

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

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

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 青木 正志

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

- . **総括研究報告書**-----1
研究代表者 青木 正志
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**
研究分担者 安達 喜一
ALS を対象とする第 II 相臨床試験開始に向けた非臨床試験および原薬・治
験薬関連試験の実施-----5

- . **研究者一覧**

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

研究代表者 青木 正志 東北大学神経内科 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は発症から数年で全身に筋萎縮が進展し呼吸筋麻痺に至る神経難病の象徴的疾患である。ALSは有効な治療法がないため世界的に新規治療法開発が強く求められている。しかし、国内外での治療研究や臨床試験の結果、唯一認可されたリルゾールは生存期間延長効果が平均2～3カ月で筋力改善効果がないため、まったく不十分である。東北大学神経内科では世界に先駆けて髄腔内投与が可能なALS動物モデル（ALSラット）の開発に成功した。一方、肝細胞増殖因子（HGF）は本邦で発見された強力な運動ニューロン保護因子である。私たちはこのALSラットに組換えHGF蛋白質の髄腔内持続投与を行い明確な治療効果を確認した。すなわち、ALS発症期からの投与であっても約63%の罹病期間延長効果があり、これまで報告されたALS治療実験の中でも最も良い成績を示した。

本研究グループは組換え HGF に関する特許や製造方法を確保し、平成 23 年世界に先駆けて ALS 患者を対象とする第 I 相臨床試験を東北大学病院にて開始した。このように、本研究グループは HGF による ALS 治療法開発において現在も世界をリードしており、第 I 相臨床試験において安全性と薬物動態を確認した後は、速やかに第 II 相臨床試験を実施し ALS 患者に対する HGF の有効性を確認することが必要である。本研究では、第 II 相臨床試験の治験申請に必要な非臨床試験（長期投与の安全性を確認する慢性毒性試験等）、組換え HGF 蛋白質の原薬・治験薬製造、原薬の品質保証のための CMC 試験（規格・分析試験等）を実施した。さらに、第 II 相臨床試験のプロトコル開発に注力し、モニタリング・監査・データマネジメントの体制整備も進めることができた。

研究分担者

安達喜一（クリングファーマ株式会社）
浅田隆太（京都大学医学部附属病院・探索医療センター・探索医療開発部）

共同研究者

加藤昌昭（東北大学病院神経内科）
割田 仁（東北大学病院神経内科）
豎山真規（東北大学病院神経内科）
阿部哲士、福田一弘、井上逸男（クリングファーマ株式会社）

A. 研究目的

本研究では、難病中の難病といわれる神経

変性疾患ALSに対して、本邦発のHGFを用いた治療法開発をさらに推進する。本ALS治療法開発研究は、1993年に*SOD1*遺伝子が家族性ALSの原因遺伝子として北米で発見され、本邦からも研究代表者の青木が中心となり新たな*SOD1*遺伝子変異を報告した時に始まった（Nature Genet, 1993）。代表者らは変異*SOD1*導入ALSラットを世界に先駆けて完成し、薬剤をALS病態の主座である中枢神経系の運動ニューロンに効率良く到達できる髄腔内投与方法を初めてALSモデル動物で可能にした（J Neurosci, 2001）。このALSラットに対する組換えHGF蛋白質の髄腔内持続投与は顕著な治療効果を示した（J Neuropathol

Exp Neurol, 2007)。すなわち、HGFをALS発症期から投与しても約63%の罹病期間延長効果を示すことができ、ALSモデル動物を用いた治療実験の中でも国内外で最も良い成績となった。このようにALSに対する有効性が期待でき、かつ本邦で発見された強力な運動ニューロン保護因子HGFを日本発の創薬として研究する意義は大きい。

このHGF髄腔内持続投与によるALS治療法開発を念頭に、霊長類(サル)を用いて臨床用量の設定と安全性試験を実施、髄腔内投与に用いる医療器具と薬物動態の検査施設を選定、治験薬を製造、そして第I相臨床試験プロトコル作成と前臨床試験を着実に進めてきた。これらの研究成果をもって、ヒトにおける安全性と薬物動態を検証する第I相臨床試験(治験)が平成23年7月東北大学病院治験審査委員会にて承認された。本臨床試験は早期ALS罹患者を対象とした単回あるいは反復投与試験であり、現在順調に進行している。

本研究では上記の第I相臨床試験結果をふまえ、組換えHGF蛋白質の髄腔内投与によるALS治療法開発を第II相臨床試験へと進めるため、必須となる非臨床試験および原薬・治験薬関連試験、そしてプロトコル開発を行う。以上の研究を通して、第II相臨床試験の治験届に必要なデータ・資料を整備し、研究期間(平成24~26年度)内の第II相臨床試験(治験)開始を目標とする。

B. 研究方法

本邦で発見された運動ニューロン保護因子HGFの髄腔内投与によるALS治療法開発は現在、第I相臨床試験を実施中である。本研究では、ALS患者における有効性を確認する第II相臨床試験を開始するために必須の、非臨床試験、原薬・治験薬製造、原薬・

治験薬関連試験、プロトコル開発等を実施する。これらによりALSに対するHGFによる新規治療法開発をさらに推進する。

非臨床試験：第II相臨床試験では、組換えHGF蛋白質を長期間髄腔内に投与する予定である。そこで、カニクイザルを用いた最長6ヶ月の慢性毒性試験を行い、第II相臨床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。平成25年度は予備試験による条件検討を十分行った後、GLP準拠の本試験を開始する。組換えHGF蛋白質に対する抗体産生を確認するために必要なピオチン化HGFの調整や安定化試験も実施する。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毒性試験を前年度から継続して実施する(平成26年度まで継続)。平成25年度はラットおよびウサギを用いた胚胎児試験(セグメント2)の予備試験を実施・終了し、本試験を開始する。さらに、ALS唯一の既存薬であるリルゾールとの薬物相互作用試験を前年度予備試験で得られた条件にしたがって行う。

原薬・治験薬製造：第II相臨床試験で使用する治験薬を製造するための原薬をGMP基準で製造する。

原薬・治験薬関連試験：HGF原薬の品質保証に要する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(前年度から継続)、およびHGF蛋白質の糖鎖構造解析を実施する。また、現在第I相臨床試験で使用中の治験薬の予備安定性試験を継続する。

プロトコル開発等：第II相臨床試験のプロトコル開発を継続し、併せてモニタリング・監査・データマネジメントの整備を進める(前年度より継続)。

（倫理面への配慮）

現在施行中の第I相臨床試験（治験）は東北大学病院治験審査委員会承認を得ており、「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)に従って行う。動物を用いた実験はすべて研究委託施設の動物実験倫理規定に基づいて施行し、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する。組換えDNA実験はすべて実施施設の組換えDNA安全管理規定に基づいて行う。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) に従い行う。

C. 研究結果

1) 研究班全体としての成果

神経難病の象徴的疾患である ALS に対して有効性が強く期待できる HGF を用いた ALS 治療法の開発をさらに推進した。東北大学病院で実施中の第 I 相臨床試験を継続しつつ、第 II 相臨床試験を開始するために必要な非臨床試験とプロトコル開発・実施体制整備を進めており、第 I 相試験終了後は遅滞なく第 II 相試験を開始する予定である。世界的に ALS の新規治療法開発が切望されている中、本研究は、わが国発の運動ニューロン保護因子 HGF を画期的な ALS 治療薬として世界に発信できると期待される。

2) 各分担項目の成果

平成 25 年度の研究成果を以下に記す。

非臨床試験：

- ・ カニクイザルを用いた慢性毒性予備試験を終了し至適条件が得られたため、本試験を開始した（GLP準拠）。

- ・ ラットおよびウサギを用いた胚胎児試験の予備試験を終了し、本試験を開始した。ウサギの試験は終了し、明らかな HGF 毒性は認められなかった。
- ・ リルゾールとの薬物相互作用試験により、相互作用はないことが明らかとなった。
原薬・治験薬製造：
- ・ 製品標準書に則り、異常逸脱なく GMP 製造を終えた。
原薬・治験薬関連試験：
- ・ 宿主由来蛋白試験は遺伝子増幅およびクローニングまで終了した。
- ・ HGF 蛋白質の糖鎖構造解析を終了した。
- ・ 治験薬の予備安定試験を行い、36カ月までの安定性を確認した。- 70 保存品質試験を追加して実施した。
プロトコル開発等：

現在、東北大学病院で実施中の第I相臨床試験データを集積しつつ、第II相臨床試験のプロトコル案を作成した。第II相臨床試験で用いる用法用量をほぼ確立し、主要評価項目・副次評価項目、選択基準・除外基準を策定した。現案における目標症例数(サンプルサイズ)を検討中である。また、前年度に引き続き、第II相試験を専任で担当できる人材育成を行った。

なお、第II相試験で一定の効果があり、安全性が示されればオーファン医薬品として承認申請を前倒しできる可能性があり、医薬品医療機器総合機構と相談を予定している。

D. 考察

カニクイザルを用いた慢性毒性試験の本試験（GLP準拠）については、平成25年度中に試験終了できなかったが、平成26年度中には終了する見込みである。ALS患者への長期投与となる第II相試験開始前にきわ

めて重要な試験であり、引き続き重点的に取り組む。

生殖発生毒性試験は計画通りの進捗が得られ、ラットでの試験は平成26年度中に終了見込みである。

原薬・治験薬製造もGMP準拠での原薬製造工程が計画通り終了し、製造したHGF原薬の品質規格試験を平成26年度に実施できる。

原薬・治験薬関連試験は、平成25年度中に計画していたすべての試験を終了し、目標を達成できた。平成26年度は宿主由来蛋白試験のうち、継代培地への馴化とセルバンク作製までを実施する。

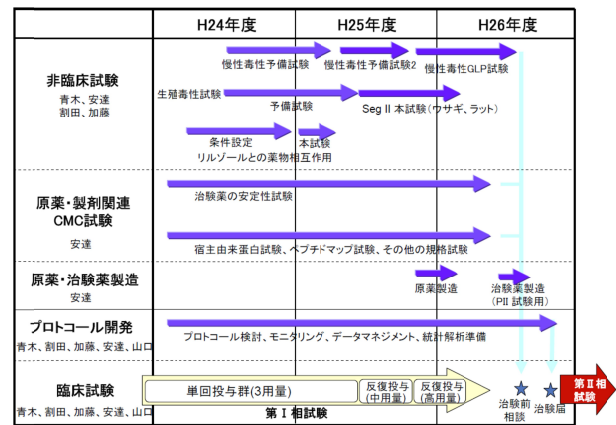
現在、軽症ALS罹患者を対象とした第I相臨床試験が東北大学病院にて進行中である。同試験内で既に3用量（低～高用量）による単回投与および中用量による反復投与を終了した。これまで治験薬との因果関係が「おそらくあり」とされるグレード2（中等度）以上の有害事象は発生しておらず、HGF蛋白質の脊髄腔内投与の安全性をほぼ確認できた。

また、単回投与において用量依存的な薬物動態を確認したことに加え、中用量による反復投与の薬物動態をも確認したことで、第II相臨床試験の用法用量をほぼ確立することができた。現在、高用量での反復投与を追加実施し、臨床データのさらなる拡充を行っている。平成26年度には第I相臨床試験データを総括し、第II相臨床試験のプロトコルを完成する。

第II相臨床試験開始までの開発スケジュールを下図に示す。平成25年度の研究達成状況に鑑み、研究期間（平成24～26年度）終了までに第II相試験を開始することは、十分に達成可能と考えられる。なお、第II相臨床試験の開始にあたっては、被検候補

者を効果的にリクルートするための患者登録（レジストリ）システム構築もまた必要と考えられる。

開発スケジュール



E. 結論

ALS を対象とする第 II 相臨床試験を開始するために必要となる非臨床試験および原薬・治験薬関連試験のうち、平成 25 年度に実施予定であった試験を概ね終了することができた。そして、原薬製造を実施し、第 II 相臨床試験用の治験薬製造の準備ができ、プロトコル開発も順調に進展している。平成 26 年度（最終年度）は引き続き各種試験とプロトコル開発、治験実施体制整備等を完了し、現在実施中の第 I 相臨床試験終了後すみやかに第 II 相臨床試験を開始できる体制を確立する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ALS を対象とする第 II 相臨床試験開始に向けた非臨床試験 および原薬・治験薬関連試験の実施

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

筋萎縮性側索硬化症（ALS）を対象とする肝細胞増殖因子（HGF）の第 II 相試験を開始するために必要となる非臨床試験および原薬・治験薬関連試験を実施した。平成 25 年度の主たる達成事項は以下のとおりで、第 II 相試験の準備を着実に進めることができた。

- ◆ カニクイザルを用いた慢性毒性予備試験を終了し、GLP準拠による本試験を開始した（平成26年度に終了見込）
- ◆ 生殖発生毒性試験（セグメント2）の予備試験を終了し、ウサギとラットの2種で本試験を開始した。ウサギの試験は終了した（ラットの試験は平成26年度に終了見込）。
- ◆ ALSの既存薬であるリルゾールとの薬物相互作用試験を終了した。
- ◆ 第II相試験で使用する治験薬を製造するために必要な原薬製造を開始した（平成26年度に製造終了見込）
- ◆ 原薬の品質保証のための各種CMC試験（規格・分析試験等）を行った。
- ◆ 治験薬の予備安定性試験を行った。

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、トランスレーショナルリサーチを実践している点で厚生労働省の難治性疾患克服研究事業の中でも

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、必須となる非臨床試験および原薬・治験薬関連試験を行う。これらの試験を通して、第 II 相試験の治験届に必要なデータ・資料を整備し、研究期間（平成 24～26 年度）終了までに第 II 相試験を開始することを目標とする。

B. 研究方法

1) 非臨床試験

第 II 相試験では、組換え HGF 蛋白質を長期間脊髄腔内に投与することを予定している。そこで、カニクイザルを用いた最長 6 箇月の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。平成 25 年度は予備試験を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（組換え HGF に対する抗体産生を確認するために必要となるピオチン化 HGF の調製や安定化試験を含む）。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。平成 25 年度はラットおよびウサギを用いた胎児試験（セグメント 2）の予備試験を実施し、本試験（申請資料の信頼性の基準）を開始する。さらに、ALS の唯一の既存薬であるリルゾールとの薬物相互作用試験を *in vitro* の実験系で行う（条件検討のための予備試験は平成 24 年度に実施済み）。

2) 原薬・治験薬製造

第 II 相試験で使用する治験薬を製造するために必要な原薬を 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する。最終的に 600L 培養槽に播種して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、不活性な一本鎖 HGF を活性型の二本鎖 HGF に変換し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、宿主由来蛋白質試験（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。平成 26 年度まで継続）、および HGF 蛋白質の糖鎖構造解析を行う。

現在実施中の第 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（ELISA 標準物質の安定性試験を含む）。安定性試験は日米欧医薬品規制調和国際会議（ICH）の Q1A, Q1B, Q5C ガイドラインに則って実施する。

（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)に従う。

また、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 26 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に提出する(平成26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) 非臨床試験

- ・ カニクイザルを用いた慢性毒性予備試験：条件検討のための予備試験を終了し、GLP準拠による本試験を開始した。
- ・ 生殖発生毒性試験：ラットおよびウサギを用いた胚胎児試験(セグメント2)の予備試験を終了し、本試験(申請資料の信頼性の基準)を開始した。ウサギの試験は終了し、胚・胎児の内臓および骨格に対してHGFによる明らかな毒性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の実験系で検討した結果、相互作用はないと考えられた。

2) 原薬・治験薬製造

- ・ 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(遺伝子増幅およびクローニングまで)およびHGF蛋白質の糖鎖構造解析を終了し、第II相試験の治験届に含める試験データを得ることができた。
- ・ 治験薬の予備安定性試験：36箇月点(-

20 保存)の試験を実施し、36箇月まで治験薬の安定性に問題がないことを確認した。また、-70 保存品の品質試験を追加で実施し、治験薬の安定性を担保できる期間を延長した。当該治験薬は、実施中の第I相試験において引き続き使用できると判断した。

D. 考察

カニクイザルを用いた慢性毒性GLP試験については、平成25年度中に試験を終了することはできなかったが、平成26年度中には終了する見込である。ALS患者への長期投与となる第II相試験を開始する上で非常に重要な試験であるため、より一層重点的に取り組む。生殖発生毒性試験については、平成25年度中にウサギでの試験は終了した。ラットでの試験は平成26年度中には終了する見込である。

原薬・治験薬製造については、GMP準拠による原薬製造工程を終了した。製造したHGF原薬の品質規格試験ならびに出荷判定は平成26年度に実施する。

原薬・治験薬関連試験については、平成25年度中に予定していた試験を終了し、全ての目標を達成した。平成26年度は宿主由来蛋白試験(継代培地への馴化とセルバンク作製まで)を予定どおり実施する。

現在、ALS患者を対象とする第I相試験を東北大学病院において実施している。これまでに3用量(低・中・高用量)による単回投与群(第一～第三コホート)および中用量による反復投与群(第四コホート)を終了した。第四コホートまででは、治験薬との因果関係が「おそらくあり」とされるグレード2(中等度)以上の有害事象は発生しておらず、HGF蛋白質の脊髄腔内投与の安全性をほぼ確認できた。また、単回投与に

において用量依存的な薬物動態を確認したことに加え、中用量による反復投与の薬物動態をも確認し、第II相試験の用法用量をほぼ確立することができた。これらの臨床データを踏まえて第II相試験のプロトコル骨子案を作成した。現在、高用量での反復投与群（第五コホート）を追加で実施し、臨床データの更なる拡充を計画している。平成26年度には、反復投与群第五コホートの臨床データも踏まえて、II相試験のプロトコルを最終化する。

第II相試験開始までの開発スケジュールを下図に示す。平成25年度の研究達成状況に鑑み、研究期間（平成24～26年度）終了までに第II相試験を開始することは、十分に達成可能と考えている。

治験薬関連試験のうち、平成25年度に実施予定であった試験を概ね終了することができた。平成26年度は引き続き各種試験を遂行し、現在実施中の第I相試験を終了した後に、すみやかに第II相試験に移行できる体制を整える。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

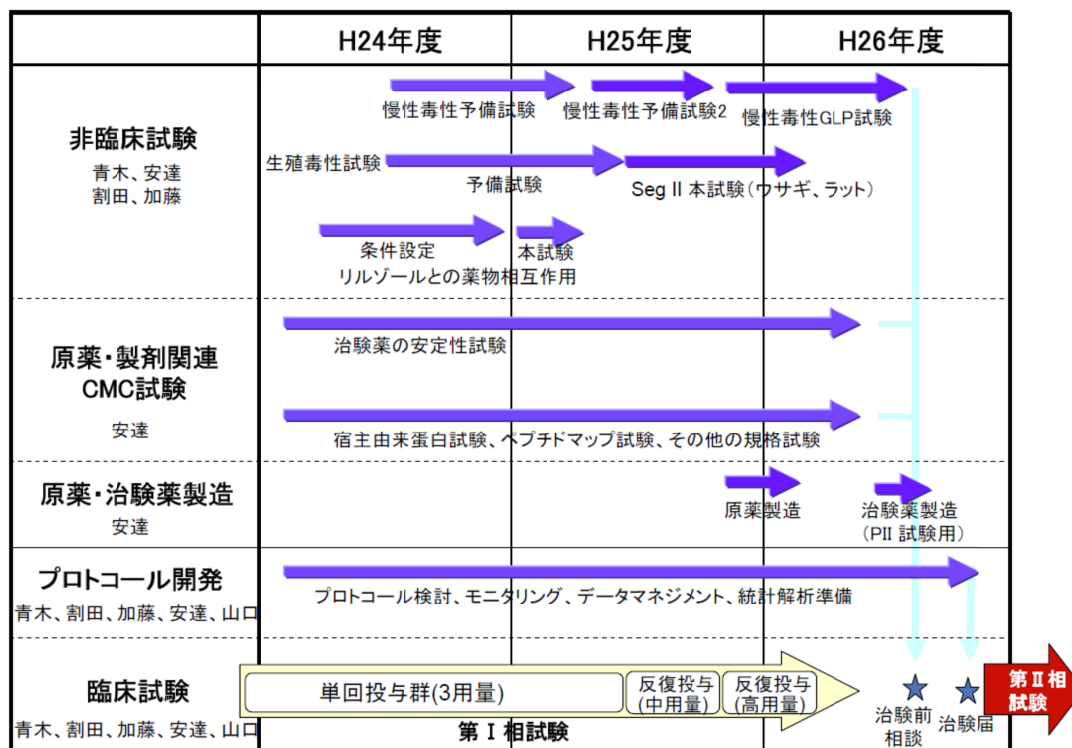
G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の取得状況（予定を含む）

なし

開発スケジュール



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試験および原薬・

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
なし					

. 研究者一覧

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

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	青木 正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学	教授
研究分担者	浅田 隆太	京都大学医学部附属病院 探索 医療センター 探索医療研究部	特定助教
	安達 喜一	クリンゲルファーマ株式会社	取締役事業開発部長