

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 26 ( 2014 ) 年 4 月

# 目 次

I .	総括研究報告 -----	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(RS)研究	
	川 西 徹	
II .	分担研究報告	
	1 . ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究 -----	9
	加 藤 く み 子	
	2 . 改変タンパク質製剤 ( 改変型抗体医薬 ) の評価に関する RS 研究 -----	19
	石 井 明 子	
	3 . 核酸医薬品の評価に関する RS 研究 -----	35
	井 上 貴 雄	
	4 . タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性の評価に関するRS研究 -----	55
	阿 曾 幸 男	
	5 . 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究 -----	59
	内 田 恵 理 子	
III .	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	77
IV .	研究成果の刊行物・別刷	

## 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 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 所長

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： 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； キーとなると考えられる評価手法を開発・標準化する； 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。

2年目の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：

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評価法について調査，考察し，「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」の解説論文に反映した； 評価手法の中でも，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 製剤の臨床上の有効性及び安全性に影響する重要なファクターであるので，有効性と安全性確保の観点より，その評価手法として，ナノ DDS 製剤の血液適合性試験（補体系活性化試験），赤血球との相互作用（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最適化，確立した。

### (2) 高度改変タンパク質製剤の評価に関する RS 研究：

改変タンパク質製剤では，作用の種特異性が高く，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。そこで非臨床試験から臨床試験への安全かつ迅速な移行のための環境整備のための研究を行った。本年度は，改変型医薬品の分子設計について，薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程を考慮して，留意すべき事項をまとめた； Fcγ受容体結合親和性プロファイリングに適した表面プラズモン共鳴（SPR）解析法を構築するとともに，改変型抗体医薬品の非臨床評価において課題となる Fcγ受容体結合親和性の種差を解析した。

### (3) 核酸医薬品の評価に関する RS 研究：

核酸医薬品の安全性確保において，オフターゲット効果（標的 mRNA と類似した配列を持つ遺伝子の発現が抑制される現象）の発現は最も懸念される点であり，特に「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現評価法の確立や判断基準の設定が喫緊の課題となっている。そこで本年度は，複数のタイプが存在するアンチセンス医薬品について調査研究を行い，それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を検討，提案した； さらに，Kynamro®の上市で注目を集めている Gapmer 型アンチセンスに関して，マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の誘導を検証した。

### (4) タンパク質性医薬品等の安定性評価に関する RS 研究：

タンパク質医薬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おり，保存中の品質変化を

短期間に評価できる方法は初期臨床段階での品質確保や製剤処方最適化に有用であり、革新的タンパク質医薬の開発を促進するものと考えられる。本研究においてはタンパク質の動的揺らぎを指標とした短期間での安定性評価法の開発・標準化を目指す。本年度は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β緩和時間等を指標とした）として、<sup>13</sup>C-NMR 緩和時間の可能性について引き続き検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の <sup>13</sup>C-NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆する結果を得た。

（５）遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究：

染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの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法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした；一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した；また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。

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 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 室長
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五室室長
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室 室長
内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第一室室長

研究協力者

吉澤靖貴	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
桜井真理	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
多田 稔	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第三室 室長
鈴木琢雄	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
五十嵐友香	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部協力研究員

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・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者によって構成され,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:

ナノ DDS 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評価手法に関しては,科学的な論文を中心に調査した。また,EMA や FDA から発出されているガイドライン等を参考に,タンパク質,細胞との相互作用が有効性や安全性に与える影響について考察した。

中性リポソームおよびカチオン性リポソームについて,補体活性化測定,溶血性試験,血液凝固試験の最適化を行った。

### B-2 改変タンパク質性製剤の評価に関する RS 研究:

バイオ医薬品の製造と開発に関する考え方として,ICH Q11ガイドラインに記載されている目標製品品質プロファイルや重要品質特性の考え方,ならびに,改変型抗体に関する学術文献をもとに,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。SPR解析にはBiacore T200 (GEヘルスケア)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抗体 (GEヘルスケア)を固定化した。His-tag付加されたFcγR細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Sino Biologicals) 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用いて結合親和性の解析を行った。

### B-3 核酸医薬品の評価に関する RS 研究:

核酸医薬品の開発状況を,文献および国内外の学術集会等で調査して「アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類」に関してまとめた。さらに,現在,最も進んだ開発段階にあるGapmer型アンチセンスを対象にオフターゲット効果を解析した。具体的には,GFPを安定発現するヒト細胞 (HEK293細胞) に対して,GFPに対するアンチセンスを添加し,抗GFPアンチセンスと相補的に結合しうるヒト内源性遺伝子がどのように発現変化するかを,マイクロアレイおよび定量PCRにより解析した。

### B-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関する RS 研究:

<sup>13</sup>C-NMR 緩和時間の市販製剤中のタンパク質の局所的な運動性の評価への適用性については,ヒュミラ皮下注(アダリムマブ),アクテムラ注(トシズマブ),レミケード注用(インフリキマブ)を用いて検討した。レミケード注用は凍結乾燥品であり,5%溶液になるよう水を加え溶解したものについて測定した。緩和時間はInversion-recovery法によって20において測定した。変性温度はマイクロ熱量計 (TAM, TA Instruments) を用い,毎時1の昇温速度で測定した。

### B-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関する RS 研究:

染色体組込型ベクター製品の開発動向は関連する論文や書籍,学会等の情報を基に検討した。リスク評価については,EMAのガイダンス及び関連する論文を中心に検討した。Gp91phox 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター産生細胞(パッケージング細胞)の培養上清からウイルスRNAを抽出,デジタルPCRを用いてウイルス

コピー数を測定した。レトロウィルスベクターで K562 細胞を感染させ、細胞への感染率を感染力価として算出するとともに、残存率を算出した。

### (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。遺伝子組み換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)及びこれに基づく当研究所の規則に従い、研究内容につき各研究機関の承認を得て遂行する。さらに動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、動物実験委員会に研究計画を申請し、承認を得た後に行うと共に、動物愛護の精神に則って、実験を遂行する。

## C. 研究結果

我が国の産学において医薬品開発が活発であり、ヒト初回臨床試験が間近、あるいは臨床試験が行われつつある革新的医薬品として、(1)ナノ DDS 製剤、(2)改変型抗体医薬品、(3)核酸医薬品、(4)遺伝子治療用医薬品 をとりあげ、これら医薬品のヒト初回臨床試験、さらには承認申請に至るまでに配慮すべき要件、特に品質、安全性評価の要件を明らかにするため、以下の RS 研究を行った。

### C-1 ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究：

(1) ナノ DDS 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主な評価法としては、

直接、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法 としては a) タンパク結合率、血球分配率 (*in vivo* 試験)； b) 血液適合性試験 (*in vitro* 試験)； c) ゲル電気泳動と質量

分析法 (*in vitro* 試験)；

間接的に、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法 としては a) 動的光散乱 (*in vitro* 試験)； b) 静的光散乱 (*in vitro* 試験)； c) 蛍光色素標識化 (*in vitro, in vivo* 試験)； d) 同位体標識化 (主として *in vivo* 試験)

があり、それぞれの試験法についてその利点、欠点等を含めてまとめ、昨年度作成した、“ブロック共重合体ミセル医薬品に関する MHLW-EMA 国際共同リフレクション・ペーパー”の解説文とした。

(2) ナノ DDS 製剤の臨床前での安全性について留意すべきポイントとして、血液適合性に着目した。血液適合性試験は本邦では医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスに掲載されているが、ナノ DDS 製剤の試験への適用で問題が発生することが少なくない。そこでリポソーム製剤の試験が可能となるように (1) 補体系活性化測定法、(2) 溶血性試験法、(3) 血液凝固試験法 について最適化を行い、試験法を確立した。

### C-2 改変タンパク質製剤 (改変型抗体医薬品) の評価に関する RS 研究：

(1) IgG の各領域の構造および機能についてまとめるとともに、改変型抗体医薬品を分子設計するにあたって考慮すべき要件をまとめ、選択されたリード抗体を至適化するには、(1) 有効性・安全性に関連する薬理作用、薬物動態、免疫原性；(2) 製剤化に関連する溶解性、安定性；さらに (3) 製造工程 を考慮して、構造の至適化が必要であることを明らかにした。次に有効性・安全性の観点からは、薬理作用、薬物動態、免疫原性の観点で分子設計にあたって配慮すべきポイントをまとめた。製剤化の観点からは、溶解性、安定性、製造工程の観点で、分子設計にあたって配慮すべきポイントをまとめた。

(2) 次に抗体医薬品の抗体依存性細胞傷害作用による抗腫瘍作用という薬理作用発現を期待する一方で、インフュージョン反応の発現等の有害反応にもつながる可能性のある抗体医薬の Fc 領域と Fc $\gamma$  受容体の結合性を評価する上で重要な、Fc $\gamma$  受容体結合に関する種差の検討を SPR 解析により行った。その結果、ヒト Fc $\gamma$  受容体とマ

ウス Fc $\gamma$  受容体では、ヒト IgG<sub>1</sub> 由来 Fc を持つ抗体の結合親和性に相違が認められたが、ヒト Fc $\gamma$  受容体とカニクイザル Fc $\gamma$  受容体に対する抗体の結合性には、大きな違いはないことを明らかにした。

### C-3 核酸医薬品の評価に関する RS 研究：

(1) アンチセンス医薬品の機能的分類を理解する上で必須である、修飾型核酸およびアンチセンス医薬品それぞれの開発状況を調査し、今後開発が活発化されるアンチセンス医薬品の特徴をまとめた。

(2) 次にその中で最も開発段階が進んでいるアンチセンス医薬品である Gapmer 型アンチセンスは、オフターゲット効果の発現が検証されておらず、どれくらいの相補性を持つ mRNA が影響を受けるのか不明である。そこで Gapmer 型アンチセンスをヒト細胞に添加し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の発現を網羅的に検証した。その結果、以下の点が明らかになった。

- ・完全相補する標的外遺伝子は、その 60%以上が 50%未満まで発現抑制される。
- ・1 塩基ミスマッチを持つ遺伝子であっても、40%程度の遺伝子は 50%未満まで発現抑制される。
- ・2 塩基ミスマッチを持つ遺伝子でも、50%未満まで発現抑制されるケースがある。ただし、その発生確率は小さいと見積もられる。

以上の解析結果から、13 塩基長の Gapmer 型アンチセンスの場合、少なくとも 1 塩基ミスマッチを有する遺伝子までは、オフターゲット候補遺伝子として *in silico* 解析でピックアップする必要があり、発現抑制の程度をヒト細胞で解析するのが適当と考えられた。13 塩基長のアンチセンスでは 1 塩基ミスマッチを持つ mRNA は理論的には 52 個存在しており、定量 PCR 等で個別に解析するよりも、マイクロアレイを用いた網羅的解析の方が効率がよいと考えられた(効率のみならず、2 塩基ミスマッチを持つ mRNA の挙動も同時に解析できる利点がある)。

### C-4 タンパク質性医薬品および核酸医薬品の安定性評価に関する RS 研究：

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、初年度確率したタンパク質カルボニル炭素の <sup>13</sup>C-NMR 緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。その結果、緩和時間が大きく分子運動性が大きいと考えられる試料ほど、変性温度が低く不安定であることが示され、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の <sup>13</sup>C-NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆するものとする。

### C-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関する RS 研究：

(1) 遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリサイエンス研究の一環として、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの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み試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。

(2) 遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。

### D . 研究により得られた成果の今後の活用

今年度、各課題について得られた成果は下記の通りに活用される。

(1) ナノ DDS 製剤の評価： 本研究でまとめ

たナノ DDS 製剤のタンパク質や細胞との相互作用の試験法に関する情報は、昨年度作成した“ブロック共重合体ミセル製剤の MHLW-EMA 国際共同リフレクションペーパー”の技術的解説文として利用されることになる。また、リポソーム製剤の試験法として最適化された血液適合性試験は、今後その他のナノ DDS 製剤の安全性試験法に応用されることが予想される。

- (2) 改変タンパク質製剤(改変型抗体医薬品)の評価: 改変型抗体医薬品を分子設計する際に配慮すべきポイントが整理され、今後の抗体医薬品の的確な設計に生かされる。また Fc 受容体の結合活性の種差に関する結果は、マウスやサルを用いた試験結果をヒトに外挿する際に極めて有用な情報となる。
- (3) 核酸医薬品の評価: 世界的にみても規制方針が確立していない“アンチセンス核酸医薬品の開発にあたって配慮すべきポイント”をまとめる上での基礎資料が得られるとともに、それらポイントの中で安全性評価における最重要課題である“オフターゲット効果評価法”を提案する上でキーとなるデータが得られた。
- (4) タンパク質の安定性の評価:  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。今後 NMR 緩和時間と保存安定性との関連が明らかになり、実時間で保存に比べ、短時間で安定性評価が可能な評価法の開発に結びつける予定である。
- (5) 遺伝子治療用医薬品の評価: 本研究の成果は、現在実施している遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等に活用する予定である。

以上、最終年度、各課題の目的を達成する上で有用かつ重要なデータおよび資料が得られた。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文および総説

#### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto, T. Fujimaki, Y., Takada, Y., Aida, K., Terahara, T., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging. *J Pharm Biomed Anal* **74**, 14-21 (2013)
- 2) Koide, T., Nagato, T., Kanou, Y., Matsui, K., Natsuyama, S., Kawanishi, T.: Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation, *Int J Pharm* **441**, 135-145 (2013)
- 3) Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Randolph, T. W., Impact of heat treatment on miscibility of proteins and disaccharides in frozen solutions., *Eur J Pharm Biopharm.* **85**, 177-183 (2013)
- 4) Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H.: Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids, *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1171-1180 (2014)
- 5) Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y.: Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the intracellular fate of encapsulated doxorubicin, *Mol Pharmaceutics* **11**, 160-167 (2014)
- 6) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H.: Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their



- components, *Biomaterials*. **35**, 1347-1358 (2014)
- 7) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Yamaguchi, T., Okuda, H., Kawanishi, T.: High performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* **5**, 5899-5902 (2013)
- 8) 川西徹: 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, 衛研報 **131**, 2-6 (2013)
- 9) 川西徹, 清原孝雄, 檜山行雄, 津田重城: 今後の日本薬局方の新しい流れ, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **44** 790-801. (2013)
- 10) 加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹: ブロック共重合体ミセル医薬品の評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **44**, 968-975 (2013)
- 11) 加藤くみ子: DDS製剤開発の活性化と実現に向けた取り組みについて 薬剤学 **73**, 187-188 (2013)
- 12) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ: 抗体医薬の分子設計 薬剤学 **74**, 1-8 (2014)
- 13) 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: 第4章 ヒト初回投与量設定方法 第2節 バイオ医薬品, 新薬開発にむけた臨床試験(第1相臨床試験)での適切な投与量設定と有効性/安全性評価, pp72-86 サイエンス&テクノロジー出版, 東京 (2013)
- 14) 井上貴雄: 抗体医薬の動向 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス **45** (in press)
- 15) 阿曾幸男: 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 公衆衛生 **72**, 125-129 (2014)
- 16) 内田恵理子: 遺伝子治療薬, バイオ医薬品 西島正弘, 川崎ナナ編, pp235-244, 化学同人, 京都(2013)

## 2. 学会発表 講演

- 1) 加藤くみ子 「ブロック共重合体ミセル医薬品に関する欧州医薬品庁(EMA)との共同文書作成」第10回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム 2014年1月16日(東京)
- 2) 加藤くみ子「リポソーム製剤の評価手法について」ナノ製剤技術研究会 2013年10月4日(京都)
- 3) 加藤くみ子「DDS製剤キャリアの動態とトランスポーター」第29回日本DDS学会学術集会 2013年7月5日(京都)
- 4) 加藤くみ子「ナノテクノロジーの医薬品開発への応用」第50回薬剤学懇談会研究討論会 2013年6月28日(札幌)
- 5) Kumiko Sakai-Kato "Current Initiatives relevant to Nanomedicines in Japan" The European Summit for clinical nanomedicines 2013 2013年6月25日(Basel)
- 6) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 次世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会第134年会シンポジウム 2014年3月 熊本
- 7) 井上貴雄:「核酸医薬開発の動向と課題」, 医薬基盤研究所講演会(2013.12)(大阪)
- 8) 井上貴雄:「核酸医薬品の現状と課題(総論)」, ライフサイエンス技術部会 材料分科会講演会(核酸医薬研究の最前線 ~有機合成からのアプローチ~)(2013.11)(東京)
- 9) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の動向と課題」, 第144回ヒューマンサイエンスエキスパート研修会(核酸医薬品開発を巡る国際的展望と期待 -核酸医薬は新薬開発の突破口となるか-)(2013.10)(東京)

## 学会発表

- 1) 加藤くみ子, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広 リポソーム及び内包薬物の細胞内動態に関する研究 第22回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京(2013.9.15)
- 2) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏: リポソーム

に内封されたドキシソルピシンの細胞内動態に及ぼすリポソーム構成脂質の影響,第29回日本DDS学会,京都,2013年7月

- 3) 運 敬太,加藤くみ子,奥田晴宏:リポソーム中のポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質の細胞内動態特性評価,日本薬剤学会第28会,名古屋,2013年5月
- 4) 加藤くみ子,日高征幸,運敬太,川西徹,奥田晴宏“シリカ粒子,酸化チタンの物理的・化学的特性とin vitro腸管吸収モデルによる細胞透過性との関連性について”日本薬剤学会第28年会 平成25年5月25日
- 5) 吉田徳幸,内田恵理子,小比賀聡,佐藤陽治,井上貴雄:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」,日本薬学会第134年会(2014.3)(熊本)
- 6) 吉田徳幸,内田恵理子,小比賀聡,佐藤陽治,井上貴雄:「核酸医薬品のオフターゲット効果に関する基盤研究」,第11回アンチセンスシンポジウム(2013.11)(徳島)
- 7) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato:「In Silico Analysis of Off-target Effects of Oligonucleotide Therapeutics」,9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society(2013.10)(Naples)
- 8) 吉田徳幸,井上貴雄,内田恵理子,小比賀聡,佐藤陽治:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」,第5回日本RNAi研究会(2013.8)(広島)
- 9) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の現状と課題およびガイドライン策定に向けた取り組み」,ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査WG会議(2013.7)(東京)

## 2. 実用新案登録

なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

分担研究報告書

革新的医薬品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究  
ナノDDS製剤

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 室長

研究要旨

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評価法について調査、考察し、「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」の解説論文に反映した。さらに、評価手法の中でも、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 製剤の臨床上の有効性及び安全性に影響する重要なファクターである。そこで、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノ DDS 製剤の血液適合性試験、つまり補体系活性化試験、赤血球との相互作用（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最適化し、確立した。

研究協力者

吉澤靖貴

桜井真理

A. 研究目的

標的指向性の向上により標的部位に医薬品を選択的に送達することで、副作用の低減、有効性の向上をコンセプトとした画期的医薬品の開発が進展している。脂質、合成高分子等の自己組織化を有効成分の内包、放出制御に利用する微細加工技術（ナノテクノロジー）はその代表例である。様々な素材を用いた原薬や製剤の開発は、高機能化・複雑化しており、2010年以降、ナノテクノロジーに関連した規制の適応範囲や製品毎の評価に関する規制文書が欧米規制当局を中心に発出されている。我が国においてもナノテクノロジーを応用した高機能なナノ DDS 製剤開発が急速に進展している状況下、規制の適応範囲や評価法の

妥当性を検証する、あるいは裏打ちするための研究が必要である。

最先端のバイオテクノロジーやナノテクノロジーを用い、様々な素材を利用した複雑な構造を有するナノ DDS 製剤においては、これらの新素材が生体に投与された際に、血液成分や細胞など生体を構成する要素に接触する。このようなタンパク質や細胞との相互作用は、細網内皮系による取り込み、血中滞留性、ミセルの構造安定性（つまり有効成分の放出性）、標的細胞への取り込みなど、ナノ DDS 製剤の有効性や安全性に影響し得るため、*in vitro*、*in vivo* におけるタンパク質や細胞との相互作用評価は、重要品質特性の特定、ナノ DDS 製剤の薬物動態や薬理作用、安全性を

考察する上で重要である(図1)。そこで本年度は、ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤等の静脈注射ナノ DDS 製剤について in vivo におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する評価法について調査、考察した。

さらに、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として欧米で議論が活発となっている、ナノ DDS 製剤の血液適合性試験、つまり補体系活性化試験、赤血球との相互作用(溶血性試験)、及び血漿成分への影響(血液凝固試験)に着目し、リポソーム製剤を対象に最適化し、確立した。

## B. 研究方法

(1) ナノ DDS 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評価法に関する調査研究

評価手法に関しては、科学的な論文を中心に調査した。また、EMA や FDA から発出されているガイドライン等を参考に、タンパク質、細胞との相互作用が有効性や安全性に与える影響について考察した。

(2) ナノ DDS 製剤の血液適合性に関する研究

(2-1) リポソームの調製

実験で用いる中性リポソームは、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)及び Cholesterol (Chol)を物質量比で 1:1 で混合し、脂質薄膜法を用いて作製した。カチオン性リポソームは 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)及び Chol を物質量比で 1:1 で混合し、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。

(2-2) 補体活性化測定

MicroVue iC3b ELISAkit, SC5b-9 ELISA kit, ヒト血清, HAGG(Heat Aggregated Gamma Globin), ZymosanA は QUIDEL 社製を用いた。

ヒト血清と脂質濃度 10mg/mL に希釈したりポソームを 1:1 の割合(7 $\mu$ L:7 $\mu$ L)でヒト血清と混合させ、37 $^{\circ}$ C の湯浴に 15min インキュベートした。インキュベート後のサンプルを 10mM EDTA を添加した ELISA キット付属の Specimen Diluent で適宜希釈をし、生成した補体活性化産物 iC3b または SC5-9 の生成量を ELISA メーカー提供のプロトコールに従い測定した。プレートリーダー(Abs450nm を使用)は BioRad 社製を用いた。

(2-3) 溶血性試験法

ウサギ脱繊維血はコージンバイオ社製を、ヘモグロビン B-テストワコーは和光純薬社製を、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)は Sigma 社製を用いた。

ウサギ脱繊維血に PBS を加え 800 $\times$ g で遠心分離し赤血球を洗浄した。これを溶血が見られなくなるまで繰り返した後、上清をブランク用に回収し、沈殿した赤血球はヘモグロビン B-テストワコーによりヘモグロビン量を定量した。ヘモグロビン量が 10mg/mL になるよう PBS で希釈し、回収した上清も PBS で同倍希釈した。各種コントロール用試薬およびリポソームサンプルを 2, 0.4, 0.08mg/mL の 3 濃度になるように PBS で希釈し、1.5mL チューブに希釈した各コントロール用試薬、およびリポソームサンプルを 10 $\mu$ L ずつ入れた。この上から、ヘモグロビン量を調製した脱繊維血および上清を各 90 $\mu$ L 添加した。37 $^{\circ}$ C の湯浴で 4 時間インキュベート後、サンプルを 800 $\times$ g で 5min 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(Abs570nm)。

(2-4) 血液凝固試験法

血液凝固試験用標準ヒト血漿, PT 測定試薬「デイドイノピン」、及び APTT 測定試薬「アクチン FSL」はシスメックス社製を用いた。

血液凝固試験用標準ヒト血漿を超純水 1mL で溶解した。希釈したヒト血漿を、リポソーム、ポジティブコントロールである抗凝固剤 (EDTA / PBS) , 及びコントロール(ベースライン)である PBS と、それぞれ 162 $\mu$ L:8 $\mu$ L の比率となるように混合し 37 °C で 30min インキュベートした。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。

#### (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、領布品であるため、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。遺伝子組み換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号) 及びこれに基づく当研究所の規則に従い、研究内容につき各研究機関の承認を得て遂行する。さらに動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、動物実験委員会に研究計画を申請し、承認を得た後に行うと共に、動物愛護の精神に則って、実験を遂行する。

### C. 研究結果

#### (1) ナノ DDS 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評価法に関する調査研究

ナノ DDS 製剤の体内動態や薬効、及び安全性に影響を及ぼす生体内のタンパク質や細胞との相互作用は、多くの場合、ナノ DDS 製剤の表面で起こる。重量当たりの表面積は粒子径が小さくなると急激に増大するため、バルク固体と比べ、その相互作用の頻度も増大すると考えられる。し

たがって、ナノ医薬品を設計する際は、安定性に優れ、生体内に投与後はより好ましい薬物動態特性、薬効、及び安全性を示すよう、ナノ医薬品の表面物性の制御が重要になる。具体的には、キャリア組成を工夫する、PEG など親水性ポリマーで表面を被覆する、等の製剤設計により

血漿タンパク質との非特異的相互作用の制御、細網内皮系による認識・クリアランスの回避、ナノ医薬品の血中滞留性の向上、血液適合性(溶血性、凝固系、補体系等への影響)の向上、免疫原性の抑制、標的細胞内への取り込み促進

等の効果が期待される。

本研究では、ナノ DDS 製剤の生体内タンパク質、細胞との相互作用の具体的評価法を科学論文より調査した。直接的な相互作用の評価手法と間接的な相互作用の評価手法に便宜上分類し、以下に調査結果を記す。ただし、これらは事例であり、他にも適切な評価手法があるかもしれない。

#### 直接、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法

- タンパク結合率、血球分配率(in vitro 試験)：低分子化学合成品では、薬物代謝評価のために一般的に行われている試験である。ナノ DDS 製剤またはそのキャリア成分と血液タンパク質との結合理型、非結合理型の分離(ゲル濾過法や平衡透析法などによる)が困難である場合や、キャリア成分の全血中濃度、血漿中濃度測定が困難である場合も想定される。しかし、低分子化学合成品で汎用されている手法等を利用し、ナノ DDS 製剤のタンパク質結合率や血球分配率を求めることが可能であれば測定を行うことが好ましいと考える。
- 血液適合性試験 (in vitro)：溶血性試験(赤血球との相互作用)や、血液凝固(血漿成分への影響)、補体系への影響を調べる試験等がある。
- ゲル電気泳動と質量分析法 (in vitro)：ナノ DDS 製剤と相互作用するタンパク質を同定するための手法として有効である。

間接的に、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法

- a) 動的光散乱(in vitro): タンパク質との相互作用によるサイズの変化を追跡し, ナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる. ただし, 血液など多成分のタンパク質が混在する溶液中では一般的に適さない.
- b) 静的光散乱(in vitro): 散乱光の角度分布を測定することによって, 粒子の大きさ, 分子量, 粒子の形状, 粒子間相互作用などについて情報を得ることが可能であるため, ナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる.
- c) 蛍光色素標識化(in vitro, in vivo): キャリア成分や有効成分を蛍光標識化し, 消光現象や蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用することにより, タンパク質や細胞との相互作用によるナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる. ただし, 蛍光色素による標識の安定性に留意する必要がある.
- d) 同位体標識化(主として in vivo): キャリア成分や有効成分を標識化し, その動態を追跡することにより, タンパク質や細胞との相互作用による動態への影響を考察することが可能となる. ただし, ナノ DDS 製剤の構造安定性に関する情報を得る手法としては一般的には適さない.

さらに, 血中における遊離有効成分濃度と有効成分の総濃度, また組織あるいは臓器中における有効成分の総濃度に基づき, in vivo でのナノ DDS 製剤の挙動を考察することも生体でのタンパク質や細胞との相互作用を間接的に評価する上で有効であると考えられる. in vitro における薬物放出試験も in vivo の安定性を評価する上で重要な情報を与える. 血漿を用いるのが, 最も in vivo を反映した試験法と言えるが, 血漿中で測定できない場合は, アルブミンを含有した緩衝液など適切な「関連媒体」を用いることが必要であろう.

ナノ DDS 製剤の細胞, タンパク質との相互作用の重要性については, 特に安全性の観点から欧

米規制当局の文書にも言及されている. 例えば, EMA のリポソーム製剤に関するリフレクションペーパーでは, リポソーム製剤の補体活性化の測定について言及されている<sup>1)</sup>. すでに臨床応用されているリポソーム製剤<sup>2)</sup>や鉄ナノ粒子製剤<sup>3)</sup>では, 安全性に関わる課題として, インフュージョンリアクション(輸注反応)がしばしば問題となることがある. 一般にインフュージョンリアクションとは, 薬剤投与中又は投与開始後 24 時間以内に発現する紅潮, 息切れ, 顔のむくみ, 頭痛, 悪寒, 血圧低下などの症状の総称である. 24 時間以降, または 2 回目の投与以降に発現することもある. インフュージョンリアクションが生じるメカニズムについてはまだ十分に分かっていないが, リポソーム製剤においては, 補体成分の活性化が主要誘因であることが示唆されており<sup>2)</sup>, 補体活性化により生成した補体分解産物による肥満細胞や好塩基球の脱顆粒や血管透過性の亢進, 平滑筋収縮などがアレルギー様症状を引き起こし, 補体活性化の程度が大きいほど偽アレルギー反応のリスクが高まると考えられている. Szebeni らは, これを, C-activation-related pseudoallergy (CARPA) と呼ばれる反応であるとしている<sup>4)</sup>. 欧州では, 補体成分の活性化を誘起しやすいリポソーム製剤の物理的・化学的特性に関する研究が進んでいる. これまで報告されている要因を表 1 にまとめた EMA のリフレクションペーパーには, 有害事象の可能性の程度を評価するために in vitro と in vivo の試験, 例えば, 補体(あるいはマクロファージや好塩基球)の活性化測定や, ブタなど感度の高い動物モデルを用い投与後の肺動脈圧の上昇をモニターする手法等を, 必要に応じて考慮すべきである, との記載がある.<sup>1)</sup>

一方, FDA のリポソームに関するドラフトガイドラインには, 「リポソームと血清タンパク質及びリポタンパク質の相互作用は, リポソーム製剤に使用する脂質の種類に依存するため, 原薬及びリポソーム製剤のタンパク結合率(リポタンパク

質を含む)の測定や主要結合タンパク質の同定を行うこと」との記載がある<sup>5)</sup>。ナノ医薬品の in vivo 安定性は、リポタンパク質をはじめ血中タンパク質との相互作用により影響を受ける可能性がある。リポソーム製剤などのキャリア型ナノ医薬品から有効成分が早期放出された結果として投与量が予定以上に放出された場合、そのような相互作用は安全上の意味合いを有する。

このように、製剤設計の早期段階からナノ医薬品の細胞やタンパク質との相互作用に関する情報を得て、これをコントロールするための表面物性の制御が重要な課題となる。

2013年にEMAより、ナノ医薬品の表面被覆に関するリフレクションペーパーが発出された<sup>6)</sup>。本文書は、非経口投与型のナノ医薬品の開発にあたり、ナノ医薬品の表面被覆について留意すべき点に焦点をあてた文書である。製剤の体内分布、細胞内動態への影響から、

ナノ医薬品表面への PEG 等による被覆の均一性や被覆の安定性

受容体のリガンドや抗体などナノ医薬品に標的性を付与するための表面修飾分子の配向性が、有効性や安全性の観点から特に重要な特性であるとしている。具体的な製剤特性評価における留意点としては、上記に関連して、組成を含む被覆素材の解析、被覆素材を結合するリンカー部分の化学の明確化、被覆の安定性(保存時の安定性及び使用時の安定性)を指摘している。また、上記に関連して、ナノ医薬品の表面に存在する表面修飾分子の配向性やコンフォーメーションに留意すべきことが記されている。本リフレクションペーパーは、表面被覆のみに焦点を当てた文書であり、ナノ医薬品の開発において表面物性の重要性が窺い知れる。

本年発出された「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」<sup>7)</sup>にも、ブロック共重合体ミセル製剤の薬物動態学的特性は、ブ

ック共重合体ミセルと血漿、血清タンパク質又は血液細胞との相互作用により変化し得ること、また、ナノ DDS 製剤の体内分布、安定性及び安全性に影響する可能性があることが知られているため、静脈内に投与したブロック共重合体ミセルのタンパク質及び細胞との相互作用について考察することが重要であることが記載された。さらに、本研究で調査した具体的な相互作用に関する評価手法を、本リフレクションペーパーの解説論文に反映した<sup>8)</sup>。

## (2)ナノ DDS 製剤の血液適合性に関する研究

本研究では、ナノ DDS 製剤の臨床上で安全性において留意すべき事項として、血液適合性に着目した。血液適合性(Hemocompatibility)試験は医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスに掲載されており、製品に生体に接触する部分が存在する場合、血中の細胞やタンパク質にさらされることにより生じる有害作用についての非臨床試験の一つである<sup>9)</sup>。血液適合性試験は、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目に分類される。血液学的項目では主に赤血球や白血球との相互作用を評価し、代表的な標準評価項目として全血算と溶血が挙げられている。また、補体系に関する標準的な試験項目としては、可溶性の補体分解産物(C3a, C5a, SC5b-9など)の一つ又は複数を用いた補体活性の評価が記載されている。

本研究では、ナノ DDS 製剤で重要と思われる以下の3つの項目について、リポソーム製剤を対象として評価手法を確立した。

### (2-1) 補体系活性化測定法

リポソーム製剤を対象として、補体系活性化測定法を検討した。図2に補体系活性化メカニズムを示す。補体の主な成分はC1~C9で表され、C1は3つのフラグメント(C1q, C1r, C1s)、その他は補体系が活性化される過程で2つ以上のフラグメントになるものがある(C3a, C3bなど)。補体

活性化の経路として、3種類(古典経路,第2(副)経路,レクチン経路)が知られており、いずれの経路もC3がC3aとC3bに分解される。更に、C3bはC5のC5aとC5bの分解に寄与し、最終的にC5b6789(C5b-9)が生成される。最終産物であるC5b-9は膜傷害(溶血や細胞傷害)作用を有することが知られている<sup>9)</sup>。医療機器のガイドラインには「生理作用や検出が容易なことから、可溶性のフラグメント(C3a, C5a, SC5b-9など)の一つ又は複数を用いて補体活性の評価が行われている」との記載がある<sup>9)</sup>。そこで、医療機器の血液適合性試験において測定例として例示されている補体活性化産物(C3a, C5a)についてELISA法で測定することとしたが、C3a及びよりC5aは不安定であり、ヒト血清中濃度を測定することができなかった。そこで、SC5b-9、及びより定量的な測定が可能であるとの報告<sup>10)</sup>を参考にC3bの分解物であるiC3bをELISA法で測定することとした。補体活性化産物を測定するに当たり、検体であるリポソーム製剤と混合するヒト血漿は、できるだけ新鮮であることが求められる<sup>10)</sup>。しかし、製剤設計の段階で本法を用いるためには、新鮮なヒト血清を毎回得ることは難しい場合があることから、市販の補体活性化産物測定用のコントロール血清を用いることとした。また、ポジティブコントロールとしては、HAGG(Heat Aggregated Gamma Globin)、ZymosanAを用い、いずれの補体活性化産物においてもコントロール血清との混合により、iC3b, SC5b-9の増加を検出することができ、検量線は良好な直線性を得た。またpositive control(HAGG)を用いたiC3bとSC5b-9測定の日内再現性はそれぞれ、RSD=9.77, 3.73%以下(n=3)であった。

#### (2-2) 溶血性試験法

血液溶血性試験には、第1法:溶血によるヘモグロビンの吸収極大波長(540 or 576nm)にて定量する方法、第2法:ヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンに変換しその吸光度から溶出率を算

出する方法の2法が報告されている<sup>9)</sup>が、シアン化合物の不必要な使用を避ける目的から、第1法を用い、リポソーム製剤において最適化することとした。

ポジティブコントロールとして、一般的に用いられているTriton-X(final conc 1%)を用い、この溶血率を100%とすることとした。カチオン性の物質は溶血性を有することが知られているが、今回いずれの濃度でも中性リポソームであるDOPCリポソームよりカチオン性リポソームDOTAPで溶血率が大きい結果となり、本法の妥当性を示している。その結果を、図3に示す。繰り返し再現性はいずれのリポソームも0.2mg/mLの際に、0.94%以下と良好であった。測定濃度により溶血率は異なるため、実際の投与量等を考慮し、複数濃度で測定する必要があるであろう。また、インキュベーション時間によっても溶血率は異なるため、時間依存性を確認することも重要である。1点でおこなう場合は4時間とした<sup>9)</sup>。

#### (2-3) 血液凝固試験法

ナノDDS製剤が血液凝固因子と相互作用することにより血液凝固システムに影響を及ぼすことは安全性の面で懸念事項である。本血液凝固試験法は、ナノ粒子製剤が血漿の凝集時間に与える影響を評価する方法である。

血液凝固、すなわち凝固反応は数多くの因子が関与する複雑な過程を経るが、凝固には図4に示すように主に3つの経路が関与している。つまり内因性のもの(接触活性化経路としても知られており、表面への損傷により活性化される)、外因性のもの(組織因子経路としても知られている)。

最終共通経路:それぞれの経路はそれに特化した方法によって評価する。活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)試験は内因性経路の評価に用いる。プロトロンビン時間(PT)試験は外因性経路の計測に用いる。トロンビン時間(TT)は最終共通経路の機能性の指標となる。いずれの経路も多



くの凝固因子が関与し、いくつかは経路で共通して機能している。血液凝固試験法の原理は、加温下血漿に検体を加え凝固計により凝固時間を測定し、主として凝固時間の延長を測定することで、血漿成分中の凝固因子と検体との相互作用を調べる手法である。本研究では、評価項目として汎用される AP, APTT 時間を測定することとした。

凝固計による凝固時間測定前の試料調製法については、米国 Nanotechnology Characterization Laboratory(NCL)より提案されている手法である“Coagulation Assays”<sup>11)</sup>を参考にプロトコールを作成した。PBS をコントロール(ベースライン)、凝固阻害剤として知られている EDTA をポジティブコントロールとし、凝固時間を測定し試験法の妥当性を評価した。AP 時間の PBS, EDTA(1mg/mL)の RSD は 2.88, 0.38% (n=3) と繰り返し再現性は良好であった。また APTT 時間の PBS, EDTA の RSD は 0.50, 0.32% (n=3) と繰り返し再現性は良好であった。DOPC リポソーム製剤では、コントロールである PBS と同等の値を示した。実際の投与量等を考慮し、実試料の凝固時間を複数濃度で測定し、PBS 及び EDTA の凝固時間と比較し、血液凝固への影響を判断することとした。

#### D. 考察

DDS 製剤の開発においては、最先端のバイオテクノロジーやナノテクノロジーを用い、様々な素材を利用した複雑な構造を有する医薬品の開発が進められている。また、医療デバイスとの融合製品の開発も活発である。これらの新素材が生体に投与された際に、血液成分や細胞など生体を構成する要素に直接接触して利用されるため、生体反応、特に免疫学的反応に関わる評価が安全性の観点からも重要であろう。静脈血中にナノ DDS 製剤が投与された際の赤血球や補体成分との相互作用評価の必要性については受け入れられつつあり、また製剤の特性によっては血液凝固への

影響についても懸念されている<sup>12)</sup>。これらを *in vitro* で評価する試験について欧米での議論は進んでいるが、我が国では十分とは言えない。そこで、本研究では、補体系活性化試験、赤血球との相互作用(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最適化し、確立した。これらは、我が国における医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスでは、血液適合性試験とよばれる試験に該当するものである。本研究では、ポジティブコントロールや前処理法、サンプルであるリポソームの濃度依存性等を検討し最適化した。安全性に関わる *in vitro* 試験開発の目的は、開発中のナノ DDS 製剤を *in vivo* 投与した際に生じ得る急性の毒性反応を迅速に評価することである。したがって、製剤設計の早期段階からこれらの *in vitro* 評価を行うことが可能なよう、市販のコントロール血清を用いるなど、試験の利便性にも配慮し評価法を確立した。

今後は、さらに、本試験法を用いて品質特性との相関に関する知見を蓄積するとともに、*in vitro* 試験の結果と *in vivo* における安全性との相関性についてさらに調査研究を進め知見を蓄積する必要があると思われる。

#### E. 結論

ナノ DDS 製剤のタンパク質や細胞との相互作用は、細網内皮系による取り込み、血中滞留性、ナノ DDS 製剤の構造安定性(つまり有効成分の放出性)、標的細胞への取り込みなど、有効性や安全性に影響するため、*in vitro*、*in vivo* におけるタンパク質や細胞との相互作用評価は、重要品質特性の特定、ナノ DDS 製剤の薬物動態や薬理作用を考察する上で重要である。本研究では、直接的、及び間接的なこれら相互作用の評価手法についてまとめた。

さらに、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノ DDS 製剤の血液適合性試

験,つまり補体系活性化試験,赤血球との相互作用(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最適化し,確立した.

## 謝辞

厚生労働省及び国立医薬品食品衛生研究所が事務局となり設置された検討会「ナノ医薬品に関する勉強会」において,ブロック共重合体ミセル医薬品評価に関し技術的な御助言を賜りました勉強会委員の先生方に深謝致します.

## 参考文献

- 1) Reflection paper on data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product, European Medicines Agency, 2013
- 2) J.Szebeni, Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions, Eur. J. Nanomed. 1, 33-53, (2012)
- 3) New recommendations to manage risk of allergic reactions with intravenous iron-containing medicines, European Medicines Agency, 2013
- 4) J. Szebeni, Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity, Toxicology 216, 106-121.(2005)
- 5) Draft Guidance for Industry, Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, US Food and Drug Administration, 2002
- 6) Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products, European Medicines Agency, 2013

- 7) 「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の公開等について」平成26年1月10日付 薬食審査発0110第1号
- 8) 加藤くみ子,中西健,小崎雅人,松田嘉弘,平野舞,花田博幸,久田茂,小野寺博志,西山伸宏,原島秀吉,松村保広,片岡一則,奥田晴宏,川西徹“ブロック共重合体ミセル医薬品の評価”医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44(12),968-975(2013)
- 9) 医療機器の製造販売承認申請等に必要なる生物学的安全性評価の基本的考え方について平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号
- 10) NCL Method ITA-5.2, Quantitative Analysis of Complement Activation, Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute-Frederick, 2010
- 11) NCL Method ITA-12, Coagulation Assays, Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute-Frederick, 2011
- 12) M.A., Dobrovolskaia, S.E., McNeil, Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines, J. Control. Release 172, 456-466 (2013)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H. “Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids”. Biochim Biophys Acta. 1840,1171-1180 (2014)
- (2) Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the

intracellular fate of encapsulated doxorubicin"  
Mol Pharm. 11, 560-567 (2014)

- (3) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusahara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H., "Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components" *Biomaterials* 35, 1347-1358 (2014)
- (4) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Yamaguchi, T., Okuda, H., Kawanishi, T., "High performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles." *Analytical Methods* 5, 5899-5902, 2013.
- (5) 加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹 "ブロック共重合体ミセル医薬品の評価" *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 44 (12), 968-975 (2013)
- (6) 加藤くみ子 "DDS 製剤開発の活性化と実現に向けた取り組みについて" *薬剤学* 73(3), 187-188, 2013

## 2. 学会発表・講演

### 講演

- (1) 加藤くみ子 「ブロック共重合体ミセル医薬品に関する欧州医薬品庁 (EMA) との共同文書作成」 第 10 回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム 2014 年 1 月 16 日(東京)
- (2) 加藤くみ子「リポソーム製剤の評価手法について」 ナノ製剤技術研究会 2013 年 10 月 4 日 (京都)
- (3) 加藤くみ子「DDS 製剤キャリアの動態とトランスポーター」 第 29 回日本 DDS 学会学術集会 2013 年 7 月 5 日 (京都)

- (4) 加藤 くみ子「ナノテクノロジーの医薬品開発への応用」 第 50 回薬剤学懇談会研究討論会 2013 年 6 月 28 日 (札幌)
- (5) Kumiko Sakai-Kato "Current Initiatives relevant to Nanomedicines in Japan" The European Summit for clinical nanomedicines 2013 2013 年 6 月 25 日 (Basel)

### 学会発表

- (1) 加藤くみ子, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広 リポソーム及び内包薬物の細胞内動態に関する研究 第 22 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 東京 (2013.9.15)
- (2) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏: リポソームに内封されたドキソルビシンの細胞内動態に及ぼすリポソーム構成脂質の影響, 第 29 回日本 DDS 学会, 京都, 2013 年 7 月
- (3) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏: リポソーム中のポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質の細胞内動態特性評価, 日本薬剤学会第 28 会, 名古屋, 2013 年 5 月
- (4) 加藤くみ子, 日高征幸, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏 "シリカ粒子, 酸化チタンの物理的・化学的特性と in vitro 腸管吸収モデルによる細胞透過性との関連性について" 日本薬剤学会第 28 年会 平成 25 年 5 月 25 日

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 リポソーム製剤の補体活性化のリスクを高めることが報告されている主な要因\*

- ・正あるいは負の表面電荷
- ・サイズの増加
- ・不均質性
- ・凝集体の存在
- ・リポソーム外に有効成分が存在すること (特にドキソルビシンや類似薬)
- ・高い割合 (>50%) で膜中にコレステロールが存在すること
- ・不電荷のリン脂質にPEGが結合したリポソーム
- ・リポソーム表層のポリアミノ基修飾
- ・エンドトキシン<sup>\*\*</sup>の混入<sup>\*\*</sup>

\*参考文献2

\*\*エンドトキシン<sup>\*\*</sup>の混入はリポソーム自体の特性ではないが、製剤に起因する要因として記載した。

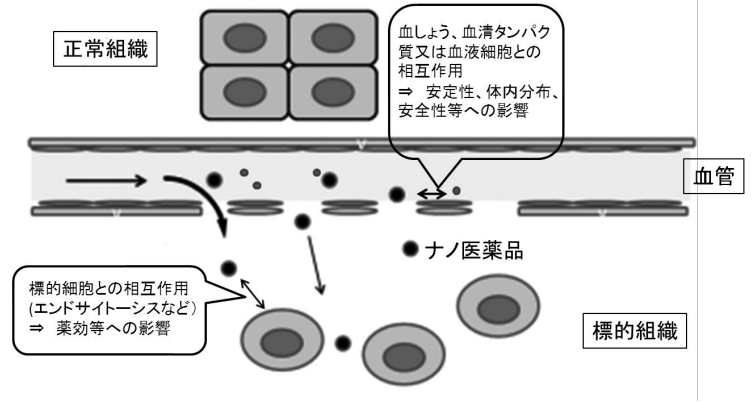


図1 ナノDDS製剤と細胞やタンパク質との相互作用に関する概念図

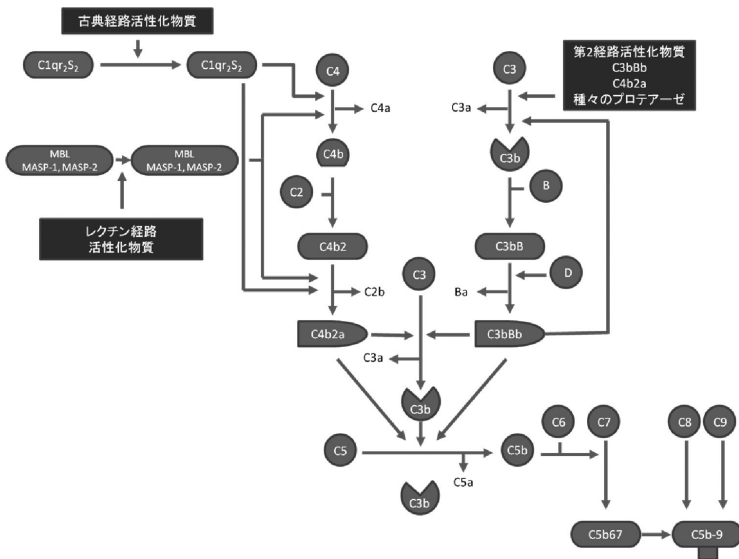


図2 補体系活性化経路の模式

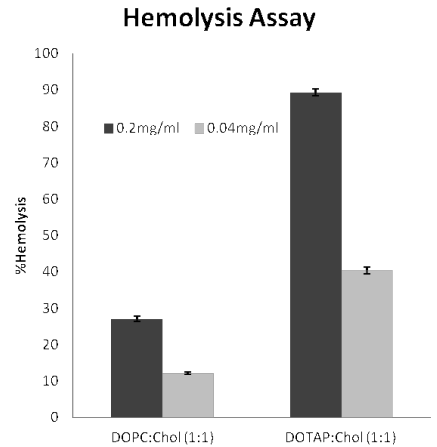


図3 中性リポソーム及びカチオン性リポソームの溶血率 (%)

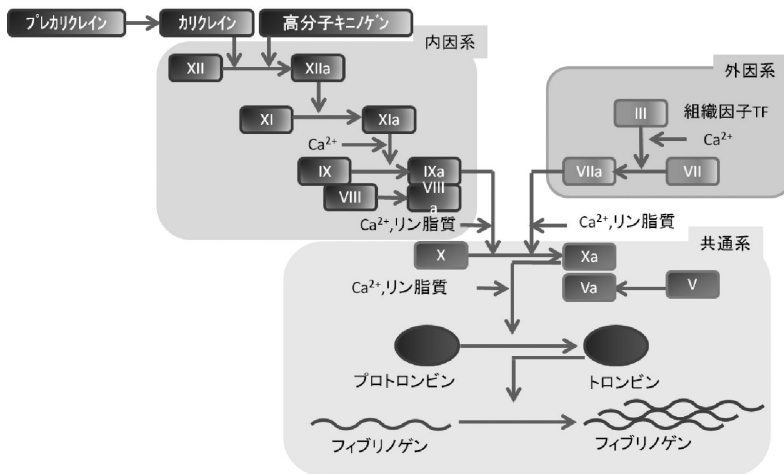


図4 血液凝固機構の模式図

改変タンパク質製剤（改変型抗体医薬品）の評価に関する RS 研究

研究分担者 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

**研究要旨** 改変型抗体医薬品に代表される改変タンパク質製剤は、高い標的特異性を持つ次世代医薬品として期待されている。その開発に際しては、治療効果はもとより、免疫原性等の安全性や、製剤の安定性等、様々な要素を考慮して分子設計を行うことが必要である。本邦でも様々な開発が進む改変型抗体医薬品の品質・有効性・安全性確保の要件を明らかにし、その開発環境整備を行うことを目的に、本年度は、改変型医薬品の分子設計について、薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程を考慮して、留意すべき事項をまとめた。また、Fc $\gamma$  受容体結合親和性プロファイリングに適した SPR 解析法構築し、改変型抗体医薬品の非臨床評価において課題となる Fc $\gamma$  受容体結合親和性の種差を解析した。

研究協力者

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第三室 室長

鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 第一室 主任研究官

**A. 研究目的**

マウスモノクローナル抗体作製技術の開発を端緒に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体と進化した抗体医薬品は、IgG サブクラス置換、アミノ酸置換、糖鎖改変、薬物修飾、低分子化、PEG 化等の分子設計技術の応用により、多様化している。抗体医薬品の開発では、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。

本研究では、改変型抗体医薬品の品質・有効

性・安全性確保の要件を明らかにし、その開発環境整備を行うことを目的に、本年度は、まず、IgG の構造と機能に基づき、抗体医薬品の薬理作用及び薬物動態に関する基本的な知見を整理した上で、改変型抗体医薬品の開発事例をもとに、分子設計において重要と考えられる事項を整理した。

また、抗体医薬品の有効性・安全性には、標的抗原との結合性に加え、免疫エフェクター細胞の活性化に関与する Fc $\gamma$  受容体が関わることをふまえ、抗体医薬品の非臨床試験に用いられるマウス及び非ヒト霊長類の Fc $\gamma$  受容体と抗体医薬品の結合性を解析し、非臨床試験結果のヒトへの外挿における留意点について考察した。

**B. 研究方法**

**B.1 抗体医薬品の体内動態及び分子設計に関する調査研究**

バイオ医薬品の製造と開発に関する考え方として、ICH Q11 ガイドラインに記載されている目標製品品質プロファイルや重要品質特性の考え方、ならびに、改変型抗体に関する学術文献をも

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。

## B.2 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による Fc 受容体結合親和性の解析

SPR 解析には Biacore T200 (GE ヘルスケア) 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 抗体 (GE ヘルスケア) を固定化した。His-tag 付加された Fc $\gamma$ R 細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Sino Biologicals) 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用いて結合親和性の解析を行った。

測定用緩衝液は HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% Surfactant P20), 再生用緩衝液は 10 mM glycine (pH1.5) を用いた。キャプチャー分子の濃度は 1  $\mu$ g/ml, 結合時間は 1 分, 流速は 10  $\mu$ l/min とした。アナライト結合, 解離, 再生の時間はそれぞれ 3 分, 5 分, 1 分とし, 流速は 30  $\mu$ l/min とした。解析には, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa についてそれぞれ, 1:1 binding model, steady state model, two state reaction model を適用し, 結合解離定数 ( $K_D$ ) を算出した。

(倫理面への配慮)

調査研究については検体を用いることがないため, 倫理面への配慮を必要としない。実験に用いたタンパク質等の試薬類は, 市販の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。

## C. 研究結果

### C.1 分子設計における要件

基礎研究あるいは医薬品開発を目的に作製されている改変型抗体医薬品の具体例を調査し, 開発目標となる適応疾患, 用法, 薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程等を考慮した分子設計における要件をまとめた。

#### C.1.1 IgG 及び抗体医薬品の構造と機能

##### C.1.1.1 IgG の構造と機能

IgG1 は, 2 本の H 鎖及び 2 本の L 鎖からなる分子量約 150,000 の糖タンパク質で, CH2 ドメインの Asn297 に N-結合型糖鎖付加部位が存在する。可変部の配列が各抗体により異なり, 可変部に含まれる相補性決定部 (CDR) が抗原結合に関わる。定常部は, 遺伝子多型による数個のアミノ酸残基の違いを除き, IgG サブクラスが同じ抗体に共通する配列である。可変部と定常部の間はヒンジ部と呼ばれ, H 鎖間のジスルフィド結合が位置する (図 1 A)。

ヒンジ部の一部, CH2, 及び CH3 ドメインからなる Fc ドメインは, Fc 受容体や補体との結合能を持ち, Fc 受容体の活性化による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性, 及び, 補体の活性化による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性に関与している (図 1 B-i)。

また, Fc ドメインは, IgG の輸送担体である新生児型 Fc 受容体 FcRn との結合能を持ち, FcRn によるリサイクリングあるいはトランスサイトosis に関与する (図 1 B-ii)。

##### C.1.1.2 抗体医薬品の骨格構造

図 2 に, IgG 型抗体, 低分子抗体, PK 改良型低分子抗体に分類して, 現在開発されている抗体医薬品の骨格を示した。

典型的な IgG 型抗体としてマウス抗体, キメラ抗体, ヒト化抗体, ヒト抗体があり, その他に, 二重特異性抗体, 抗体薬物複合体, 糖鎖改変抗体, アミノ酸配列改変抗体等の改変型抗体が開発されている。

低分子抗体として, 可変部と定常部 CL 及び CH1 ドメインからなる Fab の他, 可変部のみからなる scFv, 2 つの scFv が会合した diabody, 2 つの scFv をリンカーでつないだ tandem-scFv, 1 本鎖で抗原結合能を持つラマ由来抗体可変部 V<sub>HH</sub> などが開発されている。これら低分子抗体においても, キメラ化やヒト化等, 免疫原性を低減する改変が行われている。また, 低分子抗体では,

PEG 化や FcRn 結合性の付与等 , 血中半減期延長に寄与する修飾が行われることがあり , 図 2 では , これらを PK 改良型低分子抗体として示した .

### C.1.2 抗体医薬品の分子設計における要件

開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において重要と考えられる主な事項を図 3 にまとめた .

抗体医薬品の開発では , まず , 目的とする適応疾患に応じて抗原が選択され , ハイブリドーマやファージディスプレイライブラリー等のスクリーニングにより , 目的とする抗原への結合能を持つ抗体クローンが取得される . 得られた抗体クローンの中から , 抗原との結合親和性や特異性 , 及び , 抗原の生理機能への影響を評価して , 開発候補となるリード抗体が選択される .

めんえきげん

#### C.1.2.1 有効性・安全性

##### C.1.2.1.1 薬理作用

抗体医薬品の薬理作用は , 抗原との結合 , 及び , エフェクター活性に寄与する Fc $\gamma$  受容体や補体との結合に依存するため , これらの結合能を至適化するための改変が行われる . また , 目的とする薬理作用に応じ , 二重特異性抗体への改変や , 化学薬品による修飾等が行われることもある .

##### (1) 抗原結合の至適化

抗原結合には , 可変部の構造が関与する . リード抗体の抗原結合親和性が不十分な場合や , ヒト化に伴い親和性が低下した場合 , あるいは , 特異性の向上が必要となる場合 , CDR 及びその周辺のフレームワーク部のアミノ酸置換が行われる .

1 つの抗体が 2 種類の抗原に結合することで薬理作用の発揮が期待できる場合 , 1 つの抗体に 2 種類の可変部を持たせ , 二重特異性抗体とすることがある .

##### (2) エフェクター活性の至適化

ADCC 活性や CDC 活性等のエフェクター活性

には , Fc ドメインのアミノ酸配列及び糖鎖構造が関与している . 通例 , 細胞傷害活性を期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を増強 , 中和活性のみを期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を低減する方向で改変が行われる .

エフェクター活性を考慮した至適化において , まず , IgG サブクラスの選択が行われ , さらに , 必要に応じて , Fc 受容体や補体結合に関与するアミノ酸残基の改変が行われる . ヒト IgG には , IgG1~4 のサブクラスがあり , これまでに承認されている抗体医薬品の多くでは , IgG1 サブクラスが用いられているが , IgG2 , IgG4 , あるいは , IgG2 と 4 のキメラ定常領域が用いられている例がある . IgG4 はエフェクター活性が弱く , 特に補体活性化能が低い点の特徴で , 中和のみを目的とする抗体に選択される . IgG3 はエフェクター活性が強いという特徴を持つが , ヒンジ領域が長く分子間ジスルフィド結合の数が多いことや , 遺伝子多型が多いこと等が懸念され , これまでのところ , 抗体医薬品に使われている例はない .

糖鎖構造改変の例として , Asn297 に結合する N 結合型糖鎖において , フコシル化された糖鎖の含量を低減することで Fc RIII への結合親和性を上げ , ADCC 活性を増強する技術が開発されている . 抗 CCR4 抗体モガムリズマブがこの例である ( 表 1 ) .

##### (3) 化学薬品による修飾

抗腫瘍効果を期待する抗体医薬品では , 抗体と強力な細胞傷害作用を持つ薬物を共有結合させた抗体薬物複合体 ( ADC ) として開発されることがある . 細胞表面抗原に結合した ADC は , 抗原の細胞内移行に伴いエンドソームに移行し , 酸性化 , 酵素消化等により , 薬物が放出される . 薬物の放出性はリンカーの構造に依存するため , ADC の分子設計においてはリンカーの設計が重要である .

##### C.1.2.1.2 薬物動態

抗体医薬品は、それ自身が標的指向性を持っているため、薬物動態に関しては、血中滞留性や組織移行性が課題となる。抗体医薬品の体内動態には、有効成分の分子サイズ、荷電、及び、FcRn 結合性等が関与する。図 4 に、抗体医薬品の分子サイズと、組織毛細血管、リンパ管、及び、腎糸球体基底膜の細胞間隙の大きさを示した。皮下投与の際、低分子抗体は、毛細血管及びリンパ管から吸収される大きさで、IgG 型抗体はリンパ管から吸収される大きさである(図 5)。低分子抗体は、糸球体ろ過を受けるサイズであるため、消失には、糸球体ろ過の寄与が大きい(図 6)。IgG 型抗体は、糸球体ろ過されず、その消失には、細胞への非特異的取り込みに伴う分解、及び、標的介在性の薬物消失 (Target mediated drug disposition)、さらに、これらに対する FcRn の抑制効果が関与する(図 1B-ii)。

IgG 抗体では、Fc ドメインの改変による FcRn 結合親和性向上や、可変部の改変による抗原非結合型抗体のリサイクリング等を目的とした分子設計が行われる。低分子抗体では、主に、血中半減期延長のための分子設計が行われる。

#### (1) IgG 型抗体

IgG 型の抗体医薬品では、他のタンパク質医薬品と比較して血中滞留性はよいが、標的介在性の薬物消失等により、血中半減期が 2~5 日程度のものもある。また、一度、抗原に結合した抗体医薬品は、リサイクルされても、再度別の抗原に結合することはできず、生体内に存在しても機能を発揮できない。これらの課題を踏まえ、血中半減期の延長や、抗原の結合していない遊離型抗体をリサイクルさせるための分子設計が必要となる。

血中半減期の延長には、Fc ドメインのアミノ酸置換により、FcRn 結合親和性を上昇させる分子設計が行われており、動物実験では、野生型の 4 倍程度までの血中半減期の延長がみられている。遊離型抗体のリサイクリングには、細胞内エンドソームの酸性条件下で荷電状態が変わる His 残基

を CDR に導入する手法が開発されており、この手法を用いると、抗原抗体複合体が細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内で抗原が抗体から解離するため、遊離型抗体のみが FcRn によりリサイクルされる。これらの分子設計による体内動態改良は、投与量や投与頻度の低減につながり、慢性疾患治療用抗体で望まれる皮下投与製剤の開発可能性も高めるものと考えられる。

#### (2) 低分子抗体

IgG 型の抗体医薬品とは対照的に、Fc ドメインを持たない低分子抗体医薬品は、FcRn によるリサイクリングを受けず、また、糸球体ろ過により消失するため、半減期が数時間程度と短い。血中半減期を延長し、有効血中濃度を維持するための分子設計として、Fc ドメイン、あるいは、IgG に結合するペプチドと低分子抗体を融合することで、直接あるいは間接的に FcRn 結合性を付与する試みがなされている。また、FcRn には、IgG のみならず、アルブミンも結合するため、Fc に代わり、アルブミンを利用することも試みられている。

##### (2)-1 直接的 FcRn 結合性付与

低分子抗体-Fc 融合タンパク質として、scFv、あるいは、二重特異性 scFv と Fc の融合タンパク質等の作製が報告されており、scFv では 3.5 時間であった血中半減期が、scFv-Fc では 93 時間に延長された例もある。また、低分子抗体-アルブミン融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabody とアルブミンの融合タンパク質、また、diabody とアルブミンドメイン III 融合タンパク質等の分子設計の例がある。

##### (2)-2 間接的 FcRn 結合性付与

IgG 結合配列として、IgG 結合性を持つタンパク質である Protein A、Protein G、あるいは Protein L 由来のペプチド配列を低分子抗体に付与する方法が開発されており、低分子抗体-IgG 結



合性ペプチド融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabody と IgG 結合性ペプチドの融合タンパク質等が報告されている。IgG 上の Protein A 及び Protein G 結合部位は、FcRn 結合部位に近い場合、IgG の FcRn への結合を阻害しないペプチド配列を選択することが重要となる。ペプチドを利用する方法では、Fc ドメインやアルブミンとの融合タンパク質とする場合と比べ、分子量が大きくなるため、組織浸透性を保てる可能性が高くなると考えられる。

### (2)-3 その他

他のバイオ医薬品の血中半減期延長のために用いられている PEG 化は、低分子抗体医薬品にも応用されており、PEG 化された Fab 構造を持つセルトリズマブ ペゴルがその例である(表 1)。有効成分の構造を改変する手法の他、開発中の製品では、ポンプを用いて低分子抗体を持続注入する方法も用いられており、投与デバイスの工夫で有効血中濃度を維持する手法も含め、体内動態の制御には、様々な手法が考えられる。

#### C.1.2.1.3 免疫原性

投与された医薬品が免疫原性を示し、抗薬物抗体が産生されると、薬物の血中半減期への影響や、有効性の低下、免疫応答による有害作用発生につながる可能性がある。ヒトに対する免疫原性の程度は、臨床試験を実施しなければ分からないが、臨床試験段階で免疫原性の問題が生じると、開発の続行が危ぶまれるため、分子設計の段階で、免疫原性に寄与する構造についても考慮する必要がある。

免疫原性の回避について、今のところ定型化された手法はないが、分子設計に寄与する情報を得る方法として、抗原提示に関わる MHC クラス II 分子に結合するペプチド配列(T 細胞エピトープ)を推定することや、リード抗体選択に際し、ヒト T 細胞の活性化を指標とした *in vitro* アッセイ等が利用される。

#### C.1.2.2 製剤化

##### C.1.2.2.1 溶解性

これまでに承認されている抗体医薬品は、全て注射剤であり、投与経路は、抗腫瘍薬では点滴静注、免疫調節薬では皮下投与が多い(表 1)。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。

##### C.1.2.2.2 安定性

抗体医薬品製剤は、溶液製剤または凍結乾燥製剤で、通例、4 で保存される。有効期間の設定には、実時間実保存条件での安定性試験が必要であり、最終的な評価には長時間を要する。安定性の評価項目は、有効性・安全性に影響する品質特性となるが、製剤の保存中にもその含量が増加し得る凝集体は、免疫原性等、安全性への影響が懸念される不純物であるので、製剤の安定性を考える上で、特に注意が必要である。また、脱アミドや酸化等の化学的な修飾、高次構造変化等も有効性・安全性に影響する品質特性として、安定性の評価項目になることが想定される。安定性試験結果で問題が生じる事態を避けるため、分子設計の段階で、凝集体形成や化学修飾の懸念が少ないアミノ酸配列を選択することが望ましい。凝集体形成を起こしやすいアミノ酸配列を予測する方法が検討されており、これらに一致する配列を回避する等の分子設計が考えられる。

##### C.1.2.3 製造工程

IgG 骨格を持つ典型的な抗体医薬品の製造工程としては、プラットフォーム化された技術があり、分子設計の際に考慮すべきことは多くない。しかし、その他の改変抗体では、個別に対応すべき問題を考慮して、分子設計を行う必要がある。

代表的な例は二重特異性抗体である。抗原 A に結合する H 鎖, L 鎖, 抗原 B に結合する H 鎖, L 鎖からは, 10 通りの分子種が生じ得るため, 目的とする抗体の収率は低い。これを回避するため, 2 種類の H 鎖にそれぞれ鍵と鍵穴となるアミノ酸置換を施し, 目的とする H 鎖の会合を促進する方法や, L 鎖の共通化等の分子設計が行われている。

また, Fc ドメインを持たない低分子抗体の精製には, IgG 型抗体で汎用される Protein A カラムを用いることができないため, 別のアフィニティーカラムに結合させるためのアミノ酸配列が導入される例もある。培養上清中の安定性が悪い等, 大量生産に適さない抗体は, 除外すべきである。

## C.2 ヒト Fc 領域を持つ抗体医薬品の Fc<sub>γ</sub> 受容体結合の種差

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, Fc<sub>γ</sub> 受容体の活性化を介した作用が関与する。Fc<sub>γ</sub> 受容体の活性化は, 抗体依存性細胞傷害作用に関与し, 抗腫瘍作用を期待する抗体医薬品の薬理作用発現に寄与する一方で, インフュージョン反応の発現等の有害反応につながる可能性もあることから, 非臨床試験に用いる動物種の選択や, 非臨床試験結果のヒトへの外挿の際には, 抗体医薬品と標的抗原の結合のみならず, Fc<sub>γ</sub> 受容体結合に関する種差を考慮する必要がある。

### C.2.1 Fc<sub>γ</sub> 受容体ファミリー

表 2 に, ヒト, マウス, 非ヒト霊長類の Fc<sub>γ</sub> 受容体ファミリーの特徴をまとめた。ヒトでは 4 つの活性化型受容体 (Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RIIa, Fc<sub>γ</sub>RIIIa, Fc<sub>γ</sub>RIIIb) と 1 つの抑制性受容体 (Fc<sub>γ</sub>RIIb) が存在し, 抗腫瘍活性を目的とする抗体医薬品では

NK 細胞に発現する Fc<sub>γ</sub>RIIIa を介した ADCC 活性が主要な薬理メカニズムの一つとして知られている。最近では, マクロファージや好中球を介した抗体医薬品の細胞傷害活性の発揮における Fc<sub>γ</sub>RIIa および Fc<sub>γ</sub>RIIIb の関与が報告され, Fc<sub>γ</sub>RIIIa を含むこれら Fc<sub>γ</sub> 受容体への親和性を増強した抗体医薬品の開発が進展している。また炎症性サイトカインの中和など免疫系の抑制を目的とする抗体医薬品では抑制性受容体である Fc<sub>γ</sub>RIIb との親和性の向上も試みられている。

マウスには 3 つの活性化型 Fc<sub>γ</sub> 受容体 (Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RIII, Fc<sub>γ</sub>RIV) と一つの抑制性 Fc<sub>γ</sub> 受容体 (Fc<sub>γ</sub>RII) が存在する。マウス Fc<sub>γ</sub>RI はヒト Fc<sub>γ</sub>RI の相同タンパク質であり, 主な機能はヒト・マウスともに抗原提示細胞における抗原-抗体複合体の貪食である。マウス Fc<sub>γ</sub>RII は抑制性の受容体であり, 構造的にも機能的にもヒト Fc<sub>γ</sub>RIIb と類似している。

一方, マウスには, ヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa の直接的な相同タンパク質は存在しない。マウス Fc<sub>γ</sub>RIII は NK 細胞に発現する唯一の Fc<sub>γ</sub> 受容体であり, ヒト Fc<sub>γ</sub>RIIIa と同様に CD16 と命名されているが, 系統学的にはヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa と類似している。しかし, マウス Fc<sub>γ</sub>RIII の細胞内ドメインには ITAM 配列が存在しないため, 機能的な面では, 細胞内ドメインに ITAM 配列を持つヒト Fc<sub>γ</sub>RIIa と異なる可能性が考えられる。

マウスにはヒト Fc<sub>γ</sub>RIII と一次配列上約 60% の相同性を有する Fc<sub>γ</sub>RIV が存在するが, Fc<sub>γ</sub>RIII をはじめとするヒトの低親和性 Fc<sub>γ</sub> 受容体と比較して, 単量体の IgG に対する結合親和性が高いことや, IgE 受容体としても機能すること等の特徴があり, マウス Fc<sub>γ</sub>RIV は, ヒトのどの Fc<sub>γ</sub> 受容体とも異なる特性を有する受容体である。

非ヒト霊長類はヒトと同様の各種 Fc<sub>γ</sub> 受容体を有しており, カニクイザルの Fc<sub>γ</sub> 受容体はヒトとの間で Fc<sub>γ</sub>RI 90%, Fc<sub>γ</sub>RIIa 89%, Fc<sub>γ</sub>RIIb 92%,

Fc $\gamma$ RIIIa 91%と一次構造上、高い同一性を有している。一方で、カニクイザル Fc $\gamma$ RIIIa ではヒト Fc $\gamma$ RIIIa において IgG との結合に關与するとされるアミノ酸残基が異なっており、ヒト IgG に対する結合親和性が異なることが報告されている。さらにカニクイザル、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も大きな特徴の一つである。

### C.2.2 ヒト IgG サブクラスの Fc $\gamma$ 受容体結合性

図 7 に、SPR 解析により、ヒト IgG 由来 Fc 領域を持つ抗体医薬品のヒト Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ RI, IIa, IIIa) 結合親和性を解析した結果を示す。用いた抗体医薬品は、ヒトマウスキメラ型 IgG1 抗体 (セツキシマブ)、糖鎖改変型ヒト化 IgG1 抗体 (モガムリズマブ)、ヒト IgG2 抗体 (パニツムマブ)、ヒト化 IgG4 抗体 (ナタリズマブ) である。結合親和性の指標である  $K_D$  は、3 回の測定の平均値として示した。

各 Fc $\gamma$  受容体への抗体の結合および解離により、それぞれ特徴的なセンサーグラムが得られた。Fc $\gamma$ RI と抗体との結合及び解離は比較的遅く、また、 $K_D$  が数十 nM 程度と、高親和性を示した。Fc $\gamma$ RIIIa は、結合と解離がともに速く、 $K_D$  が数  $\mu$ M 程度と、低親和性を示した。

また、各サブクラスの抗体の Fc $\gamma$  受容体の結合性も特徴的なパターンを示した。Fc $\gamma$ RI との結合は、IgG2 では検出されず、IgG4 では、IgG1 より低親和性であった。Fc $\gamma$ RIIIa との結合は、IgG1、糖鎖改変 IgG1、IgG2、及び、IgG4 の 4 種類の抗体全てで検出されたが、IgG4 では他の 3 種類と比較して低親和性であった。Fc $\gamma$ RIIIa との結合親和性は、糖鎖改変 IgG1 で顕著に高く、糖鎖改変 IgG1 の  $K_D$  は、IgG1 に対して 1/6 程度であった。IgG2 及び IgG4 では、Fc $\gamma$ RIIIa との結合は、検出されなかった。

### C.2.3 ヒト IgG1-Fc 領域を持つ抗体医薬品のヒト、マウス、非ヒト霊長類 Fc $\gamma$ 受容体結合親和性

## 解析

図 8 に、ヒトマウスキメラ型 IgG1 抗体インフリキシマブについて、ヒト、マウス、及び、カニクイザル Fc $\gamma$  受容体結合親和性を解析した結果を示す。実験の繰り返し数が十分でないため、今年度の結果としては、センサーグラムの形状のみを示している。

ヒト IgG1-Fc を持つ抗体インフリキシマブとの結合性に関して、ヒトとマウスを比較すると、Fc $\gamma$ RI 結合性に関しては、マウス Fc $\gamma$ RI との結合速度および解離速度ともに大きく、ヒト Fc $\gamma$ RI と比較して、結合親和性が低い結果となった。

マウス Fc $\gamma$ RIII との結合は、結合及び解離速度が共に大きく、ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 結合と類似したセンサーグラムになった。マウス Fc $\gamma$ RIII との結合量が低く、リガンドとして用いた組換えタンパク質の失活等の可能性も考えられたが、マウス IgG2b であるムロモナブ CD3 を用いた実験では、マウス Fc $\gamma$ RIII との結合が十分検出されており (data not shown)、失活等が起こっている可能性は少ないと考えられる。ヒト Fc $\gamma$ RIIIb、及び、マウス Fc $\gamma$ RII との結合は、いずれも、結合速度、解離速度が大きいセンサーグラムとなり、類似していた。また、ヒトには存在しないマウス Fc $\gamma$ RIV に対して、ヒト IgG1-Fc を持つ抗体インフリキシマブは明確に結合性を示した。

## D. 考察

### D.1. 分子設計

抗体医薬品の分子設計において考慮すべきポイントについて、薬理、薬物動態、免疫原性、溶解性、安定性、製造工程、品質管理の効率の観点から考察した。抗体医薬品の分子設計は、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る。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とされており、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必要である。

## D.2. Fc 受容体結合性

SPR 法を用いた Fc<sub>γ</sub> 受容体結合性プロファイリングにより、ヒト IgG1、糖鎖改変 IgG1、IgG2、及び IgG4 由来 Fc を持つ抗体の Fc<sub>γ</sub> 受容体の特徴が明らかになった (図 7)。糖鎖改変 IgG1 抗体モガムリズマブでは、非改変 IgG1 由来 Fc を持つ抗体と比較して、Fc<sub>γ</sub>RIIIa 結合親和性が上昇していることが確認された。また、Fc<sub>γ</sub>RIIIb 結合親和性も上昇していた (data not shown)。モガムリズマブでは、フコシル化糖鎖の含量が低減されているが、これによる Fc<sub>γ</sub>RI 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIa 結合への影響はあまりないことも確認された。

IgG2 抗体パニツムマブは、図に示した 3 種類の Fc<sub>γ</sub> 受容体の中では、Fc<sub>γ</sub>RIIIa にのみ結合性を示した。また、パニツムマブと Fc<sub>γ</sub>RIIIb 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIb との結合は検出されなかった (data not shown)。これらの結果から、IgG2 は、専ら、Fc<sub>γ</sub>RIIIa を発現する好中球やマクロファージ等をエフェクターとする免疫応答を惹起すると考えられる。

IgG4 抗体ナタリズマブは、Fc<sub>γ</sub>RIIIa との結合性が検出されず、Fc<sub>γ</sub>RI 及び Fc<sub>γ</sub>RIIIa との結合親和性も低かった。IgG4 は、エフェクター活性が低いことが特徴とされており、その知見と一致する結果であった。

ヒト、マウス、カニクイザルの Fc<sub>γ</sub> 受容体結合親和性解析の結果から、ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とマウス Fc<sub>γ</sub> 受容体では、ヒト IgG1-Fc を持つ抗体医薬品の結合性が異なることが明らかになった。抗体医薬品の非臨床試験では、標的抗原トランスジェニックマウスやヒト由来癌細胞を移植したマウス等が用いられるが、マウスでは、Fc<sub>γ</sub> 受容体を介した生体応答が、ヒトと異なることを考慮して、

試験結果を解釈する必要があると考えられる。

ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とカニクイザル Fc<sub>γ</sub> 受容体の結合に顕著な差は認められなかったが、カニクイザルでは Fc<sub>γ</sub>RIIIb が存在しない点は、本質的に異なる点である。Fc<sub>γ</sub>RIIIb を介する反応が、非臨床試験では検出されていないことに留意する必要があるだろう。今年度は、ヒト IgG1 由来 Fc を持つインフリキシマブを例に、Fc<sub>γ</sub> 受容体結合性の解析を行ったが、他の IgG サブクラス由来 Fc を持つ抗体や、代表的な改変型抗体についても同様の解析を行い、改変型抗体医薬品の非臨床試験における留意点をまとめる予定である。

## E. 結論

抗体医薬品の分子設計における留意点を考察すると共に、Fc<sub>γ</sub> 受容体結合親和性の種差を解析し、以下の点を明らかにした。

- 1) 改変型医薬品の開発では、薬理作用や体内動態のみならず、免疫原性等の安全性、製剤化、及び、製造工程を考慮した分子設計を行うことが重要である。
- 2) ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とマウス Fc<sub>γ</sub> 受容体では、ヒト IgG1 由来 Fc を持つ抗体の結合親和性に相違が認められた。ヒト Fc<sub>γ</sub> 受容体とカニクイザル Fc<sub>γ</sub> 受容体に対する抗体の結合性には、大きな違いはなかった。Fc<sub>γ</sub>RIIIb は、マウスやカニクイザルには存在しないため、非臨床試験結果のヒトへの外挿において、注意が必要である。

## F. 研究発表

- (1) 総説
  - 1) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ: 抗体医薬品の分子設計 薬剤学 74(1), 1-8 (2014)
  - 2) 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: 新薬開発にむけた臨床試験 (第 ~ 相臨床試験) での適切な投与量設定と有効性 / 安全性評価 第 4 章 ヒト初回投与量設定方法 第 2 節 バ

イオ医薬品 サイエンス&テクノロジー出版  
東京, pp. 72-86 (2013)

(2) 学会発表

- 1) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 次  
世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会  
第134年会シンポジウム 2014年3月 熊本

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

- (1) 特許取得 なし
- (2) 実用新案登録 なし
- (3) その他 なし

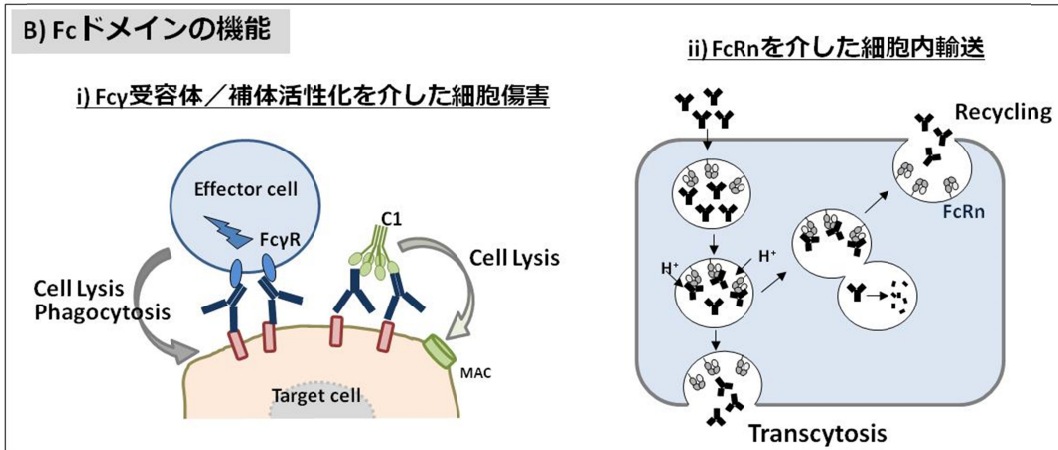
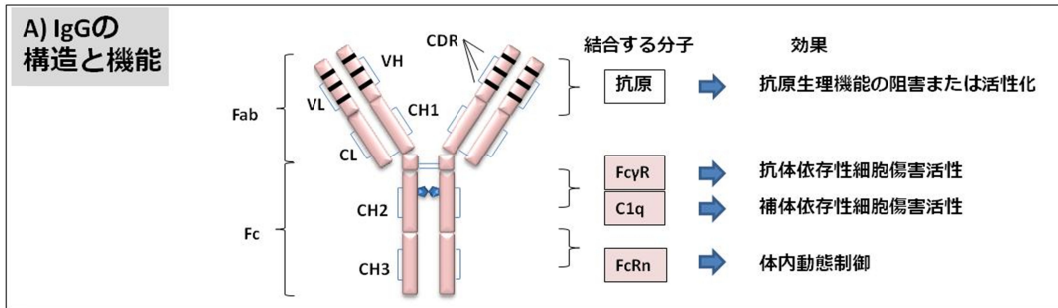


図 1 IgG の構造と機能

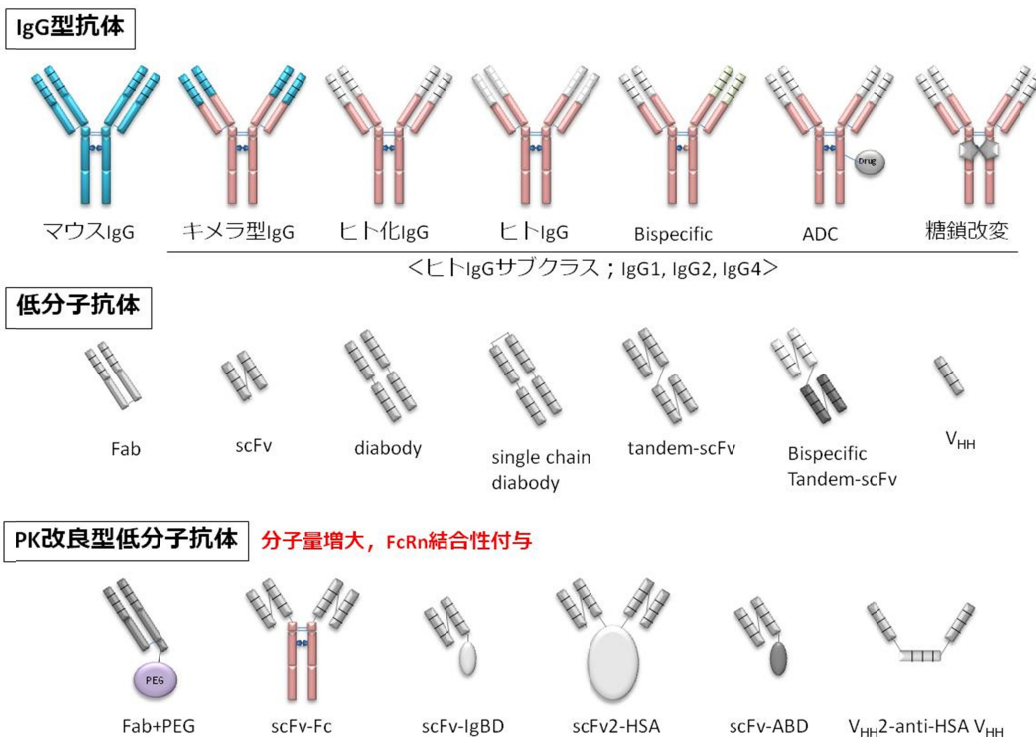


図2 抗体医薬品の骨格構造の例

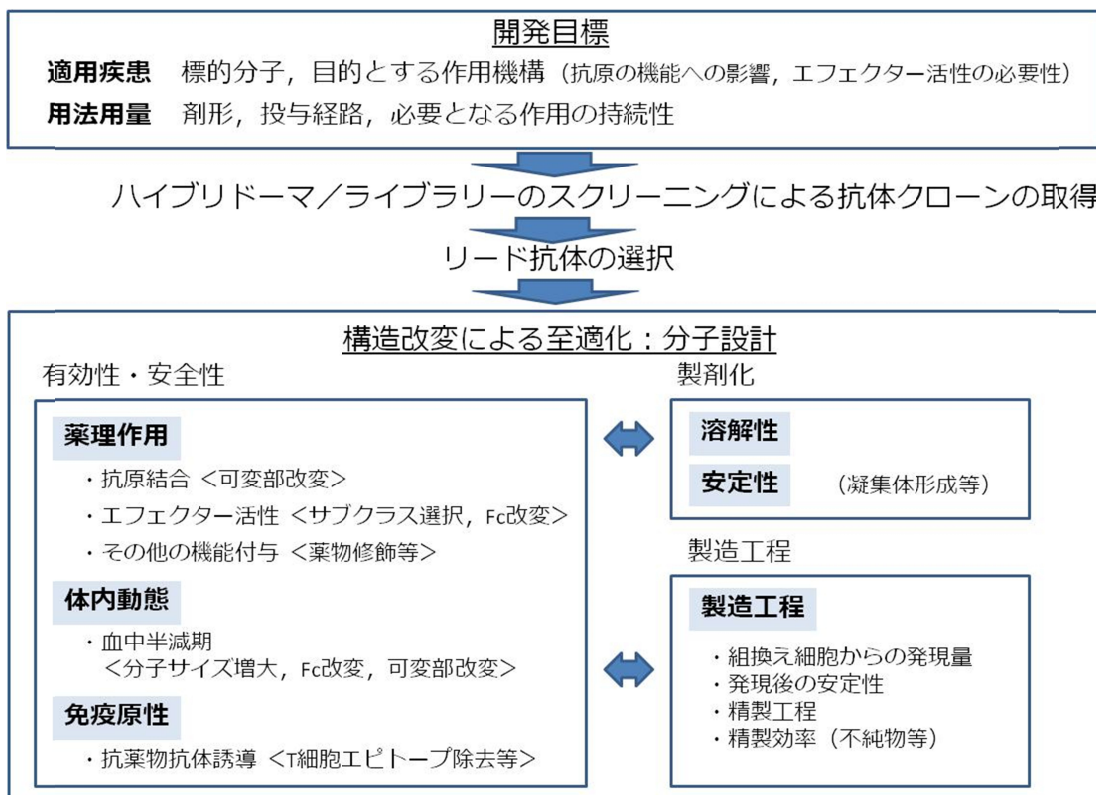


図3 開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計

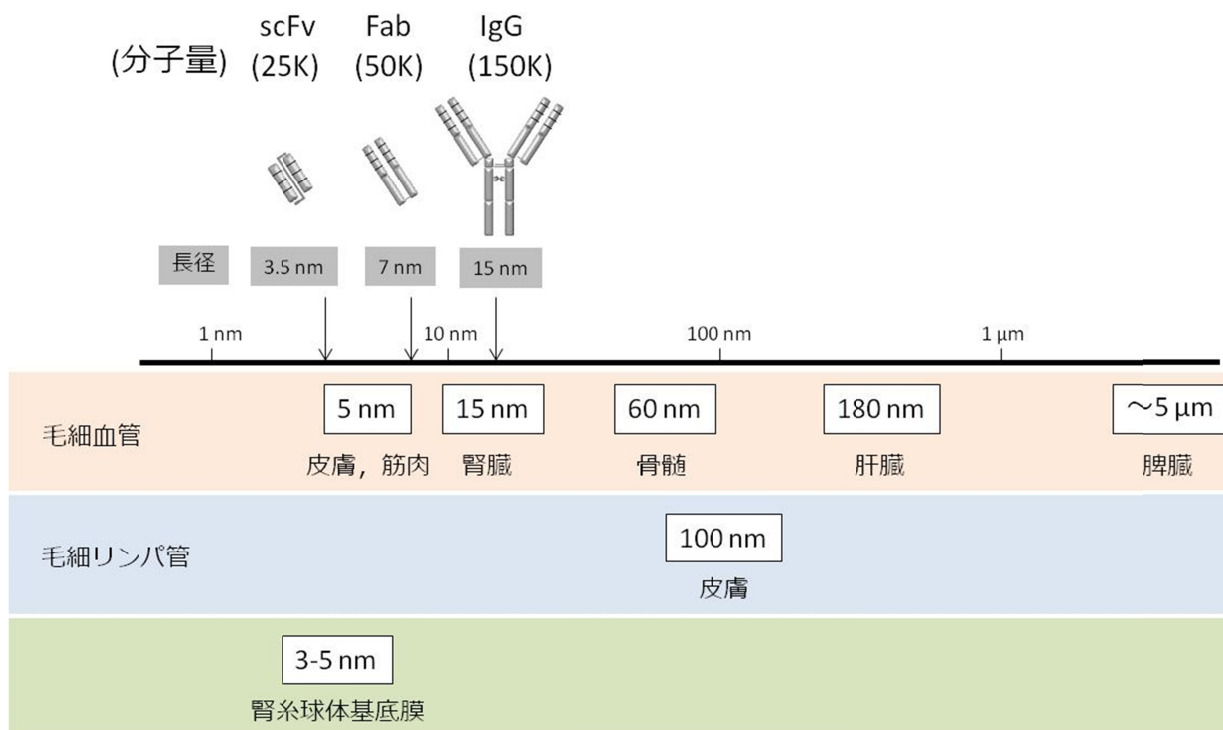


図4 抗体医薬品の分子量・分子サイズと細胞間隙経路の大きさ

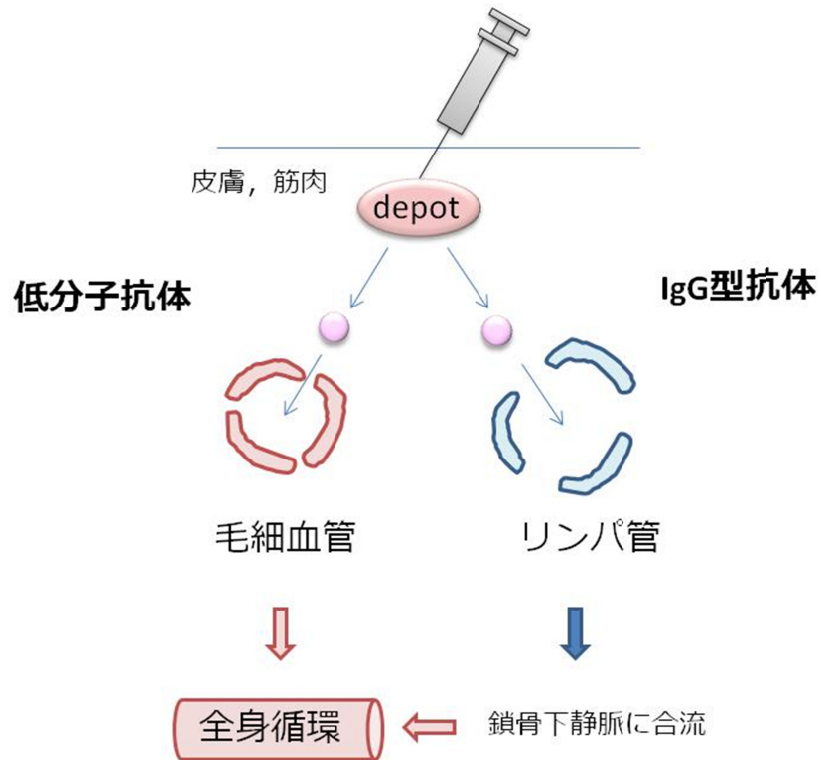


図5 皮下, 筋肉からの薬物の吸収

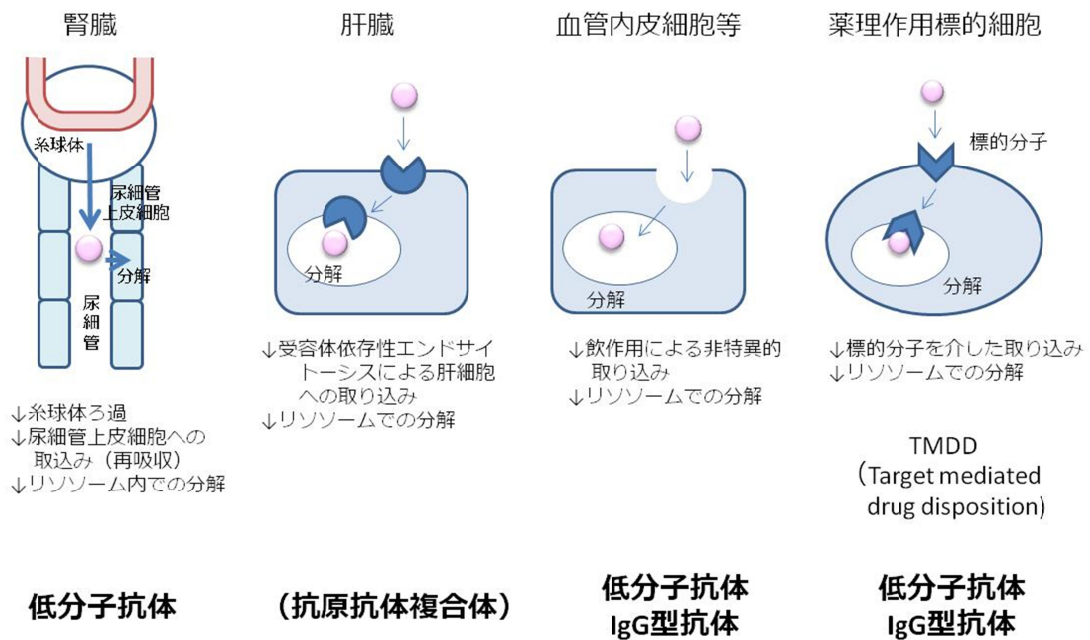




図6 種々の組織におけるバイオ医薬品の消失機構

表1 日本で承認された抗体医薬品の性状および投与経路

構造	標的分子	一般名	販売名	性状	投与経路	主な適用疾患
<b>抗腫瘍薬</b>						
マウス IgG1 <sub>K</sub> (MX-DTPA : <sup>90</sup> Y 標識)	CD20	イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴアリン イットリウム	溶液	点滴静注	B細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	CD20	リツキシマブ	リツキサン	溶液	点滴静注	B細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	EGFR	セツキシマブ	アービタックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	VEGF	ベバシズマブ	アバスタチン	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	HER2	ペルツズマブ	パージェタ	溶液	点滴静注	乳がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	HER2	トラスツズマブ	ハーセプチン	凍結乾燥	点滴静注	転移性乳がん
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub> (糖鎖改変)	CCR4	モガムリスマブ	ボテリジオ	溶液	点滴静注	成人T細胞白血病リンパ腫
ヒト化 IgG4 <sub>K</sub> (カリケアマイシン修飾)	CD33	ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターグ	凍結乾燥	点滴静注	急性骨髄性白血病
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	CD20	オフアツムマブ	アーゼラ	溶液	点滴静注	慢性リンパ性白血病
ヒト IgG2 <sub>K</sub>	EGFR	パニツムマブ	ベクティビックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
<b>免疫調節薬</b>						
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	TNF $\alpha$	インフリキシマブ	レミケード	凍結乾燥	点滴静注	関節リウマチ
キメラ IgG1 <sub>K</sub>	CD25	バシリキシマブ	シムレクト	凍結乾燥	静脈内	腎移植後の急性拒絶反応抑制
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	IL6R	トシリズマブ	アクテムラ	溶液	点滴静注, 皮下	関節リウマチ
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	IgE	オマリズマブ	ゾレア	凍結乾燥	皮下	気管支喘息
ヒト化 IgG1 <sub>K</sub>	RSウイルス	パリビズマブ	シナジス	凍結乾燥, 溶液	筋肉内	RSウイルス感染
ヒト化 Fab' (PEG化低分子抗体)	TNF抗体	セルトリスマブ ベゴル	シムジア	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	TNF $\alpha$	アダリムマブ	ヒュミラ	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	IL12/IL23-p40	ウステキヌマブ	ステラーラ	溶液	皮下	尋常性乾癬
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	TNF $\alpha$	ゴリムマブ	シンボニー	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1 <sub>K</sub>	IL-1 $\beta$	カナキヌマブ	イラリス	凍結乾燥	皮下	クリオピリン関連周期性症候群
ヒト IgG2/4 <sub>K</sub>	補体C5	エクリズマブ	ソリリス	溶液	点滴静注	発作性夜間ヘモグロビン尿症
<b>その他</b>						
ヒト化 Fab (低分子抗体)	VEGF	ラニズマブ	ルセンチス	溶液	硝子体内	加齢黄斑変性症
ヒト IgG2	RANKL	デノスマブ	ランマーク, プラリア	溶液	皮下	骨病変, 骨粗鬆症

表2 ヒト, マウス, 非ヒト霊長類の Fcγ 受容体ファミリーの特徴

ヒト	マウス	非ヒト霊長類
FcγRI	FcγRI 構造, 発現分布および生理機能の点 でヒトとの類似性は比較的高い	FcγRI ヒトとの相同性高い (90%)
FcγRIIa	直接的な相同タンパク質は 存在しない	FcγRIIa ヒトとの相同性高い (89%) ITAM部分の配列異なる
FcγRIIb	FcγRII	FcγRIIb ヒトとの相同性高い (92%)
FcγRIIIa	FcγRIII NK細胞に発現. 細胞外領域の構造 はヒトFcγRIIIaにより近い.	FcγRIIIa ヒトとの相同性高い (91%) IgG結合部位のアミノ酸配列異なる
FcγRIIIb	なし	なし
	FcγRIV IgGに対して比較的親和性高い IgE受容体としても機能	

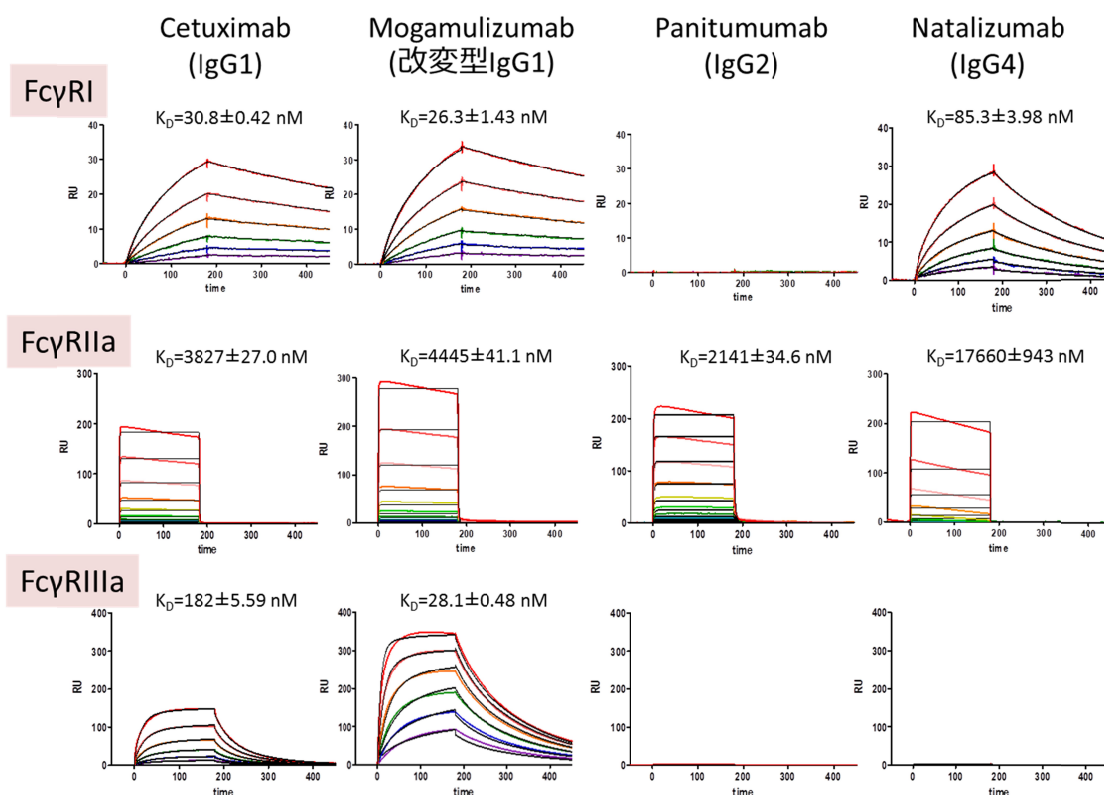


図7 SPR法によるヒト IgG 各サブクラスの抗体医薬品のヒト Fc 受容体結合親和性解析

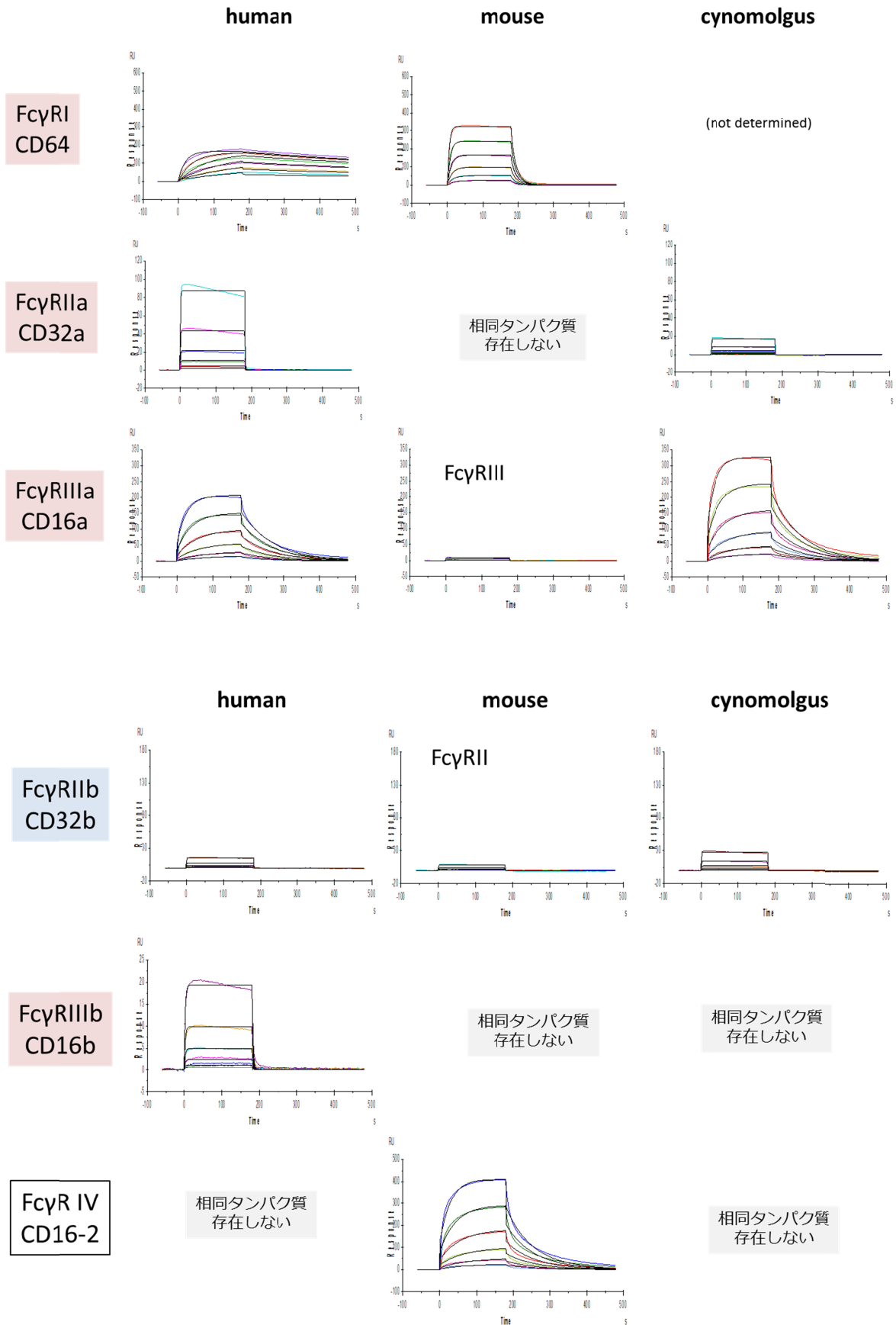


図8 ヒト IgG1Fc 領域を持つ抗体 (インフリキシマブ) のヒト, マウス, カニクイザル Fcγ 受容体結合親和性解析



## 核酸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

研究分担者 井上 貴雄 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

本研究では、国内外においてガイドラインが存在しない核酸医薬品について、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を行う。核酸医薬品は化学合成によって製造される医薬品であるが、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特有の性質がある。その中で特に重要とされるのが「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現であり、その評価法の確立や判断基準の設定が喫緊の課題となっている。すなわち、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、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でも対応についてコンセンサスが得られておらず、開発が遅延する恐れ出ている。本年度は、複数のタイプが存在するアンチセンス医薬品について調査研究を行い、それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を考察、提案した。さらに、Kynamro®の上市で注目を集めている Gapmer 型アンチセンスに関して、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の誘導を検証した。

### A. 研究目的

本研究では、国内外においてガイドラインが存在しない核酸医薬品について、品質・安全性を評価する試験法の確立、審査指針の根拠となる実験的データの創出、基準策定の土台となるコンセプトの提案など、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（RS 研究）を行う。これにより、核酸医薬品の開発を促進し、日本初となる、日本発の核酸医薬品を上市するための体制を整える。さらに、ケーススタディを積み重ねながら、核酸医薬品の開発/審査/承認が滞りなく進行する環境を整備し、核酸医薬品の適用が期待されている難治性疾患や希少疾患の領域にいち早く医薬品を届ける体制を構築する。

#### 1. 核酸医薬品の特性とそれに付随する課題

本研究では、核酸医薬品の RS 研究を行う前

提となる「核酸医薬品に特有の性質」について調査を行ってきた。解決すべき課題を包括的に理解するため、まず核酸医薬品の性質を整理したい。

核酸医薬品とは一般に、「核酸あるいは修飾型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」と定義できる。従って、核酸医薬品の規制は基本的には化学合成医薬品をベースに考えればよいと思われる。低分子医薬品やバイオ医薬品と比較し、核酸医薬品に特徴的な点としては、以下の項目を挙げることができる。

核酸医薬品は化学合成により製造されるが、分子量は一般的な低分子医薬品より遥かに大きい（3,000–15,000 程度）。また、リ

ン酸部に負電荷を有するポリアニオンであることから細胞膜を通過しにくい。以上の特徴から全身投与された核酸医薬品は特徴的な体内分布を示す（肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、固形癌等に集積）。

核酸医薬品は 3'末端から一塩基ずつ連結していく固相合成法により製造される。このため、N 塩基長のオリゴ核酸を合成する場合、途中で塩基が抜けた N-1、N-2 などの不純物が含まれる。技術的な限界から、核酸医薬品の不純物は低分子医薬品と比べて含有率が高くなると考えられる。

核酸医薬品ではヌクレアーゼ耐性を付与するため、一般にリン酸ジエステル部がホスホロチオアート化（S 化）されている（図表 5）。これによりリン原子上に不斉点が発生し、合成されたオリゴ核酸は立体異性体が混在した化合物となる。例えば、11 塩基長のオリゴ核酸を考えた場合、核酸の連結部（不斉点）は 10 箇所存在するため、 $2^{10}=1024$  個の異性体の混合物となる。現在の技術では、これらの異性体を完全分離することができないため、「リン原子の立体化学に起因する異性体はいずれも有効成分」という前提で開発が進められている。実際、アメリカ食品医薬品局で既に承認されている核酸医薬品である Vitravene®（一般名：Fomivirsen）および Kynamro®（一般名：Mipomersen）（図表 2）はいずれもキラルが制御されていない異性体の混合物である。

核酸医薬品は Toll 様受容体に代表されるパターン認識受容体を介して自然免疫系を活性化する場合がある。研究の進展に伴い、受容体に認識されるオリゴ核酸の配列法則性などが明らかにされつつある。

アンチセンスや siRNA に代表される「RNA

を認識する核酸医薬品」は、標的 RNA と相補的に結合することにより有効性を発揮する。これらの核酸医薬品では、標的遺伝子以外の遺伝子と結合することにより発現を抑制する「相補的結合依存的なオフターゲット効果」のリスクが危惧されている。

核酸医薬品をマウス、ラット、サルに投与して観察される共通の毒性として、血液凝固時間の延長、補体の活性化、免疫性細胞の活性化、肝毒性、腎毒性などが知られる。これらの毒性の発現は、配列によって強弱があり、オリゴ核酸の物理化学的性状に依存すると考えられているが、発症機構は不明である。ケーススタディも不足しているため、ヒトへの外挿性に関しては慎重を要する。

## 2. 安全性担保の観点から見た核酸医薬品開発の課題

以上に挙げた核酸医薬品の性質の中で、安全性担保の観点では、と関連して「不純分の許容範囲の設定」、と関連して「相補的結合依存的なオフターゲット効果が起こる条件の解明」、と関連して「ヒトにおける毒性発現を予測する評価法の確立」が特に重要な点と認識されている。「不純分の許容範囲の設定」に関しては、主な不純物が N-1 等の「配列が変化したオリゴ核酸」であるため、そのリスクとしては、「N-1 のオリゴ核酸が標的以外の遺伝子に相補的に結合し、発現を抑制する」という懸念である。従って、不純物に関する課題は、に記載したオフターゲット効果の課題と本質的には同一であり、まずは、オフターゲット効果が起こる条件（配列、濃度等）に関して、基盤研究を進めるべきである。

「ヒトにおける毒性発現を予測する評価法の確立」に関しては、現時点では毒性発現の分子機構がわかっていないため、科学的根拠に裏付

けられた直接的な評価法を構築することは困難である。まずは分子機構を解明する基礎研究が必要であろう。現状では、臨床開発候補品を選択する際、肝毒性等を指標に簡易的にネガティブセレクションを行う場合があり、その後、通常非臨床安全性試験を行い、慎重な考察に基づいて First-in-man 試験に入ることになる。なお、ヒトと動物では核酸医薬品の標的となる遺伝子配列が異なるため、安全性試験を行う際には、サロゲートの利用やヒト遺伝子を導入したトランスジェニック動物の使用が検討される場合がある(ここでは詳細は割愛する)。「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関しては、ゲノム配列の異なる動物では評価できないため、通常非臨床安全性試験では対応不可能である。従って、核酸医薬品に特有の評価系/判断基準が必要となる。

### 3. 「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関する知見

以上に述べた、核酸医薬品の RS 研究に関する課題を俯瞰し、本研究では「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の評価法確立、判断基準の設定が特に緊急性を要すると判断した。理由としては、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、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が挙げられ、日本の規制当局においても、オフターゲット効果をどのように扱えばよいか、対応に迫られている現状がある。

現在、様々なタイプの核酸医薬品が開発されているが(図表 1, 3, 4)、「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現を考慮すべき核酸医薬品は、RNA を標的とする医薬品であり、現実的にはアンチセンス医薬品および siRNA 医薬品の 2 種類である(図表 1, 3, 7)。これら 2 つの核酸医薬品は開発段階、開発品目数で見れば、上位 1 位、2 位に相当する。今年度

の開発動向を調査したところ(文献 1, 図表 7)、臨床試験段階にあるアンチセンス医薬品候補品は約 50、うち 8 品目が phase 3 であり、2 品目は既に上市されている。一方、siRNA 医薬品は臨床段階にあるのが約 15、うち 1 品目が phase 3 に入ったところである(上市された siRNA 医薬品はまだ存在しない)。すなわち、アンチセンス医薬品の開発が大きくリードしているのが現状である。一方、オフターゲット効果に関する研究については、siRNA に関しては基盤研究が進んでおり、オフターゲット効果が起こる条件が明らかにされているが(Nat Biotechnol. 21(6), 635-637, 2003 など)、アンチセンスについてはほとんど解析されていない。特に、近年開発されている高機能性アンチセンス(後述)を用いたオフターゲット効果の検討は皆無である。以上の点から、アンチセンス医薬品によって引き起こされるオフターゲット効果を本研究課題の中心テーマに設定した。

同じアンチセンス医薬品の範疇にあっても、標的となる RNA の種類(mRNA, pre-mRNA, miRNA)や作用機構(RNA 分解、立体障害)が異なる医薬品が存在し(図表 7)、種類によってオフターゲット効果の概念や評価法が変わってくると予想される。従って、平成 25 年度においては、まず、「アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究」を行ったのち、それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を考察、提案した。さらに、アンチセンス医薬品の中でも最も開発が進んでいる Gapmer 型アンチセンスに関して、「Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証」を行った。以下に、具体的な研究成果を述べる。

## B. 研究方法

### 1. アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究

国内外の学術集会において、アンチセンス医

薬品の研究開発状況を調査した(第9回核酸医薬国際学会、第6回 AsiaTIDES、第23回アンチセンスシンポジウム、第15回日本RNA学会など)。また平成25年度は、ヒューマンサイエンス振興財団規制動向調査ワーキンググループの調査対象が核酸医薬品であったため、本メンバーと密接に情報交換を行い、調査内容を共有した。さらに、実際にアンチセンス医薬品開発を行っている国内の主要製薬企業とミーティングを行い、オフターゲット効果の評価法に関して議論を行った。

## 2. Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証

現在、最も開発段階が進んでいる Gapmer 型アンチセンスを対象にオフターゲット効果を解析した。具体的には、GFP を安定発現するヒト細胞 (HEK293 細胞) に対して、GFP に対するアンチセンスを添加し、抗 GFP アンチセンスと相補的に結合するヒト内在性遺伝子がどのように発現変化するかをマイクロアレイおよび定量 PCR により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要な試料・資料の取り扱いはない。

## C. 研究結果及び考察

### 1. アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究

アンチセンス医薬品の機能的分類を理解する上で修飾型核酸の開発状況を把握することが必須であるので、まず、修飾型核酸の開発状況に関して調査した結果を述べる。次に、アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類を整理する。

#### 1.1 修飾型核酸の開発状況

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® (アンチセンス) および Macugen® (アプタマー) はいずれも硝子体内へ局注する医薬品であった(図表2)。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。Toll 様受容体を介する自然免疫活性化も化学修飾により回避できる可能性が指摘されている。以上のような利点から、現在開発されているほとんどの核酸医薬品は何かしらの化学修飾が施されている。

核酸の化学修飾は、リン酸部の修飾、糖部の修飾、塩基部の修飾に分類することができる。リン酸部の修飾としては、O (酸素原子) を S (硫黄原子) に置換した S 化がよく知られており(図表5)、現在開発されている多くの核酸医薬品において S 化がベースとして導入されている(S 化された核酸により合成されたオリゴ核酸は“S オリゴ”と呼ばれる)。S 化は核酸と核酸をつなぐリン酸ジエステル結合部の修飾であることから、ヌクレアーゼ耐性の獲得に大きく寄与し、また、疎水性が増すことから細胞内への取り込みも改善する。上述のように、リン酸部の S 化によりリン原子上に不斉点が発生するため、S オリゴは立体異性体が混在した化合物として合成される。この点は品質管理の観点から重要であり、核酸医薬品に特有の考慮が必要となる。



糖部の修飾には、2'位の修飾と架橋型修飾がある。2'位の修飾は核酸医薬品開発の初期段階から試みられており、2'-F、2'-O-Methyl (2'-OMe)、2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE)などが知られている(図表6, 上段)。既に上市された核酸医薬品を例にとると、Vitravene®はS化のみで糖部は修飾されていないが、Macugen®ではピリミジン塩基の核酸(シトシン、ウラシル)が2'-F化されており、プリン塩基の核酸(アデニン、グアニン)は2'-OMeが施されている。Kynamro®については、S化に加えて、オリゴ核酸の両端に2'-MOEが導入されている(後述)。

架橋型修飾は、「揺らぎのある頭部の立体配座を架橋により固定化する」というコンセプトにより創製されたもので、近年特に注目を集めている(図表6, 下段)。通常、核酸はRNA型(N型)とDNA型(S型)の両方のコンフォメーションをとることができるが、頭部2'位と4'位を化学的に架橋することにより、厳密にRNA型(N型)に固定することができる。これにより、相補鎖との結合力が顕著に向上すると共に、ヌクレアーゼに対する立体障害によりヌクレアーゼ耐性も付与される。架橋型核酸は日本が世界に先駆けて開発を進めており、1997年に大阪大学薬学部の今西、小比賀らによって2',4'-BNA[2',4'-Bridged Nucleic Acid、別名LNA(Locked Nucleic Acid)]が開発されたのが最初の報告である。架橋型核酸としては、他にBNA<sup>CO</sup>、BNA<sup>NC</sup>、ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)、cEt BNAなどが開発されている(図表6, 下段)。糖部の“修飾”ではないが、糖部分をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体も核酸医薬品の原料として用いられている(図表6, 上段右)。モルフォリノオリゴ核酸はヌクレアーゼで分解されず、また毒性が低いという利点がある。

オリゴ核酸の塩基部は相補鎖との結合に特

に重要であることから、相補鎖形成が前提であるアンチセンス、siRNAにおいて塩基部が修飾されることはほとんどない。一方で、三次元的な立体構造により蛋白質を認識するアプタマーでは、立体構造の多様性獲得あるいは蛋白質との親和性増強を狙って、塩基部が修飾されるケースがある。

## 1.2 アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類

アンチセンス医薬品は、標的RNAと配列依存的に二重鎖を形成するオリゴ核酸を有効成分とし、標的RNAの機能を制御することで有効性を発揮する。これまで承認まで至ったアンチセンス医薬品はVitravene®およびKynamro®の2品目であり(図表2)、日本では承認された例はない(日本ではアプタマー医薬品であるMacugen®が承認されたのみ)。特筆すべきは、昨年(2013年)に承認されたKynamro®が核酸医薬品としては初の、全身投与性の医薬品である点である。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、キャリア無しで皮下投与される。上述のように、全身投与し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に加えて、静注/皮下注が可能な全身投与型のアンチセンス医薬品が上市されてくると予想される。

以上のように、アンチセンス医薬品は今最も注目されている核酸医薬品であるが、その応用範囲は拡大しており、標的RNAや作用機序の違いにより、「Gapmer型」、「スプライシング制御型」、「miRNA型」の3つに分類することができる(図表7)。以下にそれぞれのアンチセンスについて概説する。

### 1.2.1 Gapmer 型アンチセンス

アンチセンス医薬品の開発の歴史は古く、1980-1990年代から開発が行われてきたが、体内で分解されやすく、また、有効性も乏しいことなどから、ほとんどの開発は中止された。しかし、その後も基盤研究が進められ、修飾型核酸の開発ならびに RNase H 研究の進展により、「Gapmer 型アンチセンス」が登場した。上述の Kynamro® が Gapmer 型であることからわかるように、今、最も開発の進んでいる核酸医薬品である。Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解することにより機能する（図表 8）。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には 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 がオリゴの中央部で DNA/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖を切断する。RNase H は普遍的に発現する酵素で、主に核内に存在することから、Gapmer 型アンチセンスは核内で機能していると考えられている。Kynamro® では、結合力を高める修飾型核酸として糖部を修飾した 2'-MOE が使用されているが（図表 6, 8）、現在開発段階にあるアンチセンスでは、さらに結合力の強い架橋型核酸も用いられている。Gapmer 型アンチセンスの開発を牽引しているのはアンチセンス開発の老舗 ISIS 社であり、Genzyme 社と提携して Kynamro® を上市している。世界初の核酸医薬品である Vitravene® を開発したのも ISIS 社である。その他、Santaris 社が架橋型核酸 LNA (2',4'-BNA) を用いた Gapmer 型アンチセンスを開発している。

### 1.2.2 スプライシング制御型アンチセンス

現在開発されているアンチセンス医薬品の主流は mRNA を分解する Gapmer 型であるが、立体障害によって蛋白質のアクセスを阻害するタイプのアンチセンスも開発されており、その代表例として「スプライシング制御型アンチセンス」が挙げられる（図表 7）。現在、臨床開発段階にあるスプライシング制御型アンチセンスは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬であり、エクソスキッピングの機序によって作用する（図表 9）。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では、ジストロフィン遺伝子（79 個のエクソンで構成される）がエクソン単位で欠失する変異が多く観察されており、この結果、筋細胞の維持に必須であるジストロフィン蛋白が生成しない。図表 9 に示した例では、エクソン 50 の欠失により、「エクソン 49 と 51 が連結した mRNA」が生じ、エクソン 51 以降で読み枠がずれることにより、早期にストップコドンが生じる。この結果生じた「C 末側が欠失した変異ジストロフィン蛋白」は不安定なため、分解される。この状況において、エクソン 51 の ESE 領域（Exonic splicing enhancer: スプライシングを促進するシス配列）と相補的に結合するアンチセンスを導入すると、スプライシングが変化し、エクソン 51 が“スキップ”される。これにより生じる「エクソン 49 とエクソン 52 が連結した mRNA」は読み枠が合うことから、C 末端まで翻訳されることとなり、「エクソン 50、51 にコードされるアミノ酸だけが欠失した少し短いジストロフィン蛋白」が生成する。重要な点は、「ジストロフィン蛋白は N 末側のモチーフと C 末側のモチーフが機能発現に必須であるが、中央部の配列は多少抜けても機能が保持される」点である。エクソスキッピング法はこのジストロフィン蛋白の性質を生かした治療法と言える。本手法で

用いるアンチセンスのターゲットは pre-mRNA であり、pre-mRNA とスプライシングに關する蛋白質群との結合を阻害することに機能を発現する。図表 9 の作用機構を見てもわかるように、エクソンスキッピング法ではアンチセンス医薬品は RNA 鎖に結合すればよく、Gapmer 型のように RNA 鎖を切断する必要はない(むしろ、切断してはいけない)。従って、アンチセンスとの pre-mRNA との結合力を高めつつも、RNase H が作用しないように修飾型核酸が配置される。また、RNase が作用しないモルフォリノオリゴも用いられる。

エクソンスキッピング療法に用いるアンチセンスとして開発が進んでいるものは、GlaxoSmithKline 社と Prosensa 社が開発している Drisapersen、ならびに Sarepta 社が開発している Eteplirsen がある。いずれも図表 9 に示したエクソン 51 を標的とするもので、前者は 2' -OMe 化アンチセンス、後者はモルフォリノオリゴが用いられている。Drisapersen は日本を含めた複数の国で大規模な国際共同治験 (phase 3) が進行していたが、主要評価項目 (6 分間歩行距離) が有意に改善しなかったことを 2013 年 9 月に発表している (その後、GlaxoSmithKline 社は Prosensa 社に Drisapersen の開発権を返還している)。Eteplirsen は phase 2b で良好な結果が得られており、2014 年に phase 3 が開始される予定である。国内においても第一三共と日本新薬で開発が進められており、それぞれエクソン 45 とエクソン 53 を標的したアンチセンスの開発が発表されている。エクソン 45、エクソン 53 のスキッピングは、エクソン 51 のスキッピングに次いで対象患者数が多いとされている。第一三共は独自に開発した架橋型核酸 ENA (図表 6) を用いており、日本新薬はモルフォリノオリゴを使用している。現在開発が進んでいるスプライシング制御型アンチセンスはエクソン

スキッピングの機序によるものであるが、今後病態の解明が進むにつれ、エクソンインクルージョンなど新しいスプライシング制御型アンチセンスが開発されると考えられる。

### 1.2.3 miRNA 阻害型アンチセンス

非コード RNA の 1 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 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が、miRNA は非常に短い RNA であることから、siRNA によって認識/分解することは事実上不可能である。そこで、miRNA と相補的に結合する「miRNA 阻害型アンチセンス」が miRNA の機能を抑制する手法として用いられる (図表 10)。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 (図表 7)。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、ならびに 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 (図表 6, 10) 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 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。

以上に記載した「修飾型核酸の開発状況」な

らびに「アンチセンス医薬品の開発動向」に関する調査研究の内容は文献1で発表を行った。

#### 1.2.4 オフターゲット効果の評価に関する考察

オフターゲット効果の発現を考える上で、「アンチセンス医薬品が標的 RNA を認識する塩基長」が重要である。一般にアンチセンスの塩基長が長ければ長いほど、ヒトゲノムにおいて完全相補する塩基配列の出現頻度は低くなり、特異性が向上する(図表 11)。すなわち、アンチセンス医薬品が長いほどオフターゲット効果が起きにくいと予想される。

我々は平成 24 年度の成果として、“オフターゲット効果が生じる可能性がある遺伝子(核酸医薬品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、ヒトゲノム上にいくつ存在するか”を推定するため、数理計算により理論値を算出してきた(図表 12)。さらに、仮想のアンチセンスを 5000 本以上作成し、独自に作成した検索プログラムを用いて検索を行った結果(*in silico*解析)、数理計算によって導いた理論値をもって、実測したオフターゲット候補遺伝子数を見積もることができることを示した(図表 13)。

オフターゲット候補遺伝子数の理論値(図表 12)を見ると、20 塩基長のアンチセンスでは完全相補(0 塩基ミスマッチ)するヒト mRNA はほぼ存在しないが( $< 10^3$ )、13 塩基長程度まで短くなると完全相補するヒト mRNA が出現する(13 塩基長で 1.3 個)。上市されている Kynamro®は 20 塩基長であるが、標的である ApoB-100 以外に完全相補する mRNA は存在しないことが報告されている。Gapmer 型アンチセンスの場合、修飾核酸の技術進展に伴い、短い塩基長でも mRNA と強固に結合することが可能となっており、また、製造コストの有利性もあり、12-16 塩基長程度の短い塩基長のアンチセンスが開発されている。12-16 塩基の範囲でも

完全相補する mRNA の数は個別に解析できる範囲(数個程度)と見積もられるが、ミスマッチを許容するとオフターゲット候補遺伝子が一気に増加し、数十~数百にも及ぶ。従って、ミスマッチを持つ mRNA が発現抑制されるかを検証することが重要である(図表 12, 13)。この点に関しては、以降の「3. Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証」において、実験的に検証した結果を述べる。

以降、それぞれのアンチセンス医薬品について、オフターゲット効果の評価に関する考察を行い、技術的に可能な評価法を提案する。

##### 1.2.4.1 Gapmer 型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

Gapmer 型アンチセンスは mRNA を分解する作用を持つため、オフターゲット効果の評価には mRNA を定量できるマイクロアレイや定量 PCR が適している。どちらを選択するかは、*in silico* 解析でピックアップしたオフターゲット候補遺伝子の数を考慮し、時間/労力/コストの観点から判断されるが、それぞれの利点があるので併用するのが望ましい。

Gapmer 型アンチセンスは核内に存在する RNase H の作用により mRNA を分解するため、核内で生成するスプライシング前の pre-mRNA も原理的に標的となる。従って、*in silico*でオフターゲット候補遺伝子を抽出する際には pre-mRNA も検索対象にすべきであるが、現状では重複性のない pre-mRNA のデータベースが存在しないという問題がある。一方、Wet 解析では、pre-mRNA が分解されれば対応する mRNA 量も減少するため、上述の方法で mRNA を定量すれば、オフターゲット効果を評価できることになる。Gapmer 型によりオフターゲット効果が起こる配列条件が明らかになっていない点を加味すると、mRNA を対象とした *in silico* 解析に加え、ヒト細胞を用いたマイクロアレイ

解析を行うことが重要と考えられる。

#### 1.2.4.2 スプライシング制御型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

スプライシング制御型アンチセンスは核内において、pre-mRNA と結合し、蛋白性のスプライシング因子の結合を阻害することで機能を発揮する。現在開発が進んでいるエクソスキッピング療法に用いられるアンチセンスの場合、標的となる配列は pre-mRNA 上のスプライシングを促進するシス配列となり、エクソン内にある上述の ESE 配列やイントロン/エクソン境界配列が候補となる。実際にエクソスキッピングを引き起こす pre-mRNA 上の配列は、pre-mRNA 全体から見るとごく限られていると予想される。

エクソスキッピング用アンチセンスが「標的以外の遺伝子のスプライシングに影響を与えるオフターゲット効果」を考えると、*in silico*解析では pre-mRNA を対象に検索を行うべきであるが、上述のとおり pre-mRNA のデータベースは整備されていない。従って、現状ではエクソン内にある ESE 配列を念頭において、mRNA を対象に検索するに留めることとなる。なお、ヒトゲノム全体を検索することは可能であるが、mRNA コード領域以外の配列には一塩基多型が非常に多いことから「どの(誰の)ヒトゲノムを使うのか」という問題がある。さらに、検索を行ってもヒットした配列が遺伝子上のどこに位置するのか(プロモーター領域か、エクソン内か、イントロン内か、遺伝子と遺伝子の間のジャンクションなのか)を整理、提示できる公開されたプログラムが存在しないので、多数の配列がヒットした場合は現実的にはオフターゲット候補遺伝子を抽出することは困難である。

以上に述べたように *in silico*解析だけでは、オフターゲット候補遺伝子の抽出には限界があるが、Wet 解析を行えば網羅的な解析が可能

と考えられる。まず、「標的以外の遺伝子の“スプライシング”に影響を与えるオフターゲット効果」を考える。スプライシングが変化すると mRNA の読み枠がずれ、終始コドンが早期に出現する 경우가多く、その場合は NMD (nonsense-mediated mRNA decay: ナンセンスコドン依存的 mRNA 分解)のメカニズムで mRNA が分解される。このようなケースは mRNA の量を評価するマイクロアレイを用いれば網羅的にオフターゲット遺伝子を抽出することができる。一方、スプライシングが変化するだけで mRNA 量が変わらないケースでは、マイクロアレイによる評価では不十分である(マイクロアレイに貼り付けてあるプローブの中で、スプライシング変化により相補結合性を失うものがあると考えられるが、その変化を検出するだけの感度が保証されない)。この場合は、「mRNA の量の変化」ではなく、「エクソンの量の変化」という概念で定量する必要がある。従来より、エクソン単位での定量が可能なアレイとして「エクソンアレイ」が知られていたが、ごく最近では、スプライシング変化をより高感度に捉えることができる「HTA (Human Transcriptome Array)」が利用可能となっている。

さらに、次世代シーケンサーの開発進展に伴い、「RNA-seq」もスプライシング変化を検出する評価系になり得る。すなわち、mRNA の配列を直接シーケンスすることでスプライシングが生じた部分を検出し、シーケンスのリード数で RNA 量を見積もるといった評価法である。現時点ではコストの面、定量性の面で不利であるが、ハイブリダイズという間接的な手法ではなく、直接的に mRNA 配列を読むので、将来的にはポテンシャルが高い評価法と考えている。

次に、「標的以外の遺伝子の“翻訳”に影響を与えるオフターゲット効果」について考える。スプライシング制御型アンチセンスは RNase H が作用しないようにデザインされており、立体

障害によって機能する。核で機能するが想定されているが、原理的には細胞質に存在する mRNA にも結合しうるため、標的以外の遺伝子に結合し、翻訳を抑制する可能性も考えられる。従来、アンチセンスの立体障害による翻訳の阻害は効率が悪いとされてきたが、近年開発されている修飾型核酸は結合力が強力であることから注意を要する。具体的には、*in silico* 解析で相補的に結合する mRNA を抽出しておき、その遺伝子産物に対する抗体を用いて蛋白量を検出する必要がある。しかし、現実的には遺伝子産物ごとに抗体を準備することは難しい。まずは、「結合力の強いアンチセンスが翻訳にどれくらいの影響を及ぼすか」をモデルシステムを使って検討する必要があるだろう。

#### 1.2.4.3 miRNA 阻害型制御型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

miRNA 阻害型アンチセンスもスプライシング制御型と同様に RNA と結合し、立体障害により機能する。mRNA を分解しないことから、オフターゲット効果の評価に関しては基本的にはスプライシング制御型アンチセンスと同様に考えてよいであろう。

#### 1.2.4.3 miRNA に作用することで生じるオフターゲット効果に関する考察

最後に各種アンチセンスが miRNA に作用することでオフターゲット効果を引き起こすケースについて考察する。まず、*in silico* 解析に関しては、現状では、miRNA、あるいはその前駆体である pri-miRNA (primary-miRNA) や pre-miRNA (precursor-miRNA) に対してのみ、検索できるシステムは整っていない。一方、Wet 解析に関しては、miRNA の作用は標的 mRNA の翻訳抑制あるいは分解であるので、miRNA を介するオフターゲット効果については、前者は蛋白、後者は mRNA で評価しなければいけない。しかしながら、そもそも miRNA の機能は「1つ

の miRNA が数十から種百の mRNA を標的とし、それぞれの発現を“弱く”抑制することで、転写全体のバランスを保つ」というものである。仮にオフターゲット効果として何かしらの miRNA を阻害しても、Wet 解析で検出することは困難と考えられる。*in silico* で検索できるシステムの構築が重要であろう。

以上、それぞれのアンチセンス医薬品に関し、オフターゲット効果が起こりうる点を列挙し、それぞれに対する評価法とその限界を示した。これは、医薬品候補の安全性評価に必ずしも必要というわけではない。現状では検討が行われていないので、「オフターゲット効果が実際に起こるのか」に関して、モデル遺伝子を使って基礎的データを取得する必要があると考えられる。

## 2. Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証

上述のように、Gapmer 型アンチセンスは最も開発段階の進んだ核酸医薬品でありながら、オフターゲット効果の発現は検証されておらず、どれくらいの相補性を持つ mRNA が影響を受けるのかは不明である。そこで、本年度(平成 25 年度)は、Gapmer 型アンチセンスをヒト細胞に添加し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の発現を網羅的に検証した。以下に解析の詳細を述べる。なお、本研究の成果は投稿準備中であるため、具体的な配列、数値、図表に関しては現時点では公開しないこととし、導かれる結論に重点をおいて記述する。

### 2.1 細胞株の選択

生物種によってゲノム配列は異なるため、ヒトに投与する核酸医薬品の「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関しては、ヒト由来の細胞/組織で検証する必要がある。現在では、ヒト化マウスやヒト iPS 細胞由来の組織など、

ヒト組織を人工的に作出する技術があるが、現状ではこれらのツールは発展途上であり、一定の規格を保証できる状況にない。また、初代培養ヒト細胞は最初のトライアルとしては扱いにくい。従って、本研究では株化ヒト細胞を用いることとした。また、オンターゲット遺伝子に関しては、内在遺伝子の発現に影響を与えないように、外来遺伝子の GFP (Green Fluorescent Protein) を用いることとした。以上の考察のもと、複数の細胞株で検討を行い、アンチセンスが効率よく作用する「GFP 安定発現 HEK293 細胞」を選択した。

## 2.2 Gapmer 型アンチセンスの配列スクリーニング

Gapmer 型アンチセンスは mRNA を分解する作用を有するが、siRNA と比較すると配列の選択は難しい。すなわち、siRNA はよく効く配列を選ぶプログラムが複数公開されているので、効果の高い siRNA を容易に同定できるが、Gapmer 型アンチセンスに関してはプログラムが存在せず (存在しても公開されていないために)、細胞ベースでスクリーニングを行う必要がある。我々は、現在開発が進んでいる Gapmer 型アンチセンスの塩基長が短くなっていることを念頭におき (図表 12)、本研究で用いるアンチセンスの長さを 13~14 塩基長とした。また、Gapmer 型アンチセンスの両端に配置した修飾核酸 (mRNA との結合力を増強させる修飾核酸、図 8 参照) は現在開発が進むアンチセンスでも用いられている LNA とした。実際にオフターゲット効果の検証に用いた「GFP アンチセンス A」および「GFP アンチセンス B」の配列スクリーニングの経緯は以下のとおりである。

GFP アンチセンス A : GFP mRNA に対するアンチセンスを 60 本以上作成して、GFP 安定発現 HEK293 細胞を用いたスクリーニングを行い、「GFP 発現を 15%まで減少させるアンチセン

ス」として同定した。

GFP アンチセンス B : 我々が独自に作成した検索プログラム (本研究 24 年度の成果) を用いて、「最も多くのヒト mRNA の相補するアンチセンス」として同定した。GFP の発現を 50%まで抑制する。

## 2.3 マイクロアレイ解析の条件設定

アンチセンス医薬品はキャリアを用いない Naked な状態で投与されるが、本研究ではできるだけ効率よくオフターゲット候補遺伝子 (mRNA) とアンチセンスを相互作用させるため、遺伝子導入試薬 (Lipofection2000, Invitrogen) を用いた。コントロールは Lipofection2000 のみの添加、回収時間はオンターゲット遺伝子 (GFP mRNA) が最も効率よく発現抑制される添加 24 時間後、アンチセンス濃度は細胞毒性が出ないことを確認した上で、GFP が十分に抑制される 50 nM とした。実験群は「コントロール、GFP アンチセンス A、eGFP アンチセンス B 各 n=3」である。用いたマイクロアレイは Human Genome U133 Plus2.0 Array (Affymetrix 社)、データ解析は GeneSpring を使用した。なお、「オフターゲット効果が生じている」と判断する基準に関しては、コントロールと比較して、標的遺伝子以外の遺伝子の発現が 50%未満まで低下した場合と規定した。これは、遺伝子改変技術により作製された遺伝子ヘテロ欠損マウスは、ほとんどの場合、表現型を示さないこと、ヒトの機能欠損型変異による遺伝性疾患に関しても、多くの場合、ヘテロ欠損では異常が現れないこと (ヘテロ欠損で異常が現れたとしても忍容性が高いと考えられること) による。すなわち、遺伝学的な知見から、遺伝子発現が 50%程度保たれていれば機能的に大きな異常を伴わないと考えられる。

## 2.4 マイクロアレイ解析の結果および考察

以上の解析から、以下の点が明らかになった。

- ・完全相補する標的外遺伝子は、その 60%以上が 50%未満まで発現抑制される。
- ・1 塩基ミスマッチを持つ遺伝子であっても、40%程度の遺伝子は 50%未満まで発現抑制される。
- ・2 塩基ミスマッチを持つ遺伝子でも、50%未満まで発現抑制されるケースがある。ただし、その発生確率は小さいと見積もられる。

以上の解析結果から、13 塩基長の Gapmer 型アンチセンスの場合、少なくとも 1 塩基ミスマッチを有する遺伝子までは、オフターゲット候補遺伝子として *in silico* 解析でピックアップする必要があり、発現抑制の程度をヒト細胞で解析するのが適当と考えられる。図表 12 に示したように、13 塩基長のアンチセンスでは 1 塩基ミスマッチを持つ mRNA は理論的には 52 個存在しており、定量 PCR 等で個別に解析するよりも、マイクロアレイを用いた網羅的解析の方が効率がよいと考えられる(効率のみならず、2 塩基ミスマッチを持つ mRNA の挙動も同時に解析できる利点がある)。

### D. 結論

現在、オフターゲット効果の評価に関しては、統一した見解が得られていないが、楽観的には、「完全相補する mRNA の数は限られているので、まず *in silico* 解析を行う。ヒットした遺伝子に関しては情報を収集し、必要があれば、その遺伝子の発現変動を確認しておく。」という見方がある。これは、既に上市されている Gapmer 型アンチセンス Kynamro®の知見に基づく部分が大きいように感じられる。すなわち、20 塩基長の Kynamro®では、「完全相補、1 塩基ミスマッチの mRNA は存在せず、2 塩基ミスマッチを持つ 4 つの遺伝子ではオフターゲット効果

は起こらなかった」という記載がある。これにより、「オフターゲット候補遺伝子はそもそも数えるほどしかなく、ミスマッチがあっても発現抑制ケースは少ないのではないか」という認識が広がっていると予想される。Kynamro®では修飾型核酸として 2'-MOE が用いられているが、現在開発されている Gapmer 型の中には 2'-MOE よりはるかに結合力が強い架橋型核酸が使用されるものが含まれており、本研究で用いた架橋型核酸 LNA がその代表例である。今後はミスマッチを持つ mRNA でもオフターゲット効果が十分起こりうるという前提に立って安全性評価を行うべきであろう。

なお、報告書の中では混乱を避けるため、「アンチセンスの塩基長が長ければ長いほど配列を認識する特異性が高く、オフターゲット効果が起こりにくい」という前提で記載した。これは大枠では正しいが、一方で、「塩基長が長ければ長いほど、標的 RNA との結合力は大きくなり、その結果、多少のミスマッチがあっても RNA と相互作用することができる」という側面も考えられる。すなわち、塩基長の長いアンチセンスはミスマッチを許容しやすいと予想される。本研究において、13 塩基長のアンチセンスで 1 塩基ミスマッチの mRNA を分解できたことを考慮すると、13 塩基よりも長いアンチセンスでは 2 塩基ミスマッチ、3 塩基ミスマッチまで認識し、オフターゲット効果を示す可能性も考えられる。この点に関しても、今後検証する必要がある。

### E. 研究発表

1. 論文発表
  - 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)，東京(2014)，印刷中
2. 学会発表
  - 1) 吉田徳幸，内田恵理子，小比賀聡，佐藤



- 陽治, 井上貴雄:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 日本薬学会第 134 年会(2014.3)(熊本)
- 2) 井上貴雄:「核酸医薬開発の動向と課題」, 医薬基盤研究所講演会(2013.12)(大阪)
- 3) 吉田徳幸, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治, 井上貴雄:「核酸医薬品のオフターゲット効果に関する基盤研究」, 第 11 回アンチセンスシンポジウム(2013.11)(徳島)
- 4) 井上貴雄:「核酸医薬品の現状と課題(総論)」, ライフサイエンス技術部会 材料分科会講演会(核酸医薬研究の最前線 ~有機合成からのアプローチ~)(2013.11)(東京)
- 5) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の動向と課題」, 第 144 回ヒューマンサイエンス エキスパート研修会(核酸医薬品開発を巡る国際的展望と期待 -核酸医薬は新薬開発の突破口となるか-)(2013.10)(東京)
- 6) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato:「In Silico Analysis of Off-target Effects of Oligonucleotide Therapeutics」, 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society(2013.10)(Naples)
- 7) 吉田徳幸, 井上貴雄, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 第 5 回日本 RNAi 研究会(2013.8)(広島)
- 8) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の現状と課題

およびガイドライン策定に向けた取り組み」, ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査 WG 会議(2013.7)(東京)

- F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当無し。

図表 1

## 核酸医薬品の分類

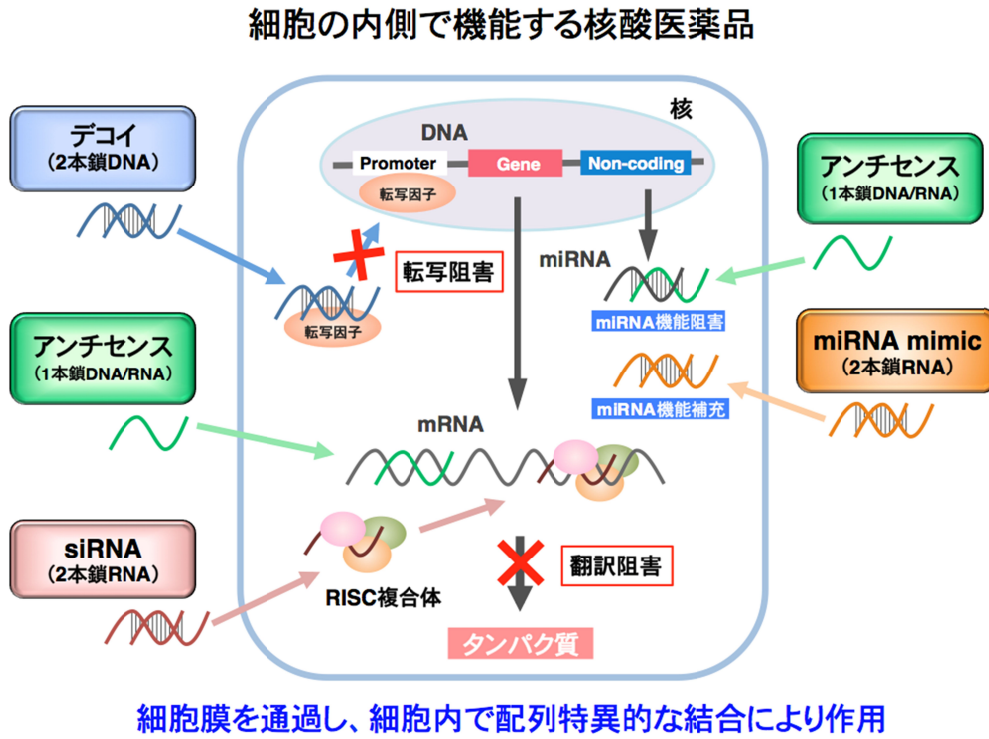
	アンチセンス	miRNA アンチセンス	siRNA	miRNA mimic	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖RNA, ヘアピン1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
標的	mRNA Pre-mRNA	miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞"外" (エンドソーム内)
作用機序	mRNA分解 スプライシング 阻害	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, Prosensa, Sarepta	Santaris, Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

図表 2

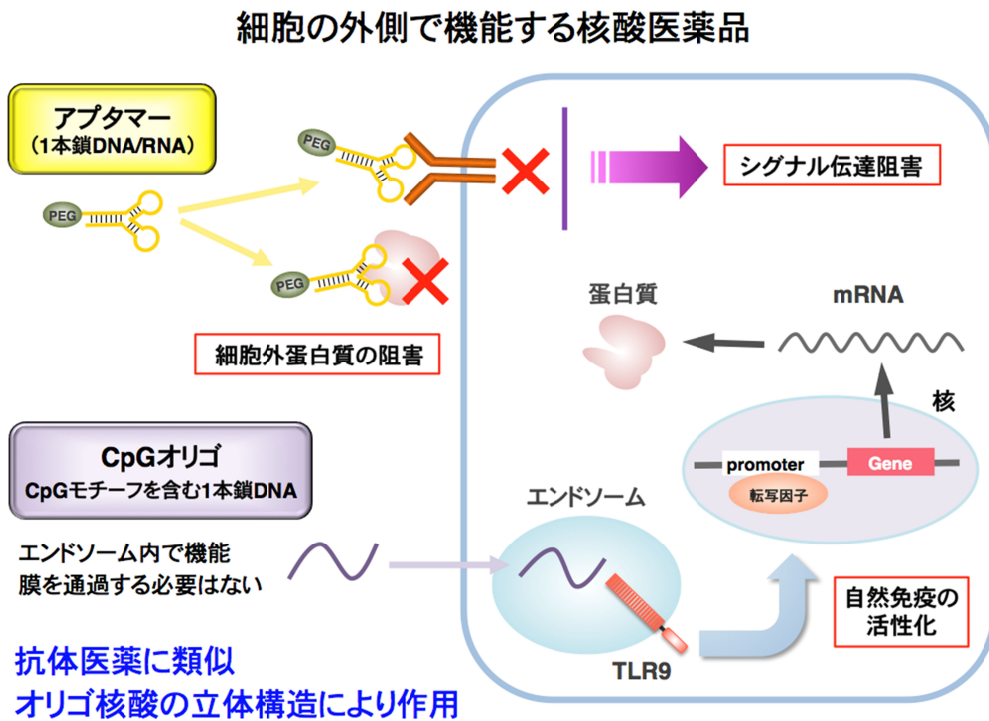
## これまでに上市された核酸医薬品

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

図表 3

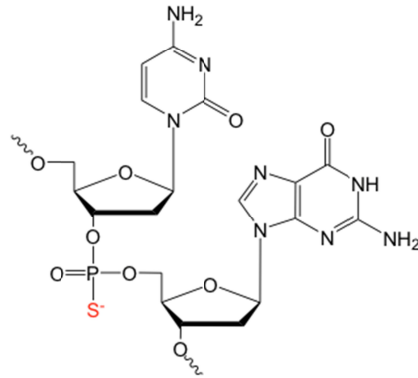


図表 4



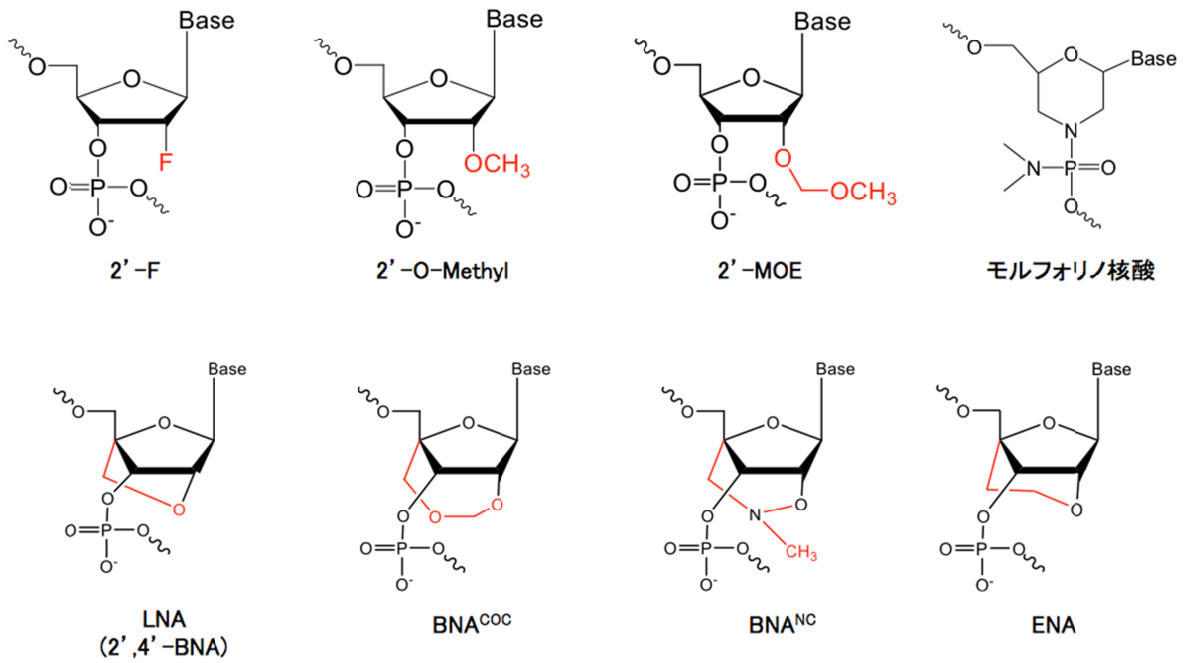
図表 5

代表的なリン酸部の修飾  
(ホスホロチオアート化)



図表 6

代表的な糖部の修飾



図表 7

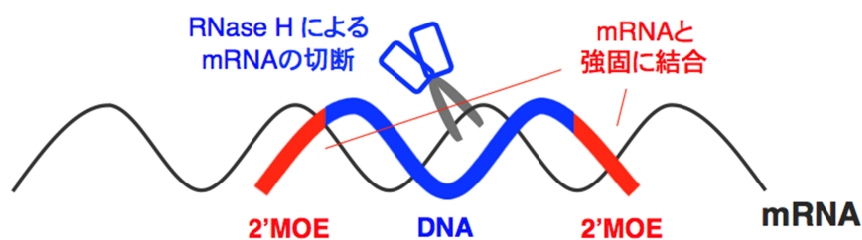
### RNAを標的とする核酸医薬品の分類

	アンチセンス			siRNA
	Gapmer型	スプライシング 制御型	miRNA 阻害型	
開発品目数 (臨床試験&上市)		~50 (Phase3:8品目, 上市:2品目)		~15 (Phase3:1品目)
標的	mRNA	pre-mRNA	miRNA	mRNA
作用原理	RNase H	立体障害	立体障害	RISC
作用機構	mRNAの分解	pre-mRNAとスプライス因子 の結合阻害	miRNAとmRNA の結合阻害	mRNAの分解
標的RNAを認識する 塩基長	12-21	20-30	12-16	19
オフターゲット効果が生じる 配列法則性	未解明	未解明	未解明	解明

図表 8

### Gapmer型アンチセンスの構造と作用機構

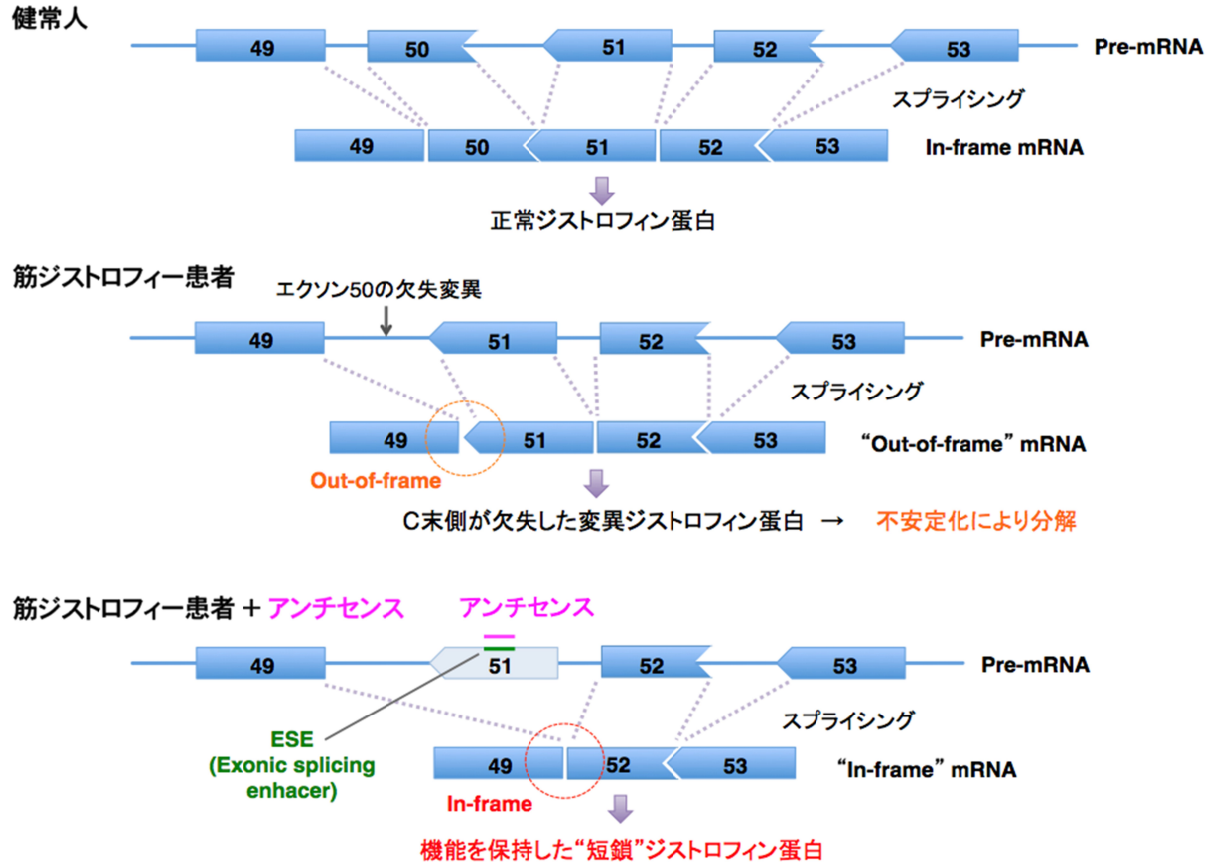
RNase H: DNA/RNA二本鎖を認識し、RNAを切断するエンドヌクレアーゼ



- オリゴ核酸の両端にmRNAとの結合力が強い「糖部を修飾した修飾型核酸 (2'-MOE、LNA、ENA等)」を導入する。
- オリゴ核酸の中央“Gap”部分はRNase Hが基質として認識できるよう、DNA骨格にする(すなわち、糖部の2'位を修飾しない)。
- 一般に、Gapmer型アンチセンスはリン酸部がS化されている。

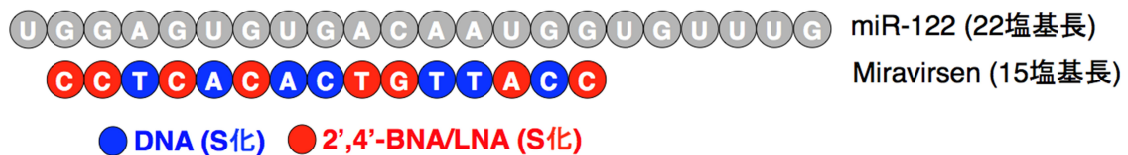
図表 9

### スプライシング制御型アンチセンスの作用機構



図表 10

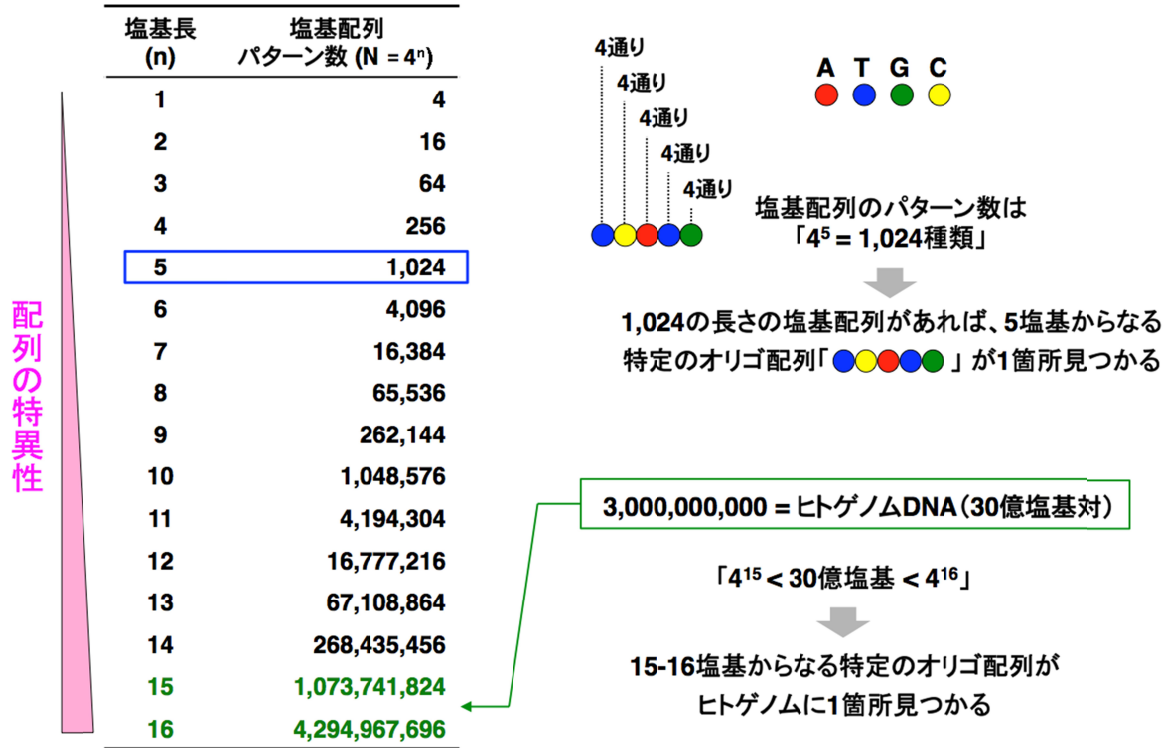
### miRNA阻害型アンチセンス (Miravirsen) の構造



RNAとの結合力の強い架橋型核酸をオリゴ核酸内に散りばめて配置 (“Mixmers”と呼ばれる)

図表 1 1

### 塩基長と塩基配列パターン数



図表 1 2

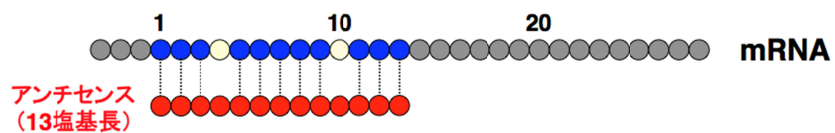
アンチセンスの塩基長	ヒトmRNAコード領域に存在する相補配列の数 (オフターゲット候補遺伝子の数)			
	0塩基 ミスマッチ	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ	3塩基 ミスマッチ
22	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	1.1×10 <sup>2</sup>	2.1×10 <sup>-1</sup>
21	<10 <sup>-3</sup>	1.3×10 <sup>3</sup>	3.9×10 <sup>2</sup>	7.3×10 <sup>-1</sup>
20	<10 <sup>-3</sup>	4.9×10 <sup>3</sup>	1.4×10 <sup>1</sup>	2.5
19	<10 <sup>-3</sup>	1.9×10 <sup>2</sup>	5.0×10 <sup>-1</sup>	8.6
18	1.3×10 <sup>3</sup>	7.1×10 <sup>2</sup>	1.8	29
17	5.2×10 <sup>3</sup>	2.7×10 <sup>1</sup>	6.4	96
16	2.1×10 <sup>2</sup>	1.0	23	317
15	8.4×10 <sup>2</sup>	3.8	79	1030
14	3.4×10 <sup>-1</sup>	14	275	3295
13	1.3	52	941	>10 <sup>4</sup>
12	5.4	193	3186	>10 <sup>4</sup>
11	21	708	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
10	86	2575	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>

上市されている Gapmer型アンチセンス (Kynamro®)

近年開発されている Gapmer型アンチセンス

図表 1 3

オフターゲット効果が生じる遺伝子数の見積もり  
(13塩基長)



		0塩基 ミスマッチ	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ
数理計算	理論値	1.3	52	941
	遺伝子A (n=2383配列)	4.1 ± 10	101 ± 93	1238 ± 651
in silico 解析	遺伝子B (n=1389配列)	3.0 ± 3.8	88 ± 68	1166 ± 568
	遺伝子C (n=1423配列)	2.8 ± 4.4	85 ± 82	1132 ± 590

→ ミスマッチを持つmRNAが発現抑制されるかを検証する必要あり



タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性に関する研究

分担研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

研究要旨 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。

A. 研究目的

革新的医薬品として注目を集めているタンパク質性医薬品の品質変化は化学的な分解とともに、分子の高次構造の変化を伴う物理的な変化によっても引き起こされ、有効性、安全性に影響を及ぼす。低分子医薬品に比べ分解メカニズムが複雑であり、医薬品添加剤が品質変化に及ぼす影響も複雑である。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。

本研究においてはタンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼす有効成分側、医薬品添加剤側の因子に関する調査を行うとともに、特に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や、有効成分と添加剤との相互作用を評価する手法を開発する。特に、近年タンパク質の安定性との関連が示唆される緩和時間等の分子内の局所的な運動性を指標にした評価法について検討する。局所的な運動性はタンパク質医薬品の疎水性相互作用によるタンパク質の凝集反応や酸無水物中間体を経る脱アミド反応に関連することが示唆されている。タンパク質医薬品の安定性に影響を及ぼす因子と実測される保存安定性との関連を明らかにし、安定性評価法と

しての標準化をめざす。

NMR 緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎの保存安定性の指標となりうることが示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が 5%程度あれば  $^{13}\text{C}$ -NMR の測定が可能であり、抗体医薬の市販剤中のタンパク質の運動性評価に適用できることを明らかにした。本年度はいくつかの抗体医薬の市販剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を变化させた試料について緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。

B. 研究方法

$^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間の市販剤中のタンパク質の局所的な運動性の評価への適用性についてはヒュミラ皮下注(アダリムマブ)、アクテムラ注(トシズマブ)、レミケード注用(インフリキマブ)を用いて検討した。レミケード注用は凍結乾燥品であり、5%溶液になるよう水を加え溶解したものについて測定した。緩和時間は Inversion-recovery 法によって 20 において測定した。変性温度はマイクロ熱量計(TAM、TA Instruments)を用い、毎時 1 の昇温速度で測定した。

(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。

## C. 研究結果

### 1) タンパク質の動的な揺らぎの $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間による評価

NMR 緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎが保存安定性の指標となりうるということが示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が 5% 程度あれば  $^{13}\text{C}$ -NMR の測定が可能であり、タンパク質カルボニル炭素の緩和時間の測定が可能であることを明らかにした。本年度は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低下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。溶液状態の試料においては NMR 緩和時間が長いほど分子運動性が良いので、ヒュミラ皮下注に処方されるアダリマブについては、塩濃度が高いほど分子運動性が高いと考えられる。アクテムラ注に処方されるトシズマブのカルボニル炭素の緩和時間は 2.5s、レミケード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。

### 2) 示差走査熱量測定による変性温度の測定

タンパク質溶液を一定速度（毎時 1 ）で昇温すると変性に伴う吸熱が観測される。吸熱のピーク温度は変性温度 ( $T_m$ ) といわれ、タンパク質の熱的安定性の指標として用いられる。pH や緩衝塩濃度を変えて測定した変性温度と保存試料の動的な光散乱の経時的な増加によって見積もられる凝集速度との間に関連があることが報告されており、変性温度は保存安定性の指標として用いることができると考えられる。そこで、本研究におい

ては市販製剤中の抗体タンパク質の保存安定性の指標として  $T_m$  を用いた。ヒュミラ皮下注の変性温度の測定例を Fig. 1 に示す。毎時 1 の昇温速度で試料温度を上昇させると 65 付近に吸熱ピークが観測された。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  $T_m$  は高温にシフトし、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低温にシフトした。表 1 にいくつかの市販製剤中の抗体タンパク質の変性温度を示す。ヒュミラ注に処方されるアダリマブの変性温度は、塩の濃度の他に pH の影響も受け、pH5 にくらべ pH6 の方が高い変性温度を示した。また、アクテムラ注に処方されるトシズマブの変性温度も溶液の pH、塩濃度の影響を受けることが示された。

抗体タンパク質のカルボニル炭素の  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間と変性温度との関係を Fig. 2 に示す。緩和時間が大きく分子運動性が高いと考えられる試料ほど、変性温度が低く不安定であることが示された。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を示唆するものとする。

## D. 考察

本年度の検討により、保存安定性の指標として用いたタンパク質の変性温度とカルボニル炭素の  $^{13}\text{C}$ -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。関連を結論付けるためには更なる検討が必要であると考えられる。たんぱく質の保存安定性の指標として用いた変性温度については、相対的な安定性の比較が可能であり、溶液の pH や緩衝塩の濃度によって  $T_m$  が変化し、高い  $T_m$  が観測される溶液における凝集が起こりにくいことは明らかであるが、タンパク質間の保存安定性の比較に適用が可能かについては不明である。今回検討した抗体タンパク質においては、タンパク質が異なっても、見かけ上変性温度と緩和時間に関連があるように見える。今後、凝集等の保存安定性を実測し、 $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和

時間との関連を明らかにする必要があると考える。NMR 緩和時間と保存安定性との関連が明らかにできれば、実時間での保存に比べ、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。

#### E. 結論

タンパク質の高次構造の揺らぎを  $^{13}\text{C}$ -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。動的な揺らぎの指標である  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間は保存安定性の指標として用いた変性温度と関連することが示唆され  $^{13}\text{C}$ -NMR 緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 阿曾幸男, 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. 公衆衛生, 印刷中(2014)

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

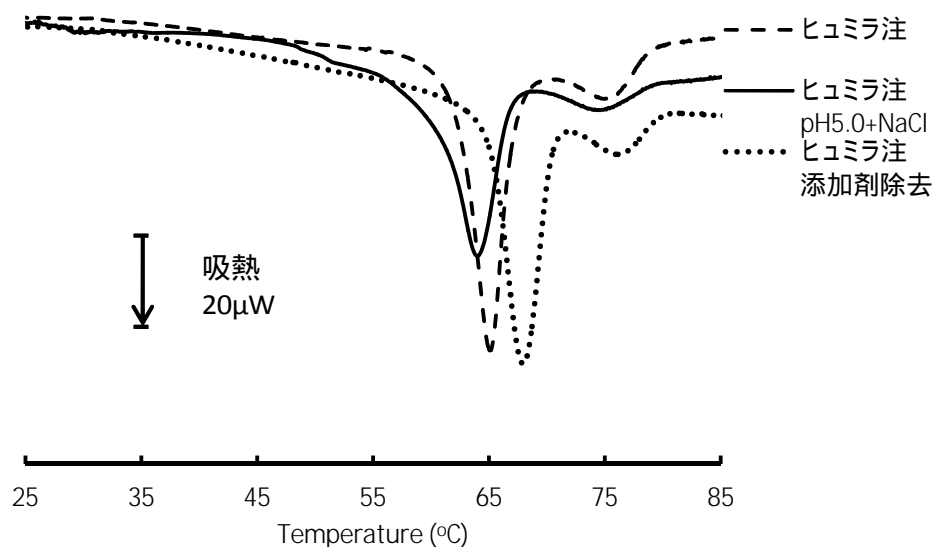


図 1 変性温度の測定例

表 1 変性温度に及ぼすpH、塩濃度の影響

	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
ヒュミラ注	64.8	75.0	
ヒュミラ 水 透析	67.7	77.4	
ヒュミラ pH6.0 透析	67.2	75.7	
ヒュミラ pH8.0 透析	67.1	74.2	
ヒュミラ pH5.0 透析	65.4	75.0	
ヒュミラ pH5.0+0.9%NaCl 透析	63.3	74.6	
アクテムラ注	70.6	76	85.3
アクテムラ 水 透析	71.3	75.5	85.7
アクテムラ pH6.0 透析	71.1	76.7	85.6
アクテムラ pH6.0+0.9%NaCl 透析	67.6	74.8	85.5
レミケード 50mg/mL	64.4	66.2	77.3

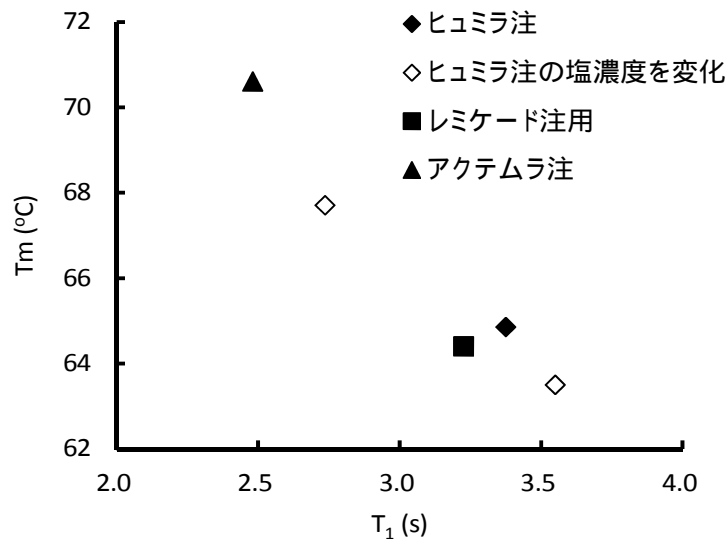


図 2 変性温度と <sup>13</sup>C-NMR 緩和時間の関係

## 遺伝子治療用医薬品の評価に関するレギュラトリ サイエンス研究

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリ サイエンス研究の一環として、今年度は染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの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法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。これらの結果は、現在実施中の遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等において活用していく予定である。

研究協力者

五十嵐 友香 国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部協力研究員

### A. 研究目的

本研究は、革新的医薬品としての遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリ サイエンス研究として、(1) 遺伝子治療用医薬品のヒト初回臨床試験の実施に当たっての条件(品質および安全性の確認)の明確化とその手法の開発、(2) 遺伝子治療用医薬品の有用性、安全性を確認・確保するための評価法の開発およびその標準化、(3) 遺伝子治療用医薬品を承認申請するに当たって考慮すべき要件の明確化および基準の作成を目的としている。

昨年度は、国内外の遺伝子治療用医薬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、遺伝子治療用ベクターとして、最近、特に開発が進んでいるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター製品の開発と品質、安全性確保に関する要件を検討した。また、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法開発の一環として、デジタル PCR の活用に関する検討を開始した。今年度は、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題として挿入変異のリスクについて検討した。また、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価の一環として、デジタル PCR を活用した比活性の評価及び遺伝子導入細胞でのベクターの残存性について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 染色体組込型ベクターの開発動向及び安全性確保

染色体組込型ベクター製品の開発動向は関連する論文や書籍、学会等の情報を基に検討した。リスク評価については、EMA のガイダンス及び関連する論文を中心に検討した。

### 2) 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法

#### (1)レトロウイルスベクターの産生

Gp91phox 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター産生細胞(パッケージング細胞)の培養は、80%コンフルエントな状態で培地交換を行い、経時的にレトロウイルスベクターを含む培養上清を回収して試料とした。

比活性比較のための試験では、次の条件でレトロウイルスベクター上清を回収した。

#### Group A (培地交換なし)

培養開始から 6 時間後に上清回収

培養開始から 24 時間後に上清回収

培養開始から 48 時間後に上清回収

培養開始から 72 時間後に上清回収

#### Group B (培地交換あり)

培養開始 6 時間後に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 24 時間後 (培地交換 18 時間後) に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 48 時間後(培地交換 24 時間後)に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 72 時間後(培地交換 24 時間後)に上清回収、fresh medium を添加

#### (2)ウイルスゲノムコピー数の定量

各レトロウイルスベクター上清 160  $\mu$ l から NucleoSpin RNA virus キット(タカラバイオ)を用いてウイルス RNA を抽出し、50 $\mu$ l の TE 液に懸濁した。得られた RNA 試料について、デジタル PCR ( QX100 Droplet Digital PCR

システム ; BioRad 社 ) を用いてウイルスゲノムコピー数を測定した。PCR 反応試薬は OneStep RT-ddPCR kit for probes(BIO-RAD 社)を用い、以下のプライマー、プロ - プを使用した。

Forward ; GGCATCGCAGCTTGGATACA

Reverse ; CCCTCATTCACAGCCCAGTTC

Probe ; [6-FAM]ACGTGAAGGCTGCCGACC  
CCG[BHQ1a-6FAM]

Tm temp. : 60 degree

なお、いずれのサンプルも triplicate で測定した。

#### (3)レトロウイルスベクターの感染力価の測定

レトロネクチン(タカラバイオ)をコートした 6 well dish を用意し、翌日 1 well あたり  $1.8 \sim 2.0 \times 10^6$  個の K562 細胞 (p67phox、p47phox 遺伝子導入済み)を播種後、各ウイルス上清を 4 ml とプロタミン 4 $\mu$ l を添加し、32 で 2 時間、2000G で遠心することにより感染させた。感染操作後、fresh medium に交換して培養した。感染翌日、同じ手法を用いて再度感染操作を行った。その後、37 , 5% CO<sub>2</sub> で 3 日間培養後、細胞内染色(gp91, 7D5)を行い、フローサイトメーターを用いて細胞への感染率を感染力価として算出した。

#### (4)遺伝子導入細胞でのウイルス残存性

細胞への遺伝子導入は、レトロウイルスベクターと K562 細胞を混合後、レトロネクチン使用して 32 で 2 時間の遠心により行った。感染後、遠心分離により上清としてウイルス液を回収し、遺伝子導入細胞のペレットは  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度になるように PBS(-)を 18ml 添加して調製し、遠心洗浄する行程を 4 回繰り返した。感染用ウイルス液、感染後の残存上清及び 4 回の洗浄液を回収した上清の 計 6 サンプルについて、ウイルスコピー数を ddPCR を用いて評価した。なお、洗浄操作による残存ウイ

ルス粒子数の減少の理論値は、遠心後の細胞上清を吸引廃棄した後の残存液量をおよそ 50 $\mu$ l と仮定し、そこに PBS を 18 ml 添加して洗浄することから、理論的には 1/400 ずつ希釈されていくとして算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面への配慮が必要な試料・資料は取り扱わなかった。

## C. 研究結果

### C.1. 染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題

#### C.1.1 染色体組込型ベクターの開発動向

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、トランスポゾンなど、染色体にゲノムを組み込むための機構を有するベクターを指す。染色体に組み込まれることにより、細胞分裂でも遺伝子は失われず、長期間の持続的遺伝子発現が必要な単一遺伝子疾患や分裂細胞での長期発現を目的とする遺伝子治療で広く活用されている。

染色体組込型ベクターは、主に *ex vivo* 遺伝子治療で遺伝性疾患またはがんを対象に用いられている。単一遺伝子疾患に対する治療法としては、*ex vivo* で造血幹細胞に欠損遺伝子を導入する造血幹細胞遺伝子治療が主に行われている。アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)、Wiscott-Aldrich 症候群 (WAS)、慢性肉芽腫症 (CGD) などの先天性免疫不全症やサラセミア、中枢神経疾患の副腎白質ジストロフィー (ALD) などに対して実施された *ex vivo* 造血幹細胞遺伝子治療では、1 回の投与で長期にわたる有効性を示す論文が報告されている。ADA-SCID の遺伝子治療用レトロウイルスベクターは、現在 GSK 社により第 3 相臨床試験が海外で実施中である。

一方、がんに対する遺伝子治療では、染色体

組込型ベクターを用いて、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) や、がん抗原を認識する単鎖抗体の抗原認識部位と T 細胞のシグナル伝達ドメインを結合したキメラ抗原受容体 (CAR) を導入した自己の遺伝子改変 T 細胞を用いる養子免疫遺伝子治療製品の開発が急速に進展している。特に、レンチウイルスベクターを用いて B 細胞抗原 CD19 を認識する CAR 遺伝子を導入した遺伝子改変 T 細胞は、慢性リンパ性白血病患者に対し 3 名中 2 名で完全寛解が得られたという (*Sci. Transl. Med.* 3, 95, 2011)。また悪性度の高い小児白血病患児 2 例でも完全寛解を達成したと報告されている (*NEJM* 368, 1509, 2013)。この製品は、Novartis 社が開発中であり、日本でも臨床試験が開始の予定である。

その他にも遺伝子治療の変法として、白血病治療のための同種造血幹細胞移植後の T 細胞輸注療法において、自殺遺伝子のヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を導入した同種 T 細胞を投与することにより、重篤な移植片対宿主病 (GVHD) が発症した場合にガンシクロピルの投与により HSV-TK 導入細胞を死滅させる自殺遺伝子治療が利用されている。

染色体組込型ベクターを用いた日本の遺伝子治療の現状としては、遺伝性疾患では ADA 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究が北大で実施され、10 年以上の長期有効性が報告されているほか、CGD の遺伝子治療が成育医療研究センターで承認されている。がんに対する遺伝子治療では、TCR 遺伝子治療の臨床研究が三重大で 2 件実施されている。そのうち昨年より開始された臨床研究では、内因性 TCR と遺伝子導入した TCR とのミスペアリングを防ぐために、内在性 TCR に対する siRNA をがん抗原の WT1 特異的 TCR 遺伝子とともに T 細胞に導入する方法が採用されており、siRNA をベクターで投与する初めての臨床研究となる。また、GVHD 発症予防の遺伝子治療も筑波大とがんセンター

で実施されている。今後、CAR 遺伝子治療も自治医大で開始される予定である。

一方、九州大では、網膜色素変性症に対してサルレンチウイルス (SIV) ベクターを用いた *in vivo* 遺伝子治療臨床研究が、昨年、厚生科学審議会で承認された。本ベクターは我が国で独自に開発されたレンチウイルスベクターであり、本ベクターを用いた First-in-Human の遺伝子治療臨床試験が昨年より実施され、すでに複数の患者に投与されている。このように、さまざまな製品の開発がわが国でも進められており、遺伝性疾患を中心に、レトロウイルスベクターからレンチウイルスベクターへと開発のトレンドが移りつつある。

### C.1.2 染色体組込型ベクターの安全性確保の課題

染色体組込型ベクターは、染色体にベクターが組込まれることにより長期間の遺伝子発現が可能となる長所を持つ一方で、染色体にランダム・セミランダムに組み込まれるため、挿入変異によるがん化の可能性がある。遺伝子治療が開始された当初から、挿入変異によるがん化のリスクは指摘されていたが、ランダムな組込では確率論的に見てがん化のリスクは極めて低いものと考えられていた。しかし、X-SCID の遺伝子治療においてがん原遺伝子の LM02 遺伝子座にベクターが挿入されることにより白血病が発症し (science 302, 415, 2003)、その後、フランス、イギリスで実施された計 20 名の患者のうち 5 名という極めて高い頻度で挿入変異による T 細胞性白血病の発症が認められたことから、レトロウイルスベクターでは挿入変異が安全性上の最大のリスクと考えられるようになった。しかし、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は全て高リスクというわけではないことも判明している。EMA は 2013 年に、Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional

mutagenesis (挿入変異の臨床リスク管理に関するリフレクションペーパー) を発出している。このリフレクションペーパーや関連論文、資料等を基に、染色体組込型ベクターの挿入変異リスクの管理と挿入変異リスクの評価法について検討した。

#### (1) レトロウイルスベクターの挿入変異リスク

レトロウイルスベクターは、これまで 300 以上の臨床プロトコルで使用されている。先天性免疫不全症に対して行われた造血幹細胞を標的とする遺伝子治療では、有効性が確認されている一方、前述の X-SCID に加え CGD、WAS に対する遺伝子治療を受けた患者でも造血系の異常 (白血病及び骨髄異形成症候群) が認められ、合計 12 名に達している (Table 1)。異常が確認された全てのケースで、ベクターの癌遺伝子近傍への挿入が確認されており、癌遺伝子が活性化したことががん化の原因と考えられる。しかし、このような挿入変異による造血系の異常は、今のところ造血幹細胞を標的とした先天性免疫不全症に限定されている。レトロウイルスベクターは T 細胞への遺伝子導入も数多くの被験者に対して実施されているが、これまで白血病発症は認められていない。また、X-SCID 等と同じ先天性免疫不全症で、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が行われた ADA-SCID では、LM02 や MDS-EV11 といったがん遺伝子領域への挿入が確認されているにもかかわらず、治療後 10 年以上経過しているが、がんの発症は認められていない (Table 1)。また、まだ経験が短く例数も少ないこともあるが、同じく染色体組込型ベクターであるレンチウイルスベクターでは、これまで サラセミアでクローン優位性が確認されたもののがん化の発症は確認されていないなど、一概に染色体組込型ベクターあるいはレトロウイルスベクターといってもリスクは同じではない。



これまでの経験から、がん化が認められているのは特定の対象疾患 (X-SCID, WAS) 、または特定の強力なエンハンサー・プロモーター活性を持つ Spleen Focus-Forming Virus (SFFV) 由来レトロウイルスベクターを使用した場合に限られている。一方で、白血病を発症した患者は、1名を除き白血病も免疫不全症も治癒している。これらの結果から、骨髄移植が実施できない重篤な先天性免疫不全症に対しては、以下の項に示すような十分なリスクへの対応策をとった上でということが前提になるが、リスク・ベネフィットを考慮すると造血幹細胞遺伝子治療のベネフィットがリスクに勝るものと考えられる。

## (2) 挿入変異によるがん化のリスク要因と対応策

染色体組込型ベクターが染色体に挿入されても、大部分はサイレントであるか、あるいは細胞が死滅するのみと考えられる。ベクターの組込による異常クローン増殖に必要な前提として、

- 形質転換能を持つがん関連遺伝子内にベクター挿入を持つ細胞クローン
  - ベクターが組み込まれたクローンが長時間生存すること
  - クローンの寄与が十分に高く、他のクローンよりも過剰に増殖すること
- の3点が挙げられる。

このようながん化のリスクに寄与する要因として、以下の点が重要と考えられる。

- ・ベクターデザイン(ベクター骨格と調節エレメントを含む)
- ・挿入プロファイル
- ・ベクターの投与量
- ・導入遺伝子産物
- ・標的細胞集団/臓器

### a) ベクターデザイン

染色体組込型ベクターの挿入変異リスクに寄与する主な要因として、ベクターがゲノムに挿入された際、近傍の遺伝子をトランスに活性化することが可能な強力なエンハンサー・プロモーター配列がウイルスベクターの LTR に存在することが挙げられる。LTR にあるウイルスそのもののプロモーターを除去した自己不活化 (Self inactivating ; SIN) LTR はそのようなリスクを排除できる。しかし、ベクターに組み込まれた導入遺伝子を発現させるためのエンハンサー・プロモーターからのトランス活性化能についても考慮する必要がある。現在の知見では、あまり強力でないプロモーターを選択する方が挿入変異リスクを低下させることが示唆されている。染色体組込型ベクターに存在するスプライスドナー・アクセプターサイトと polyA シグナルは、異常スプライシングを介して安全性に影響する別の転写産物を生じる可能性がある。ベクター固有の遺伝的不安定性も安全性モニタリングで考慮すべきである。

### b) 挿入プロファイル

ベクターがゲノムの特定の部位に組み込まれやすい傾向、例えばレトロウイルスベクターは転写開始部位に挿入されやすい傾向があるため、特定の遺伝子発現を増強する可能性がある。レンチウイルスベクターの挿入プロファイルはレトロウイルスベクターとは異なり、より安全性が高いと考えられる。また、特定のゲノムの位置を標的とした人工 zinc finger nucleas( ZFN )や TALE nucleas( TALEn )、CRISPR-CAS システムなどの遺伝子修正・遺伝子置換技術(ゲノム編集技術)を用いることで、ランダム、セミランダムな挿入によるリスクを低減することが期待される。しかし、これらのベクターの特異性とオフターゲット効果については、注意深い評価が必要となる。

### c) ベクターの投与量

遺伝毒性のリスクは患者に投与される遺伝子導入細胞数が増えるに従い増加する。また、これまでの経験から、細胞あたりのベクター組込数が増加するとリスクはさらに増加すると考えられる。細胞あたりの導入遺伝子量を減らすこと、治療効果が得られる範囲で導入細胞量を減らすとリスクを低減できると考えられる。

### d) 導入遺伝子産物

その他の重要な考慮点として、導入遺伝子産物とその作用機構、及びその産物の遺伝子発現制御の必要性が挙げられる。導入遺伝子産物が細胞の増殖制御に関与している場合、これが不適切に発現される場合（例えば、正常よりも高発現する場合や細胞系列の制限なく発現する場合）、挿入変異のリスクは高まり、さらなる変異を加速する可能性がある。

### d) 標的細胞集団/臓器

標的細胞集団/臓器もリスクに寄与する要因となる。一般に、発がんリスクは細胞・組織の成熟度と逆相関する。例えば、レトロウイルスベクターは造血幹細胞ではがん化を引き起こすが、成熟リンパ球ではがん化が認められないなど、細胞の遺伝的プログラムの相違によると考えられる。胎児組織への *in vivo* 遺伝子導入は、成人組織への導入と比べて相当高リスクと考えられる。Ex vivo 遺伝子導入では、細胞が暴露された *in vitro* での培養期間や増殖因子との接触などの状態や、遺伝子改変細胞として投与後の *in vivo* の状態も考慮すべきである。また、ベクターの転写活性を制御するメチル化状態などのエピジェネティックな状態や導入遺伝子配列も、ベクターによる発がん過程に影響する可能性がある。

### (3) 組込試験

一般に、特定のベクターが宿主細胞に永続的

に組込まれて長期間持続する場合、挿入変異のリスクについて非臨床及び臨床での組込試験で評価すべきである。非臨床サンプル、臨床サンプルを用いたベクター組込のゲノム分布の特性解析や分子レベルでのクローナリティー試験には数種類の方法が利用できる。患者での組込試験の必要性と試験の程度は、用いたベクターの使用経験、非臨床及び臨床試験結果に依存する。

新規ベクターでは、初期のフィージビリティ試験において、組込のプロファイルを調べることにより、ベクターの生物学的性質を理解し、安全性プロファイルの改善に役立つ重要な情報が得られる。例えば、特定部位を標的とするゲノム編集技術に基づいたベクターでは、組込試験は組込の特異性を決定する手段となる。組込型ベクターを用いる場合、*ex vivo* でも *in vivo* でも、関連する標的組織・臓器で組込試験を実施すべきである。臨床の組込試験は、非臨床試験で同定された安全性上の課題をモニタリングするために必要であり、特定の組込プロファイルが有害事象を引き起こしやすいかどうかを評価するのに役立つ。ベクターを *in vivo* 投与した後での組織・臓器からの組込部位の回収には、ベクターの持続性及び遺伝子導入量の検証を目的とした試験と組み合わせが可能な侵襲的方法が必要となる。有害事象が生じた場合、ベクター組込試験は原因となるベクター組込の役割の解明や、治療後の残存病変の検出に有用と考えられる。

### (4) 組込試験から得られる情報

ベクター組込部位の回収は、まずは移植した遺伝子導入細胞の代表サンプルを抽出し、特定のリスクのある遺伝子領域に組込を持つクローンの優性、拡大または増幅クローンの異常などの同定を目的とするべきである。組込部位についてより詳細に分析する場合は、各クローンの寄与を定量化可能な試験を計画する。

LAM-PCR などの手法とハイスループットシーケンスを組み合わせると、細胞あたりの組込ベクターコピー数とクローナリティー(ベクター組込により区別される異なる細胞クローン)に応じて、一つの試料から数百、数千の挿入部位を検出することができる。しかし、現在の手法ではまだ、定量の感度や精度とデータの解釈に限界がある。ベクター組込部位の大規模分析では、制限酵素を用いて目的 DNA を断片化するが、この手法は特定の PCR 産物の増幅にバイアスをかける可能性がある。制限酵素によるバイアスを減らし、定量精度を改善するために、組込部位の回収に制限酵素を用いない物理的切断などの方法が開発され、その有効性が現在評価されている段階である。非臨床及び臨床での安全性評価から得られる情報としては、

組込のクラスターの *in vivo* での有無

遺伝子導入細胞での各組込体の相対的寄与が挙げられる。

a) 共通挿入部位 (Common insertion sites ; CIS)

マウスを用いた挿入変異試験は、*in vivo* でのがん遺伝子の調節解除と発がんの誘導を調べる方法であるが、このスクリーニングで生じたがん細胞は、がん関連遺伝子近傍の Common insertion sites (CIS) と呼ばれる特定領域にベクターが組み込まれている。レトロウイルスベクターを用いて遺伝子治療を行った患者で生じた白血病・骨髄異形成細胞では、LMO2、MECOM、CCND2 等のがん遺伝子近傍に CIS が認められており、ある条件下では CIS は人でも挿入変異を予測するものと考えられる。しかし、CIS は必ずしもがん化による選択でエンリッチされたわけではなく、特定の染色体部位へのベクター組込プロファイルにバイアスがかかったためかもしれないことから、CIS のデータの解釈は注意深く扱うべきである。バイアスによる可能性を区別するには、

遺伝子導入時の *in vitro* でのベクター分布と *in vivo* でのベクター陽性細胞を比較する試験が必要である。CIS の分析は、現時点では試験集団でのベクターの挿入変異リスクに関する情報を提供するが、試験での個人のがん化を予測するものではないことを考慮する必要がある。

b) 遺伝子改変細胞クローンの定量

LAM-PCR 等の分子生物学的手法では、組込まれたベクターとゲノムとのジャンクションのシーケンスリード数に応じて、各遺伝子改変細胞クローンの寄与を定量的に評価することができる。しかし、挿入部位配列の計測による各クローンの測定頻度は、技術的な制約に影響される。当初、患者試料中の遺伝子改変細胞クローンの多様性は、LAM-PCR 産物の電気泳動での検出を基に推定され、バンドがわずかしか検出されない場合、遺伝子導入細胞はオリゴクローナルと見なし、多数のバンドのスミアとなる場合は多数の異なる挿入部位があることを示唆するためポリクローナルとみなした。しかし、LAM-PCR 産物の解析にハイスループットシーケンスを導入し、各成分からのリードの相対数が得られることで、新たな情報が得られている。例えば、X-SCID 遺伝子治療を行った患者 1 名の細胞の化学療法前後でのハイスループット分析により、ベクター-ゲノムジャンクションのシーケンス数は LMO2 へのベクター組込を持つ白血球クローンの動態とよく関連していた。また、遺伝子治療を行ったサラセミア患者で、HMGA2 領域にベクター組込があるクローンの相対的な存在比の決定に有用であった。しかし、LAM-PCR 法は制限酵素を用いることによる技術的バイアスを持つため、挿入部位の頻度はシーケンスで得られる結果と、LAM-PCR で相違が見られる場合がある。遺伝子導入効率が低い場合や、わずかな細胞集団からなるクローンの過大評価を避けるには、

ベクター-ゲノムジャンクションのシーケンス数は、分析試料中の遺伝子導入細胞の頻度を考慮すべきである。

現時点では、分子生物学的データのみでは十分ではなく、他の生物学的あるいは免疫学的アッセイから得られたデータと臨床での知見を組み合わせることが推奨される。遺伝子治療後の患者のフォローアップには、同一の組込部位を持つ細胞の持続性とその寄与を調べることが望ましい。制限酵素を用いない挿入部位の回収法が最近開発されており、制限酵素に依存しない方法が確立されれば、ベクター挿入試験に用いることができるようになる。

これらの試験では、方法の再現性、感度、特異性等、試験法を検証するための内部標準が重要である。バリデーションでは、同一時点での細胞のサンプリングと配列解析を繰り返し実施し、得られたシーケンスリードによりサンプル調製とシーケンスのバイアスの影響を評価する必要がある。この試験は、各試料に含まれる組込部位のカバー率の推定に有用である。

#### (5)患者での望ましい染色体組込プロファイル

目的とするベクターの組込プロファイルは、由来する野生型ウイルスの生物学的特性を反映している。ガンマレトロウイルスベクターの染色体組込はプロモーター領域に強い指向性を持ち、レンチウイルスベクターは転写ユニット内部への組込が優先され、アルファレトロウイルスではもっとランダムな分布を示す。In vitro でのデータと、遺伝子改変細胞で治療した患者の in vivo データの適切な比較が、増殖細胞でのベクター組込プロファイルを明らかにする基本となる。しかしどのような場合でも、染色体組込型ベクターはヒトゲノムのあらゆる危険な領域をヒットする可能性がある。低い遺伝子導入効率・少ない細胞数の移植ではオリゴクローナルとなることもあるが、遺伝子導入細胞を投与した患者では原則として、高度なポ

リクローナル状態が望ましい組込プロファイルといえる。造血系分化の数学的モデルによると、特に前駆細胞分画からの分化では、有害な選択が生じなくても長期のフォローアップではオリゴクローナルな状態が生理学的に生じることが予測される。持続的なクローン拡大がないことが望ましいが、一時的にクローンが増加しても幹細胞の活性化や病原体への免疫応答を反映しているだけかもしれない。

#### (6) 組込のリスクを低減させるための方策

ベクターバックボーンを選択は挿入プロファイルに大きな影響を与える。SIN レトロウイルスと SIN レンチウイルスは、ウイルスLTR に存在するエンハンサー・プロモーター配列を除去したもので、ベクターによる近傍遺伝子のトランス活性化の可能性を減らすことができる。

SIN ベクターでは、非臨床モデルでがん化リスクの上昇が認められるウイルスのプロモーター・エンハンサーよりも、細胞調節エレメントなどの比較的弱いプロモーター・エンハンサーの利用が好まれるが、十分な治療効果を達成するのに必要なタンパク質の発現量が得られるかという観点も考慮する必要がある。また、クロマチン・インスレーター配列は、エンハンサー・プロモーターの間に置くとその相互作用を阻害し、また導入遺伝子カセットからの発現が組込部位の影響を受けてサイレンシングされることを防ぐ。インスレーターは組込まれたベクターと宿主ゲノムとの相互作用を阻害することにより安全性を高める可能性がある。しかし、ベクターと宿主ゲノムの異常な融合転写産物により転写が生じる場合には、その効果は限定的である。組込による近傍ゲノム部位との異常スプライシングを防ぐには、ベクター中のスプライシングアクセプター・スプライシングドナーの除去を考慮すべきである。このように各エレメントについて知見が蓄積されてきて

はいるが、エレメントと特定の配列の相互作用など様々な要因がベクター全体の挿入変異リスクに影響するため、各ウイルスベクターでのエレメントの選択は注意深い研究が必要となる。ゲノム編集技術（ZFN や TALEN 等）を利用すると、安全な遺伝子導入領域であることが判明している AAVS1 や CCR5 等の領域に特異的に遺伝子導入できる可能性がある。このような安全な部位や特定領域への遺伝子導入が治療に応用できれば、遺伝子治療の安全性は著しく改善される。しかし、ゲノム編集技術は染色体 DNA への二本鎖切断の導入と修復を行うことから、標的細胞ゲノム全体でみたときのゲノム編集技術による遺伝子導入の特異性について十分な評価が必要である。

#### (7) 挿入変異によるがん化を評価するための非臨床モデル

染色体組込型ベクター製品の安全性を調べるための非臨床試験法として複数の方法が開発されている。In vitro 不死化試験（IVIM）は、マウス骨髄幹細胞の in vitro での培養に基づく方法で、異なるベクターコンストラクトの遺伝毒性能の測定を目的としている。遺伝子導入細胞の形質転換のパラメーターとして再播種の頻度により定量化している。この方法の感度は、強力なウイルスプロモーターを持つ陽性コントロールベクターを用いた場合、1~2 mutants/10<sup>5</sup> cells とされる。一般に、ベクターのエンハンサー活性が弱いほど、挿入変異は低下する傾向が見られる。この方法には、特定の領域でのわずかな遺伝毒性イベントのみを読みとることと、マウス骨髄細胞を使用するため培養条件が再現性に影響するという試験法の限界がある。

In vivo での発がん性試験は、組込型ベクターによる癌化を検出できるはずである。遺伝子改変造血前駆細胞の移植や直接投与法は有用なモデルとなる可能性があり、目的のベクター

で遺伝子導入した造血幹細胞の野生型マウスへの移植は、異なるベクターや導入遺伝子を比較する共通のプラットフォームとして検討されている。しかし、臨床試験で白血病発症との関連が知られているベクターを用いた場合でも白血病/リンパ腫の出現は低く、多くのマウス系統で長期フォローアップにより観察される白血病/リンパ腫の自然発生頻度との区別が難しい。このためリスクの予測に必要なマウスの数は非常に多くなり、また試験には長期間必要となる。野生型マウスでのクローン選択を増加させるため、継代移植が提案されているが、実際の遺伝子治療プロトコルとは異なることになる。白血病発症のサロゲートマーカーとして、細胞の増殖や生存に關与する遺伝子近傍への組込みによるクローンの変化の評価が提唱されているが、臨床試験でのがん化リスクの予測における重要性はまだ明らかではない。

疾患モデル動物を用いた遺伝毒性試験は、ベクターの組込による導入遺伝子の効果と、疾患の背景を組み合わせる分析する利点があり、より関連性が高い可能性がある。しかし、疾患マウスを用いても、X-SCID 遺伝子治療のように、ベクターによるがん化を予測できないかもしれない。疾患マウスモデルでの試験も正常マウスでの遺伝毒性試験と共通する限界がある。

ベクターの挿入により発がん活性が感作される可能性のある、がん化しやすいマウスモデルを用いる方法もある。このようなマウスは in vivo 及び ex vivo での発がん性試験に適しており、正常マウスや疾患モデルと比較して遺伝毒性の評価をより早くより安定的に評価できる。実際、がん化しやすい Cdkn2a<sup>-/-</sup> マウスを用いた試験では、SIN LTR や弱いプロモーターを持つベクターは、他のベクターよりも安全性に優れることが示されている。しかしこのようなモデルの使用にもいくつかの注意が必要である。第一に、腫瘍形成がおこりやすいため、がん化能が低い新規ベクターではベクターの

遺伝毒性が隠されてしまう可能性がある。また、このモデルの表現型はベクターの目的とする疾患とは異なる。がん化しやすいマウスと疾患マウスを交配すると、ベクターによるがん化の加速と目的とする疾患での遺伝子導入細胞の投与が可能ながん化試験の新たな方法となる。しかし、二つの遺伝的背景の相互作用は長い時間がかかり、非臨床試験での使用の妨げになる特異な性質を持つマウス系統が生じる可能性もある。

動物モデルをベクター組込試験に用いる場合、モデルのゲノムや背景、がん化の機構の相違を考慮することが必要である。

#### (8) 臨床試験での考慮事項

現時点では、挿入変異とがん化リスクの予測に利用可能な臨床データ及び実験的データは限られている。遺伝子治療薬の臨床開発では、上述の様々な手法を用いてリスク評価を行うことは、適切なリスク管理、リスクの低減化の方法として役立つ。臨床の報告例から、がん化の発生まで数年かかることが示唆されており、この長い潜伏期間はがんの多段階発生を示唆し、挿入変異を生じるベクターの組込の大部分は、腫瘍発生に直接作用するというよりも、腫瘍発生を起こしやすくするだけとも考えられる。

患者の長期フォローアップは、染色体組込型ベクターによる遺伝子治療を受けた全ての患者に対して実施すべきである。臨床試験や市販後に実施すべきフォローアップの期間、頻度及び試験の程度は、明らかにされたリスクの程度に依存する。治療によるがん化のリスクの可能性や現実のリスクと、既知のベネフィットについて意識すべきである。販売承認(および国の規制当局の決定となる臨床試験の承認)は製品のリスク・ベネフィットの全体を考慮して判断されると考えられる。

## C.2 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法の開発

遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法開発の一環として、従来の PCR 法を改良した新しい PCR 技術であるデジタル PCR の活用に関して検討している。

定量 PCR 法は、遺伝子治療薬の品質・安全性評価において、ベクターや導入遺伝子を高感度で迅速に定量検出可能な方法として汎用されている。一方、デジタル PCR 法は、通常の定量 PCR と同様にプライマー、プローブを用いて検出するが、定量 PCR の 1 つのサンプルを、多数の微小区画、例えば、本研究で使用した droplet digital PCR(ddPCR)装置では約 20,000 個の droplet に分割し、それぞれの区画で個別に PCR 反応を行い、ターゲット遺伝子を含む微小区画のみを陽性として検出する方法である。多数の微小区画で反応させた陽性の微小区画の割合を測定し、ポアソン分布に当てはめることで、試料中のターゲット DNA のコピー数を高感度に絶対定量することが可能とされ、標準品との比較により定量するため標準品がないと定量できない定量 PCR に対して有利な点となる。また、微小区画で反応することにより、阻害物質の共存による阻害がおこりにくく、定量 PCR よりも高感度で、微量でも高精度に検出可能とつたわれている。

24 年度は遺伝子治療用ベクターの検出について、ddPCR 法と定量 PCR 法の検出感度の比較を行い、定量 PCR 法と比較して血漿中のベクターをより高感度に検出できることを明らかにした。今年度は、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価と、レトロウイルスベクターで遺伝子導入を行った細胞でのウイルスの残存性の測定について検討した。

### C.2.1 レトロウイルスベクターの比活性に関する検討

ウイルスベクターの品質管理規格として、ウ

ウイルス粒子数やゲノムコピー数を指標にする場合と、感染力価や遺伝子発現量を指標とする場合がある。しかし、ウイルスベクターに含まれるウイルスは全て感染性を持つわけではなく、感染性のないウイルスは不純物と考えられることから、ウイルスベクターを粒子数・ゲノムコピー数や感染力価のみで規定するのではなく、感染性のあるウイルス粒子の比率、あるいは感染力価とゲノムコピー数との比率として表される比活性を管理することが重要であり、比活性はウイルスベクターの重要品質特性と考えられる。ウイルスベクターの比活性を評価する場合、ウイルス粒子数の測定にはウイルスタンパク質の定量や電顕も用いられるが、定量 PCR/RT-PCR は簡便にゲノムコピー数を測定できる方法として汎用されている。しかし、定量 PCR を用いてウイルスベクターのゲノムコピー数の正確な定量を行うには濃度既知のウイルス標準品が必要であり、アデノウイルスベクターのように国際標準品が作成されているもの以外、正確な定量は困難である。一方、ddPCR は標準品なしでコピー数を絶対定量することが可能とされ、ウイルスベクターの品質管理に有用と考えられる。そこで、ddPCR を利用してレトロウイルスベクターの比活性を検討した。

レトロウイルスベクターはベクター産生細胞の培養上清中に回収されるので、Group A としてベクター産生細胞を培養し、培地交換せずにウイルスベクター上清を継時的に回収した場合、Group B として、継時的にウイルスベクター上清を回収し、そのたびに培地交換した場合についてゲノムコピー数を ddPCR で、感染力価をフローサイトメーターで測定した (Fig.1)。その結果、Group A では培養時間の増加に伴いゲノムコピー数は経時的に増加し、ウイルスベクターが培養上清に蓄積されていることが示された。Group B のコピー数は、同じ時点で回収した Group A の試料のゲノム

コピー数よりも低く、培地交換後の培養時間に依存していた。一方、各試料について感染力価を調べたところ、各時点での試料で Group A、Group B にほとんど差が認められなかった

レトロウイルスベクターは 1 粒子にウイルスゲノム 2 コピーを持つため、ゲノムコピー数と感染力価から、以下のように仮定して比活性を算出した。

$$\text{ウイルス粒子数} = \text{ゲノムコピー数} / 2$$

$$\text{比活性} = \text{感染細胞数} / \text{ウイルス粒子数}$$

その結果、比活性は培養 6 時間後の上清が最も高く、培養時間の経過に伴い比活性は低下した (Fig.2)。また、Group B のように培地を新鮮なものに交換して培養を続けることにより、一定の比活性を有するウイルスベクターをハーベストすることが可能であることが示唆された。Group A のように培養上清中にウイルスベクターを長時間維持すると、新しくウイルスベクターが産生される一方で、初期に産生されたウイルスが失活していく可能性が示唆された。

このような検討をベクター毎に実施することで、ウイルスの品質を規定しうる一定以上の比活性を持つウイルスベクターの回収条件の最適化を行うことが可能と考えられる。

### C.2.2 Ex vivo 遺伝子導入細胞でのウイルスベクターの残存性に関する検討

ウイルスベクターの臨床使用はカルタヘナ法の第一種使用等に該当するため、遺伝子治療の臨床研究や治験の実施には、国によるカルタヘナ法の第一種使用規程の承認が必要とされる。現在は、ウイルスベクターを in vivo で投与する場合だけでなく、ex vivo で遺伝子導入を行った細胞を臨床に用いる場合についても、ウイルスベクターが遺伝子導入細胞に残存する可能性と導入されたウイルスベクターに増

殖性ウイルスが混入している可能性があることからカルタヘナ法の第一種使用が適用されている。しかし、増殖性ウイルスはこれまで検出されたことはなく、製造法の改良から増殖性ウイルスの出現の可能性は極めて低いものとなっている。また、ex vivo 遺伝子治療では、細胞への遺伝子導入後、適切な細胞洗浄等の処理により、ウイルスベクターは除去され、また残存する微量なウイルス粒子も投与までの培養期間(3~14日程度)において失活するとされており、カルタヘナ第一種使用を適用しなくてよい可能性がある。もし、遺伝子導入細胞画分にウイルスベクターが残存しているのであれば、遺伝子導入細胞の安全性上の懸念ともなる。そこで、実際にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入細胞を調製後、細胞の洗浄によりウイルス粒子が適切に除去されるかどうかについて検討を行った。

K562細胞への遺伝子導入に用いた感染用レトロウイルスベクター液、遺伝子導入後に回収した残存上清及び4回の洗浄で回収された各洗浄液上清の計6サンプルについて、低濃度の遺伝子を高精度に検出可能なddPCRを用いてウイルスゲノムコピー数を測定した(Fig.3)。その結果、遺伝子導入後の残存上清に多くのウイルスが回収され、その後の希釈・洗浄操作の理論値では3回の洗浄によりウイルスベクターは細胞残渣に1コピー以下になると計算された。しかし、実測値を見ると、1回目の洗浄では理論値とほぼ一致してウイルス濃度が低下したが、2回目以降の洗浄でも洗浄液中のウイルス濃度はあまり減少せず、細胞にウイルスベクターが付着して残存している可能性が示唆された。4回の洗浄操作を行っても、およそ1~2コピー/ $\mu\text{l}$ の濃度で洗浄液に回収された。これは、実際の患者への遺伝子導入細胞の投与量に換算すると、細胞数 $1 \times 10^7$  cells/mlで5~10 ml程度を投与することから、5000~20000コピー程度が投与時に混入する計算に

なる。しかし実際には、遺伝子導入操作と洗浄を行ってすぐに患者に投与するわけではなく、数日間の培養を行った後に投与するプロトコールが遺伝子治療臨床研究実施施設では採用されている。レトロウイルスベクターは比較的短時間で感染性を失うとされることから、37℃で培養した場合のゲノムコピー数及び感染力価の変化を検討した(Fig.4)。その結果、レトロウイルスベクターは凍結保存や4℃保存では安定だが、37℃では12時間で力価が半減し、24時間では10%程にまで低下し、さらに長時間のインキュベーションで活性はほぼ消失することが確認された。

これらの結果から、遺伝子導入細胞にはウイルスベクターが残存する可能性はあるが、感染性のあるベクターが投与される可能性は極めて低いと考えられる。

## D. 考察

### D.1 染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題

染色体組込型ベクターは先天性、後天性疾患の治療において、ex vivo や in vivo での遺伝子の導入、遺伝子修正の有望な道具である。染色体組込による挿入変異のリスクは遺伝子治療製品の開発中、常に注意深く考慮する必要がある。遺伝子治療製品の全体的な評価には、変異原性から発がん性イベントへの転換を引き起こしやすい要因として、ベクターの組込のプロファイル、組込による活性化や不活化を引き起こしやすい遺伝子エレメントの存在、導入遺伝子の性質、標的細胞・組織の性質、その他の変異を誘発する要因に関する考慮を含めるべきである。ベクターの組込試験と遺伝子導入細胞のクローナリティ試験は、非臨床試験、臨床試験の実施において、製品の包括的な安全性評価のための重要なツールとなるが、挿入変異・がん化のリスク評価に利用できる技術はまだ開発段階である。データの解釈では、試験法が



さらに改良され、妥当性が示されるまではこれから試験の限界について考慮する必要がある。

遺伝子治療の初期の臨床試験でがん化が発生したことにより、遺伝子治療の開発は一次ストップしたが、その後、レトロウイルスベクターの改良からレンチウイルスベクターへと遺伝子治療技術は様々な改良が試みられており、より安全性の高いプロファイルを示す新規のベクターが臨床応用されてきている。また、挿入変異リスクを減らすための新たな遺伝子導入の方法も開発されてきている。しかし、ベクターの挿入変異・がん化のリスク評価に利用できる実験技術はまだ開発段階であり、臨床のリスク評価を十分に行うことはできないので、患者の綿密な長期フォローアップが重要となる。ベクターの挿入変異リスクを正確に評価可能な *in vitro*, *in vivo* のリスク評価法の開発が求められる。

## D.2 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法の開発

ウイルスベクターの品質管理において、ベクターの力価や遺伝子発現量だけでなく、感染性のあるウイルス粒子と感染性のない粒子との比率や力価とウイルスのゲノムコピー数との比率(比活性)の管理を行うための方法として、標準品がなくてもコピー数を絶対定量することが可能なデジタル PCR の活用を検討した。レトロウイルスベクターは主として *ex vivo* 遺伝子導入に用いられており、患者に直接投与されるわけではないが、遺伝子治療製品の規格としては比活性を規定して一定の品質のベクターを使用することが重要と考えられ、この方法として、ddPCR の有用性が確認された。なお、今回の比活性の算出においては、感染力価の測定において、一細胞あたり一ウイルスベクターが感染したと仮定して計算した。しかし実際には数コピー挿入されることがあるので、ddPCR の特性を生かして、一細胞あたりのコピー数を

算出する方法を確立する必要があり、現在検討を進めている。この技術が確立されればより正確な比活性値を算出することが可能であり、今後のウイルス粒子の品質評価の一助となると思われる。このような検討を通じて、遺伝子治療薬の品質評価に関して最新の技術をどのように取り入れていくかについてのコンセプトを明確にする予定である。

一方、遺伝子導入細胞でのウイルス残存性については、理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性が示された。感染に至らないウイルス粒子が細胞外に強固に結合している可能性がある。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入では感染効率を上げるためにレトロネクチンを使用しているが、レトロネクチンは細胞接着ドメインで標的細胞に結合し、ヘパリン結合ドメインでウイルス粒子と結合するため、レトロネクチンに結合したウイルスが洗浄操作でも容易にははがれない可能性がある。実際の臨床においては、たとえば成育医療センターの臨床研究プロトコールの場合、ウイルスベクターで遺伝子導入後2日間の培養期間中に3回および投与前3回の計6回の洗浄操作が行われることや、レトロウイルスベクターは1日以上培養で感染性を失うことから、感染性のあるウイルスベクターが遺伝子導入細胞とともに患者に投与される可能性は極めて低いが、各臨床プロトコールにおいて、どの程度ウイルスの残存があるのかについて事前評価しておく必要があると考えられる。

## E. 結論

遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリサイエンス研究の一環として、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの要因とリスク

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み試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。これらの結果は、現在実施している遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等に活用していく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 内田恵理子：“**バイオ医薬品**”，第 25 章 遺伝子治療薬，西島正弘・川崎ナナ編，化学同人，京都(2013)，pp.235-244

### 2. 学会発表

1) 吉田徳幸，井上貴雄，内田恵理子，小比賀聡，佐藤陽治：オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究、第 5 回日本 RNAi 研究会、2013.8、広島

2) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato : In silico analysis of off-target effects of oligonucleotide therapeutics, 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, October 6-8, 2013, Naples, Italy

3) 吉田徳幸，小比賀聡，内田恵理子，佐藤陽治，井上貴雄：オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究、日本薬学会第 134 年会、2014.3、熊本

G. **知的財産権の出願・登録状況** (予定を含む)  
該当なし

Table 1 遺伝子組込型ベクターを用いた臨床試験におけるベクターの挿入部位とがん化

対象疾患	ベクターの種類	標的細胞	分析数/患者数	挿入部位数	癌遺伝子関連挿入部位	クローン優位性	がん化
X-SCID (仏)	レトロ	造血幹細胞	8/10	9767	CCND(3/7), LMO2(3/7), BMI1(1/7), HMGA2 (2/7)	4/7	4 (T-ALL)
X-SCID (英)	レトロ	造血幹細胞	6/10	438	-	1/6	1 (T-ALL)
ADA-SCID (伊)	レトロ	造血幹細胞	4/10	708	LMO2(4/4), CCND2	0/4	0
	レトロ	造血幹細胞	4/10	1959	LMO2, MDS-EVI1	0/4	0
ADA-SCID (伊)	レトロ	T細胞	4/6	2198	-	0/4	0
CGD	レトロ	造血幹細胞	2/2	765	MDS-EVI1(2/2), PRDM16(2/2), SETBP1(2/2)	2/2	3 (骨髄異形成)
WAS	レトロ	造血幹細胞	2/10	15247	CCND2(2/2), LMO2(2/2), BMI1(2/2), MDS1-EVI1(2/2), PEDM16(2/2), SETBP1(2/2)	0/2	4/10 (ALL)
AIDS	レンチ	造血幹細胞	3/5	8019	-	0/3	0
X-CGD	レンチ	造血幹細胞	2/2	3597	-	0/2	0
βサラセミア	レンチ	造血幹細胞	1/2	-	HMGA2(1/1)	1/1	0

Knight S et al: Curr.Gene Ther. 13, 11 (2013) 改変

## レトロウイルスベクター(培養上清)のゲノムコピー数と感染力価

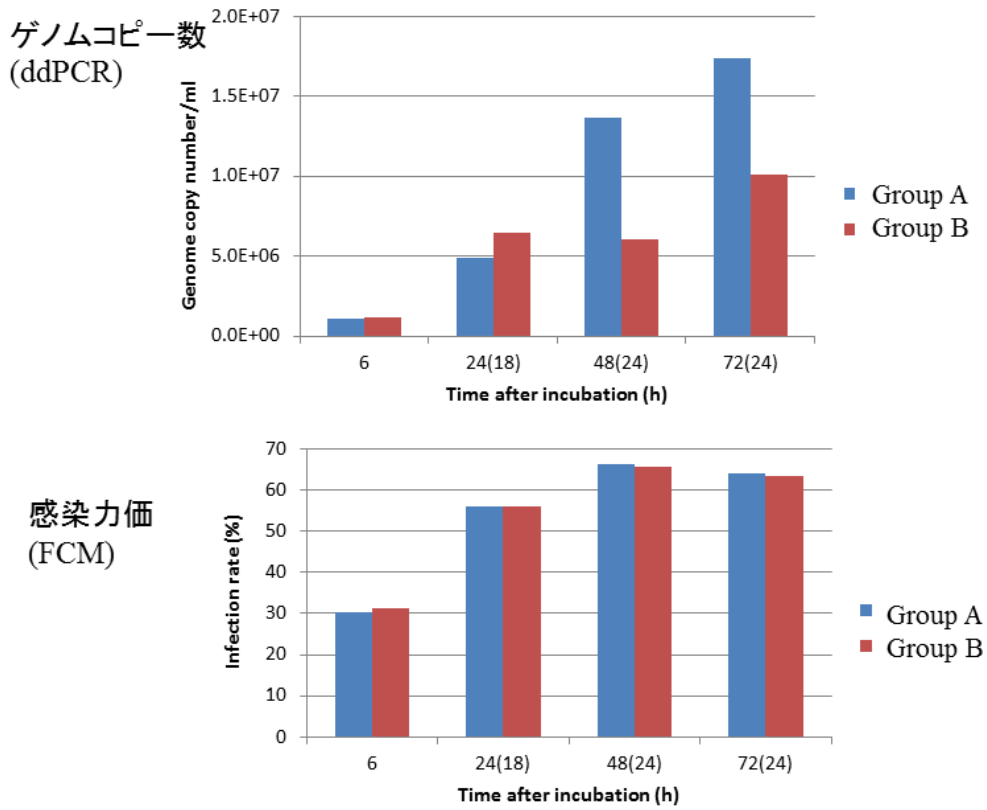


Fig.1 レトロウイルスベクター(培養上清)のゲノムコピー数と感染力価

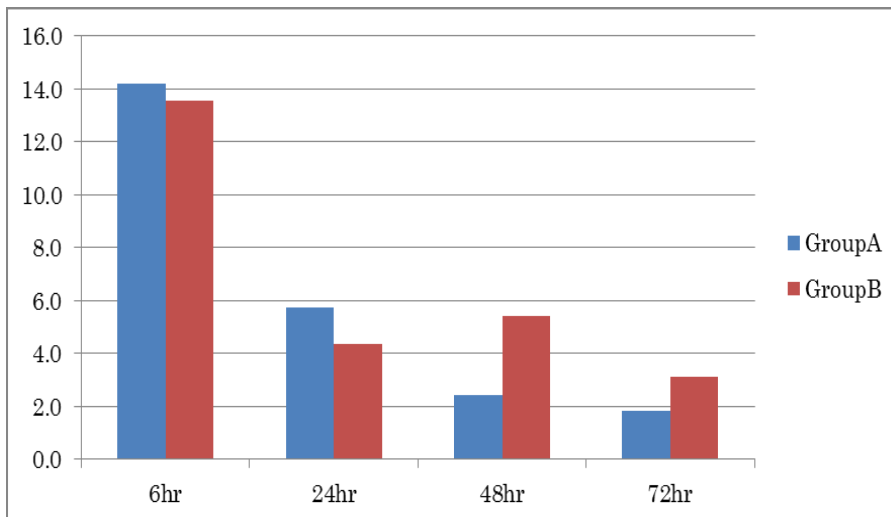


Fig.2 レトロウイルスベクター(培養上清)の培養条件と比活性

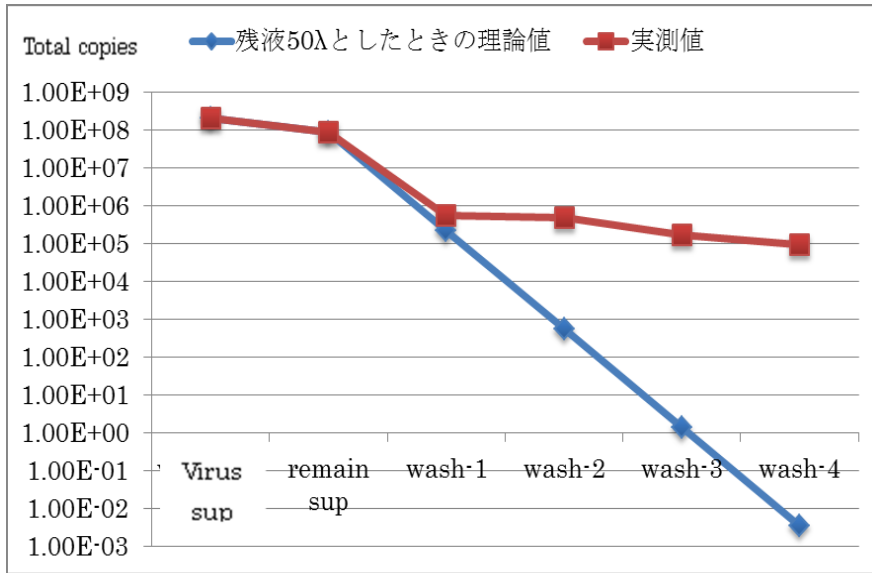


Fig.3 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入後の細胞へのウイルスの残存性

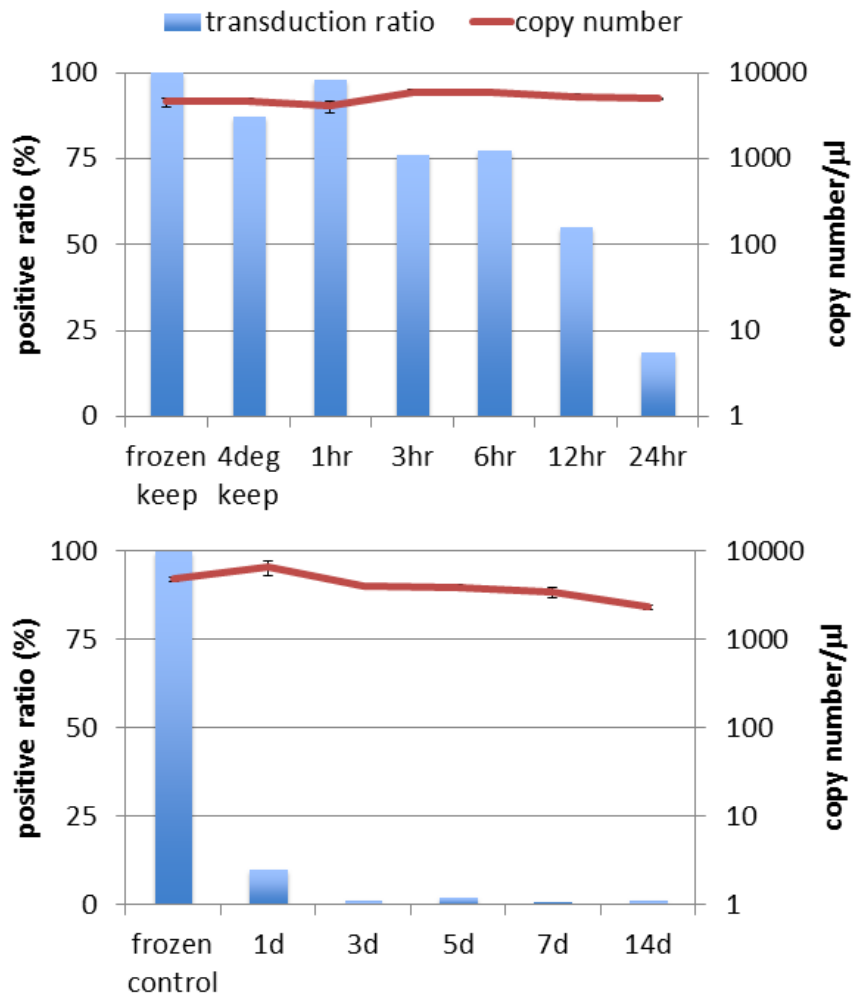


Fig.4 レトロウイルスベクターの37 保存時間とコピー数及び感染力値の変化



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ	第 4 章 ヒト初 回投与量設定方 法 第 2 節 バ イオ医薬品		新薬開発にむけ た臨床試験(第 ~ 相臨床試験) での適切な投与 量設定と有効性 /安全性評価	サイエン ス&テク ノロジー 出版	東京	2013	72-86
内田恵理 子	遺伝子治療薬	西島正弘 川崎ナナ	バイオ医薬品	化学同人	京都	2013	235-244

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakamoto, T. Fujimaki, Y., Takada, Y., Aida, K., Terahara, T., Kawanishi, T., Hiyama, Y.	Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging	<i>J Pharm Biomed Anal</i>	<b>74</b>	14-21	2013
Koide, T., Nagato, T., Kanou, Y., Matsui, K., Natsuyama, S., Kawanishi, T.,	Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation	<i>Int J Pharm</i>	<b>441</b>	135- 145	2013
Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.	Impact of heat treatment on miscibility of proteins and disaccharides in frozen solutions.	<i>Eur J Pharm Biopharm</i>	<b>85</b>	177-183	2013
Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H.	Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids	<i>Biochim Biophys Acta.</i>	<b>1840</b>	1171-1180	2014

Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y.	Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the intracellular fate of encapsulated doxorubicin	Mol Pharmceutics	<b>11</b>	560-567	2014
Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H.,	Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components	Biomaterials	<b>35</b>	1347-1358	2014
Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Yamaguchi, T., Okuda, H., Kawanishi, T.,	High performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles.	Analytical Methods	<b>5</b>	5899-5902,	2013
川西 徹	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	衛研報	<b>131</b>	2-6	2013
川西 徹, 清原孝雄, 檜山 行雄, 津田 重城	今後の日本薬局方の新しい流れ	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	<b>44</b>	790-801	2013
加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹	ブロック共重合体ミセル医薬品の評価	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	<b>44</b>	968-975	2013
加藤くみ子	DDS 製剤開発の活性化と実現に向けた取り組みについて	薬剤学	<b>73</b>	187-188	2013
石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ	抗体医薬の分子設計	薬剤学	<b>74</b>	1-8	2014
井上貴雄	核酸医薬品の動向	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	<b>45</b>		In press
阿曾幸男	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	公衆衛生	<b>72</b>	125-129	2014