

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

補助事業課題名： 革新的医薬品等開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得
Establishment and standardization of novel safety evaluation methods for accelerating
innovative medicine development and data acquisition using these methods

実施期間：平成29年5月1日 ～ 令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：斎藤 嘉朗
Yoshiro Saito

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長
Director, Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences

II 補助事業の概要

近年、医薬品開発の成功率低下が指摘されている。しかし特定分子を標的とする医薬品（広義の分子標的薬）は比較的成功率が高いとされ、核酸医薬品を含め革新的医薬品の多くはこれに属し、その開発効率化は、本邦の医薬品産業の活性化につながる重要な課題である。「医薬品の評価方法の開発と標準化」は、その土台を供すものであり、承認審査の過程で利用されるだけでなく、企業における医薬品開発段階での有用な判断基準となり、開発の効率化をもたらす。中でも、臨床試験段階での重篤副作用による開発中止は、莫大な損害をもたらすため避けられるべきものであり、非臨床段階で予測性高く医薬品候補物質の安全性を適切に評価できることが重要である。現在、医薬品開発で用いられている非臨床安全性評価法は、本状況に鑑みると十分と言えず、製薬企業等の開発現場から、新規評価手法の開発が求められている。本研究は、臨床試験段階での副作用による開発中止回避等、今後の革新的医薬品等の開発効率化に必要な、下記の非臨床試験段階における次世代安全性評価法3種を対象とした。

①マイクロサンプリングに関する生体試料中薬物濃度分析（バイオアナリシス）手法

②次世代分子標的薬の安全性確保のための、核酸医薬品及び次世代低分子薬に関するオフターゲット作用評価法

③胆汁排泄機構を備えた *in vitro* 肝障害評価系の構築と予測評価系

各研究は基本的に、まず評価系の構築、検証を行い、多施設で頑健性の確認を行って標準法とした。標準的な評価法の確立という内容から頑健性を旨とし、また開発評価法を同時並行で薬事戦略相談や承認申請資料作成に利用いただくことを想定し、多くの企業の参加を得て行った。研究の進捗は、公開の成果発表会を行い開発現場への迅速な伝達を行った。以下に、個別の成果と意義を示す。

①マイクロサンプリングに関する生体試料中薬物濃度分析（バイオアナリシス）手法

非臨床トキシコキネティクス試験へのマイクロサンプリング適用に関するICHガイドラインのQ&Aが最終化されたが、実際の適用に関する標準的方法は確立されていないため、マイクロサンプリングを適用する分子群3種の生体試料中(薬物)濃度分析法の開発を含め、以下の研究を行った。マイクロサンプリングの医薬品開発での利用に関し、有用な成果を挙げる事ができた。

①-1：マイクロサンプリング手法

マイクロサンプリング手法の毒性影響評価として、反復投与毒性試験に用いられるラットを対象とした 28 日間の試験を多施設共同で行い、24 時間で 6-7 点について各々 50 μ l を鎖骨下静脈採血するマイクロサンプリング法は、採血した動物に認められる所見として軽微で各評価項目における背景値の範囲内であった。さらに、毒性を有する被験物質 3 種に関し、ラットにおける毒性評価へのマイクロサンプリング影響について検討を行い、毒性プロファイルに大きな影響はないことを明らかとした。非臨床試験における実際の利用に向けて、エビデンスを得た。

①-2：核酸医薬品の生体試料中薬物濃度分析法

マイクロサンプリングを適用する分子として、まず核酸医薬品に関しては、アンチセンス医薬品としてミボメルセンをモデル被験物質とし、高分解能型質量分析計 (MS) を用いた生体試料中薬物濃度分析法を構築した。さらに、汎用性の高い四重極型 MS を用いた分析法を構築し、多施設バリデーション試験を行って標準化を行った。また、siRNA 医薬品に関しても、モデル化合物に関して四重極型 MS を用いた分析法を開発し、多施設バリデーション試験にて良好な結果を得た。以上より、血液を対象に、医薬品開発現場での応用が可能な標準的核酸医薬品分析法を開発した。

①-3 高分子薬（抗体医薬品）の生体試料中薬物濃度分析法

高分子薬（抗体医薬品）に関しては、LC/MS 系での測定法の確立と多施設評価を行った。まず、非臨床試験で用いるための動物血清中の抗体医薬品を対象とした標準的 LC/MS 測定手法を確立することを目的に、抗 CD20 抗体をモデル被験物質としてマウス血清を対象に、抗体の定常領域のペプチドをサロゲートとした LC/MS による薬物濃度測定方法を構築し、多施設バリデーションを行って標準化した。さらに、同モデル被験物質を用いて、臨床試験で用いるためのヒト血清中抗体の標準的 LC/MS 測定手法を、相補性決定領域のペプチドをサロゲートとして確立し、多施設バリデーションを実施し、全ての機関で良好な結果が得られることを確認した。実際の抗体医薬品開発での利用が十分期待される成果であり、これを進めるための留意点文書案も作成した。

①-4：バイオマーカーの生体試料中薬物濃度分析法

バイオマーカー分子に関しては、低分子 2 種、高分子 1 種を対象にした。低分子バイオマーカーとしては、血中に高濃度に存在するリゾホスファチジルコリン及び低濃度で存在するプロスタグランジン E₂、高分子バイオマーカーとしては低濃度のグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) を対象分子として選択して、LC/MS 法での分析法 (GLP-1 は免疫沈降法を組み合わせた手法) を構築し、多施設共同によるバリデーションを実施して標準化した。さらに、ヒトにおけるマイクロサンプリングを想定した指先採血と一般的な上腕静脈採血を行って、血漿中濃度の採血部位間の比較を行い、異なる採血部位であっても同一被験者では同様の濃度であることが明らかとなった。一方、アミノ酸で 5 分子、脂質で 9 分子について変動が認められた。以上の結果から、一部の分子を除き、採血部位の影響が概ね無いことが明らかとなり、バイオマーカーとして利用する際の留意事項として有用な成果となった。以上より、バイオマーカーの医薬品開発での利用に関し、有用な成果を挙げることができた。

②次世代分子標的薬の安全性確保のための、核酸医薬品及び次世代低分子薬に関するオフターゲット作用評価法

②-1：核酸医薬品

核酸医薬品に由来する毒性は、RNA との相補結合に起因する毒性とタンパク質等との結合に起因する毒性に概念的に分類することができる。このうち、RNA との結合に起因する毒性（オフターゲット効果に由来する毒性）については、原理的に動物での評価が困難であることから、「ヒト」を対象とした非臨床安全性評価の技術開発が求められている。一方、タンパク質等との結合に起因する毒性については、従来の低分子医薬品の毒性発現機構と同一であることから、動物を用いた一般的な非臨床安全性試験で毒性を評価できると考えられる。しかし、Toll-like receptor (TLR) などのパターン認識受容体を介した自然免疫系の活性化については、配列特異性や発現細胞/組織の違いなどから種差があることから、「ヒト」を対象とした評価法の開発が望まれる。以上を踏まえ、本研究では核酸医薬品の中でも最も開発/実用化が進んでいるアンチセンス医薬品について、オリゴ核酸に特有の機序で誘導されると考えられる肝毒性、ならびに自然免疫活性化について、ヒト由来の細胞等を用いた評価技術の確立を行った。

②-1-1：肝毒性の評価法に関する研究（令和元年度まで実施）：

アンチセンス医薬品のうち標的 RNA を切断することで有効性を発揮する RNA 分解型アンチセンスでは、オフターゲット効果に起因する肝毒性が生じるリスクが知られている。本研究ではこれを予測するための評価技術として、マウスの肝細胞の 9 割近くがヒト肝由来細胞に置き換わった「ヒト肝キメラマウス」を用いた評価系の構築を進めた。本研究において、ヒト肝細胞に由来する毒性を特異的に検出する ELISA 法の最適条件を決定し、肝毒

性を誘導する陽性コントロール候補を同定した。また、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓にアンチセンスを効率的に送達する条件を構築した。

②-1-2：自然免疫活性化の評価法に関する研究：先行研究で明らかにしたアンチセンスによる新規自然免疫活性化経路（シトシンのメチル化では回避できない自然免疫活性化経路）について *in vitro* 評価法の確立を行った。本研究において、ヒト細胞（X）におけるサイトカイン（Y）の産生・放出を指標とした評価系を構築した。また、本評価系を用いて、当該経路を活性化するモデルアンチセンス医薬を複数見出し、本評価系の妥当性を示した。

以上は、種差の観点から動物試験での評価・予測が難しいとされていた核酸医薬によるオフターゲット効果に由来する毒性、自然免疫系の評価について、本研究はヒト肝キメラマウス・ヒト細胞を用いた新しい評価技術を創出するものであり、社会ニーズへの対応、医療分野での貢献という点でも極めて有用な成果である。

②-2：低分子医薬品

標的分子をタンパク質レベルで直接分解する次世代分子標的低分子薬の臨床開発が進んでいるが、このようなタンパク質分解医薬についても、オフターゲット作用を引き起こす可能性が考えられる。そこで、プロテオミクス技術を基盤として、タンパク質分解医薬のオフターゲット作用を検出する汎用性の高い評価法の開発を行った。

タンパク質分解医薬は、標的タンパク質と1対1の結合で作用する従来の低分子医薬とは異なり、「標的-薬剤-E3リガーゼ」で構成される3者複合体がユビキチン化修飾に適した立体配置になった時のみ分解活性を示す。このことから我々は、相同タンパク質の構造がヒトと同一ではない試験動物においては、オフターゲット作用が種間で再現されない可能性があると考え、まずは種差の検証を行った。ヒト細胞およびマウス細胞にタンパク質分解医薬のモデル化合物を添加し、オフターゲット作用（オフターゲットタンパク質の発現減少）をLC/MS/MSを用いたショットガンプロテオミクスにより網羅的に調べた。また、ユビキチン-プロテアソーム系を介したオフターゲット分子に絞るために、プロテアソーム阻害剤の存在下および非存在下で比較し、プロテアソーム阻害剤存在下では発現減少が見られなくなる分子のみをピックアップした。その結果、ヒト-動物（マウス）細胞間で、オフターゲットタンパク質の発現変動プロファイルはほとんど関連しなかったことから、当該医薬品における非臨床安全性試験（動物試験）では種差が問題となる可能性（ヒト細胞を用いたオフターゲット解析の必要性）が示唆された。

タンパク質分解医薬のオフターゲット評価法としては、タンパク質の量の変動を包括的に解析可能なプロテオミクス手法が適していると考えられる。また、オフターゲット作用の評価においては、オフターゲット分子の発現低下の程度を正確に把握する相対定量が重要であるため、定量性の高いプロテオミクスの活用が望まれる。そこで本研究では、ターゲットプロテオミクス技術を用いて、リスク分子に限定して発現量の変動を感度良く定量する評価系を構築することとした。動物試験や臨床試験の期間内では評価が困難な、ヒトにおける発がん性の有無を評価できる試験系が求められていることから、解析対象のリスク分子をがん抑制遺伝子（発現抑制されるとがん化に繋がる遺伝子）に限定して調査を行い、重要ながんリスク分子を特定した。特定したがん抑制遺伝子から6分子をピックアップし、ターゲットプロテオミクスによる評価系の構築を検討した。6分子に対して、ターゲットプロテオミクスに必要な内部標準ペプチド候補の選出・合成・適切性の検証を繰り返して実施し、これらのタンパク質の変動を評価できるペプチドを選出することに成功した。また、これらのペプチドを用いて分析メソッドを確立し、標的タンパク質の発現を減少させるモデル化合物（陽性コントロール）を用いた検証により、高い信頼性で定量解析可能な評価系であることを明らかにした。

以上は、タンパク質分解医薬のオフターゲット作用の種差を明確に示す知見であり、その非臨床評価法の構築は臨床試験段階での副作用による開発中止の回避と開発効率化の観点で意義深い成果と考える。

③胆汁排泄機構を備えた *in vitro* 肝障害評価系の構築と予測評価系

医薬品の胆汁排泄は動物試験に拠っているのが現状であり、汎用性のある *in vitro* で胆汁排泄機構を備えたヒト細胞培養系の確立が求められている。そこで創薬の初期段階で利用可能な胆汁排泄機構を備えた *in vitro* 肝障害評価系の開発を目的とし、以下の研究を行った。③-1「三次元培養基材を用いた胆汁排泄機構を備えた肝障害評価系の構築と検証」として、Cell-ableでヒト肝キメラマウス由来ヒト肝細胞Hu-Liver cell、Cellbedでヒト肝癌細胞株HepaG2細胞を三次元培養し、毛細胆管の形成と毛細胆管への胆汁排泄を観察した。その結果、何れの細胞においても胆汁排泄能を有する毛細胆管を形成することができた。③-2「コラーゲンビトリゲル膜（CVM）チャンバーを用いた胆汁排泄系の構築と検証」として、毛細胆管様構造を安定かつ良好に形成するHepG2-NIAS細胞をCVMチャンバーで酸素供給培養した。その結果、高いCYP3A4活性や十分な胆汁取込/排泄トランスポーターの発現が確認できる培養系が構築できた。また、毛細胆管様構造体に蓄積したモデル蛍光基質をCVMチャ

ンバー下層に排出させるための方法を見出した。③-3「サンドウィッチ法による胆汁うっ滞スクリーニング系の構築と検証」として、PXB細胞を用いた胆汁うっ滞毒性スクリーニング系の構築とプロトコル標準化を目的とし、サンドウィッチ培養したPXB細胞で7薬物の胆汁うっ滞毒性評価を行った。その結果、4薬物で凍結ヒト肝細胞と同程度の胆汁酸依存的な細胞毒性が検出できた。このことから胆汁うっ滞毒性の評価のための標準プロトコルが作製できたと考えられる。③-4「標準法作成、*in vivo*モデルを用いた検証と基盤データの取得」として、研究期間の前半では、ヒト肝細胞で毛細胆管を形成させるための培養方法を検討し、ヒト凍結肝細胞、ヒトiPS細胞由来肝細胞、Hu-Liver cellで胆汁排泄能を有した伸長した毛細胆管を形成するため培養方法を構築することができた。加えて、何れの細胞も毛細胆管形成時に薬物代謝酵素や胆汁取込/排泄トランスポーターの発現がヒト肝臓若しくはベンダー指定の至適条件下のヒト凍結肝細胞と同程度発現していることが確認できた。研究期間の後半では、各機関で確立した各種肝細胞の培養法（③-2、3、4）で標準プロトコルにより5種の薬物の胆汁うっ滞毒性を評価した。各培養法で胆汁酸依存的な顕著な細胞毒性を示す結果が観察された。得られた結果を比較検証したところ、共通して胆汁うっ滞毒性が認められる薬物と細胞によって胆汁うっ滞毒性が異なる薬物が明らかになった。これは細胞間で異なる薬物代謝を反映した評価が実施できていることを示唆している。以上のことから、③-3で作製した胆汁うっ滞毒性の評価のための標準プロトコルを導入した系は、医薬品の胆汁うっ滞リスクを評価するための標準法になりえると考えられる。

In recent years, a decline in the success rate of drug development has been noted. However, molecular-targeted drugs are considered to have a relatively high success rate, and many innovative drugs, including oligonucleotide drugs, belong to this category. The development and standardization of evaluation methods for pharmaceuticals provides the basis for accelerating drug development, and is not only used in the approval review process, but also serves as a useful criterion for the drug development in the pharmaceutical companies, leading to more efficient drug development. In particular, efficient evaluation on safety of drug candidates in the nonclinical stage is important, because attrition due to serious adverse reactions in the clinical trial stage can cause enormous damage to the companies and thus, should be avoided. However, the non-clinical safety evaluation methods currently used in drug development were not sufficient. This study focused on development of the following three evaluation methods in the non-clinical study phase.

(1) Bioanalysis method related to microsampling

(2) Off-target effect with oligonucleotide drugs and next-generation small molecule drugs

(3) Liver injury related to biliary excretion

Each study was basically conducted by constructing and validating the evaluation methods, and then confirming its robustness in a multicenter study for standardization. The progress of the research was promptly publicized to the researchers through open symposium. Individual results and their significance are described below.

(1) Bioanalysis method related to microsampling

Although the ICH guideline S3A Q&A on the application of microsampling to nonclinical toxicokinetics studies was finalized, standard methods for application of microsampling, including the development of bioanalysis methods for three molecular groups to which microsampling is applied, had not been established; therefore, the following studies were conducted. We believe that we have obtained useful results regarding the use of microsampling in drug development. (1)-1: To evaluate the toxicological effects of the microsampling technique, a 28-day study in rats used in repeated-dose toxicity studies was conducted. The microsampling technique, in which 50 μ l of blood at 6-7 points were collected in 24 hours from the jugular vein, was found to have only minimal influence on the toxicity parameters in the rats. Furthermore, the effect of microsampling on toxicity assessment in rats was examined for the three toxic test substances, and it was found that there was no significant effect on toxicity profiles. Evidence was obtained for microsampling use in nonclinical studies. (1)-2 As a molecule to which microsampling is applied, we used an antisense drug mipomersen as a model for oligonucleotide drugs, and developed a bioanalysis method using a high-resolution mass spectrometer (MS). Furthermore, an analytical method using a triple quadrupole MS was developed and standardized through a multicenter validation study. In addition, for siRNA drugs, an analytical method using triple quadrupole MS was developed for a model compound, and good results were obtained in a multicenter validation study. In conclusion, we developed a standard method for bioanalysis of oligonucleotide drugs that can be applied in the field of drug development. (1)-3: For macromolecular drugs (antibody drugs), we established an analytical method using LC/MS system and conducted a multicenter evaluation. First, for the purpose of establishing a standard LC/MS method for antibody drugs in animal serum for use in nonclinical studies, we established a bioanalytical method for measuring a surrogate peptide in the antibody's constant region by LC/MS using mouse serum with anti-CD20 antibody as a model substance, and multicenter validation was performed for standardization. Furthermore, using the same model test substance, we established a standard LC/MS method for measuring antibodies in human serum by measuring a surrogate peptide in the antibody's complementarity determining region for use in clinical trials, conducted multicenter validation, and confirmed that good results were obtained at all institutions. The results are expected to be used in the actual development of antibody drugs. (1)-4: Regarding biomarker molecules, bioanalytical methods using LC/MS were developed for lysophosphatidylcholine and prostaglandin E₂ as models for low molecular weight biomarkers, and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as high molecular weight biomarker, and standardized through multicenter validation. In addition, a comparison of plasma concentrations between blood collection sites was conducted by performing a fingertip blood collection and a general brachial vein blood collection, and it was found that plasma concentrations were similar except for 5 amino acids and 9 lipids. These results indicate that there was almost no influence of the blood collection site on the small biomarker candidate levels, which is a useful information for biomarker selection. In conclusion, we obtained useful results regarding the use of biomarkers in drug development.

(2) The methods for off-target evaluation system for oligonucleotide therapeutics and next generation small molecule drugs

(2)-1: Oligonucleotide therapeutics

RNA targeting oligonucleotide therapeutics (such as antisense oligonucleotides (ASO))-mediated unintended toxicity can be classified as hybridization-dependent and -independent. Hybridization-dependent off-target effects are potentially caused by

inadvertent binding of ASOs to RNA with sequences similar to that of the target RNA. Conventional animal studies cannot be used to assess toxicity induced by off-target effects because of differences in the genome sequence between humans and other animals. Consequently, to predict toxicity caused by off-target effects, the development of methods for non-clinical safety evaluation of "human" is needed. By contrast, ASOs toxicity via hybridization-independent effects is assumed to be due to interactions between ASOs and cellular proteins and unrelated to the Watson–Crick base pairing of ASOs to RNA. However, since there are species specificity in the activation of the innate immune system via pattern recognition receptors such as Toll-like receptors (TLRs) due to differences in sequences and expressing cells/tissues, it is desirable to develop evaluation methods for "human". In this study, we established the evaluation methods for hepatotoxicity which is mainly caused by off-target effects of ASOs using chimeric mice with humanized livers. We also developed the evaluation system for innate immune activation using production and release of cytokines (Y) in human cells (X).

(2)-2: next-generation small molecule drugs

Targeted protein degradation (TPD) drugs that control the expression level of specific proteins are in clinical development, but they may cause off-target effects. In this study, we developed an evaluation system to detect off-target effects of TPD drugs based on proteomics technology. We first investigated species differences in TPD drugs. Off-target effects (decreased expression of off-target proteins) in human and mouse cells treated with model compounds of TPD drugs were comprehensively analyzed by shotgun proteomics using LC/MS/MS. The expression variation profiles of off-target proteins hardly correlated between human and animal (mouse) cells, suggesting that species differences may be a problem (need for off-target analysis using human cells) in nonclinical safety studies (animal studies) for TPD drugs. Next, we developed an off-target evaluation system that focuses on risk molecules by using targeted proteomics technology. Given the importance of human carcinogenicity-related molecules, which are difficult to assess within the timeframe of a clinical trial, we focused our investigation of risk molecules on tumor suppressor genes (genes whose suppression of expression leads to the development of cancer). Six molecules were selected from the identified tumor suppressor genes and an evaluation system was developed. For these molecules, we identified internal standard peptides for targeted proteomics and established analytical methods. In addition, we have validated the evaluation system by using model compounds (positive controls) that decrease the expression of the target proteins, and have clarified that the evaluation system is capable of quantitative analysis with high reliability.

(3) Liver injury related to biliary excretion

In vitro assay system with bile excretion function is awaited for evaluation of cholestasis risk in early stages of drug development; therefore, the following studies were conducted. (3)-1: To construct the bile excretion evaluation system using a three-dimensional (3D) culture substrate, we cultured Hu-Liver cells derived from chimeric mice with humanized livers and human hepatoma cell line HepaG2 cells in 3D. Cells cultured in 3D were able to form bile canaliculi with bile excretion function. (3)-2: To construct the bile excretion evaluation system using collagen vitrigel membrane (CVM) chamber, HepG2-NIAS cells, which form bile canaliculi stably, were cultured in CVM chambers with oxygen supply. Bile uptake/excretion transporter expression and high CYP3A4 activity were observed. (3)-3: Standard protocol for evaluation of cholestasis toxicity was established using sandwich-cultured PXB cells. (3)-4: To construct a standard method for evaluation of cholestasis risk, we established a culture system to form extended bile canaliculi with bile excretion function using cryopreserved human hepatocytes, human iPS cell-derived hepatocytes, and Hu-Liver cells. The cholestasis toxicity of drugs was evaluated in the bile canaliculi-formation culture of various hepatocyte established in (3)-2 to 4. The result suggests that the evaluation system with standard protocol established in (3)-3 is useful for evaluation of cholestasis risk.