベーションの目指す方向性（医療イノベーション推進室）”において我が国の科学技術政策の最重要課題にあげられている。以上の国の施策を実現するため、本研究では革新的医薬品開発に向けた規制環境整備のためのレギュラトリーサイエンス研究として、我が国で臨床応用が試みられているナノDDS医薬品、改変タンパク質性医薬品（抗体医薬）、核酸医薬品、遺伝子治療用医薬品さらに本年度は特

に血糖降下薬をとりあげ、以下の取り組みを開始した：

- 1) 革新的医薬品のヒト初回臨床試験の実施にあたっての条件（品質および安全性の確認）の明確化とその手法の開発
- 2) 革新的医薬品候補について、医療における有用性を確認、確保するための評価法の開発、及びその標準化
- 3) 革新的医薬品を承認申請するにあたって考慮すべき要件の明確化、及び基準の作成

本研究は、現在まで我が国における医薬品の規制に関わる技術的なガイドラインや評価法の作成、あるいはその国際調和に関わってきた国立医薬品食品衛生研究所の医薬品関連部門の研究員によって構成され、臨床応用に至る過程でキーとなる評価法等の開発・標準化研究を実施する。これらの研究成果は、規制当局である厚生労働省および審査担当の医薬品医療機器総合機構との連携の中で、医薬品の規制にダイレクトに反映されることが大きな特徴である。

## B. 研究方法

### B-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

#### (1) ナノ医薬品の評価法

##### (1-1) 経口固形製剤の添加物に利用されるシリカ粒子及び酸化チタンの安全性について

シリカ粒子は、粒子径の異なる3種類の製品を用いた（それぞれのメーカー表示サイズは50、100、200nm）。また、酸化チタンは、結晶系の異なる2種類の製品を用いた（ルチル型及びアナターゼ型）。粒子径及びゼータ電位はZetasizer Nano（Malvern社製）で測定した。

絶食時及び摂食時における人工腸液（それぞれFaSSIF、FeSSIFと略記する）は、推奨プロトコールに従い調製した。また、絶食時及び摂食時における人工胃液（それぞれFaSSGF、FeSSGFと略記する）は、論文に従い調製した。

細胞内取り込み量評価は、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞株を対象とし、様々な溶媒で希釈した蛍光標識シリカ粒子を添加し2時間培養後、細胞破壊後、遠心分離し、上清中の蛍光強度を蛍光分光光度計により測定した。

蛍光標識シリカ粒子の細胞内動態は、共焦点顕微鏡観察により観察した。シリカ粒子のCaco-2膜透過評価はBD BioCoat HTS Caco-2アッセイシステム推奨プロトコールに従い、Caco-2単層膜形成を膜抵抗値TEER（Trans Epithelial Electric Resistance）により確認し、Apical（腸管）側に様々な溶媒で希釈した蛍光標識シリカ粒子を添加後、Basal（基底膜）側を経時的にサンプリング（膜抵抗値も測定）し、サンプル中の蛍光強度を測定した。細胞毒性評価はCCK-8アッセイにより評価した。

##### (1-2) ナノDDS製剤の血液適合性に関する研究

実験で用いるリポソームは、各脂質成分を混合し、脂質薄膜法を用いて作製した。リポソームの粒子径及びゼータ電位はZetasizer Nano（Malvern社製）で測定した。

補体活性化測定は、MicroVue iC3b ELISAKit、SC5b-9 ELISA kitを用いて測定した。ヒト血清、HAGG（Heat Aggregated Gamma Goblin）、ZymosanAはQUIDEL社製を用いた。

溶血性試験法は、医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスを参考に、リポソーム製剤を対象として最適化した。ウサギ脱繊維血、ネガティブコントロールのポリエチレングリコール（平均分子量8,000Da）を用いた。脱繊維血とリポソームを37℃の湯浴で4時間インキュベート後、遠心分離し、ヘモグロビンが流出した上清をPBSで適宜希釈し、吸光度をプレートリーダーにより測定した。

血液凝固試験法は血液凝固試験用標準ヒト血漿、PT測定試薬「デイドイノビン」、及びAPTT測定試薬「アクチンFSL」はシスメックス社製を用い、ポジティブコントロールである抗凝固剤にはEDTA/PBS、及びコントロール（ベースライン）にはPBSを用いた。凝固時間（PT時間及びAPTT時間）は凝固計CA-50（シスメックス社製）の操作マニュアルに従って測定した。血小板凝固試験に関わる評価法は科学的な論文を中心に調査した。

##### (1-3) 核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価法の開発

異なる蛍光特性を有する色素でそれぞれ標識したリポソームとsiRNAを混合し、複合体を形成した。マクロファージ細胞であるMD細胞、及びヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に複合体を添加し、5-6時間後に共焦点顕微鏡（Nikon、A1）で細胞内局在を観察した。

##### (2) ナノ医薬品の分類に関連した規制動向について

欧州医薬品庁（EMA）や米国食品医薬品局（Food and Drug Administration : FDA）から発出されているガイドライン等や科学的な論文を中心に、ナノ医薬品の分類に関する動向を調査した。

##### (3) ナノDDS製剤の評価に関する研究

###### (3-1) 同等性/同質性の評価について

欧州医薬品庁から発出されているリポソーム製剤の後続品開発に関する文書を参照し、有効性の同一性、製剤の生物学的同等性の観点から考察した。本考察をもとに、ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤のようなナノDDS製剤の開発に同等性/同質性（コンパラビリティ）の概念を適応することの適切性について、EMAと議論した。

### (3-2) リポソーム製剤の評価に関する研究

品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性試験の評価に当たっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項の文書化に着手した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来培養細胞は、研究用の市販品、頒布品であるため、倫理的に問題となるような事項はないと考えられるが、常に倫理問題を意識しながら研究を遂行し、将来必要が生じた場合には速やかに当研究所研究倫理委員会に申請して、その審査を受けるものとする。

## B-2 改変タンパク質製剤の評価に関するRS研究

### (1) 抗体医薬品等改変タンパク質製剤の生物活性評価

#### (1-1) SPR法によるFc受容体結合親和性の解析

SPR解析にはBiacore T200を使用した。アミンカップリングによりセンサーチップCM5に抗His-tag抗体を固定化した。His付加された各種Fc<sub>γ</sub>受容体細胞外ドメインの組換えタンパク質をキャプチャーし、アナライトとして各種の抗体医薬品を添加して、結合親和性の解析を行った。FcRn結合親和性の測定には、FcRn細胞外ドメインを固定化したセンサーチップを用い、抗体医薬品等の試料をアナライトとして添加した。LF-Fcを試料とする場合は、Protein Aを固定化したセンサーチップに、LF-Fcをキャプチャーし、Fc<sub>γ</sub>受容体をアナライトとして添加した。

#### (1-2) Fc<sub>γ</sub>受容体発現レポーター細胞を用いたFc<sub>γ</sub>

受容体活性化能評価系 (Bridging-Luciferase Assay)

標的細胞としてA431細胞、エフェクター細胞としてFc<sub>γ</sub>RIIaあるいはFc<sub>γ</sub>RIIIaとカルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子を導入したJurkat細胞 (Jurkat/Fc<sub>γ</sub>R/NFAT-Luc) を使用した。96穴プレートにA431細胞を播種し、一晚培養した。培養液を取り除きOPTI-MEMで洗浄した後、OPTI-MEMに懸濁したJurkat/Fc<sub>γ</sub>R/NFAT-Luc細胞をプレートに播種し、各濃度のセツキシマブ存在下で37℃、4時間共培養した。各ウェルにONE-Glo Luciferase Assay試薬を添加し、マルチモードプレートリーダーを用いてルシフ

ェラーゼ活性を測定した。LF-Fcの評価では、標的細胞非存在下での測定を行った。

### (2) 改変タンパク質製剤開発における留意事項

改変型タンパク質製剤の開発動向、学術文献、バイオ医薬品の品質安全性に関するこれまでの知見をもとに、改変型抗体医薬品製剤の分子設計において求められる要件を考察した。また、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス(平成24年4月2日薬食審査発0402第1号)」を参照し、本研究で実施した改変型抗体のFc<sub>γ</sub>受容体親和性の種差に関する解析結果を含め、改変タンパク質製剤のFIHに向けた留意事項をまとめた。

(倫理面への配慮)

実験に用いたタンパク質等の試薬類は、遺伝子組換えにより作製された組換えタンパク質であり、倫理面での配慮を要するものではない。Fc<sub>γ</sub>受容体活性化能の評価に用いた細胞は、細胞バンクより購入した細胞株をもとに作製したものであり倫理面での配慮を要するものではない。

## B-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

### (1) 核酸医薬品のオフターゲット効果の評価法に関する調査および考察

核酸医薬品に関する国内外の学術集会への参加、有識者との意見交換、原著論文/総説の文献調査を行い、核酸医薬品の開発動向を把握すると共に作用機序による分類を行った。さらに、作用機序から推定されるオフターゲット効果の発現機構について、評価法の観点から考察を行った。この過程で、オフターゲット効果に関する基盤研究を至急行う必要があるのはアンチセンス医薬品であることがわかったため、以降の解析ではアンチセンスに焦点を絞り、解析を行った。

### (2) オフターゲット候補遺伝子数の見積もりならびに抽出法に関する研究

オフターゲット効果が生じる可能性がある遺伝子(アンチセンスと相補的に結合する遺伝子 = オフターゲット候補遺伝子)が、“確率的にヒトゲノムにいくつ存在するか”を推定するため、確率計算によりオフターゲット候補遺伝子数の理論値を算出した。



また、オフターゲット候補遺伝子が“実際にヒトゲノムにいくつ存在するか”を明らかにするため、仮想アンチセンスを5195本設計し、*in silico*解析によりアンチセンスと相補結合する遺伝子数を調べた。*in silico*解析を行うにあたっては、ライフサイエンス統合データベースセンター・内藤雄樹氏に御協力を頂き、10-30塩基長程度の短いオリゴ核酸の相同性検索に適したGGRNAおよびGGGenomeの検索システムを用いてオフターゲット候補遺伝子を抽出した。この際、アンチセンスとの相補結合部位にミスマッチやインサクション、あるいはデリーションを有する遺伝子についても漏れなく抽出し、結合様式を指標に整理を行った。なお、GGRNAおよびGGGenomeを用いた検索に関しては、一般に公開されている検索条件ではオフターゲット候補遺伝子を幅広く抽出することが困難と考えられたため、内藤氏の協力のもと、本研究独自に検索システムを改良し、可能な限り相補性の条件を緩めて検索を行った。

### (3) Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果の包括的解析

Gapmer型アンチセンスは標的mRNAを切断／分解するタイプのアンチセンスである。Gapmer型アンチセンスでは、オリゴ核酸の両端にmRNAとの結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分の配列にはDNAが用いられる。このアンチセンスが標的mRNAと結合すると、“DNAとRNAの相補鎖を認識してRNA鎖を切断するヌクレアーゼ”であるRNase Hがオリゴ中央部でDNA/RNA二重鎖を認識し、RNA鎖を切断する。全身投与性の核酸医薬品として初めて上市されたアンチセンス（Kynamro）がGapmer型であることに象徴されるように、Gapmer型アンチセンスは現在最も開発の進んでいる核酸医薬品の1つである。しかし、Gapmer型アンチセンスによるオフターゲット効果の発現に関しては研究がほとんど行われておらず、従って、安全性評価の手法や判断基準は整備されていないのが現状である。本研究では、この問題を克服するため、Gapmer型アンチセンスによるオフターゲット効果の発現を実験的に検証し、オフターゲット効果の評価法確立に必要な基礎的なデータを創出した。具体的には、以下

の解析を行った。

#### (3-1) ヒト培養細胞を用いたオフターゲット効果の検証（オフターゲット効果が引き起こされる配列条件の検証：マイクロアレイ解析）

本解析では、「Gapmer型アンチセンスとどの程度の相補性を有するmRNAが分解されるか」について検証するため、eGFP mRNAを標的とするアンチセンスとeGFP発現ヒト細胞を用いて、ヒト細胞に内在的に発現する遺伝子への影響を検討した。まず、eGFP mRNAに対して考えられる全ての仮想アンチセンス（13、15、18塩基長）を設計し、*in silico*解析によってアンチセンスと相補性を有するヒト遺伝子（オフターゲット候補遺伝子）の数を調べた。この中から、オフターゲット候補遺伝子数が多いアンチセンスを38本抽出・合成した後、eGFP発現ヒト細胞を用いた*in vitro*解析により、eGFP mRNAを効率よく分解するアンチセンスを5本選別した。次に、これらの抗eGFPアンチセンスをそれぞれeGFP発現ヒト細胞に導入し、内在的に発現するヒト遺伝子の発現変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した。得られた遺伝子発現のデータは、ミスマッチ数などで分類したオフターゲット候補遺伝子のグループ毎に統計解析し、相補性の程度と発現変化の関連を検証した。

#### (3-2) *in vitro*試験と*in vivo*試験の相関性に関する検証（マウス肝培養細胞とマウス肝臓におけるオフターゲット効果の比較）

ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果はゲノム配列がヒトと異なる動物では評価できないため、ヒト細胞を用いた試験が必要である。培養細胞を用いた評価系を構築する前提として、細胞系の試験で個体のオフターゲット効果を予測できることを実験的に示しておくことが望ましい。そこで、マウス由来培養細胞とマウス個体に同じGapmer型アンチセンスを導入し、細胞と個体における遺伝子発現の変化を比較した。具体的には、既報論文から、マウス個体において標的mRNAを効率よく分解するGapmer型アンチセンスを選択・合成し、当該アンチセンスがマウス肝培養細胞においても有効であることを確認した。次に、当該アンチセンスをマウス肝培養細胞およびマウスに導入し、肝細胞および肝臓

から得たRNAでマイクロアレイ解析を行った。

### (3-3) ヒト肝細胞キメラマウスを用いたオフターゲット効果の検証

近年、細胞／組織の一部がヒト由来の細胞に置き換わった「ヒト化動物」の研究が進んでいるが、中でも肝臓がヒト肝細胞に置き換わった「ヒト肝細胞キメラマウス」については安定提供されるまでに技術進展しており、医薬品評価系としてのポテンシャルも報告されている。一方、全身投与されるアンチセンス医薬品は肝臓に集積・機能することが知られており、実際、現在開発されているGapmer型アンチセンスの多くは肝臓を標的とするものである。上述のように、オフターゲット効果は動物では評価できないが、ヒト肝細胞キメラマウスを用いれば、アンチセンス医薬品のオフターゲット効果を個体で評価できる可能性がある。そこで、「①ヒト培養細胞を用いた*in vitro*解析」で選別したGapmer型アンチセンスをヒト肝細胞キメラマウスに投与し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した「ヒト肝細胞キメラマウス」の作成の際に用いた「ヒト肝細胞」については、インフォームド・コンセントが得られた市販のヒト凍結肝細胞を利用した。動物実験においては、国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規定に従った。

## B-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

タンパク質性医薬品は保存により様々な品質変化を引き起こすことが知られているが、タンパク質において普遍的に起こり得る凝集に着目し、凝集のしやすさに影響を及ぼすタンパク質側の因子の評価法について調査を行った。

市販製剤としてヒュミラ皮下注（アダリムマブ）、ランマーク皮下注120mg（デノスマブ）、アクテムラ点滴静注用400mg（トシズマブ）、レミケード点滴静注用100mg（インフリキマブ）を用いた。レミケード点滴静注用は凍結乾燥製剤であり、10mLの水で溶解して用いた。これらの試料を25℃に保存し、サイズ排除クロマトグラフィー（カラム：Shodex

KW403-4F 4.6mm×300mm、カラム温度：30℃、移動相0.3MNaClを添加した50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、検出：210nm）により凝集体の検出を行った。また、2種類の逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（カラム1：Inertsil WP300 C8カラム、4.6mm×300mm、カラム2：Proteonavi C4カラム、4.6mm×150mm、カラム温度：60℃、検出：280nm）によりデスアミド体等の分解物の測定を行った。

タンパク質の分解に伴う微少な熱の測定は等温ミクロ熱量計（IMC）（TAMIII、TAインストルメント）を用い、25℃で行った。製剤の液を高圧蒸気滅菌した専用のガラス容器に移し、熱量計にセットした。

タンパク質の局所的な運動性の評価は、タンパク質のカルボニル炭素について測定した<sup>13</sup>C-NMR緩和時間（T1）により行った。T1はInversion-recovery法によって20℃において測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

## B-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

### (1) 遺伝子治療用製品のガイダンスの整備のための研究

遺伝子治療用製品の開発動向は関連する論文や書籍等の情報およびThe Journal of Gene Medicineが公開している遺伝子治療臨床試験データベース等を中心に調査・分析した。規制状況に関してはFDAやEMAのホームページ情報および欧米の薬局方の情報を中心に検討した。

### (2) 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価に関する研究

#### (2-1) デジタルPCRを用いたウイルスベクターの品質評価

ウイルスベクターの検出手法やその感度の比較評価の一環として、p53発現アデノウイルスベクターAd5CMV-p53を取り上げ、定量PCR法とデジタルPCR法（QX100 Droplet Digital PCRシステム）で比較した。ウイルスベクターの比活性の評価はgp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクター産生細胞の培養

上清を経時的に回収し、コピー数をデジタルPCRで、感染力価をp67phox、p47phox遺伝子発現K562細胞への感染率により評価した。遺伝子導入細胞へのベクターの残存性は、gp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクターを用いてK562細胞への遺伝子導入後に洗浄操作や培養を行い、残存ウイルスベクターのコピー数と感染力価により評価した。

#### (2-2) 次世代シーケンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価

エンベロープタンパク質等をstableに発現するベクター産生細胞から得たgp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクターとパッケージング細胞にエンベローププラスミドとベクタープラスミドを一過性にトランスフェクションして得たgp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクターを取り上げ、これらの2つのベクターよりウイルスゲノムを調製し、キャピラリーシーケンサーABI 3500xl Genetic Analyzerと次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000を用いて塩基配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

ウイルスベクターを用いた実験は、成育医療研究センター及び国立医薬品食品衛生研究所の遺伝子組換え実験安全管理規則に基づき適正な審査により承認されたもので、規則を遵守して適切に実施された。

### B-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

糖尿病治療薬に関して、既存の臨床評価ガイドラインには言及されていない新規のインスリン製剤を開発する際の臨床評価方法を検討するとともに、インスリン製剤を除く新規の血糖降下薬と既承認のインスリン製剤を併用した場合の臨床評価方法等を検討した。

#### (1) インスリン製剤の臨床評価方法

これまで言及されてこなかった新規のインスリン製剤を開発する際の臨床試験について、海外のガイドライン並びにこれまで承認された製剤の申請データパッケージ及び審査情報をもとに、必要な試験の種類や、試験ごとの目的、対象、評価項目、試験期間、試験方法、観察項目、評価法等について整理した。

#### (2) インスリン製剤併用時の臨床評価方法

インスリン以外の血糖降下薬と既承認のインスリン製剤を長期間併用した場合の安全性及び有効性を評価するための臨床試験について、インスリン製剤の特徴を踏まえ、目的、対象、評価項目、試験期間、用法・用量、試験症例数、観察項効能・効果の記載等について整理した。

#### (3) その他

糖尿病にかかる最新の治療ガイドライン、パブリックコメント等を参照し、記載内容を更新した。また、これらの評価方法にかかる考え方について日本糖尿病学会年次学術集会においてシンポジウムを開催するとともに、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部において専門協議を開催し、専門家と意見交換を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、承認審査情報の整理等を中心に行っており、人権擁護上の配慮や動物愛護等に配慮が必要な事項はない。

### C. 結果

#### C-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

##### (1) ナノDDS製剤の評価法

##### (1-1) 経口固形製剤の添加物に利用されるシリカ粒子及び酸化チタンの安全性について

経口固形製剤に含有されるシリカ粒子や酸化チタン等の添加剤についてはその機能性から一次粒子がナノメートルサイズであるものも汎用されつつあるが、その安全性に関する評価が十分にされていない。そこでこれら粒子の物理的・化学的特性（サイズ・凝集性）と腸管吸収・毒性について、人工腸液・人工胃液を用いた評価系を開発し、両特性の関連性を精査した。その結果、シリカ粒子、酸化チタンとも、人工腸液中での凝集が観察され、CaCo-2細胞を用いた*in vitro*モデルにて、粒子サイズが100nm以上になると、*in vitro*試験における腸管吸収や細胞毒性が観察されないことが明らかとなった。

##### (1-2) ナノDDS製剤の血液適合性に関する研究

ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤の*in vivo*におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する

る評価法について調査、考察した。ナノDDS製剤と血中タンパク質との相互作用は、生体内安定性、有効成分の放出性、輸注反応など、ナノDDS製剤の臨床上的有効性及び安全性に影響する重要なファクターである。したがって有効性と安全性確保の観点より、製剤設計の段階からナノDDS製剤と血中タンパク質との相互作用を評価する手法の開発が重要である。そこで本研究では、ナノDDS製剤の血液適合性試験、つまり、補体系活性化試験、血球との相互作用（溶血性試験）、及び血漿成分への影響（血液凝固試験）について、リポソーム製剤を対象にその評価手法を確立した。

さらに平成26年度は、最適化した試験法を様々な物理的・化学的特性を有するリポソーム製剤に適用し、品質特性と*in vitro*血液適合性との関連性を明らかにするとともに、いくつかの特性についてはすでに報告されている内容との一致を確認し、本手法の妥当性を示すことができた。

### (1-3) 核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価法の開発

siRNA（small interference RNA）は21-23bp程度の2本鎖RNA分子であり、標的mRNAを特異的に切断することで遺伝子発現を抑制することができる。近年、リポソームや高分子ミセルを始めとするナノテクノロジーを応用したキャリアの利用等、多くの送達技術が開発中である。リポソーム、及びsiRNAを異なる蛍光特性を持つ色素でそれぞれ標識後、複合体を形成し、2種類の細胞に添加後、共焦点顕微鏡で観察することにより、siRNA、脂質、及び両者の複合体の局在を観察することが可能となった。

### (2) ナノ医薬品の分類に関連した規制動向について

製剤側の特性を利用した機能、及び生体側の特性を利用した機能によりナノ医薬品の分類を試みた。さらに、ナノ医薬品の分類に関する国際的な動向を調査した。

### (3) ナノDDS製剤の評価について

#### (3-1) 同等性／同質性評価について

ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤のようなナノDDS製剤の開発に同等性／同質性（コンパリティ）の概念を適用することの適切性につい

て、バイオ医薬品と対比させ考察した。欧州医薬品庁から発出されているリポソーム製剤の後続品開発に関する文書を参照しつつ、有効性の同一性、製剤の生物学的同等性の観点から考察した。

#### (3-2) リポソーム製剤の評価について

同等性／同質性の考え方やこれまでに得られた研究成果を踏まえ、リポソーム製剤の評価に関する文書化に着手した。品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性評価の節は、申請時に必要なデータセットを想定して作成することとする。一方、First in humanの節は、ヒトに初めて投与するまでに確認しておくべき品質、非臨床データは何か、またヒト初回投与量設定において考慮すべき点に関して記述することとした。ブロック共重合体ミセル医薬品とリポソーム製剤では、開発コンセプトは同様であるが、前者は有効成分がミセル形成の駆動力となりうるのに対し、後者は、有効成分なしでも脂質ベシクルを形成しうるなど、大きく異なる特性も有する。これらの違いに留意しながら、文書化を進めることが重要である。

## C-2 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

### (1) SPR法及びBridging-Luciferase Assayを用いた解析手法の有用性評価

#### (1-1) Fc領域の構造変化がFc $\gamma$ 受容体を介した薬理作用の発揮に及ぼす影響の評価

SPR法によるFc $\gamma$ 受容体結合親和性評価系、および、Fc $\gamma$ 受容体発現細胞を用いたBridging-Luciferase AssayによるFc $\gamma$ 受容体活性化能評価系を構築し、その有用性評価の一例として、抗体医薬品の分子変化体の生物活性評価を行った。

酸化剤tBHPを用いて強制酸化処理を施し、Fc領域に構造変化を生じた抗EGFR抗体セツキシマブを試料とした。tBHP処理では、メチオニン残基の酸化が生じる。tBHP処理により、FcRnに対する結合親和性の著しい低下が確認されたが、抗原との結合には顕著な影響は認められず、Fc $\gamma$ RI、IIa、IIIaに対する結合能にも顕著な影響は認められなかった。次にFc $\gamma$ 受容体を介した免疫エフェクター細胞の活性化能への影響を検討する目的で、標的細胞としてEGFRを

高発現するA431細胞を用いたBridging-Luciferase Assayを実施した。Fc $\gamma$ RIIa発現細胞ではtBHP処理濃度に依存してエフェクター細胞活性化能の減弱が認められ、tBHP処理によってセツキシマブのFc $\gamma$ RIIa活性化能が低下することが示された。Fc $\gamma$ RIIIa発現細胞を用いた場合は、エフェクター活性の減弱は認められなかった。tBHP処理による構造変化がFc $\gamma$ RIIa活性化能を低下させるという新しい知見が得られ、Fc $\gamma$ R結合及び活性化に関するこれらの評価系の有用性が明らかになった。

#### (1-2) LF-Fcの特性解析への応用

上記と同様の評価系を用い、新規改変タンパク質製剤のモデルとして、Lactoferrin-Fc融合タンパク質(LF-Fc)、及び、ヒンジ領域欠損LF-Fcの特性解析を行った。Lactoferrinは、抗炎症作用等を持つタンパク質で、ヒンジ領域欠損LF-Fcは、Fcを介した免疫活性化により生じる有害反応の回避を目的に作製されている。SPR法によるFc $\gamma$ 受容体結合性解析を行った結果、ヒンジ領域欠損LF-FcのFc $\gamma$ 受容体結合性は、LF-Fcより低く、Fc $\gamma$ RI結合性は検出されたが、Fc $\gamma$ RIIa、IIIaとの結合は検出されなかった。Fc $\gamma$ 受容体発現レポーター細胞を用いてFc $\gamma$ 受容体活性化能を評価したところ、LF-Fc単独によるFc $\gamma$ RIIIa活性化が認められたのに対して、ヒンジ欠損LF-FcではFc $\gamma$ RIIIa活性化が認められなかった。LF-Fc単独でのFc $\gamma$ 受容体活性化は、infusion reaction等の有害反応につながる可能性が考えられることから、有害反応の回避を目的に作製されたヒンジ領域欠損LF-Fcの特徴を明らかにすることができ、本評価系の有用性が示された。

#### (2) 改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項

##### (2-1) 改変タンパク質製剤の分子設計における課題

改変型抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤では、近年、皮下投与製剤が増えている。改変タンパク質の分子設計においては、目的とする適応疾患、剤形、投与経路等を念頭に、有効性・安全性を得るために必要な薬理作用、薬物動態、ならびに、製剤化を考え、構造の至適化が進められるが、その他に、有効性低下や有害反応発生につながる可

能性のある免疫原性、さらには、製造工程や品質管理の効率についても考慮した分子設計が必要である。

製剤化を考慮した場合に重要となるのは、溶解性、安定性である。免疫調節薬が用いられる慢性疾患では、自己注射が可能な皮下投与製剤が好まれる傾向が強くなっており、静脈内投与製剤が承認されて数年後に、皮下投与製剤が開発・承認される例も出てきている。皮下投与製剤では液量が限られ、高濃度の溶液が必要となる。抗体医薬品の投与量は高く、数十mg/ml程度の高濃度の溶液が必要になることもあり、製剤処方最適化のみでは目的とする濃度での溶液製剤の作製が困難な場合もあり得るため、分子設計の段階から、製剤化を考慮した分子の選択が必要である。

##### (2-2) 非臨床評価の課題：改変抗体医薬品のFc $\gamma$ R結合性の種差

改変型抗体製剤の非臨床試験の際、モデル動物の妥当性として、標的分子との結合性が考慮されているが、Fc受容体の種差については十分に考慮されているとは言えない状況である。しかし、Fc $\gamma$ 受容体との結合は、抗腫瘍効果やアゴニスト活性の増強、あるいは、infusion reaction等の有害反応に関わることから、ヒトへの外挿性を確保する上で、Fc受容体結合性の種差に関する情報が重要となる。そこで、非臨床試験結果のヒトへの外挿性に関する留意事項を明確化するため、ヒト、非ヒト霊長類、及び、マウスのFc $\gamma$ Rに関して、受容体ファミリー分子の種類、発現分布に関する最新情報を整理すると共に、種々の抗体に関して、Fc $\gamma$ 受容体結合性の種差を解析した。

##### (2-2-1) ヒト、マウス、カニクイザルFc $\gamma$ 受容体の構造と発現分布の種差に関する調査

ヒトFc $\gamma$ 受容体には、Fc $\gamma$ RI、IIa、IIb、IIIa、IIIbの5種類のファミリー分子が存在し、それぞれ、抗体医薬品等の有効性安全性への寄与が考えられる。非ヒト霊長類では、Fc $\gamma$ 受容体ファミリー分子の構造はヒトと類似しているが、非臨床試験に用いられるカニクイザル、アカゲザルにはヒトFc $\gamma$ RIIIbの相同タンパク質が存在しないことが、大きな特徴の一つである。マウスには、Fc $\gamma$ RI、II、III、IVが存在するが、マウスFc $\gamma$ RIIはヒトFc $\gamma$ RIIIbと類似しており、

ヒトFcγRIIIaの直接的な相同タンパク質が存在しない。また、マウスFcγRIIIはNK細胞に発現する唯一のFcγ受容体であり、ヒトFcγRIIIaと同様にCD16と命名されている一方で、系統学的にはヒトFcγRIIIaと類似している。マウスFcγRIIIはヒトFcγRIIIと一次配列上約60%の相同性を有するが一方で、IgGに対して高親和性を示すことやIgE受容体として機能することなど、ヒトFcγRIIIとは異なっている。マウスには、ヒトFcγRIIIbの相同タンパク質が存在しないことも大きな特徴の一つである。

#### (2-2-2) ヒト、カニクイザル、マウスFcγ受容体と改変タンパク質製剤の結合性と外挿における課題

前述のように、ヒト、非ヒト霊長類、及び、マウスのFcγ受容体には、構造や発現分布の差があるが、ヒトFcを持つ抗体の結合性の種差については明らかにされていない。SPR解析法を用い、各種改変型抗体について、ヒト、カニクイザル、マウスのFcγ受容体との結合親和性を比較した。ヒトIgG1抗体では、マウスFcγRIIIへの結合がほとんどなく、FcγRIIIへの結合が認められた。糖鎖改変により、FcγRIIIa結合親和性を上昇させた改変抗体であるモガムリズマブでは、ヒトと同様サルFcγRIIIaに関しても結合親和性の上昇が観察されたものの、マウスFcγRIIIは結合せず、FcγRIIIbにおいて、結合親和性の上昇が認められた。ヒトIgG2抗体であるパニツムマブでは、ヒトFcγRIIIbよりサルFcγRIIIbへの結合性が特に高く、顕著な種差が認められた。ヒトIgG4由来Fcを持つナタリズマブでは、サル、及び、マウスFcγ受容体各サブクラスへの結合性が低かったが、特にFcγRI結合性の相違が大きく、種差が認められた。非臨床試験結果のヒトへの外挿の際には、これらの種差を考慮する必要があると考えられた。

#### (2-2-3) 非臨床試験結果からのヒトでの安全性予測

抗体医薬品の有効性・安全性には、標的抗原との結合を介した作用の他、Fcγ受容体の活性化を介した作用が関与する。近年ではバイオ医薬品のヒト初回投与量の算出にあたり、非臨床薬理試験に基づいた推定最小薬理作用量 (MABEL: Minimal Anticipated Biological Effect Level) を考慮することが求められて

いるが、マウスを用いた試験では、Fcγ受容体を介した薬理作用のヒトへの外挿は困難である。カニクイザルなどの非ヒト霊長類はヒトに近い構造と発現分布を示すFcγ受容体を有しており、抗体医薬品の非臨床試験において有用な実験動物であるといえる一方で、マウスに比べて非ヒト霊長類のFcγ受容体とヒトIgGとの相互作用については未解明な点が多く、本研究で明らかになったような種差を考慮すべきである。

### C-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

#### (1) 核酸医薬品のオフターゲット効果の評価法に関する調査および考察

核酸医薬品の開発状況や作用メカニズムに関する調査研究の結果は、「論文発表等: 文献27」に取りまとめたのでここでは割愛する。ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の評価を行う必要があると思われる核酸医薬品はRNAを標的とするもので、開発動向を加味すると、現時点では、①RNAを分解する「siRNA」および「Gapmer型アンチセンス」、②RNAに結合し、立体障害により作用する「スプライシング制御型アンチセンス」および「miRNA阻害型アンチセンス」の4つについて対応を検討すればよいと思われる。siRNAのオフターゲット効果に関しては先行研究が進んでおり、複数の論文でオフターゲット効果の起こる配列法則性や回避するための方法論が報告されている (*Nat Biotechnol.* 21, 635-637, 2003等)。Gapmer型アンチセンスに関しては、本研究において解析を行っている (後述)。スプライシング制御型アンチセンスに関しては、「厚生労働科学研究 創薬基盤推進研究事業」における「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発 (研究代表: 合田幸広)」の26年度報告書 (分担研究課題: 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発) で議論を行っている。miRNA阻害型アンチセンスに関しては、確率的に他のmiRNAを阻害することはほとんどないと考えられるが、スプライシング制御型アンチセンスと同様の機序でオフターゲット効果を誘発する可能性があると考えられる。

(2) オフターゲット候補遺伝子数の見積もりなら  
びに抽出法に関する研究

オフターゲット候補遺伝子数の見積もりに関しては、確率計算により算出した理論値と5195本のアンチセンスを用いて*in silico*解析した実測値（平均値）は大まかに一致しており、理論値計算によりオフターゲット候補遺伝子数を概算できることがわかった。また、ミスマッチを許容するとオフターゲット候補遺伝子は一気に増加し、例えば、14塩基のアンチセンスを想定した場合、完全相補する遺伝子は1つ程度であるが、2塩基ミスマッチでは300近い遺伝子がヒットすることが明らかになった。この結果から、アンチセンスとミスマッチ等の不適合箇所を有する遺伝子がオフターゲット効果の影響を受けるか否かを検証することが重要であると考えられた。

(3) Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果  
の包括的解析

Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果を検証することで以下の点を明らかにした。

- 13、15、18塩基長のGapmer型アンチセンスのいずれにおいても、明確なオフターゲット効果が観察され、相補性が高いほど発現抑制を受ける遺伝子の割合が大きいことがわかった。
- Gapmer型アンチセンスの塩基長が長くなるほど、ミスマッチの影響は小さくなり、多くのミスマッチが入っても発現抑制される確率が高くなる傾向にあった。しかし、塩基長が長くなると相補結合する遺伝子の数が著しく少なくなるため、結果的には、短い塩基長のアンチセンスほどオフターゲット効果が起こる遺伝子の数が多くなることが示唆された。
- 今回の解析から、各塩基長のGapmer型アンチセンスについて、相補性の程度と発現抑制される遺伝子の割合の関係が明らかになったが、発現抑制される遺伝子と発現抑制されない遺伝子を*in silico*解析から予測することは現時点では難しいことがわかった。
- マウス肝培養細胞とマウス肝臓のオフターゲット効果の比較から、リポフェクション法で十分量のアンチセンスを導入する培養細胞よりもマウ

ス組織の方が発現抑制の程度が弱い傾向にあった。重要な点として、個体の組織において強く発現抑制されたオフターゲット遺伝子は、培養細胞においても強く発現抑制されており、培養細胞の試験系で個体のオフターゲット効果を高い確率で予測できることがわかった。

- ヒト肝細胞キメラマウスにおいてもオフターゲット効果による発現抑制が観察され、ヒトにおけるオフターゲット効果の発現を動物個体で検証できるポテンシャルが示された。ただし、今回検討を行った投与量ではアンチセンスの肝臓内への導入が十分でなかったと考えられるなど、今後精査すべき課題も明らかとなった。

C-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

(1) タンパク質の凝集に影響を及ぼす因子の評価  
法に関する調査

タンパク質性医薬品は保存により様々な品質変化を引き起こすことが知られているが、本年度はタンパク質において普遍的に起こり得る凝集に着目し、凝集のしやすさに影響を及ぼすタンパク質側の因子の評価法について調査した結果、Spatial Aggregation Propensityというパラメータを用いた分子動力学シミュレーションによって見積もった変異型および野生型モノクロナル抗体表面の疎水性の領域の広さ及び疎水性の強さが実験的にもとめた凝集のしやすさと関連することが示され (PNAS, 106, 11937 (2009))、タンパク質表面の疎水性領域を評価することにより凝集のしやすさを予測できることが分かった。また、動的な揺らぎによって疎水性アミノ酸残基がタンパク質表面に現れることが分子動力学シミュレーションによって示された (PLOS ONE, 4, e8425 (2009))。

(2) タンパク質の動的な揺らぎの<sup>13</sup>C-NMR緩和時間  
による評価

タンパク質表面の疎水性領域の広さに影響する動的な揺らぎを<sup>13</sup>C-NMRによって評価する方法について市販モノクロナル抗体製剤を用いて検討した。タンパク質を5%以上含有すれば動的な揺らぎの指標である<sup>13</sup>C-NMR緩和時間が測定できた。糖類などの添加剤の有無によって緩和時間に差が見られ、

$^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間は製剤中のタンパク質の動的な揺らぎの評価に有用であることが示唆された。いくつかの抗体医薬の市販製剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を変化させた試料についてタンパク質カルボニル炭素の緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。ヒュミラ皮下注のカルボニル炭素の緩和時間は3.4sであるのに対し、水に対して透析し、塩や添加物濃度を低下させた試料では2.7sに短縮した。一方、0.9%の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液に対して透析し、塩濃度を増加させた試料では3.6sであった。アクテムラ点滴静注用に処方されるトズマブのカルボニル炭素の緩和時間は2.5s、レミケード点滴静注用に処方されたインフリキマブ（凍結乾燥品を5%の濃度に溶解）については3.2sであった。抗体タンパク質の違いによって緩和時間が異なることから、 $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間によりタンパク質の動的な揺らぎが評価できることが示唆された。

### (3) サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相カラムを高速液体クロマトグラフィーによる抗体タンパク質の保存安定性の実測

25°Cで3か月保存した試料のサイズ排除クロマトグラムは非常に小さいがメインピークの前にピークが観測され、分子サイズの大きな分解物が生成していることが示された。製品によって分解物の生成量に差が見られた。タンパク濃度が高い製品においては、25°Cで2週間の保存によっても分解物量の増大が観測された。一方、逆相カラムを用い、デスアミド体等の極性の変化する分解物の生成について検討したが、いずれの製剤においても、今回検討した保存温度と時間ではクロマトグラムに大きな変化は見られなかった。

分子サイズが大きな分解物の生成速度は非常に小さく、正確な値を求めるためにはさらに長期の保存実験が必要であるが、今回得られた結果から大まかに見積もると、アクテムラ点滴静注用、レミケード点滴静注用水に溶解したもの、ランマーク皮下注、ヒュミラ皮下注の順に生成速度が大きくなる傾向が見られた。

(4) 等温マイクロ熱量計を用いた分解に伴う熱の測定  
抗体医薬の分解に伴う熱 (Q) は、単位時間あたりに生成する分解物の量と分解熱 $\Delta H_d$ の積によってあらわされ、分解が一次反応速度式に従う場合は次式の関係が成り立つ。

$$Q = \Delta H_d \times d[D]/dt = \Delta H_d \times k[P]$$

ここではkは分解速度定数を表し、[P]はタンパク質濃度を表す。分解の初期はタンパク質の濃度は初濃度[P]<sub>0</sub>で近似できるので、Qの値は一定となる。

$$Q \approx \Delta H_d \times k[P]_0 = \text{一定}$$

測定開始直後に比較的大きな熱が検出された後、ほぼ一定の熱が観測された。測定開始直後の熱は測定ごとに大きさや符号がランダムに変わることから、タンパク質の分解に伴う熱ではないと考えられる。本測定は試料溶液と対照として水を入れた容器を用い、それらの容器の温度差から熱を見積もっている。容器を装置にセットするときのショックや容器のシール材として使用されるゴム製のoリングの緩和などが原因と考えられる。15日以降の0.1 $\mu\text{W}$ 程度の微小な熱は100日まで測定してもほぼ一定であり、タンパク質の分解に伴う熱と考えられる。タンパク質1gあたりの熱の大きさはアクテムラ点滴静注用が約0.9 $\mu\text{W}$ 、レミケード点滴静注用を溶解したものが約1.8 $\mu\text{W}$ 、ランマーク皮下注が約4.6 $\mu\text{W}$ 、ヒュミラ皮下注が約5.5 $\mu\text{W}$ であった。これは分子サイズが大きな分解物の生成速度と同じ順番であり、等温マイクロ熱量計による分解熱と保存安定性が関連することが示唆された。分解物生成速度、分解熱は十分な精度をもって測定されていないが、両者の間には相関があるように見え、分解熱測定によりタンパク製剤の安定性を予測可能であると思われる。

### (5) 抗体タンパク質の $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間と安定性の関係

抗体タンパク質の $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間は製品によって異なっており、アクテムラ点滴静注用が約3.8秒、レミケード点滴静注用を溶解したものが3.1秒、ランマーク皮下注が2.8秒、ヒュミラ皮下注が2.7秒であった。NMR緩和時間と分子運動性の関係は複雑であり、分子運動性が非常に高い場合は、運動の速度と緩和時間は比例関係がある。すなわち、緩和時間が長い



ほど運動速度が大きい。しかし、緩和時間はある速さの分子運動で極小値をとり、さらに運動性が低くなると運動の速度と緩和時間は反比例の関係を示す。すなわち、緩和時間が大きいほど分子運動が遅い。今回検討したタンパク質の緩和時間は分解速度が小さいタンパクほど大きいことから、運動の速度と緩和時間の間に反比例の関係が成り立つ運動速度の領域での測定と考えられる。それを確認するためには温度を変えた緩和時間の測定が必要である。緩和時間の逆数の値が大きいほど分解物生成速度が大きい傾向があることから、緩和時間はタンパク質の安定性の指標として用いることができると考えられる。

#### C-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

##### (1) 遺伝子治療用製品の開発動向の調査とガイダンスの整備に関する研究

###### (1-1) 遺伝子治療用製品の開発と規制の現状

遺伝子治療用製品の開発動向としては、単一遺伝子欠損症などの希少難病に対する遺伝子治療でレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療やアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた*in vivo*遺伝子治療で有効性が確認されており、がんの遺伝子治療では腫瘍溶解性ウイルスや遺伝子改変T細胞を用いる遺伝子治療が有望である。2012年に先進国で初めて遺伝子治療用製品(リポ蛋白リパーゼ欠損症治療用AAVベクター)の製造販売が承認され、欧米では大手製薬企業による開発も活発化している。このような開発動向に対応するために、欧米では遺伝子治療の基本指針のみならず、レンチウイルスやAAV等の個別のベクターや挿入変異リスクや製法変更等の個別課題に対するガイダンス・リフレクションペーパーを数多く発出している。また、欧米では臨床研究も治験も同一のIND審査が行われている。一方、日本では臨床研究と治験は別の指針に基づき異なる審査が行われている。また両指針は約20年前に作成されて以降、品質・安全性確保に関する内容は更新されず遺伝子治療の進歩や臨床での使用経験が反映されていないため、現行指針の改正や新たな指針・ガイダンスの作成が必要と考えられる。

###### (1-2) AAVベクターの開発と品質・安全性確保

AAVベクターは非病原性ウイルスに由来し、非分裂細胞では染色体外で長期遺伝子発現することや血清型により組織特異性が異なる特徴を持つ。AAVベクターの開発において考慮すべき品質・安全性の要件はEMAが2010年に発出したReflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors)や欧州薬局方等を基に検討した。AAVベクターではベクターの最適化や血清型の選択及び一定の品質と安定性を示すベクターの大量製造法の確立が開発の課題となる。品質・安全性評価では増殖性AAVの混入、挿入変異の可能性、生殖細胞への遺伝子導入やベクターの排出への考慮が必要である。また動物モデルは人と組織特異性が異なる可能性に注意が必要であり、患者への投与後、長期フォローアップが必要と考えられることなどを明らかにした。

###### (1-3) 染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保

染色体組込型ベクターとはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなど染色体にゲノムを挿入する機構(インテグラーゼ)を持ち長期遺伝子発現が可能なベクターで、主に*ex vivo*で単一遺伝子疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療や、がんに対する遺伝子改変T細胞療法を中心に開発が進められている。染色体組込型ベクターの安全性確保における最重要課題は挿入変異やがん化のリスクである。挿入変異のリスク管理についてはEMAが2013年に発出したReflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesisを中心に検討し、挿入変異のリスク要因とリスク低減化のために考慮すべき事項、非臨床で実施すべき染色体への組込試験や挿入変異のリスク評価のための*in vitro*試験及び*in vivo*試験、臨床試験での患者の長期モニタリング法などをまとめた。

###### (1-4) 遺伝子治療用製品の開発途中での製法変更や設計変更を行う場合の考え方

遺伝子治療用製品では、開発途中で製法や設計の変更が良く行われるが、このような場合に必要となるデータについて、EMAのReflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during

developmentを中心に検討した。良く行われるベクターコンストラクトの設計変更例として、プラスミドベクターの抗生物質耐性遺伝子の変更やAAVベクターの血清型の変更、レトロウイルスベクターの自己不活化型ベクターへの変更などの例を取り上げ、導入した変更に伴い必要となる追加の非臨床試験の範囲や変更前のベクターで得られた非臨床試験データの利用、追加の非臨床試験が必要とされる場合の非臨床モデルの関連性、その後の臨床試験の開始前に新旧ベクターの製品設計の違いをブリッジングさせるために必要とされる非臨床データ等について、変更時にどの程度のデータを収集すれば良いかをまとめた。

## (2) 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法に関する研究

### (2-1) デジタルPCR法を用いた遺伝子治療用ベクターの品質評価

定量PCR法は遺伝子治療製品の品質・安全性評価においてベクターや導入遺伝子の高感度定量法として汎用されているが、従来の定量PCR法を改良した新しいPCR技術でコピー数を絶対定量可能とされるデジタルPCR法の遺伝子治療製品に適用する際の要件について検討した。デジタルPCRは定量PCR法と比較して血漿中のベクターを10倍程度高感度に検出可能であるが、試料によっては定量PCR法と同等の感度しか得られない場合もあり、定量範囲が定量PCR法よりも狭く、測定に時間もかかるという欠点も確認された。ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価では、標準品の得られないウイルスを定量可能なデジタルPCRによるウイルスゲノム定量法の有用性が確認された。ex vivo遺伝子導入細胞へのベクターの残存性の評価では、デジタルPCRによる測定では細胞への感染条件や細胞の洗浄条件によって理論値よりも多くのベクターが残存する可能性が示されたが、37℃の培養過程で時間経過と共に感染性は失われていくことが示唆された。

### (2-2) 次世代シークエンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価

製造方法の異なる2種類のレトロウイルスベクターを取り上げキャピラリーシークエンサーと次世代

シークエンサーにより塩基配列解析を行った。その結果、ベクター産生細胞を用いて製造したベクターは品質が一定で、次世代シークエンサーによって十分なカバレッジでの全塩基配列解析が可能であり、配列に変異が生じた場合でも検出可能であった。しかし、一過性のトランスフェクションで製造したベクターは品質の恒常性が製法毎に異なることがキャピラリーシークエンサーの結果からも、次世代シークエンサーの塩基配列解析のカバレッジの悪さからも明らかにされ、生産細胞系によるベクターの品質の一定性が異なることが示された。

## C-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

### (1) インスリン製剤の臨床評価方法

インスリン製剤は、単剤では超速効型、速効型、中間型、混合型、持効型に分類され、超速効型と持効型糖の異なる種類の配合剤等がある。このため、新有効成分含有医薬品の場合、混合型製剤や配合剤の場合等、開発する製剤の特徴に応じて、必要な試験を特定した。

### (2) インスリン製剤併用時の臨床評価方法

医療現場では血糖降下薬とインスリン製剤が併用される場合も多く、インスリン製剤と治験薬を長期間併用した場合の安全性、有効性を確認することも必要であり、その方法を明確化することが望まれていた。投与期間はICH E1ガイドラインにおける安全性を評価するために必要な症例数及び期間を考慮し1年以上とするが、特にインスリン製剤は、血糖値に応じて用法・用量の調節がなされ、併用試験においてはインスリン製剤の用法・用量変更による安全性及び有効性への影響が大きいと考えられることから、投与期間の中で被併用薬であるインスリン製剤の用法・用量を原則として一定とする二重盲検期間（通常12～24週間）を設定することが必要であることを明確にした。

### (3) その他

現行ガイドラインが公布されて以降の診療ガイドライン等の改訂を踏まえ、妊娠糖尿病の定義を更新する等の改訂を行った。また、パブリックコメントに寄せられた意見、質問を踏まえ、インスリン製剤

併用試験における対象患者や用量の取扱いにかかる考え方を明確化するなどの対応をした。

## D. 考察

### D-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

本研究課題では、従来の製剤とは異なるナノDDS製剤の特性、特に生体成分との相互作用に着目し、体内での挙動や安全性を予測しうる*in vitro*評価手法を構築してきた。さらに、構築した手法を用い、ナノDDS製剤の品質特性と*in vitro*製剤特性（血液適合性、細胞内動態等）について知見を蓄積することができた。

ナノDDS製剤はその品質特性や、意図された生体内での機能も多様である。近年、欧米の規制当局は、ナノ医薬品を分類するための作業定義や、ナノテクノロジーを応用した製品であるかどうかの判断基準を公表している。1つのナノDDS製剤が複数のナノメートルサイズの構成要素を有している場合は、その適切な品質特性評価のために、各要素を分離して評価することも今後は必要になってくるかもしれない。複数の分析手法の組み合わせによる品質特性評価が重要になってくるであろう。

ブロック共重合体ミセルは製剤組成、製法が複雑であり、サイズや表面物性等の製剤の物理的・化学的特性が細胞やタンパク質との相互作用、組織・臓器分布等に影響を与えることにより有効性や安全性へ直接的に影響し得る。このような観点から2014年1月に発出された「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー」において、“開発段階における製法の変更時においてはICHQ5Eに記載の製造工程変更前後の製品間の同等性／同質性（コンパラビリティ）評価の適用を考慮することも重要である”との記載をした。リポソーム製剤においては、すでに我が国においても3製品が臨床応用されており、開発段階における変更のタイミングに応じて同等性／同質性評価において配慮するポイント、製法変更を分類し、望まれる評価作業内容を整理する等の試みも可能であろう。ブロック共重合体ミセル医薬品とは異なる特性に留意しつつ、海外より発出されて

いるナノ医薬品関連の文書を参考にしてリポソーム製剤の評価に関する文書化・国際的な発信を目指したい。

### D-2 改変タンパク質製剤の評価に関するRS研究

#### (1) SPR法及びBridging-Luciferase Assayを用いた解析手法の有用性評価

SPR法を用いたFcγR結合親和性評価系、及び、Fcγ受容体発現レポーター細胞を用いたBridging-luciferase assay系を用いて、tBHP処理によりFcに構造変化を生じた分子変化体の解析、LF-Fc及びヒンジ領域欠損LF-Fcの解析を行い、構築した*in vitro*評価系として、Fcγ受容体結合／活性化評価系の有用性を示すことができた。

#### (2) 改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項

改変タンパク質の分子設計は、生産用細胞株の樹立、治験薬製造、非臨床試験、臨床試験等からなる一連の開発過程の入り口であり、生産に適した高発現株の樹立には、数か月以上の期間と多大な労力がかかることから、適切な生産用細胞を効率的に構築することが、開発初期段階での重要課題の一つとなっている。開発途中でアミノ酸配列を変更することになると、生産用細胞の構築、非臨床試験等を全てやり直すことになるため、開発過程で考慮すべき事項を早期に明確化して解析を行い、必要に応じて改変を行う等、適切な分子設計を行うことが重要である。

改変型抗体医薬品に代表される改変タンパク質製剤では、作用の種特異性が高いため、非臨床試験結果に基づくヒトでの安全性予測が困難な場合が少なくない。本研究は、多くの改変型抗体医薬品の評価において課題となるFc領域の機能評価系に着目し、モデル動物とヒトのFc受容体の種差の観点から、非臨床試験結果のヒトへの外挿性に関して、最新の知見を整理し、改変抗体のFcγ受容体結合性の種差を明らかにした。非臨床試験結果のヒトへの外挿には抗原結合のみならずFcγ受容体結合の種差を考慮する必要があり、ヒトでの安全性予測には、本評価系のようなヒト*in vitro*系の試験結果を合わせた考察が不

可欠であると考えられた。

### D-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

Gapmer型アンチセンスを開発するにあたり、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の観点から留意すべき点を考察する。

- ・本研究の成果は、オフターゲット候補遺伝子を抽出する際に「どの程度の相補性を持つ遺伝子までピックアップすれば良いか」を判断するための1つの科学的根拠を提示している。注意すべき点として、今回の解析は「オフターゲット効果が起こりやすい条件」で検証を行っている点が挙げられる。本研究の結果を参考にしながらも、①ヒトにおいて実際に有効性を発揮する濃度は今回の解析より低いと推定されること、また、②相補性が低いオフターゲット候補遺伝子は統計的には変動する可能性があるが、変動する確率は極めて小さいこと、などを考慮して、オフターゲット候補遺伝子を抽出するための検索条件を考察することが望ましいと思われる。
- ・ *in silico*解析では発現抑制される遺伝子を予測することができないため、オフターゲット候補遺伝子が実際に発現抑制されるか否かを、ヒト細胞を用いて検証する必要があると考えられる。その際、発現抑制される遺伝子が数十から数百に及ぶ可能性が考えられるため、マイクロアレイのような網羅的な手法を用いるのが現実的と考えられる。
- ・ ヒト細胞を用いた検証は実際に発現抑制される遺伝子を特定できる点で有用であるが、当該細胞に発現していない遺伝子に関しては検証ができないという欠点がある。この点は*in silico*解析と合わせて解析することで互いの弱点を補う必要がある。今回の解析から、完全相補あるいは1塩基ミスマッチのような相補性が高い遺伝子に関しては、高い確率でオフターゲット効果が誘導されることが明らかになった。すなわち、相補性が高い遺伝子に限定すると予測性は高いと考えてよい。*In vitro*試験に用いたヒト細胞に発現していない遺伝子であっても、アンチセンスと相補性が高い遺伝子については、オフターゲット効果が起

こるという前提に立ち、安全性担保の観点から当該遺伝子の機能を考察する必要がある。

### D-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

タンパク質の分子サイズの大きな分解物の生成速度と等温マイクロ熱量計による分解熱やタンパク質のカルボニル炭素の<sup>13</sup>C-NMR緩和時間との間に関連があることを示唆する結果が得られた。今回使用した<sup>13</sup>Cの共鳴周波数100MHzの装置を用いた場合、<sup>13</sup>C-NMR緩和時間は数日の測定時間を要する。また、十分なs/n比を得るためにはさらに長い測定時間が必要となる。等温マイクロ熱量計による分解熱の測定には定常状態になるまでに1ヶ月を要することから、測定時間の観点からは<sup>13</sup>C-NMR緩和時間が有利であると考えられる。しかし、<sup>13</sup>C-NMR緩和時間と分子運動性の関係は運動の速度によって比例関係が成り立つ場合と反比例の関係が成り立つ場合があり、緩和時間の温度依存性を検討することなどによりタンパク質の運動性と緩和時間の関係を詳細に検討する必要があると考えられる。

NMR緩和時間や分解に伴う微少な熱が保存安定性と関連することが示唆されたことから、実時間で保存に比べ、短時間で安定性評価が可能になり、革新的なタンパク質医薬の実用化促進につながるものと考えられる。

### D-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

#### (1) 遺伝子治療用製品のガイダンスの整備に関する研究

本研究期間中に我が国の遺伝子治療を巡る規制状況は大きく変化し、遺伝子治療薬の治験を開始する前に必要とされた確認申請は2013年に廃止され薬事戦略相談に変更された。また2014年の薬事法改正により、遺伝子治療薬は「医薬品」ではなく遺伝子治療製品として「再生医療等製品」に分類され、条件・期限付早期承認が可能となるなど、遺伝子治療製品の開発・実用化を促進する環境は整備されつつある。遺伝子治療用製品開発の上での課題である指針やガイダンスの整備については、本研究と並行して「遺伝子治療用製品の品質及び安全性の確保に関する指