

氏 名 くりばやし りょうすけ
栗林 亮佑

学 位 の 種 類 博士 (薬科学)

学 位 記 番 号 富医薬博乙第 65 号

学位授与年月日 平成 29 年 4 月 19 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学 位 論 文 題 目 バイオ医薬品の糖鎖解析及び新薬の臨床評価に基づくレギュ
ラトリーサイエンス研究
(Regulatory science studies based on carbohydrata chain
analysis of the biological medicines and the clinical
evaluation of the new drugs)

論文審査委員

(主査)	教 授	新田 淳美
(副査)	教 授	大貫 義則
(副査)	教 授	酒井 秀紀 (紹介教員)

論文内容の要旨

近年、我が国において、レギュラトリーサイエンスの普及とその発展が進んでいるところである。レギュラトリーサイエンスは、「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学」と定義されている。レギュラトリーサイエンスの範囲は医薬品、医療機器、食品、化粧品、家庭用品、農薬、化学物質等が対象となり、科学技術の促進とともに、それをどのように人間社会に還元していくか、より望ましい形で調和させていくかは、今後より重要な学問領域になっていくことが期待される。医薬品、医療機器等のレギュラトリーサイエンス研究のうち、ウェット研究は厚生労働省の所管法人である国立医薬品食品衛生研究所が、ドライ研究は独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（ヒトに用いる医薬品、医療機器等の製造販売承認審査、安全対策等を行う厚生労働省の所管法人）がその一翼を担っている。本論文では、医薬品開発におけるレギュラトリーサイエンスについて、国立医薬品食品衛生研究所におけるウェット研究（第 1 章～第 3 章）と医薬品医療機器総合機構におけるドライ研究（第 4 章及び第 5 章）について記載した。

国立医薬品食品衛生研究所におけるレギュラトリーサイエンスとして、LC/MS を用いたバイオ医薬品における糖鎖不均一性解析について著述した。バイオ医薬品は、生物による生合成過程を生産に利用していることから、分子構造上不均一性を有する可能性が本質的に存在する。例えば、現在、細胞として最も汎用されているチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）を用いた場合、目的物質は翻訳後修飾によりグリコフォームを形成し、多様な糖鎖構造を有する糖タンパク質医薬品が製造される。その糖鎖の不均一性の違い及び各糖鎖の量的違いは、バイオ医薬品の有効性及び安全性に影響することが知られている。例えば、抗腫瘍活性を有する抗体医薬品では、Fc 部分に結合した N-結合型糖鎖の N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基に付加しているフコース（Fuc）を除去すると抗体依存性細胞障害（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC）活性が増強されることが知られている。また、抗体医薬品の糖鎖は、補体依存性細胞障害（Complement Dependent Cytotoxicity: CDC）活性にも影響を及ぼし、非還元末端のガラクトース（Gal）の付加が CDC 活性を増強することが知られている。抗体医薬品以外にも、様々な糖タンパク質医薬品で糖鎖が生物活性等に影響することが報告されており、エポエチン（EPO）では、糖鎖のシアル酸結合量が増加すると血中半減期が長くなることに起因し、網状赤血球産生量が増加することが知られている。このようにバイオ医薬品の糖鎖は有効性及び安全性に関係することがあるため、開発時には可能な限り詳細な糖鎖の構造、及び機能との関連性について解析を実施するとともに、糖鎖の有効性及び安全性に及ぼす影響の大きさに応じて製造工程や最終製品の品質管理において、適切な方法を用い

て、その恒常性を評価・管理することが重要となる。そのため、バイオ医薬品の糖鎖不均一性を分析する手法として、LC/MS の応用可能性を検討することを目的に、抗体医薬品及び EPO 製剤を用いて検討を行った。

第 1 章では、カラムスイッチング法と LC/MS を用いることで、抗体医薬品の糖鎖を含めた不均一性を確認するためのシステム 1 を考案した。本システムを応用することで、抗体医薬品の培養液を採取することで、製造方法中から抗体医薬品の重要品質特性の 1 つである糖鎖不均一性を確認することが示唆された。具体的には、本システムを用いることで、各抗体医薬品（リツキシマブ、トラスツズマブ及びパリビズマブ）の糖鎖不均一性、並びに抗体医薬品の有効性及び安全性に影響する糖鎖構造である Fuc の付加体及び Fuc の欠損体、並びにヒトの抗体中には存在せず免疫原性の懸念のある Gal ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Gal の G3F や G4F を観察することができた。また、カラムスイッチングシステム 2 を開発することで、抗体医薬品の軽鎖及び重鎖の不均一性をオンラインで還元し分析することで、より詳細な抗体医薬品の不均一性を確認することができた。

第 2 章では、EPO の先行バイオ医薬品及びバイオ後続品（EPO A 及び EPO C は先行バイオ医薬品、EPO A' は EPO A のバイオ後続品、EPO C' 及び EPO C'' は EPO C のバイオ後続品）の糖鎖不均一性解析への LC/MS への応用について検討した。その結果、LC/MS を用いることで、各製剤のシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、O-アセチル化の程度、N-グリコリルノイラミン酸（NeuGc）の付加体及び酸化体由来する様々な特徴的なグライコフォームパターンを観察することができた。また、EPO で有効性に影響するシアル酸の平均付加数を各製剤間で比較（EPO A、EPO A'、EPO B、EPO C、EPO C' 及び EPO C'' でそれぞれ 12.5、11.7、12.3、12.0、12.3 及び 11.4）することができた。さらに、EPO アナログで N-結合型糖鎖結合部位を 2 ヶ所増やしたダルベポエチンを用いて同様の分析を行ったところ、シアル酸が 19~22 個付加した糖鎖構造を確認することができた。以上より、EPO の先行バイオ医薬品及びバイオ後続品間、及び EPO アナログの糖鎖不均一性解析の類似性及び特性解析に LC/MS が有用であることが示唆された。

第 3 章では、EPO の糖鎖不均一性解析への LC/MS 及び多変量解析への応用について検討した。9 つの EPO 製剤間の糖鎖不均一性の違いを明らかにするために LC/MSⁿ で得られたデータを使って多変量解析を行った結果、主成分分析（PCA）は EPO 間の糖鎖不均一性の総合的な異同の評価、判別分析（OPLS-DA）は特徴的な糖鎖を評価するのに有用であった。具体的には、PCA により、4 つの先行バイオ医薬品（EPO A、EPO F、EPO H 及び EPO I）の糖鎖不均一性を区別することが可能であり、先行バイオ医薬品とバイオ後続品（EPO A のバイオ後続品：EPO B、EPO C、EPO D 及び EPO E、EPO F のバイオ後続品：EPO G）間の糖鎖不均一性の異同を確認することができた。一方、OPLS-DA を用いることで、EPO A、EPO G 及び EPO H では、特にアセチル化糖鎖、N-アセチラクトサミン（LacNAc）構造を有する糖鎖、及びフコシル化されていない糖鎖、EPO B、EPO C、EPO D、EPO E、EPO F 及び EPO I では、2 本鎖、3 本鎖及び 4 本鎖と分岐数の違い、並びにジ、トリ及びテトラのシアル酸数の違いが特徴的な違いで観察された。LC/MS 及び多変量解析は EPO 製剤間の糖鎖不均一性の違いを明らかにすることに有用であることが示唆された。

次に、独立行政法人医薬品医療機器総合機構におけるレギュラトリーサイエンスとして、新薬の臨床評価に関する比較研究について著述した。新薬の開発において、製薬企業は品質、有効性及び安全性に関する試験を実施し、その結果を医薬品医療

機器総合機構に提出しなければならない。医薬品医療機器総合機構は、提出された試験結果に基づき、申請された医薬品の品質、有効性及び安全性の審査を行うとともに、臨床現場での使用方法、安全性に関する情報提供内容の妥当性等の適切性に至るまで幅広い観点で審査を行う。

第4章では、遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン（recFSH）（フォリトロピンベータ及びホリトロピンアルファ）の排卵誘発における臨床評価について、臨床データパッケージ、有効性、安全性、効能・効果、用法・用量及び投与経路に分けてその異同について検討した。有効性の主要評価項目として、両品目とも排卵率が設定され、既存薬である精製下垂体性性腺刺激ホルモンを対照に試験が実施され、同程度の有効性が示されている（フォリトロピンベータ：83.0%（44/53 例）精製下垂体性性腺刺激ホルモン：87.3%（48/55 例）、ホリトロピンアルファ：79.1%（102/129 例）精製下垂体性性腺刺激ホルモン：82.6%（109/132 例））。recFSHを有効成分とする両品目であるが、その臨床データパッケージの構成では、実施された臨床試験、その臨床試験成績に基づく評価、添付文書での記載は、各品目での異同を明らかにすることができた。また、当該領域は、国内の臨床評価ガイドラインが存在しない領域であり、今後当該領域における臨床評価について議論することも重要と考えられた。

第5章では、抗コリン薬の過活動膀胱における臨床評価について、トルテロジン、ソリフェナシン、イミダフェナシン及びプロピベリンを取り上げ、臨床データパッケージ、有効性、安全性及び用法・用量について、品目毎での異同について検討した。その結果、OABに対する抗コリン薬の開発においては、プラセボに対する優越性を複数回示す必要があること、並びに第Ⅲ相試験ではプラセボに対する優越性に加え、既存薬に対する非劣性を検証することが求められている。また、有効性の評価においては、三つの評価項目（頻尿、尿失禁及び尿意切迫感）について有効性を示すことが求められていることが分かる。また、recFSHとは異なり、当該領域は国内において、「過活動膀胱治療薬の臨床評価方法に関するガイドライン」が存在していることから、recFSHの排卵誘発に比べ臨床評価法が明確になっており、実際、各品目での臨床評価に大きな違いがないと考えられた。

国立医薬品食品衛生研究所でのLC/MSを用いたバイオ医薬品の糖鎖不均一性解析は、医薬品の品質評価において重要な評価手法であるとともに、最新科学の品質確保への応用研究と考えられる。このように、当該研究はLC/MSを用いた科学技術を用いて、バイオ医薬品の品質評価手法、並びに臨床現場に医薬品を出荷可能か否かの判断を行うことで、科学技術の成果を人に調和させる科学と考えられる。一方、医薬品医療機器総合機構での医薬品の臨床評価は、新薬の有効性及び安全性を予測するとともに、臨床試験の中で有効性及び安全性を評価し、その得られた知見に基づき、臨床現場における適切な対象患者、用法・用量、適正使用のための方策（添付文書での注意喚起等）を判断していく。このように、LC/MSを用いたバイオ医薬品の糖鎖解析、及び新薬の臨床評価はレギュラトリーサイエンスの重要な構成要素の一つと考えることができる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

レギュラトリーサイエンスは、第4次科学技術基本計画(平成23年閣議決定)において、「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学」とされている。医薬品、医療機器等のレギュラトリーサイエンス研究は、国立医薬品食品衛生研究所が、ヒトに用いる医薬品、医療機器等の製造販売承認審査・安全対策等は、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構がその役割を担っている。申請者の栗林亮佑氏は、国立医薬品食品衛生研究所においてバイオ医薬品の糖鎖解析に関する研究を、また医薬品医療機器総合機構において新薬の臨床評価に関する研究を行い、医薬品のレギュラトリーサイエンスの実践に向けて道を開いた。

1. カラムスイッチング法とLC/MSを用いた抗体医薬品の糖鎖不均一性解析

抗体医薬品の糖鎖の不均一性の管理は、医薬品の有効性及び安全性を保証する上で、重要な品質特性である。栗林氏は、抗体医薬品の糖鎖不均一性を LC/MS で迅速かつ簡便に測定可能な分析手法を考案した。当該システムではプロテイン A カラムと脱塩カラムの2種類のカラム、及びカラムスイッチングシステムを利用することで、オンラインで糖鎖不均一性を解析することを可能とした。オンラインで軽鎖と重鎖に分けることで、より詳細な不均一性を確認するためのシステムの構築も行った。これらのシステムは、近年医薬品の品質評価及び品質保証として注目されている Quality by design (QbD) の糖鎖不均一性を解析するための Process analytical technology (PAT) として利用可能となることが示唆された。

2. エポエチンの先行バイオ医薬品及びバイオ後続品のグリコフォーム解析への LC/MS の応用

エポエチン (EPO) の糖鎖不均一性は非常に複雑で、糖鎖が *in vivo* 活性に大きな影響を与えることが知られている。栗林氏は、EPO の先行バイオ医薬品とバイオ後続品を用いて、LC/MS の糖鎖不均一性の異同評価への応用可能性について検討を行った。EPO のグリコフォームは m/z 1700–3600 の間に 10–16 個のマススペクトルとして観察された。デコンボリューションマススペクトルの結果、28000–32000 Da で糖鎖に由来する不均一性が認められた。LC/MS は EPO の先行バイオ医薬品及びバイオ後続品間の糖鎖不均一性解析に有用であることが示唆された。

3. LC/MS 及び多変量解析を用いたエポエチンの糖鎖不均一性解析

9 つのエポエチン (EPO) 製剤 (4 つの先行バイオ医薬品、5 つのバイオ後続品) を用いて、各 EPO 製剤から N-結合型糖鎖部分を切り出した試料を LC/MS により解析を行い、トータルピーク面積に対する各糖鎖のピーク面積比を計算した。そのデータを用いて、多変量解析 (主成分分析及び判別分析) を行った。その結果、主成分分析 (PCA) が、9 つの製剤間の糖鎖の総合的な類似性評価に有用であった。また、PC 値を使うことで、EPO 製剤間の糖鎖不均一性の類似性を視覚化することができた。さらに、判別分析 (OPLS-DA) を用いることで、各 EPO 製剤で特徴的な糖鎖を同定することが可能であった。

4. 遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモンの排卵誘発における臨床評価

遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン(recFSH)製剤であるフォリトロピンベータ及びホリトロピンアルファの排卵誘発における臨床評価に関して、その異同を検討した。その結果、有効性の主要評価項目として、両品目とも排卵率が設定され、既存薬である精製下垂体性腺刺激ホルモンを対照に試験が実施され、同程度の有効性が示されていた。臨床データパッケージの構成では、実施された臨床試験、その試験成績に基づく評価において異同を明らかにすることができた。

5. 抗コリン薬の過活動膀胱における臨床評価

抗コリン薬の過活動膀胱(OAB)における臨床評価について、トルテロジン、ソリフェナシン、イミダフェナシン及びプロピペリンを取り挙げ、臨床データパッケージ、有効性、安全性及び用法・用量について、品目毎での異同について検討した。その結果、プラセボに対する優越性を複数回示す必要があること、並びに第Ⅲ相試験ではプラセボに対する優越性に加え、既存薬に対する非劣性を検証することが求められていた。また、頻尿、尿失禁及び尿意切迫感について有効性を示すことが求められていた。これらの結果から、各品目の臨床データパッケージの構成、実施された臨床試験、その臨床試験成績に基づく評価、添付文書での記載等について、異同を明らかにすることができた。

以上の栗林氏の研究により、医療用医薬品開発におけるレギュラトリーサイエンスについて、ウェット研究とドライ研究における実例がまとめられた。バイオ医薬品の糖鎖不均一性解析は、医薬品の品質評価において重要な評価手法であるとともに、最新科学の品質確保へ応用が可能である。また、新薬における臨床評価は、レギュラトリーサイエンスの重要な構成要素の一つと考えることができる。本研究は、レギュラトリーサイエンスの定義にある「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づく的確な予測、評価、判断を行うこと」を実践したものである。本研究で得られた成果は、レギュラトリーサイエンスの更なる発展に貢献し、国民の医療の向上につながるものと期待できることから、社会的重要性が高いと考えられる。

主査および副査は、申請者 栗林亮佑 氏に面接試験ならびに学力確認試験を行うとともに論文内容について審査を行い、博士(薬科学)の学位を授けるに値すると判定した。

1. 栗林亮佑, 村上真紀, 益山光一, 近澤和彦(2011) 遺伝子組換え FSH の排卵誘発における臨床評価について. *レギュラトリーサイエンス学会誌*, 1(3): 133-141.(査読有)
2. Kuribayashi R, Hashii N, Harazono A, Kawasaki N. (2012) Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/mass spectrometry with a column-switching system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 67-68: 1-9.(査読有)
3. 栗林亮佑, 村上真紀. (2012) 抗コリン薬の過活動膀胱における臨床評価. *レギュラトリーサイエンス学会誌*, 2(3): 187-201.(査読有)
4. Harazono A, Hashii N, Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N. (2013) Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 83: 65-74.(査読有)
5. Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N. (2014) Characterization of N-glycan heterogeneities of erythropoietin products by liquid chromatography/mass spectrometry and multivariate analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28(8): 921-932.(査読有)