

たい。国内企業の話題としては、日東電工/Quark 社が開発する ND-L02-s0201 (標的: HSP47, 適応: 肝硬変) が挙げられ、海外で Phase 1 試験が開始されている。siRNA 医薬品の臨床試験は、国内企業としては初めての例である。ND-L02-s0201 では、肝臓における活性化星細胞に取りこませることを目的として、ビタミン A が結合したリポソーム製剤を用いている。siRNA 医薬品の開発状況に関しては文献 20, 21 も合わせて参照されたい。

5.3 miRNA に関連する核酸医薬品

非コード RNA の一つである miRNA は 20 数塩基の短い一本鎖 RNA で、主に mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することで、mRNA の機能を阻害する。miRNA も 1993 年に線虫を用いた研究から発見され^{22, 23)}、2001 年になってヒトも含めた多くの生物種で miRNA が存在することが示された²⁴⁾。miRNA の生成機構/作用機構は siRNA のパスウェイと類似している。すなわち、ゲノム DNA から転写されてヘアピン構造をとった pri-miRNA は、二段階の切断を受けて siRNA と同じ二本鎖 RNA となる。その後、siRNA と同様に RISC 複合体に取りこまれた後、相補鎖であるパッセンジャー鎖が除かれて、一本鎖ガイド鎖 (= miRNA) が RISC 複合体に残る。この複合体がガイド鎖に相補的な mRNA を認識し、mRNA の翻訳抑制あるいは分解を引き起こす。siRNA との違いや詳細な分子機構はここでは割愛し、miRNA が標的 mRNA の機能を抑制することを強調しておく。

miRNA に関連する核酸医薬品は「miRNA の発現異常によって引き起こされる病態を、miRNA の量を正常化することによって治療する」というコンセプトで創製される。まず、miRNA の発現が減少した病態については、miRNA を補充する試みが行われる。miRNA とは上述の生成経路の最後に生じる一本鎖 RNA を指すが、miRNA が機能を獲得するためには相補結合した二本鎖の状態では RISC 複合体に取りこまれた後、一本鎖 RNA (= miRNA) になる必要がある。したがって、miRNA を補充する療法では二本鎖 RNA の状態で細胞内に導入することとなる。このように miRNA を補充する目的で使われる二本鎖 RNA は“miRNA mimic”とも呼ばれ、二本鎖 RNA であるため体内への導入にはキャリアが必要である。一般に癌においては miRNA の発現が減少していることから、miRNA mimic は癌への適応が特に期待されている。現時点では非臨床試験の段階であり、開発している企業としては Mirna 社が挙げられる。

miRNA の発現が亢進した病態では、miRNA の量を減少させる方法論が必要である。miRNA は短い RNA であることから、ほぼ同じ長さの siRNA によって miRNA を

認識し、分解することは事実上不可能である。そこで、miRNA の機能を抑制する手法として、miRNA と相補的に結合するアンチセンスが用いられる。miRNA 阻害型アンチセンスは、miRNA と標的 mRNA の結合をブロックするものであり、アンチセンス医薬品の分類としては「立体障害」となる (Table 3)。miRNA 阻害型アンチセンスの開発を行っているのは、アンチセンス医薬品開発の代表格 ISIS 社と siRNA 医薬品開発の代表格 Alnylam 社が合同で設立した Regulus 社、並びに Santaris 社、Miragen 社がある。

現在、miRNA 阻害型アンチセンスで臨床試験段階にあるのは、Santaris 社が開発している Miravirsen である。Miravirsen は架橋型核酸 LNA を含むアンチセンスであり、皮下注射に投与された後、肝臓で機能する。Miravirsen の標的である miR-122 は肝臓特異的に発現する miRNA で、miR-122 が C 型肝炎ウイルスの RNA に結合することがウイルス増殖に必須である。皮下投与された Miravirsen は肝細胞内で miR-122 をトラップするため、C 型肝炎ウイルスの増殖が抑制される。Miravirsen は Phase 2 で良好な結果が得られており、Phase 3 に入るところである。miRNA に関連する核酸医薬品の関しては文献 25, 26, 27 も合わせて参照して頂きたい。

5.4 デコイ

デコイ核酸医薬品は「転写因子が結合する DNA 領域の塩基配列」を人工的に合成した二本鎖の DNA である。デコイを細胞内に導入すると、標的の転写因子に「おとり (= デコイ)」として結合し、この結果、本来のプロモーター DNA 領域と転写因子の結合が阻害される。したがって、デコイはアプタマーと同様に蛋白質の標的とする核酸医薬品である。一般に転写因子はある特定の現象に関わる遺伝子群を同時に発現制御することから、転写因子を標的とした医薬品は効果的に有効性を発揮する可能性を秘めている。

デコイ核酸医薬品の開発はアンジェス MG において進められており、炎症に関連する遺伝子群を制御する転写因子 NF κ B (Nuclear Factor-kappa B) を標的としたデコイの臨床研究が進められている。NF κ B が関与する病態は、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、血管再狭窄、関節症など多岐に渡っており、NF κ B デコイの応用範囲は広いと期待される。本開発については、文献 28, 29 に詳しいので、そちらを参照して頂きたい。

デコイ核酸医薬品としては、もう一つ Adynxx 社が開発する AYL1 がある。AYL1 は early growth response protein 1 (EGR1) と呼ばれる転写因子と結合し、その機能を阻害する。EGR1 は神経可塑性に関与することが知られており、EGR1 の阻害により痛みの伝達が遮断される。

現在、手術時に単回投与し、手術後の痛みを低減するという目的で臨床試験が行われている。2013年の時点でPhase 2が終了し、良好な結果が得られている。

5.5 アプタマー

アプタマーは一本鎖RNA又はDNAで構成され、その立体構造により標的蛋白質と結合して機能を阻害する核酸医薬品である。試験管内人工進化法(SELEX法)によって取得される。アプタマーの利点としては、標的蛋白質への結合性/特異性が高い、免疫原性が低い、化学合成可能で製造、保存が容易であることなどが挙げられる。アプタマーは細胞外で蛋白質と結合して機能を発揮するため、原理的に抗体医薬品と競合する。現在、アプタマーの臨床開発品数は10程度であり、Phase 3の段階にあるものが2品目ある。アプタマーの具体的な開発品目に関しては、文献30, 31に詳細に記載されているのでここでは割愛し、ここではアプタマー開発のトピックとして、REG1を紹介する。

REG1は二つのオリゴ核酸PegnivacoginとAnivamersenで構成されるアプタマー医薬品で、Regado社で開発が進められている。Pegnivacoginは血液凝固因子の一つである第IXa因子を標的とするRNAアプタマーであり、第IXa因子を阻害することにより血液凝固を抑制する。一方、AnivamersenはPegnivacoginと相補的に結合するRNA鎖であり、Pegnivacoginの立体構造を変化させることができる。興味深いことに、PegnivacoginはPEG化により血中半減期が24時間以上になるように設計されており、一方で、AnivamersenはPEG化されておらず、半減期は5分未満となっている。すなわち、通常はPegnivacoginを投与することで血液凝固を抑制し、効果が強すぎた場合に半減期の短いAnivamersenを投与することで“解毒”することが可能となっている。

このようなオリゴ核酸にしかできない発想は、抗体医薬品との差別化という意味で重要であり、今後も新しいアイデアが生まれてくることを期待したい。なお、REG1はPhase 2で良好な結果が得られ、現在、Phase 3に入っている。

5.6 CpGオリゴ

CpGオリゴはここまで述べてきた核酸医薬品において副作用と懸念される点を、主作用として利用した医薬品である。すなわち、オリゴ核酸がToll様受容体を介して引き起こす自然免疫系の活性化を、免疫賦活化作用という有効性として捉えた医薬品である。CpGオリゴはワクチンを投与する際の核酸アジュバントとして利用されるケースが多く、一本鎖DNAを認識するToll様受容体9を介し

て作用する。具体的な開発品目に関しては、文献32～34を参照して頂きたい。

6. 最後に

以上、核酸医薬品の基本的性質と開発動向について述べた。今後の課題としては、デリバリー技術のさらなる進展(肝臓以外の臓器への送達、細胞内取り込み効率の向上、投与量の低減)、並びに合成コストの低減が挙げられる。これらの課題に取り組むことが重要であるが、一方で、現在の技術でも核酸医薬品の上市可能なレベルに達しており、まずは、治療可能な疾患を対象にして成功例を出していくことが重要である。

核酸医薬品の規制面については、現状ではケーススタディが少なく、世界的に整備されていない状況であるが、国内においても核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスを議論する動きが生まれている。今後、医薬品開発とレギュラトリーサイエンス研究の両輪で前進し、日本発の核酸医薬品が早期に誕生することを期待したい。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、当研究室の吉田徳幸博士、佐々木澄美博士には調査研究やFigure作成等で御協力頂きました。また、核酸医薬品開発に関わる多くの方から御助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) 鈴木和博, 「核酸医薬」 バイオ医薬品, 西島正弘, 川崎ナヲ編, 化学同人, 2013, p.226-234.
- 2) 山口照英, 内田恵理子, 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保, 世界への薬事申請書の書き方成功へのバイブル, 佐藤章弘 企画編集, 技術情報協会, 2012.
- 3) Aoki, Y.; Nagata, T.; Yokota, T.; Nakamura, A.; Wood, M.J.; Partridge, T.; Takeda, S. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013, 22 (24), p.4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
- 4) 西川元也, 核酸医薬開発の鍵を握る薬物送達システム(DDS). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2012, 43 (9), p.778-785.
- 5) 和田猛, 核酸医薬品に求められるもの. 医薬ジャーナル, 48 (1), p.61-63.
- 6) 小比賀聡, 糖部架橋型核酸の医薬への応用. 医薬ジャーナル, 2012, 48 (1), p.65-69.
- 7) Obika, S., et al. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar pucker. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, p.8735-8738.
- 8) 平尾一郎, 新規機能性核酸の創製へのチャレンジ. 医学の歩み, 2011, 238 (5), p.566-572.
- 9) シード・プランニング社, 2012年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望.

- 10) HS 財団規制動向調査ワーキンググループ. HS 財団平成 25 年度規制動向調査報告書「核酸医薬品の開発と規制の動向」. 2014 年 3 月.
- 11) 李知子, 松尾雅文. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソスキッピング誘導治療. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.536-541.
- 12) Sivanesan, S.; Howell, M.D.; Didonato, C.J.; Singh, R.N. Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci*. 2013, 4 (1). doi: 10.2478/s13380-013-0109-2
- 13) Osman, E.Y.; Yen, P.F.; Lorson, C.L. Bifunctional RNAs targeting the intronic splicing silencer N1 increase SMN levels and reduce disease severity in an animal model of spinal muscular atrophy. *Mol Ther*. 2012, 20 (1), p.119-26. doi: 10.1038/mt.2011.232.
- 14) Guo, S.; Kemphues, K.J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995, 81 (4), p.611-20. PMID: 7758115.
- 15) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 391 (6669), p.806-11. PMID: 9486653.
- 16) Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411 (6836), p.494-8. PMID: 11373684.
- 17) Kleinman, M.E.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, J.Z.; Albuquerque, R.J.; Yamasaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Karikó, K.; Ambati, B.K.; Wilgus, T.A.; DiPietro, L.A.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, J.R.; Taylor, E.W.; Ambati, J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 2008, 452 (7187), p.591-7. doi: 10.1038/nature06765.
- 18) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R.K.; Racie, T.; Rajeev, K.G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliensky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004, 432 (7014), p.173-8.
- 19) Zimmermann, T.S.; Lee, A.C.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Bumcrot, D.; Fedoruk, M.N.; Harborth, J.; Heyes, J.A.; Jeffs, L.B.; John, M.; Judge, A.D.; Lam, K.; McClintock, K.; Nechev, L.V.; Palmer, L.R.; Racie, T.; Röhl, I.; Seiffert, S.; Shanmugam, S.; Sood, V.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Wheat, A.J.; Yaworski, E.; Zedalis, W.; Koteliensky, V.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P.; MacLachlan, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006, 441 (7089), p.111-114. Epub 2006 Mar 26.
- 20) 福永淳一, 神津知子. RNAi 創薬と国内外の開発状況. バイオインダストリー. 2012, 29 (7), p.10-14.
- 21) 宮岸真. 核酸医薬 種類と DDS. *Pharma Tech Japan*. 2013, 29 (6), p.115-123.
- 22) Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, 75 (5), p.843-854.
- 23) Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993, 75 (5), p.855-862.
- 24) Lagos-Quintana, M.I.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001, 294 (5543), p.853-858.
- 25) 鹿島理沙, 羽田明子. miRNA 研究最前線. フェルマシア, 2013, 49 (6), p.524-528.
- 26) 山田陽史, 吉田哲郎. miRNA 医薬開発の現状と展望. 遺伝医学 MOOK. 2012, 23, p.208-213.
- 27) 尾崎充彦, 落谷孝広. micro 医薬によるがん治療への展開. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.524-528.
- 28) 三宅 隆, 森下竜一. デコイ核酸医薬を用いる血管疾患治療薬の開発. 医薬ジャーナル. 2012, 48 (1), p.119-123.
- 29) 玉井克人. NF κ B デコイ DNA 軟膏によるアトピー性皮膚炎の治療. 医薬ジャーナル. 2012, 48 (1), p.125-128.
- 30) 石黒亮. アプタマー創薬と国内外の開発状況. バイオインダストリー. 2012, 29 (7), p.4-9.
- 31) 藤原将寿. アプタマー医薬. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5) p.507-513.
- 32) Hancock, R.E.; Nijnik, A.; Philpott, D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012, 10 (4), p.243-254.
- 33) Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Eggermont, A.; Fridman, W.H.; Galon, J.; Sautès-Fridman, C.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012, 1 (5), p.699-716.
- 34) Bode, C.; Zhao, G.; Steinhagen, F.; Kinjo, T.; Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines*. 2011, 10 (4), p.499-511.

核酸医薬品開発の現状

Developmental Status of Oligonucleotide Therapeutics

井上 貴雄 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第5室(核酸医薬室) 室長

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 Tel & Fax : 03-3700-9217

E-mail : takao@nihs.go.jp

1 はじめに

アンチセンス, siRNA, アプタマーに代表される核酸医薬品は, これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから, 抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている¹⁾。核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で, 低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる。また, 標的分子が変わっても核酸医薬品の骨格(オリゴ核酸)は不変であり, 有効性を持つ配列のスクリーニングも比較的単純であるため, ひとつのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品を創出できると考えられている。本稿では, 新たな局面を迎えている核酸医薬品開発の現状について概説する。

2 これまでに承認されている核酸医薬品

「核酸医薬品」の明確な定義はないが, 一般には「核酸が直鎖状に結合したオリゴ核酸を薬効本体とし, 蛋白質発現を介さず直接生体に作用するもので, 化学合成により製造される医薬品」の総称とされる。遺伝子治療薬も核酸で構成される医薬品であるが, 作用発現に蛋白質への翻訳を介する点, 生物学的に製造される点において核酸医薬品とは異なる。核酸医薬品はその作用機序の違いから様々な種類が存在するが, 現在, 医薬品として開発されているものは, アンチセンス, siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA), デコイ, ア

プタマー, CpG オリゴがある(表1)。アンチセンス, siRNA, miRNA はいずれも RNA を標的とする核酸医薬品であり, mRNA の分解, mRNA の翻訳阻害, RNA とタンパク因子の結合阻害などによって機能する。デコイは細胞内で転写因子(すなわち蛋白質)と結合して転写段階を抑制する核酸医薬品である。アプタマーは三次元的な立体構造で蛋白質を認識する医薬品であり, 抗体医薬品と同様に細胞外で蛋白質と結合し, その機能を阻害する。CpG オリゴは Toll 様受容体9 (TLR9) に作用して自然免疫を活性化させる医薬品である。

これまで承認に至った核酸医薬品はアンチセンス2品目 (Vitravene®, Kynamro®), アプタマー1品目 (Macugen®) の3品目である(表2)。それぞれの承認年, 標的, 適応, 投与ルートを表2にまとめたが, 特に注目すべき点は投与ルートである。従来, 核酸医薬品は体内でヌクレアーゼにより速やかに分解される易分解性が課題となってきた背景から, 分解の影響を受けにくい局所投与型の核酸医薬品が先行して開発されてきた。実際, 2012年までに承認された Vitravene および Macugen はいずれも硝子体内へ局注する医薬品であった。しかし, 近年, 修飾型核酸の開発が顕著に進展したことにより, オリゴ核酸のヌクレアーゼ耐性が向上し, 体内での安定性は大きく改善した。また, 化学修飾により標的配列との結合性が著しく向上し, 細胞内への取り込み効率も従来に比べて改善している。さらに, これら一連の流れにより, より低濃度で有効性を得ることが可能となり, 問題とされてきた細胞毒性の問題も大きく低減した。以上のような研究進展により, 現在では皮下投

表1 核酸医薬品の分類

	アンチセンス	miRNA アンチセンス	siRNA	miRNA mimic	デコイ	アプタマー	CpG オリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖 RNA, ヘアピン 1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
標的	mRNA Pre-mRNA	miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞“外” (エンドソーム 内)
作用機序	mRNA 分解 スプライシング 阻害	miRNA 阻害	mRNA 分解	miRNA の補充	転写阻害	機能阻害	自然免疫の 活性化
開発段階	承認 2 品目 Phase 3	Phase 2 → 3	Phase 3	Phase 1	Phase 2	承認 1 品目 Phase 3	Phase 2
主な 開発企業	Isis, Santaris, Prosenza, Sarepta	Santaris Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

表2 上市された核酸医薬品

商品名	一般名	分類	承認国 承認年	標的	適応	投与ルート
Vitravene	Fomivirsen	アンチセンス	米 1998 EU 1999	サイトメガロウイルス (CMV) 遺伝子 IE2 mRNA	CMV 性網膜炎 (AIDS 患者)	硝子体内局注
Macugen	Pegaptanib	アプタマー	米 2004 EU 2006 日 2008	Vascular endothelial growth factor (VEGF)165 蛋白質	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内局注
Kynamro	Mipomersen	アンチセンス	米 2013	ApoB100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下注

与や静脈内投与など全身投与が可能な核酸医薬品が多く開発されるようになってきている。この変化を象徴するのが、2013年に全身投与型の核酸医薬品として初めて上市されたアンチセンス医薬品 Kynamro である。Kynamro は ApoB-100 の mRNA をターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬であり、リポソーム等のキャリア無しで皮下投与される。全身投与されたオリゴ核酸は肝臓や腎臓等に集積する性質があるが、Kynamro は肝臓に発現する ApoB-100 mRNA を分解することで有効性を発揮する。今後は、従来から開発されている局所投与型の核酸医薬品に加えて、静注/皮下注が可能な全身投与型の核酸医薬品が上市されてくると予想される。

3 開発段階にある核酸医薬品

現在、非臨床/臨床の段階に入っている核酸医薬品の候補品数は、「シード・プランニング社 2012 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望」²⁾ ならびに「HS 財団平成 25 年度規制動向調査報告書 核酸医薬品の開発と規制の動向」³⁾ において詳しく調べられている。最も開発候補品が多いのはアンチセンスであり、非臨床/臨床を合わせて 100 近くの候補品がある。次いで、siRNA が 50 品目程度、アプタマーは 10 品目程度が非臨床/臨床の開発段階にある。承認申請に近い phase 3 に限定すると、アンチセンス、siRNA、アプタマーがそれぞれ 8, 1, 2 品目あり、今後も着実に核酸医薬品が上市されていくものと期待される。核酸医薬品開発の全体像を俯瞰すると、RNA を標的とする核酸医薬品（アンチセンス、siRNA）の開発が特に進展しており、抗体医薬品と競合するアプタマーは伸び悩んでいる印象を受ける。対象疾患としては、核酸医薬品でしか治療できないアンメット・メディカルニーズに対する開発が中心であり、まず遺伝性疾患や難治性疾患を対象とした核酸医薬品の実用化が先行すると思われる。

4 おわりに

以上のように、核酸医薬品開発は「DDS (Drug delivery system) なしに全身投与が可能な核酸医薬品」が誕生するという、従来の核酸医薬品から大きく飛躍を遂げたステージに突入している。今後は核酸医薬品開発を進めると同時に、規制面を整備することが重要である。現状ではケーススタディが少ないが、国内においても核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスを議論する動きが生まれている。産官学が一体となり、核酸化学に強い日本の優位性を生かした独自の核酸医薬品が創出されることを期待したい。

参考文献

- 1) 井上貴雄：核酸医薬品開発の動向、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、45 (4), 288-298, 東京 (2014)
- 2) シード・プランニング社「2012 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望」
- 3) HS 財団平成 25 年度規制動向調査報告書「核酸医薬品の開発と規制の動向」(2014 年 3 月)
著者名：HS 財団規制動向調査ワーキンググループ

核酸医薬品の実用化促進に向けた取り組み

井上貴雄[#], 吉田徳幸

Study toward practical use of oligonucleotide therapeutics

Takao Inoue[#], Tokuyuki Yoshida

Over the past decade, oligonucleotide-based therapeutics such as antisense oligonucleotides and small interfering RNAs (siRNAs) have been developed extensively. For example, mipomersen (KynamroTM; ISIS Pharmaceuticals), which is a second-generation antisense oligonucleotide administered by subcutaneous injection, has recently been approved by the FDA for the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. On the other hands, methods for the evaluation of quality, efficacy and safety of oligonucleotide therapeutics have not been fully discussed. Furthermore, the regulatory guidance specific for oligonucleotide therapeutics has not been established yet. Under these circumstances, we started to collaborate with Osaka University and PMDA to discuss regulatory science focused on oligonucleotide therapeutics. Through the collaboration, we would like to propose the possible design of quality evaluation and preclinical safety evaluation of oligonucleotide therapeutics.

Keywords: Oligonucleotide Therapeutics, antisense, regulatory science

1. はじめに

アンチセンス, siRNA, アプタマーに代表される核酸医薬品は, これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから, 抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている. 本邦でも第4期科学技術基本計画(平成23年8月19日閣議決定)において革新的治療方法の確立を目指した研究開発推進が謳われる中, 核酸医薬品が明記されるなど, その期待は高まっている. また, ごく最近, 厚生労働省から発表された「先駆けパッケージ戦略」においても, 実用化促進すべき革新的医薬品として核酸医薬品が挙げられている. 核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で, 低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる. また, その物質的性質, 機能的性質から, ひとつのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品が誕生すると考えられており, 開発期間の面からも注目される.

核酸医薬に関する最近のトピックスとしては, 2013年に全身投与が可能な核酸医薬品としてKynamro[®](一般名: Mipomersen)が世界で初めて上市されたことが挙げられる. Kynamro[®]はApoB-100のmRNAをターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬であり, キャリア無しで皮下投与された後, 肝臓で有効性を発揮する. これまで核酸医薬品は体内における易分解性の問題から局所投与しかできなかったが, 修飾核酸技術の進歩等によりこの問題が打破され, 適用範囲が大きく広がっている.

以上のように, 核酸医薬は有効性の観点からは上市可能な状況となっているが, 一方で, 先端医薬品であるが故に品質・安全性の評価手法が確立されていないという問題がある. また, 核酸医薬品に特化したガイダンスも整備されていない. 核酸医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究の推進とガイダンスの策定が喫緊の課題である.

2. 研究目標

日本の核酸化学技術は世界でもトップレベルにあり, 特に大阪大学薬学研究科の小比賀聡教授らが世界に先駆けて開発した「架橋型人工核酸」は核酸医薬の分野において特筆すべき成果である. 小比賀教授のグループでは,

[#] To whom correspondence should be addressed:

Takao Inoue; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax: +81-3-3700-9217; E-mail: takao@nihs.go.jp

この架橋型人工核酸を用いたアンチセンス医薬品の開発を精力的に進めており、上述のKynamro®よりも低用量で、かつ有効性が高いアンチセンス候補品の創製に成功している。現在、高コレステロール血症の原因遺伝子の一つであるPCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 等を標的としたアンチセンスについて候補物質を得ており、今後、非臨床安全性試験ならびに臨床開発に進む予定である。以上の背景のもと、大阪大学薬学研究科が「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」に採択され、核酸医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究を推進しているところである。本事業の研究目標は、①高コレステロール血症を標的とした核酸医薬候補品(抗PCSK9アンチセンス)の臨床開発、②核酸医薬品のガイダンスの基盤となるコンセプトペーパーの作成、③核酸医薬品の品質や安全性を適正に予測/評価/判断するためのレギュラトリーサイエンス研究の推進、④核酸医薬品ならびにレギュラトリーサイエンスに精通した優秀な人材の育成、である。

3. 連携体制

本事業を推進している研究機関、メンバー、研究内容を以下に記載する(敬称略/順不同)。なお、ガイダンス策定の土台となるコンセプトペーパーの作成については、以下に示す全メンバーが議論に参加しており、大阪大学薬学研究科が中心となり、草案を執筆している。

①大阪大学薬学研究科 (以下、阪大薬)

メンバー：堤康央、小比賀聡、小林直之、橘敬祐、藤坂朱紀、辻野博之、吉田徳幸、伊藤浩介、山本剛史、藤尾慈、櫻井文教、吉岡靖雄、中山博之、宇野公之、土井健史(上記15名のうち5名は、本研究事業を中心的に進め

るメンバーとして本予算枠で事業に参画)

研究内容：研究の統括、抗PCSK9アンチセンスの開発、コンセプトペーパーの作成、核酸医薬品の品質確保に関する基盤研究

②国立循環器病研究センター研究所 (以下、国循)

メンバー：斯波真理子、山本晴子

研究内容：抗PCSK9アンチセンスの安全性と有効性に関する研究

③国立医薬品食品衛生研究所 (以下、NIHS)

メンバー：井上貴雄

研究内容：核酸医薬品の安全性評価に関する調査および基盤研究

④医薬品医療機器総合機構 (以下、PMDA)

メンバー：山田雅信、笛木修、高木和則

研究内容：ガイダンス作成に向けた基盤構築に関する調査研究、コンセプトペーパーの内容に関する議論

⑤ジーンデザイン、塩野義製薬

メンバー：非公開

研究内容：核酸医薬品の原料製造や原薬製造法に関連する情報提供および非臨床安全性評価に関する検討(ジーンデザインは国内で唯一GMPに準拠した核酸医薬製造施設を持つ企業)

人材交流の体制に関しては概略を図1にまとめた。阪大薬の吉田徳幸特任助教が協力研究員としてNIHSに向向し、核酸医薬品のオフターゲット効果に関する研究を実施している。一方、井上貴雄は阪大薬の招聘准教授(附属創薬センター 創薬臨床研究推進ユニット 核酸医薬評価科学プロジェクト)に着任しており、月1回阪大薬を訪問し、本事業に関する会議および個別研究のディスカッションに参画している。阪大薬とPMDAの人材交流に

人材交流の体制

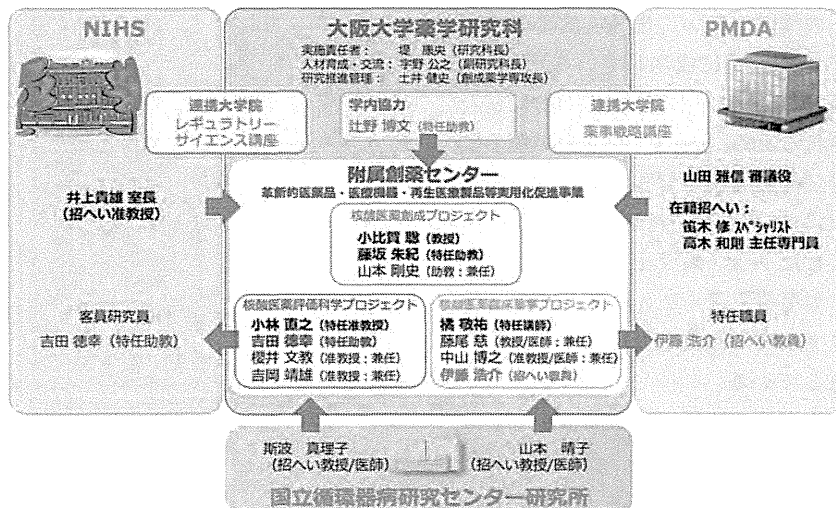


図1 人材交流の体制

関しては、薬事行政に習熟した人材を育成するため、阪大薬の伊藤浩介招聘教員が特任職員としてPMDAに出向している。PMDAでは薬事行政の実務に携わると共に、核酸医薬品の専門家としてPMDA内の核酸医薬に関連する議論に参画している。一方、阪大薬はPMDAの山田雅信審議役、笹木修スペシャリスト、高木和則主任専門員を在籍招聘として招き、本事業で作成している核酸医薬品に関するコンセプトペーパーの内容／方向性について、定期的に意見の交換を行っている。国循からは斯波真理子特任部長と山本晴子部長を阪大薬の招聘教授に迎え、核酸医薬品の塩基配列の最適化、薬効評価、毒性評価を実施している。

阪大薬の人材交流に関連する取り組みとして特筆すべきは、阪大薬がNIHS およびPMDAと大学院の連携協定を結んでいる点であり、それぞれ「レギュラトリーサイエンス講座」および「薬事戦略講座」が組織化されている。レギュラトリーサイエンス講座には、医薬品（機能性製剤学分野、バイオ医薬学分野、核酸医薬学分野、薬食衛生微生物学分野、医薬等安全性学分野）のみならず、再生医療等製品（遺伝子細胞医薬学分野）、食品（食品安全学分野）、医療機器（医療機器安全学分野）の各分野が設置されており、阪大薬がNIHSとの人材交流を通じ、幅広い分野でレギュラトリーサイエンスを強化する姿勢が伺える。

研究内容

公開可能な研究内容として、平成25年度報告書に記載した研究成果を一部改訂して記載する。

①抗PCSK9アンチセンスの評価に関する試験研究の成果

本研究事業で開発を行う抗PCSK9アンチセンスでは、小比賀教授が独自に創製した修飾型核酸「AmNA」が用いられる。AmNAの効率的な合成経路を確立するため、有機合成に関する種々の検討を行い、出発物質から12段階でAmNAを合成する技術開発に成功している。

アンチセンス医薬品は、ヒトのmRNAと相補的に結合するようにデザインされるため、mRNA配列の異なる実験動物では有効性や安全性の評価ができない。従って、個体においてアンチセンスの有効性を確認するためには、ヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成する必要がある。本事業では、ヒトPCSK9を発現するトランスジェニックマウスの作成を進めており、現在、F0ヘテロマウスを樹立している。

核酸医薬品を構成するオリゴ核酸は核酸同士がリン酸ジエステルで結合しているが、ヌクレアーゼ耐性等を付与するためにリン酸部の酸素原子が硫黄原子に置換されている（S化）。これにより、リン原子に不斉点が発生す

るため、オリゴ核酸は立体異性体が混合したラセミ体となる。核酸医薬品の品質管理に関する研究として、立体異性体の生成比を変動させる要因を探索している。

②ガイドンス策定の基盤となるコンセプトペーパーの作成

ガイドンス策定の基盤となるコンセプトペーパーとして、「核酸医薬品の品質管理に関するコンセプト」と「核酸医薬品の非臨床安全性試験に関するコンセプト」を作成した。今後、PMDA、NIHS、製薬企業、製造企業等に意見聴取した上で、改訂を行う。非臨床安全性評価に関しては、抗PCSK9アンチセンスをモデルに試験の実施方針を立案した。今年度より、非臨床安全性試験を開始する。

国立医薬品食品衛生研究所発信 | その 1 |

医薬品の発がん性不純物の 評価と管理に関するガイダンス

阿曾 幸男

あそ ゆきお 国立医薬品食品衛生研究所 連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

はじめに

化学的に合成された医薬品にはその合成に用いられる出発物質や試薬、反応中間体、反応副生成物、出発物質や試薬に含まれる不純物、保存中に生成する分解物などが不純物として混在しうる。化学合成医薬品の不純物に関するガイダンスとして、日・米・EUの三極で国際調和された日米EU医薬品規制調和国際会議(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH) Q3A/Q3B/Q3C¹⁻³⁾がある。

ほとんどの不純物の安全性確認および管理については、ICH Q3A(R2)：「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」、および Q3B(R2)：「新有効成分含有医薬品のうち、製剤の不純物に関するガイドライン」によって指針が与えられている。また、原薬または医薬品添加物の製造工程あるいは製剤の製造工程で使用されるか生成する揮発性有機化学物質に関してはICH Q3C：「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に安全性データに基づきその許容量が勧告されている。

一方、医薬品の有機不純物の中にはDNAと反応してDNAにダメージを与え、発がんリスクを高める可能性のある不純物がある。これらの不純物には発がん性のデータがないものが少なくなく、その発がん性を評価するためには時間を要する。また、DNAと反応してがんを引き起こす不純物の毒性発現には閾値がないと考えられていることから、不純物のレベルをどこまで下げるべきかについての明確な指針が必要となる。そこで、不純物の構造をもとにDNA反応性(変異原性)の評価を行い、変異原性があるとわかった不純物に対して発がん性不純物として管理するという戦略のもと、現在、発がんリスクを有する可能性のあるDNA反応性(変異原性)不純物の評価と管理に関するガイダンス(ICH M7 ガイドライン)の制定に向けた作業が進められている。

本稿においては、ICH M7 step2 文書⁴⁾に基づきガイドラインの要となる、毒性学的懸念の閾値(Thresholds of Toxicological Concern; TTC)に基づく安全とみなしうるレベルの設定、不純物の変異原性を有するかの評価、不純物の管理を中心に概説する。なお、本稿で述べた内容は今後のガイドライン制定作業において変更される可能性のあることを申し添える。

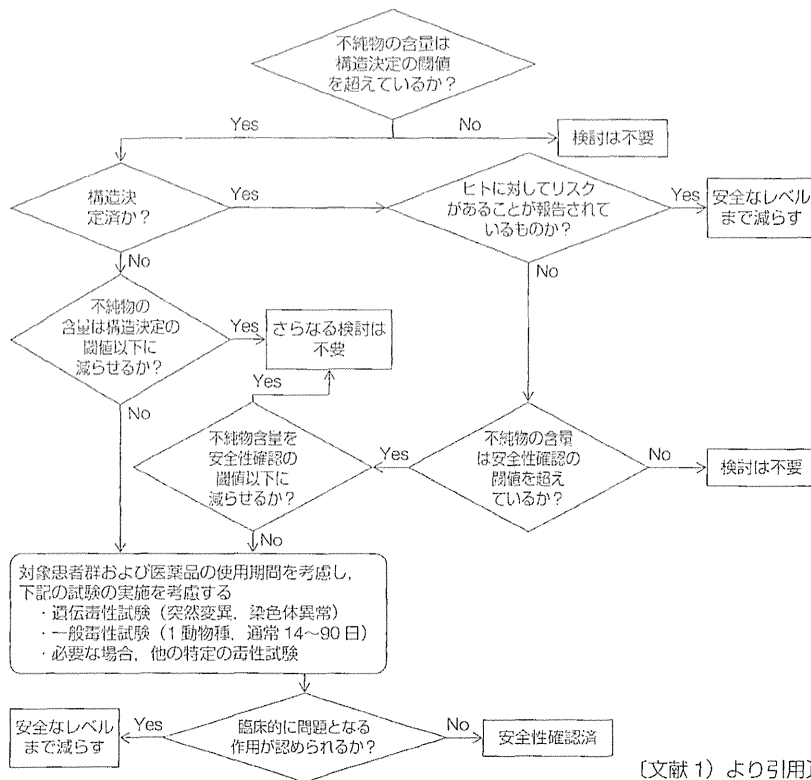


図1 構造決定、安全性の確認のためのフローチャート〔ICH Q3A(R)〕

表1 原薬中の有機不純物に関する報告、構造決定、安全性確認の閾値(Q3A(R))

最大1日投与量	報告の閾値	構造決定の閾値	安全性確認の閾値
≤2 g	0.05%	0.10%と1.0 mg/dayの低いほうの値	0.15%と1.0 mg/dayの低いほうの値
>2 g	0.03%	0.05%	0.05%

〔文献1〕より引用

DNA 反応性(変異原性)不純物に対する安全とみなしうるレベル

ICH Q3A/Q3B においては1日最大投与量に応じ、報告の必要な閾値、構造決定(identification)の必要な閾値、安全性の確認(qualification)の必要な閾値について具体的な数値が定められている(表1¹⁾、原薬の例)。また、構造決定、安全性確認のためのフローチャートが定

められている(図1)¹⁾。フローチャートに従えば、構造決定の閾値を超える不純物の構造決定を行い、既知の安全性データあるいは化学構造からみてヒトへの安全性が懸念される場合は安全なレベルまで不純物の量を減らす必要がある。ICH M7 ガイドラインにおいては、不純物が毒性の発現に閾値がないと考えられるDNA反応性(変異原性)を有するとわかったとき、その不純物のげっ歯類に対する発がん性試験データがある場合は発がんデータ(例えば試験動物の50%にがんが発生する投与量など)に基づき安全とみなされるレベルを算出することが推奨される。

一方、発がん性データがない場合にはそのようなアプローチは使えないので、ICH M7 ガイドラインにおいては、毒性学的懸念の閾値

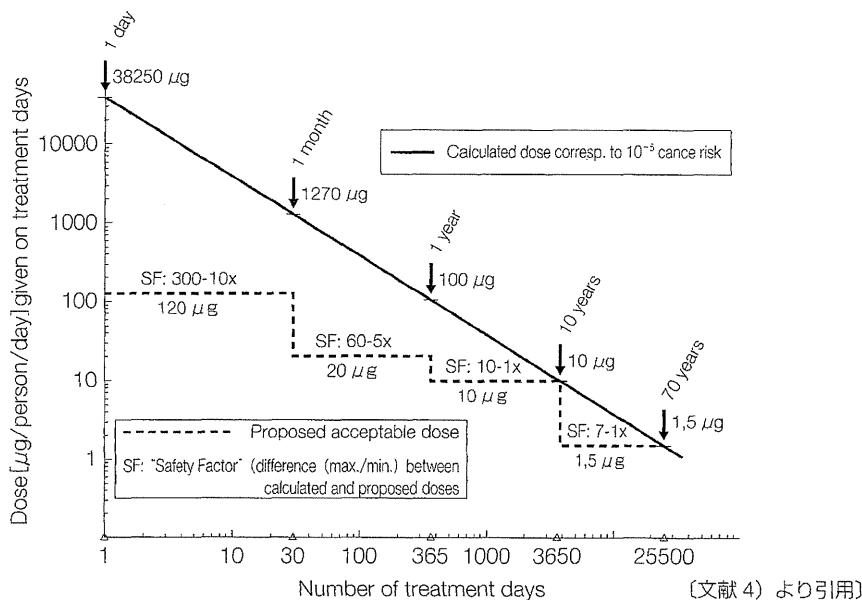


図2 投与期間の関数として表した理論上の10万分の1の発がんリスクに相当する量として算出された変異原性不純物の1日摂取量とM7ガイドラインで推奨する許容摂取量の比較

(TTC)⁶⁾の概念を取り入れ、安全とみなしうるレベルとする。

TTCとは、すべての化学物質について、その値以下では明らかな健康被害がないとするヒトでの包括的な実質安全性閾値(virtual safety dose; VSD)であり、発がん性が最も感受性の高い毒性エンドポイントであるという仮定に基づいて、発がん性データベース(carcinogenic potency database; CPDB)⁷⁾に登録された発がん物質のTD₅₀の値の分布解析から求められたものである。

10年を超えて長期間投与される医薬品中の不純物質に対するTTCは1.5 μg/dayである。この値は医薬品を毎日生涯にわたり摂取したときの発がんリスクが10⁻⁵増加する(10万人に1人ががんが生ずる)のに相当する量である。食品などでは発がんリスクの増加が10⁻⁶となるようにTTC(0.15 μg/day)が定められているが、医薬品では治療効果によるベネフィットが

あることを考慮し、10⁻⁵のリスクが用いられている。このリスクレベルは、あらゆる種類のがんを含めたとき、ヒトの一生涯において3人に1人を上回る割合で発がんすることに比べても、理論上のわずかなリスクの増加に相当すると考えられる。

また、TTCの算出はConservativeな仮定に基づいていることから、TTCを上回ったとしても必ずしも発がんリスクの増加にはつながらず、がんの発生率の増加は、実際には10万人に1人を大幅に下回る可能性が高いと考えられる⁶⁾。投与期間が短い医薬品については投与期間に応じて高い閾値を設定することが可能である⁸⁾(図2)¹⁾。これは、生涯累積用量が同じであれば高濃度の発がん性物質の短期間曝露と低濃度の発がん性物質の長期間曝露の発がんリスクは同等であるとの仮定に基づいている。

DNA 反応性(変異原性)不純物の評価

ICH M7 ガイドラインでは医薬品中の不純物が DNA と反応し、発がんリスクを高める可能性があるかの評価は以下のように行うことが推奨されている。まず、細菌に対する変異原性の予測ができる(定量的)構造活性相関((Q)SAR)プログラムによる *in silico* 解析を行う。不純物の構造がわかれば、変異原性の評価が可能であるという利点をもつ。

(Q)SAR による解析の結果、警告構造がないと判定された場合、DNA 反応性はないと見なされ、DNA 反応性に関するさらなる検討は必要ないことになる。警告構造がある場合、その構造が原薬と共通の警告構造(例えば、不純物と原薬の同じ位置および環境に同一の警告構造)である場合はその原薬の Ames 試験の結果が陰性であれば、非変異原性不純物と判断される。

原薬の警告構造と関連しない場合は TTC レベル以下に不純物を減らすか、Ames 試験により DNA 反応性(変異原性)についてさらに検討を行うことになる。Ames 試験が陰性であれば、(Q)SAR の結果のいかんにかかわらず DNA 反応性はないと見なされ、DNA 反応性に関するさらなる検討は必要ない。Ames 試験が陽性であれば TTC レベル以下に不純物を減らすことになる。Ames 試験が陽性のとき、*in vivo* における適切な gene mutation assay を行い、陰性であれば、不純物が許容限度値を超えて設定することの裏づけとなりうる。

DNA 反応性(変異原性)不純物の管理

医薬品中の不純物が DNA 反応性(変異原性)であることがわかったら、最終製品中の不純物レベルが安全とみなしうるレベル以下であるこ

とを保証する管理戦略の構築が必要となる。ICH M7 ガイドラインにおいては製品および製造工程の理解ならびにリスクマネジメントの原則に基づく管理戦略の構築を推奨している。発がん性データがない変異原性不純物の場合は TTC(1.5 µg/day)レベル以下であることを保証する必要がある。例えば1日投与量が30 mg の医薬品原薬中に許容される不純物の濃度は $1.5 \mu\text{g/day} \div 30,000 \mu\text{g/day} \times 100 = 0.005\%$ である。この値は ICH Q3A にある報告の必要な閾値より1オーダー低い値である。1日投与量が増えれば、原薬中に許容される不純物濃度はさらに低くなる。最終製品について試験を行い不純物が許容限度以下であることを示すのは不純物の管理方法として最も単純、かつストレートな方法である。

しかし、高感度の分析をルーチン的に行うことになるため、このような方法での管理は困難な場合もある。リスクマネジメントに基づき、工程設計および管理と適切な分析試験を組み合わせることにより、最終製品に関して高感度な試験を行わなくとも、最終製品中の不純物レベルが安全とみなしうるレベル以下であることを保証することが可能になる場合もある。例えば次のような例が考えられる。

出発物質 Y は、5つの合成工程の第3工程で導入され、標準的な分析法によって0.1%未満の不純物 B が日常的に検出される場合、出発物質中の0.1%(不純物の)規格が許容できるか判断するため、10%までの異なる濃度で不純物 B を出発物質に添加したラボスケールでの除去試験を行う。最後の3工程を通して500倍を超えるパージファクターが確認された場合、このパージファクターを出発物質 Y 中の0.1%の規格に適用すると、原薬中の不純物 B の量は2 ppm 未満と予測される。

この結果は、TTC に基づいた原薬中の限度値50 ppm より低く、出発物質 Y 中の不純物 B

を0.1%以下の規格で管理することにより最終製品中の不純物Bの量が許容基準以下であることを保証できることになる。具体的な管理戦略は医薬品によりケースバイケースであるが、ICH Q11:「原薬の開発と製造に関するガイドライン」⁹⁾などを参照して管理戦略を構築することになる。

おわりに

医薬品中の不純物が変異原性を有し発がん性が疑われる不純物であるとわかったら、今まではその医薬品の開発は断念されることが多かったものと思われる。それは発がん性データに基づいて不純物の許容限度値を決めることが時間と労力がかかるためと考えられる。リスク評価に基づくTTCの概念を導入することにより、発がん性に関する試験データがなく許容摂取量が不明な不純物に対して、医薬品中の許容限度値を設定することが可能と考えられる。このような医薬品の安全性を確保するためには不純物が許容限度値以下であることを保証する管理戦略の構築が不可欠である。そのためには分析技

術の高感度化もさることながら、製品や製造工程を十分に理解し、製造工程の管理を適切に行うことが今までにも増して重要になると思われる。

参考文献

- 1) International Conference on Harmonisation (2006). Q3A (R2) : Impurities in New Drug Substances.
- 2) International Conference on Harmonisation (2006). Q3B (R2) : Impurities in New Drug Products.
- 3) International Conference on Harmonisation (2011). Q3C (R5) : Impurities : Guideline for Residual Solvents.
- 4) International Conference on Harmonization. M7 Draft Consensus Guideline (2013).
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_2.pdf
- 5) Munro IC, et al: A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. *Food Chem Toxicol* **37** : 207-232, 1999
- 6) Kroes R, et al: Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment. *Toxicol Lett* **127** : 43-46, 2002
- 7) Carcinogenic Potency Database. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CPDB.htm>.
- 8) Felton SP, et al: A proposed framework for assessing risk from less-than-lifetime exposures to carcinogens. *Crit Rev Toxicol* **41** : 507-544, 2011
- 9) International Conference on Harmonisation (2012). Q11 : Development and Manufacture of Drug Substances (chemical entities and biotechnological/biological entities).

遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のための
レギュラトリーサイエンス共同研究

内田恵理子, 五十嵐友香, 佐藤陽治

Collaborative study on regulatory science for facilitating clinical development of gene
therapy products for genetic diseases

Eriko Uchida, Yuka Igarashi, Yoji Sato

遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究

内田恵理子[#], 五十嵐友香, 佐藤陽治

Collaborative study on regulatory science for facilitating clinical development of gene therapy products for genetic diseases

Eriko Uchida[#], Yuka Igarashi, Yoji Sato

Gene therapy products are expected as innovative medicinal products for intractable diseases such as life-threatening genetic diseases and cancer. Recently, clinical developments by pharmaceutical companies are accelerated in Europe and the United States, and the first gene therapy product in advanced countries was approved for marketing authorization by the European Commission in 2012. On the other hand, more than 40 clinical studies for gene therapy have been completed or ongoing in Japan, most of them are conducted as clinical researches by academic institutes, and few clinical trials have been conducted for approval of gene therapy products. In order to promote the development of gene therapy products, revision of the current guideline and/or preparation of concept paper to address the evaluation of the quality and safety of gene therapy products are necessary and desired to clearly show what data should be submitted before First-in-Human clinical trials of novel gene therapy products. We started collaborative study with academia and regulatory agency to promote regulatory science toward clinical development of gene therapy products for genetic diseases based on lentivirus and adeno-associated virus vectors; National Center for Child Health and Development (NCCHD), Nippon Medical School and PMDA have been joined in the task force. At first, we are preparing pre-draft of the revision of the current gene therapy guidelines in this project.

Keywords: gene therapy, guideline, regulatory science

1. 背景

遺伝子治療薬は、遺伝性疾患やがんなどの難治性疾患に対して、従来の医薬品とは異なる作用機序で働く革新的医薬品として期待されている。レトロウイルスベクターによる白血病の発症などの重篤な副作用が問題となり一時開発が停滞したが、最近では、新たなベクターの開発や技術の改良、経験の蓄積により、臨床で著効が得られる例が増加している。特に、欧米で開発が進められている原発性免疫不全症や先天性代謝異常症などの遺伝性難病に対する遺伝子治療薬は極めて高い治療成績が得ら

れてきており、一部の疾患では根治療法として認識されるに至っている。2012年には先進国で初めての遺伝子治療薬、Alipogene Tiparvovec (商品名Glybera; リポプロテインリパーゼ欠損症治療薬) が欧州で上市されたことから、欧米では大手製薬会社も参入して遺伝子治療薬の企業レベルでの臨床開発が活発化し、遺伝性難病に対する遺伝子治療薬を中心に、数年以内に実用化が期待される製品が複数開発中である。

一方、日本でもこれまでに40件以上の遺伝子治療臨床試験が実施されている。しかし、承認取得を目的とした企業による治験としての実施はわずかであり、ほとんどが大学等の研究者による臨床研究に留まっている。遺伝子治療薬の実用化には治験の実施が不可欠であるが、日本では欧米と異なり、治験と臨床研究で異なる指針に基づき異なる審査が行われており、臨床研究から治験への移行に際して、臨床研究の成果を直接、承認申請に向けたデータとすることが困難である。また、治験の実施に

[#] To whom correspondence should be addressed:
Eriko Uchida; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;
Tel: +81-3-3700-9217; Fax: +81-3-3700-9217;
E-mail: uchida@nihs.go.jp

際して参照すべき品質・安全性の指針が遺伝子治療の最新技術に対応していないことも、新たなベクターを用いた日本独自の新規遺伝子治療薬の開発や、海外の有望な遺伝子治療薬の導入・国際共同治験の実施を困難にしている一因と考えられる。

遺伝子治療薬の審査体制は、昨年、大きな制度改革があり、治験実施前の確認申請制度が廃止され薬事戦略相談に移行した。また、薬事法の改正により遺伝子治療薬は「再生医療等製品」に分類され、条件・期限付承認制度の創設により早期実用化が可能とされるようになった。しかし、遺伝子治療薬には重篤な副作用が生じた経験もあり、安全性を十分に確保しつつ迅速な実用化を図るには、遺伝子治療薬の有効性・安全性の評価や開発に関するガイドラインの整備等、レギュラトリーサイエンスに基づく研究開発支援が重要である。また、遺伝子治療薬に用いるベクターに特化した技術的要件や考え方を整理することが重要と考えられている。

そこで、これらの問題点を解決し、遺伝子治療薬の開発・実用化を促進することを目的として、「革新的医薬品・医療機器・再生医療等実用化促進事業」において、国立成育医療研究センター（成育）と日本医科大学（日本医大）は国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）及び医薬品医療機器総合機構（PMDA）と連携して「遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発に向けた安全性、有効性評価の確立・ガイドライン作成・人材交流」を目指した共同研究を実施することとなった。

2. 研究目標及び連携体制

本研究事業の概要と連携体制を図1に示した。研究目標としては、遺伝性難病に対する遺伝子治療薬として実用化が期待されている造血幹細胞遺伝子治療のためのレンチウイルスベクターと、酵素補充療法に用いるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを取り上げ、臨床開発を行うことを目指している。そのうえで、この研究事業の推進において得られた経験を生かして、遺伝子治療薬のガイドラインの整備を行う。現行の遺伝子治療指針の改正に加え、レンチウイルスベクターやAAVベクターの臨床開発に伴う品質・安全性評価法の開発や基盤研究に基づく評価基準の策定、ガイドライン化を目指す。このような方策により、日本での使用実績に乏しいレンチウイルスベクターやAAVベクターを用いた新規遺伝子治療薬の臨床開発を促進する基盤整備を行う。さらに、共同研究機関相互の人材交流や情報交換を行うことにより、遺伝子治療薬の開発や審査のための体制整備や人材の育成に努めることを研究目標としている。

共同研究に参加している各機関の具体的な研究項目と役割分担は以下の通りである（敬称略）。

(1) 国立成育医療研究センター（成育）：小野寺雅史（総括研究代表者）、土田尚、五十嵐友香、山本茉莉、伴野太郎

研究項目：慢性肉芽腫症（CGD）に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実施、次期の遺伝子治療臨床研究（治験）で使用されるレンチウイルスベクターの開発及び治験の準備、染色体組込み型ベクターの品質・安全性評価法の開発、ガイドラインの作成。

(2) 日本医科大学（日本医大）：島田隆（副総括代表者24～25年度）、岡田直巳（副総括代表者26年度～）

研究項目：日本で頻度が高い致死性骨系統疾患である低フォスファターゼ症と、遺伝性神経脱髄疾患である異染性白質ジストロフィーを対象疾患とするAAVベクターの開発及びAAVベクターの安全性と品質評価基準を策定するためのAAVベクターの大量生産・精製法の標準化、ガイドライン作成。

(3) 国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）：内田恵理子、佐藤陽治

研究項目：ガイドラインの作成、ウイルスベクターの品質・安全性評価法の開発。

(4) 医薬品医療機器総合機構（PMDA）：石塚量見

研究項目：臨床開発に関する助言、ガイドラインの作成。

連携体制・人材交流としては、成育から国立衛研に五十嵐研究員が派遣され、ウイルスベクターの品質・安全性評価法の開発に関する研究を行っている。国立衛研からは内田と佐藤が成育で月1回程度開催される全体会議に出席して共同研究及びガイドライン作成に関する意見交換を行っている。また、成育の判野研究補助員はAAVに関する技術習得のために日本医大に派遣され、AAVベクターの精製法の開発を行っている。一方、成育・日本医大とPMDAとの人材交流としては、PMDAの石塚専門審査官が成育を月に一度訪問し、成育からは土田医師が月に2回程度PMDAに出向き、意見交換を行っている。さらに、成育や日本医大からPMDAに講師を派遣してPMDAの審査官を対象に遺伝子治療に関連するセミナーをこれまでに8回開催しており、これには内田も出席して情報交換を行っている。

3. 研究実施状況

公表できる成果として、本共同研究で国立衛研が中心になって進めているガイドライン作成について紹介する。

遺伝子治療薬の臨床開発では、平成7年に通知された「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」が基本指針としてこれまで使用されてきた。本指針は、遺伝子治療薬の治験実施前の確認申請制度の廃止

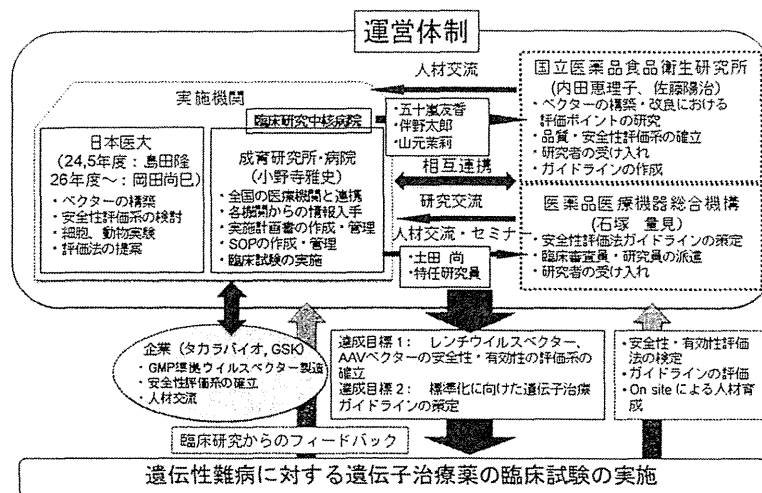


図1 事業の概要と連携体制

を目的として昨年7月に改正されたが、遺伝子治療薬の品質や安全性確保に関する項の記載は策定当時のままである。この間の遺伝子治療技術の進歩や臨床経験、海外の規制動向が反映されていないことや、非臨床試験の具体的な内容に乏しいことなど、指針としては不備があると指摘されている。この間、欧米では、遺伝子治療薬に関連する指針が改定され、また個別のベクターや関連する周辺技術に関するガイダンスが発出されていることも踏まえ、遺伝子治療薬の治験の活発化には指針の早急な整備が必要と考えられた。そこで、本研究事業ではまずこの基本指針の改正案を作成することとした。これまでに、欧米の指針等との比較を基に、従来の指針の問題点・改正ポイントを抽出し、改正指針では遺伝子治療薬の治験を開始するまでに明らかにすべき品質及び非臨床試験項目、特にFirst-in-Humanで求められる品質や安全性データを明確に示すことを目指した。現在、遺伝子治療に関するもう一つの指針である「遺伝子治療臨床に関する指針」についても厚生科学審議会の専門委員会で改正のための作業が行われている。遺伝子治療の定義や品質・安全性の記載内容は、臨床研究指針と整合性を持たせることにより、臨床研究から治験へと切れ目なく開発が進むことが期待される。そこで、臨床研究指針の品質・安全性評価項目に関する検討も同時に行い、両者の整合性を図ることとした。現在までに基本指針別紙の改正二次案を作成し、今後、さらに修正を行い最終的な改正案の今年度中の完成を目指している。

一方、基本指針の改正案には本研究事業で検討している個別のベクターの臨床開発に当たっての考慮事項や、挿入変異によるがん化リスクなどの個別の課題に関するガイダンスすべてを取り込むことは難しい。そこで、「AAVベクターの開発」、「染色体組込型ベクターの挿入

変異の評価基準」、「ウイルスベクターの品質解析と安全性評価」といった課題については、成育や日本医大で現在実施している評価研究の成果や海外の規制の最新動向を取り込み、今後、リフレクションペーパー等を作成していく予定である。

4. おわりに

本事業で作成中の遺伝子治療薬の基本指針の改正案や、今後作成を予定しているリフレクションペーパーは、遺伝性難病の遺伝子治療薬に限らず、広く遺伝子治療薬の臨床開発に役立つことが期待される。このような事業の成果により、日本でも遺伝子治療薬の開発が活発化し、実用化の促進につながることを願っている。

謝辞

本稿で紹介した共同研究は、厚生労働省「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」の支援を受け遂行したものであり、ここに感謝申し上げます。

High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, 5, 5899Received 25th July 2013
Accepted 9th September 2013

DOI: 10.1039/c3ay41249k

www.rsc.org/methods

Kumiko Sakai-Kato,^{*a} Kunie Nanjo,^a Teruhide Yamaguchi,^b Haruhiro Okuda^b and Toru Kawanishi^b

The IgG2 subclass of antibodies has emerged as an attractive therapeutic framework. However, a method for sufficiently separating the three IgG2 disulfide isoforms has not been developed. Here, we report a method for efficient separation of monoclonal IgG2 isoforms by means of high-performance liquid chromatography on a column packed with 2 μm nonporous ODS silica particles. Under optimized conditions, the isoforms were separated with high resolution because mass transfer resistance in the stationary phase was reduced by the use of the small, nonporous particles. The number of separated peaks was more than twice that reported previously. The run-to-run repeatability of the IgG2 separation pattern was satisfactory, and the day-to-day repeatability of the retention time of the main peak was good (relative standard deviation 0.9%). The separation pattern can be expected to be useful for monitoring quality consistency of therapeutic antibodies.

1. Introduction

Human monoclonal antibodies, including three of the four subclasses of immunoglobulin G (IgG1, IgG2, and IgG4), have been widely used as therapeutic drugs. Although members of the IgG1 subclass are the most widely used therapeutic antibodies, the IgG2 subclass has emerged as an attractive therapeutic framework in situations in which effector functions are undesirable or unnecessary for therapeutic activity;^{1,2} the effector functions of IgGs depend on their affinity for Fc γ receptors, which decreases in the order IgG1, IgG3 > IgG2, IgG4.^{3,4} The most characteristic structural differences between the four subclasses are the numbers and positions of disulfide bonds linking Cys residues in the hinge regions:⁵ IgG1 and IgG4 have two, whereas IgG2 has four (Fig. 1).

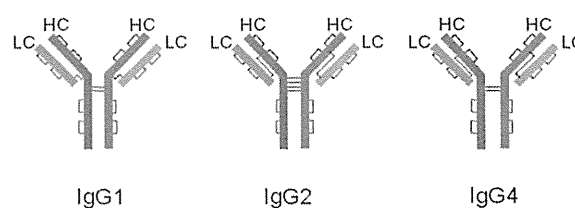


Fig. 1 Schematic showing human IgG subtypes, with disulfide links.

IgG2 antibodies were recently shown to exist in three disulfide-mediated structural isoforms.^{6–8} The effect of structural heterogeneity on antibody function has attracted much attention,⁷ and interconversion between the isoforms *in vivo* and their pharmacokinetics have also been studied.⁸ In addition to structural heterogeneity, IgGs also show heterogeneity in various other properties, such as charge. Gaining a comprehensive understanding of the structure and stability of the isoforms is important for quality control, and with this goal in mind, separation of the isoforms by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) has been studied.^{9–11} However, although resolution has been improved, separation of the IgG2 isoforms remains insufficient. Here, we report the development of a method for highly efficient separation of IgG2 isoforms by means of HPLC on a column packed with 2 μm nonporous ODS silica particles.

2. Experimental

2.1 Materials

The following commercially available monoclonal IgGs (IgG1, IgG2, and IgG4 subclasses) were purchased from reagent distributors: infliximab (hereafter referred to as IgG1#1), trastuzumab (IgG1#2), panitumumab (IgG2#1), denosumab (IgG2#2), and natalizumab (IgG4#1). Trifluoroacetic acid (TFA), acetonitrile, and ethylenediaminetetraacetic acid were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Other reagents were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

^aDivision of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: kumikato@nihs.go.jp; Fax: +81-3-3700-9662; Tel: +81-3-3700-9662

^bNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

2.2 HPLC conditions

IgG2 isoforms were separated on a Hitachi LaChromUltra HPLC system equipped with an L-2160U pump, an L-2200U automated sample injector, an L-2300 thermostatted column compartment, and an L-2485U fluorescence detector (Hitachi, Tokyo, Japan).

IgG2 isoforms were separated on a Presto FF-C18 column (250 × 4.6 mm; particle size, 2 μm; Imtakt Corp., Kyoto, Japan) with mixtures of water containing 0.1% TFA (mobile phase A) and acetonitrile containing 0.1% TFA (mobile phase B) at a flow rate of 400 μL min⁻¹. Samples were injected under loading conditions of 31, 32, 33, or 34% B, and the proportion of B was increased to 44, 43, 42, or 41% B, respectively, by means of a linear elution gradient starting at 0 min and ending at 60 min. The column was then flushed for 5 min with 95% B. The column temperature was maintained at 85 °C, the detector was operated at 220 nm, and the column pressure was approximately 15 MPa.

2.3 Reduction and alkylation of IgGs

IgG samples were diluted to 1 mg mL⁻¹ in a pH 7.5 buffer containing 7.5 M guanidine hydrochloride, 0.1 M Tris-HCl, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid to a final volume of 0.5 mL. Dithiothreitol (final concentration 5 mM) was added to the samples, which were then incubated at 37 °C for 35 min. After the addition of iodoacetic acid (final concentration 13 mM), the samples were cooled to room temperature and then incubated at room temperature in the dark for 1 hour.¹⁰

3. Results and discussion

Incomplete separation of intact IgG2 isoforms by means of reversed-phase HPLC on columns packed with 5 μm porous or spherically porous particles has been reported.^{10,11} In this study, we improved the separation by using a stationary phase packed with smaller (2 μm), nonporous particles.

The effect of stationary phase particle characteristics on plate height (H) can be determined with the van Deemter equation:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

where H is the plate height, u is the linear velocity of the mobile phase, and A , B , and C are constants that account for contributions to band broadening from eddy diffusion, longitudinal diffusion, and resistance to mass transfer of analytes, respectively. In the case of macromolecules, the effect of longitudinal diffusion (the B term) is generally negligible. The major difference between porous and nonporous particles is that for porous particles, resistance to mass transfer (the C term) is appreciable, owing to stagnation of the mobile phase in the pores. The Horvath-Lin equation describes the contribution of resistance to mass transfer (C_{stag}) for unretained solutes:¹²

$$C_{\text{stag}} = \frac{\theta k_0 d_p^2}{30D_m(1+k_0)^2} \quad (2)$$

where θ is the tortuosity factor for porous particles, k_0 is the ratio of the intraparticle void space to the interstitial void space in the column, D_m is the diffusion coefficient of the solute in the mobile phase, and d_p is the particle diameter. The contribution of C_{stag} becomes appreciable when analytes with relatively high molecular weights (relatively small D_m values) are separated. An increase in molecular weight results in a decrease in the diffusion coefficient and an increase in the mass transfer resistance. Therefore, the diffusion of large molecules in the pores makes a large contribution to the mass transfer resistance. These facts suggest that nonporous particles have a substantial advantage over porous particles for efficient separation of large molecules.¹³ Nonporous columns have previously been reported to afford higher rates of peptide recovery than porous columns.¹⁴ Furthermore, decreasing the particle size also contributes to decreases in the A and C terms of eqn (1), which in turn lead to a reduction in H and thus to band broadening. On the basis of these considerations, we used a stationary phase packed with 2 μm nonporous particles.

Reversed-phase HPLC separation of IgG2 disulfide isoforms is usually performed at high temperature (65–85 °C) and low pH.^{7–11} The use of high temperatures decreases the net affinity of the proteins for the stationary phase by increasing their solubility in the mobile phase, thereby improving their recovery.¹⁰ In our system, increasing the column temperature from 65 to 85 °C increased the peak area (Fig. 2), but did not markedly change the separation performance. Therefore, we used a column temperature of 85 °C, which was the highest temperature we could use in our system. We confirmed that the column could be used 200 times at temperatures higher than 80 °C without obvious performance degradation. Although we used a relatively long column (250 mm) to obtain high resolution,¹⁵ the elution time was almost the same as the elution times reported by researchers who used shorter columns.¹⁰

We obtained good separation by optimizing the mobile phase gradient; we used the typical gradient of water and

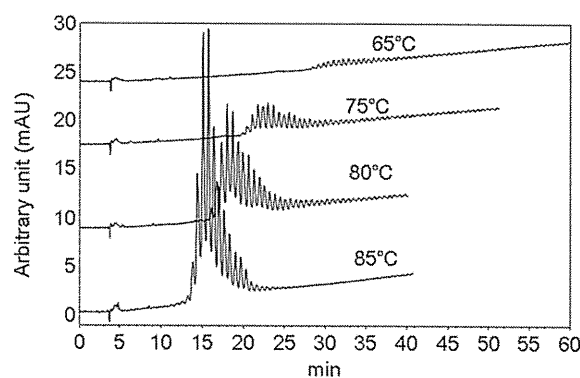


Fig. 2 Effect of temperature on the chromatographic separation of IgG2#1. Column, Presto FF-C18 (250 × 4.6 mm i.d.); mobile phases: (A) water containing 0.1% trifluoroacetic acid, (B) acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid; mobile phase gradient, (B) samples were injected under loading conditions of 34% B, and the proportion of B was increased to 41% B, with a linear elution gradient starting at 0 min and ending at 60 min; flow rate, 400 μL min⁻¹; column temperature, 65–85 °C; sample concentration, 2 mg mL⁻¹; injection volume, 2 μL.