

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）薬剤性間質性肺炎・重症薬疹に関するバイオマーカー候補の適格性確認と規制要件案の作成に関する研究

（英語）Studies for qualification of biomarker candidates on drug-induced interstitial lung disease and severe cutaneous adverse reactions, and for drafting the related guidance

研究開発実施期間：令和2年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）斎藤 嘉朗

（英語）Yoshiro Saito

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長

（英語）Director, Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

第二相・第三相試験での開発中止のそれぞれ25%及び14%は安全性の問題であり、また製造販売後に関しても、事後対応型から予測・予防型の安全対策への転換が必要とされている。特に死亡や入院期間の延長につながる重篤副作用に関して、早期の確定診断と服薬の中止・適切な治療を行い、重症化させないことが重要であり、副作用を的確に診断しうるバイオマーカーの利用は、画期的進展をもたらすと期待される。しかし、これまでにバイオマーカー候補として文献等で報告された分子は比較的多いものの、探索されたのみで別群試料を用いた検証がされていない、規制当局による適格性確認がなされていない、等の理由から医薬品開発や臨床現場では十分に利用されていない。適格性確認を受けることにより、当該マーカー分子の使用目的や使用範囲が明確となり、将来の診断キットの開発、さらには臨床試験及び臨床現場での利用が容易になることにより、医薬品開発・適正使用が進むと考えられる。

薬剤性間質性肺炎は、毎年約3,000件の重篤副作用報告がPMDAになされており、かつ日本人では海外に比して10倍以上、発症頻度が高い医薬品も多く、日本がバイオマーカー開発を主導すべきである。また重症薬疹は、本邦における副作用被害救済事例において、最上位を占めていることから、最も対策が必要な副作用である。

本研究は、以下を目標とした。

- 1) 薬剤性間質性肺炎と重症薬疹を対象に、計5種のバイオマーカー候補に関し、分析法バリデーションを行った測定系を用いて、患者試料を用いた臨床的バリデーションを行う。またこれら5種に関し、重篤副作用発現患者等由来組織やゲノム解析に基づき、副作用機序との関連性を解明する。これらを製薬企業等と連携して行い、最終的にデータを基にしてPMDAによる適格性確認を受けること。具体的には、間質性肺炎では、a) 重篤なびまん性肺胞傷害(DAD)、b) 間質性肺炎全体、重症薬疹では、c) スティーヴンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死融解症(SJS/TEN)、d) 薬剤性過敏症症候群(DIHS)、を診断するマーカー(既報マーカーとの併用を含む)に関し、適格性確認を受ける。
- 2) 欧米における副作用バイオマーカーの承認要件等について調査し、本邦における規制要件を提案すること。特に分析法バリデーションに関し、これまで提案がなされていないRNAバイオマーカーについては、個別に留意点文書を作成すること。

成果は以下の通りである。

1-1) 副作用患者試料等の収集

薬剤性間質性肺炎に関しては、医薬品による間質性肺炎発症患者の急性期と回復期31例、特発性間質性肺炎24例、及び上皮増殖因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤や免疫チェックポイント阻害薬等の適応症例(投与前から経日的に)98例(うち5例が間質性肺炎を発症)の血液及び臨床情報を収集した。また、薬剤性間質性肺炎と類似の画像を示す肺疾患である、うっ血性心不全及びがん性リンパ管症の症例を、それぞれ3例及び4例、収集した。重症薬疹に関しては、医薬品による重症薬疹発症患者の急性期と回復期(可能なら軽症期も)を69例、及び軽症薬疹患者113例の血液及び臨床情報を収集した。

1-2) 候補マーカー5種の分析法及び臨床的バリデーション及び関連機序の解析、及びPMDAによるファーマコゲノミクス・バイオマーカー相談

薬剤性間質性肺炎で3種、重症薬疹で2種のバイオマーカー候補を対象とした。

薬剤性間質性肺炎(DILD)の病型の中でも、びまん性肺胞傷害(DAD)は治療反応性に乏しく予後が悪く、回復しても線維化を残す。また早期DILDの画像所見のみではDAD病型か否かの判別が困難である。そのため、DILDが疑われる場合は、その病型がDADであるか否かを早期に判別することが重要とされる。現在、DILDの診断に用いられているSP-DやKL-6は、間質性肺炎全般を検出するものであり、DAD特異的な血液バイオマーカーを開発する臨床的意義は大きい。本研究のタンパク質バイオマーカー候補の一つ、Stratifin/14-3-3 σ (SFN)に関し、自製ELISA測定系を構築して分析的バリデーションを行い、本タンパク質の臨床的バリデーションを行った。すなわち、DILD患者の急性期と回復期および健康成人ボランティアの血清検体(探索群)を用いてSFN測定を行った結果、血清SFN値はDAD患者で有意な増加が認められ、独立した別群のDILD患者試料群(検証群, n=68)においても同様の結果が得られた。SFNは、SP-DやKL-6にはない、きわめて高いDAD特異性を示した。ROC解析の結果、SFNは、急性期と回復期の判別(AUC 0.93)、他のパターンでのDILD患者との鑑別(AUC 0.90)において優れた性能を有し、そのほか、真菌・細菌感染性肺炎や気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や非結核性抗酸菌症などの肺疾患との鑑別においても優れていた。ROC解析の結果に基づき、カットオフ値を3.6 ng/mLとして設定した。

またSFN(14-3-3 σ)は、14-3-3ファミリーに属するタンパク質である。ほとんどの14-3-3アイソフォームが種々の正常組織で幅広く発現するのに対し、SFNは重層上皮に特異的に発現することが知られており、特に、皮膚や食道組織で恒常的かつ豊富に発現している。一方、正常肺胞上皮においてはSFNの発現は弱く、SFNと間質性肺炎との関連性や間質性肺炎患者の血中SFN濃度が上昇する機序については不明な点が多い。そこでまず、DILD患者の肺胞洗浄液と血清中のSFN濃度の関連性を調べた。血清SFN値とBALF中のSFN値の間に相関が認められ(スピアマン順位相関係数 $r_s=0.609$, $P=0.012$)、血清SFN高値の患者ほど、気管支肺胞洗浄液(BALF)でもSFNが高い濃度で検出された。次に、DAD型間質性肺炎症例の剖検例を用いて免疫組織学的検討による肺組織中のSFNの発現を調べた。SFNは肺がん患者由来の正常部では発現は認められないが、DAD症例においては、DAD

の病理学的特徴でもある、増殖傾向が見られる気管支の基底細胞や II 型肺胞上皮細胞にて SFN の発現上昇が認められた。次に、II 型肺胞上皮由来の A549 細胞株を用いて、SFN の発現上昇および細胞外放出の機序について検討した。SFN は p53 により直接的な発現制御を受ける。そこで転写因子 p53 の活性化剤である JNJ26854165 を用いて A549 細胞を処理した結果、p53 の活性化に伴う SFN の発現上昇と細胞外放出量の顕著な増加が見られた。この SFN の細胞内の発現上昇と細胞外放出は、抗 p53 siRNA やカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK により抑制され、さらに細気管支上皮由来の初代培養細胞をブレオマイシンにて処理した場合においても同様の結果が得られた。これらの結果から、SFN は肺胞上皮細胞における p53 依存的なアポトーシスを介して細胞外に放出される可能性が示された。以上より、血清 SFN は、医薬品による急性肺傷害における組織傷害の度合いを反映する新しい DAD バイオマーカーとして有用であることが考えられ、臨床や新薬開発の現場における DAD 診断や治療反応性のモニタリングに役立つことが期待される。

この他、薬剤性間質性肺炎と特発性間質性肺炎及び膠原病肺の鑑別を補助しうるマーカー 2 種、並びに薬剤性過敏症候群及びスティーヴンス・ジョンソン症候群の診断を補助しうるマーカー各 1 種について、その血中濃度変動の検証を行うと共に、副作用との関連機序を明らかにした。

さらに、これらの結果を基に、PMDA のファーマコゲノミクス・バイオマーカー相談（適格性評価）を受けた。一定の評価を得たものの、さらに試料収集及び解析を行う必要性が指摘された。

2-1) 副作用バイオマーカーの本邦における規制要件の提案

米国・FDA、欧州 EMA で副作用バイオマーカーとしての適格性評価を受けた事例を調査し、その結果を基に、「医薬品開発ツールとしての安全性バイオマーカーに関する留意点」を作成した。この文書作成過程において、バイオマーカーの日本語用語集を、米国の FDA と NIH の合同プロジェクトである BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource を基に作成し、添付した。

2-2) RNA マーカーに関する分析法バリデーションの検討

RNA バイオマーカーを含む核酸バイオマーカーに関し、医薬品開発ツールとして用いる際の、定量 PCR 法による分析法開発並びにバリデーションに関する留意点文書を、他の AMED 研究班と合同で作成した。本研究班では、各種ガイドラインの調査及び RNA 部分を執筆した。国立医薬品食品衛生研究所で素案を作成後、製薬協、バイオアナリスフォーラム、PMDA、国立医薬品食品衛生研究所の委員から成る会議体で議論を行い、最終化した。

本研究は、日本人で発生頻度が高いとされる薬剤性間質性肺炎、及び医薬品副作用被害救済例の第一位である重症薬疹に関し、その診断補助に用いうるバイオマーカー（薬剤性間質性肺炎 3 種、重症薬疹 2 種）の Analytical validation (分析的バリデーション) 及び Clinical validation (臨床的バリデーション) を行うと共に、その関連機序を明らかにした点で、大きな成果をあげたと考える。今後、追加検討を行い、その結果を持って PMDA の再度の評価を受ける予定である。これらバイオマーカーの適格性が確認された場合、臨床試験及び製造販売後における医薬品の安全対策に利用可能となり、医薬品の開発及び適正使用における意義は非常に大きいと考える。

For serious adverse drug reactions that may lead to death or prolonged hospitalization, early diagnosis, discontinuation of medication, and appropriate treatment are important to prevent severe reactions. Among the reactions, Japan should take the lead in biomarker developments for drug-induced interstitial lung disease (DILD), for which approximately 3,000 cases of serious adverse drug reactions are reported to PMDA every year, and its incidence rate was reported to be several times higher in Japanese patients than in overseas patients in some drugs. Severe cutaneous adverse reactions (SCARs) are the most common reaction in the relieved cases by PMDA in Japan, and therefore, they are the most important adverse drug reactions that need to be addressed.

The objectives of this study were to

1) Perform clinical validation of five candidate biomarkers for DILD and SCAR using patient samples with validated analytical methods. The relevance of these five biomarkers to the mechanism of adverse drug reactions will be elucidated based on cell/tissue and genomic analyses derived from the patients. And finally, the data will be used for biomarker qualification by the PMDA.

2) Investigate the requirements for biomarker qualification for adverse drug reactions in the U.S. and Europe, and propose regulatory requirements in Japan. Additionally, with regard to analytical method validation, a separate "points to consider document" will be prepared for RNA biomarkers for which no regulatory proposal has been issued.

The results are as follows

1-1) Sample collection from the patients with adverse drug reactions

Regarding DILD, blood and clinical information were collected from 31 patients who developed DILD (at the acute and recovery phases), 24 with idiopathic interstitial pneumonia, and 98 patients (from pre-dose to daily) administered epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors or immune checkpoint inhibitors prospectively were collected. In addition, 3 and 4 cases of congestive heart failure and lymphangitis carcinomatosa, respectively, which are apparently similar CT images with DILD, were collected. For SCAR, blood and clinical information were collected from 69 patients with SCAR (at the acute and recovery phases), and 113 patients with mild drug eruptions.

1-2) Analytical and clinical validations for 5 candidate markers, investigation on the related mechanisms, and the Consultation on Pharmacogenomics/Biomarkers with PMDA

Three candidate biomarkers were targeted for DILD and two for severe drug eruptions.

Among the DILD subtypes, diffuse alveolar damage (DAD) has a poor prognosis due to poor response to treatment and leaves fibrosis even after recovery. In addition, it is difficult to determine whether or not a patient has DAD from the imaging findings of early-stage DILD alone. Therefore, when DILD is suspected, it is important to determine whether or not the disease type is DAD at an early stage. We found that serum stratifin would be useful as a new DAD biomarker that reflects the degree of tissue damage in acute lung injury caused by drugs, and is expected to be useful in the diagnosis of DAD and monitoring of therapeutic response in clinical setting and in new drug development. In addition, we validated the changes in blood levels and related mechanisms on two biomarkers that would help differentiate DILD from idiopathic interstitial pneumonia and collagen lung disease, and one marker each that may help diagnose drug-induced hypersensitivity syndrome and Stevens-Johnson syndrome/Toxic epidermal necrolysis. Furthermore, based on the results, they underwent the Consultation on Pharmacogenomics/Biomarkers (qualification) at PMDA. Although a certain evaluation was obtained, further sample collection and analysis was pointed out to be necessary.

2-1) Proposal on regulatory requirements for biomarkers on drug adverse reactions

"Points to consider for safety biomarkers as a Drug Development Tool" was prepared. In the process of preparing this document, a glossary of Japanese terms for biomarkers was prepared.

2-2) Consideration of Analytical Method Validation for RNA Markers

"Development and validation of qPCR methods for nucleic acid biomarkers as a drug development tool: points to consider" was prepared in collaboration with another AMED research group.