

創薬・開発イノベーションのための バイオマーカーの有用性

ノバルティスファーマ株式会社 オンコロジー早期臨床開発部
バイオマーカーサポートグループ グループマネージャ 都賀 稚香



1 はじめに
この20年を振り返ると、常に新しい創薬・開発の形が提言され、実施されてきた。

日本における臨床開発の大きな躍進のひとつは、1990年に発足したICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）の結果を受けた新GCP制定である。施行された1997年から、国際間でのデータ受け入れが進み、飛躍的にドラッグ・ラグ（drug lag、欧米諸国に比べて新薬承認が遅延する時間差）が短縮された。ただし、ここに留まらず、臨床開発のphilosophyは常に変化・改革を求められ、応えてきている。すなわち、海外で行なわれた治験データを活用し、日本人でもその成績が同じ傾向を示すかどうかを確認するブリッジング試験戦略から約10年後には、日本人も含めた様々な地域及び民族にまたがって臨床試験が実施される「国際共同治験」という概念が取り入れられ、国内・外を問わず当局と製薬会社との協働により新薬の世界同時開発の効率化に寄与している。

創薬においても忘れられないphilosophyの変化が約10数年前、

特にオンコロジーの分野で起こった。ハーセプチン®などの抗体や、グリベック®, イレッサ®など低分子化合物による分子標的治療薬の承認がそれである。それまでの抗がん剤は、細胞障害を主な作用機序としていたため、正常細胞に対しても障害を及ぼすことから、抗腫瘍効果と共に副作用の管理が臨床使用における最大の課題であった。一方、分子標的治療薬は正常細胞とがん細胞の違いを遺伝子・分子レベルで理解することにより、がん細胞に特異的な標的分子を見つけ出し、その阻害剤として設計されるため、従来の抗がん剤と比較して安全性の高さが期待されており、実際臨床使用での副作用管理が比較的容易である薬剤も多い。この概念は、長くがん特異的な効果の最大化と副作用の軽減が求められてきた抗がん剤の開発において、必然的な展開であったのかもしれない。（図1）

その後も、基礎研究の発展に伴い次々と重要ながん化シグナル及び標的分子が同定され、それに応じた分子標的治療薬が開発されている。しかしながら、次に述べるような分子標的治療薬ならではの課題も明らかになりつつある今、更なる挑戦が求められているように思う。

著者略歴

- 1993年 東京薬科大学 薬学部卒業
ノバルティス ファーマ(株) (旧サンド薬品株式会社) 筑波研究所に入社。前臨床毒性試験、安全性薬理試験、薬効薬理試験及びグリベックなどの承認申請に従事
- 2007年 東京薬科大学 薬学(薬理学) 博士号取得
Novartis Pharma AG (ノバルティススイス本社) に出向
Lab headとして、動物サンプルを用いたバイオマーカー測定手法の確立に従事
- 2010年 ノバルティス ファーマ(株) オンコロジー早期臨床開発部にてバイオマーカー戦略に従事

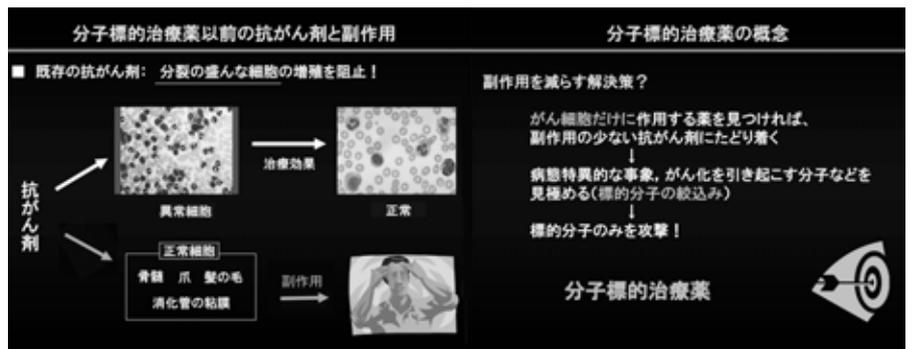


図1 従来の抗がん剤及び分子標的治療薬と副作用の概念

2 分子標的治療薬の開発とバイオマーカー戦略

順風満帆のように見える分子標的治療薬の創薬・開発だが、病態は、研究が進むほどに関与するシグナルが複雑であることが判明し、ときには代償性シグナルを構築することで治療薬への抵抗性を獲得してくる。弊社が第一世代の分子標的治療薬として経験したグリベック®のような戦略はなかなか組めないのが現実である。

グリベック®の場合、標的分子である Bcr-Abl (慢性骨髄性白血病, フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病) または c-Kit (消化管間質腫瘍) がその病態のほぼ 100% に発現しており、がん化のドライバーであることが明らかであった。従って、それらを阻害することで十分な治療効果が得られる。

ところが、このように単シグナルのみが、がん化を司るケースは珍しく、例えば肺がんなどは、ALK, EGFR, PI3K, KRas, JAK など、いくつものシグナル伝達経路が状況に応じ、異なった割合でがん化に関与しているため、ひとつの標的分子シグナルを阻害するだけでは十分な効果が得られない場合がある。従って、常に最新の研究データを確認しながら、どの癌腫のどのサブタイプで、どのシグナルが重要であるかを理解することが単剤での開発の一助となる。一方で今後必要となってくる分子標的治療薬の開発戦略のひとつは併用治療であろうと思われる。ひとつずつ関連する分子シグナルを止めることで、最終的にはがん化シグナルを総合的に阻害するという発想である。

このような戦略においては、単剤・併用開発で、抗腫瘍効果や副作用を、正しく測定し、タイムリーにモニターすることが重要となってくる。その重要なツールのひとつがバイオマーカーで

あり、適切なバイオマーカーを治験に組み込む戦略が、今後の開発の成功には必須であると考えられる。

3 バイオマーカーの開発

バイオマーカーとは「正常な生物学的過程、発病の過程、もしくは治療介入による薬理学的反応を反映する、測定および評価可能な特性」(1) である。この定義には生理学的マーカーのみならず、MRI, PET のようなイメージング技術も含まれる。

近年の研究・測定技術の進展により、バイオマーカー探索研究には多くの選択肢が与えられている。Pharmacogenomics, Toxicogenomics, Proteomics, Metabolomics など Omics と呼ばれる網羅的解析手法を用いて、遺伝子の発現、たんぱく質の構造解析、SNP の同定、細胞内の全代謝物質など、種々の分子情報の差異と共通性を見出し、生体内で生じている変化や反応を把握することで、バイオマーカーの選択に役立てようとする試みが広く行われている。ただし、ここでバイオマーカー候補物質が同定されたとしても、一般的なバイオマーカーとして認識されるまでには 10 年ほどかかると言われており、新薬の開発同様に、非常に慎重な検証が必要であることが分かる。

4 理想的なバイオマーカーとは

臨床使用の観点から、理想的なバイオマーカーについて考えてみる。特にオンコロジーの分野では、病態に特異的な分子・遺伝子レベルの変化を検討するために、標的臓器組織を用いてバイオマーカーの分析を行う場合が多い。このように手術や生検などの手技を伴うバイオマーカーを侵襲性バイオマーカーと呼ぶ。しかしながら、臨床において経時的なバイオマーカー分析のため

に、その都度生検標本を採取することは患者負担を考えると困難であることから、血液や尿サンプルを用いた非侵襲性のバイオマーカーの確立が常に期待されている。

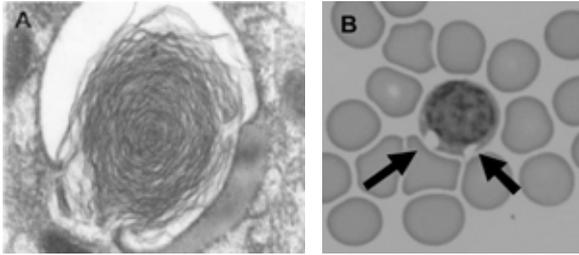
5 非侵襲性バイオマーカーの開発

ここでは筆者が実施した非臨床試験における非侵襲性バイオマーカーの測定法開発の試みを例として説明する。

1) Phospholipidosis とは

Phospholipidosis (PL) は、細胞のリソソームにリン脂質が過剰に蓄積された状態のことで、病態や薬物により誘導される。カチオン性両親媒性薬剤 (Cationic amphiphilic drugs, CAD) は、その分子構造により薬剤誘導性の Phospholipidosis (Drug Induced PL, DIPL) を引き起こすことが知られている。DIPL の誘導機序については未だ不明な部分も多いが、仮説としては a) CAD がリソソーム内に捕捉されリン脂質に結合することで、本来、細胞膜修復のためにリソソームから放出されるリン脂質をも捕捉し蓄積する、加えて b) CAD が phospholipase を阻害することで、リン脂質の代謝が阻害され、さらにリン脂質の蓄積が進むためと考えられている。

DIPL の臨床上の問題は、DIPL を誘導する薬剤がヒトにおいて PL の標的臓器である肝臓、肺、脾臓及び脳などに、機能不全などの副作用を発現する場合があることである。しかしながら、DIPL とそれら副作用との関連性は不明であり、発症率及び症状の時間的経過に関する情報が乏しいことから、ヒトでの安全性への懸念が否定できない。すなわち、非臨床試験で PL がみとめられた場合、国内外当局から臨床試験における DIPL の管理・モニタリングを提言される場合が多い。



A:電子顕微鏡下で確認できるlamellar body (2)。この特徴が確認できたらPLとの診断が可能。
B:光学顕微鏡下で確認できるリンパ球の細胞質内微小液泡(矢印)。Steatosisとの違いは、光学顕微鏡では識別できない。

図2 Phospholipidosisの病理組織学的特徴

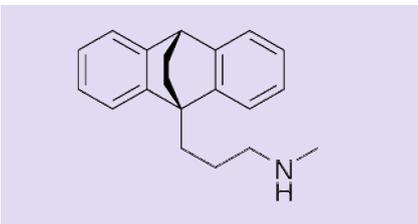


図3 Maprotilineの構造式

2) Phospholipidosis 診断方法

これまでの伝統的なDIPLの診断方法は、電子顕微鏡下でPLの特徴であるlamellar bodyを確認することである(図2)。この手法を臨床で用いる場合は、肺や肝臓などの標的臓器を生検する必要があるが、頻回の生検実施は、患者負担や倫理的な観点からも推奨されるものではなく、従って、臨床使用は事実上不可能である。

3) FCMを用いたDIPL非侵襲性biomarkerの開発

全身性のDIPLが誘導された場合、末梢血中の白血球にもPLの蓄積が認められることが報告されている(2)。Halsted BRらは(3)、白血球をNile Redで染色しフローサイトメトリー(FCM)を用いて、白血球PLを検出できることを提唱した。そこで、DIPLを非侵襲的にモニターできるバイオマーカーとして、FCM法を用いた白血球PL検出方法を確立(バリデーション)し、組織・全身性DIPLのサロゲートマーカーとしての可能性について検討した。

実験デザイン:

1. ラットにCAD構造を有する抗うつ薬Maprotiline 150mg/kg/day(図3)および溶媒対照を4日間投与した。
2. 最終投与の24時間後(試験5日目)に末梢血を採取し、白血球PL検査を実施した。

(1) 末梢血を採取し、溶血後に遠心分離法により白血球を単離。

(2) 単離した白血球をNile Redにより10分間染色。

(3) SSC vs FSC scattered plotを用いて、リンパ球+単球及び顆粒球のsub populationを区分。(図4)

(4) 非染色negative controlを用いて蛍光検出器の調整を行い、その後Nile Redで染色した白血球サンプルの蛍光を測定。(図5)

(5) 結果は、Nile Red染色サンプルと非染色negative controlの蛍光強度の差の平均を、Maprotiline投与群と溶媒対照群とで比較。(図6)

3. また同じ血液を用いて塗沫標本作製し、白血球(特にリンパ球)の細胞質内微小液泡の発現頻度を算出した。

4. さらに同日に剖検を行い、標的臓器である肺、肝臓、脾臓の病理組織検査を行い、PL関連所見の有無を確認した。

4) 結果

Maprotiline 4日間投与の結果、図6に示すように、Nile Red染色後の平均蛍光強度は溶媒対照群に比較して有意に増加していた。また血液塗沫標本においてもDIPLを示唆する所見である細胞質内微小液泡が、対照群ではほとんど認められなかったのに対し、Maprotiline投与群ではリンパ球のおよそ50%の頻度で発現していた。さらに病理組織検査の結果から、

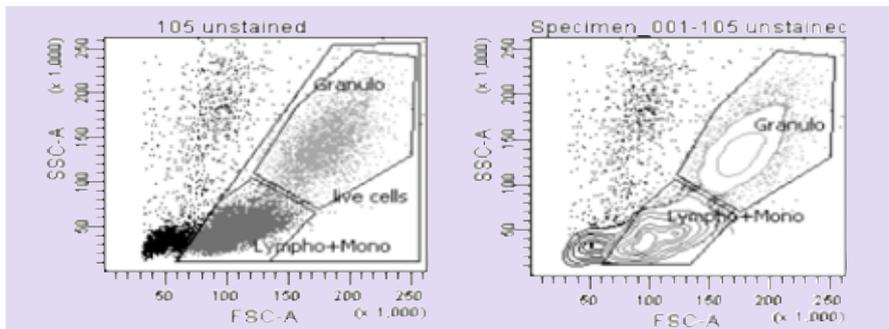
Maprotiline投与群では、肺胞泡沫細胞が中程度認められた。他の臓器では対照群及びMaprotiline投与群共に何も所見がみられなかったことから、Maprotilineの標的臓器は肺であることが示唆された。

バリデーション試験ではN数が少なく、測定ポイントも投与後の一点のみであったが、後に同様の方法も用いて、CAD構造を有する抗がん剤を14日間ラットに投与した実験を行い、Nile Redで染色したリンパ球の蛍光強度が実験開始前、実験4、8及び15日目で経時的な増加を示すことを確認し、さらにそれらの値が、リンパ球の細胞質内微小液泡の発現頻度や標的臓器でのPL関連所見のグレードと正に相関していることが示された。

これらの事実から、白血球PLを検出するFCM法は、DIPLの発現や検出をモニターするには適したサロゲートマーカーではないかと考えられる。

5) 臨床への応用

繰り返しになるが、バイオマーカー開発の最終目的は臨床での実用化である。前述のFCM測定法を実際に臨床使用するためには、まだいくつかのハードルがある。ひとつは、サンプルの保存状態を検討する必要があること。非臨床試験では新鮮血液標本を用いて検討したが、臨床使用ではたとえFCM測定であったとしても一晩以上保存した血液細胞サンプルを分析する場合は少なくない。従って、測定方法の開発には、こうした臨床使用の利便性を加味した条件検討を行う必要がある。加えて念頭に入れておかなければならないことは、白血球PLは、臓器特異的なDIPLバイオマーカーではないため、この値をもって標的臓器の副作用を予見することは難しく、さらに研究が進み、組織特異的なバイオマーカーと組



Lympho+Mono; リンパ球+単球, Granulo; 顆粒球
 図4 FCMのSSC vs FSC scattered plotにおけるリンパ球+単球及び顆粒球のsub populations

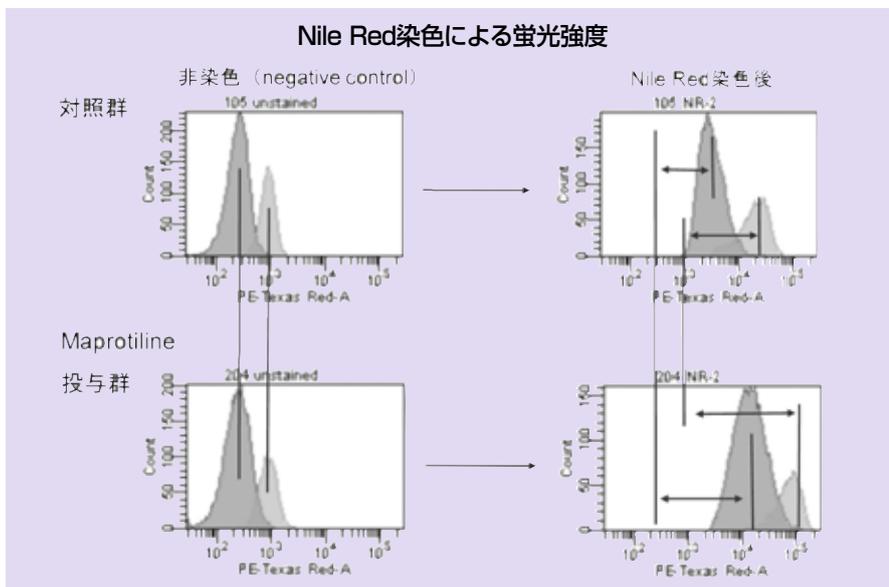
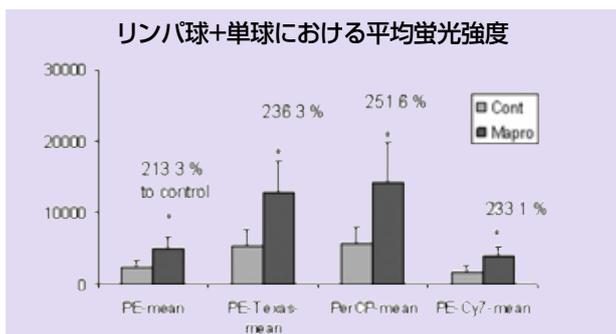


図5 Nile Red染色による蛍光強度の変化



Cont; 対照群, Mapro; Maprotiline投与群, 横軸は各波長の検出器を示す。
 図6 Maprotiline投与による, Nile Red染色後の平均蛍光強度変化

み合わせるにより、臨床上のさらなる意義を確立する必要がある。

6 バイオマーカーを用いた対象患者の適正化

最後に、臨床戦略及び創薬・バイオマーカー戦略両方の philosophy の変化が必要となる提言をして、本稿のあ

とがきに代えたい。分子標的治療薬の開発が進むにつれて、バイオマーカーの使い方も大きく変わってきているのは前述の通りだが、これまでの薬効や安全性をトラッキングするための測定項目といった意味合いだけではなく、今後は治療薬に対する反応性を予測する因子としての使い方が重要になってくる。すなわち、投与前に標的分子/遺伝子の異常が存在するかしないかで、治療薬に対する反応性を予測できるマーカーの探索である。イレッサ®とEGFR 遺伝子変異のように、これまで

にも治療薬に対する反応性の予測因子の探索は行われてきたが、ほとんどは開発が進む段階で明らかになってきたものであった。しかしながら、病態研究のめざましい発展は、事前にこのような反応性予測因子をバイオマーカーとして用いた開発を可能としつつある。

例えば、遺伝子 X に変異を有する患者を対象として、遺伝子 X 変異を標的とした治療薬の開発を実施する。この戦略のメリットは、薬剤の特徴を踏まえて効果が期待される患者対象を適切に選ぶことで、臨床上有意味な効果が得られ開発が進む、と同時に、癌腫の分子学的特徴から効果が期待されない患者に、副作用の可能性を伴う治療を提供するリスクを軽減することができることである。

現時点では「薬剤の特徴を踏まえた対象患者の適切化」という言葉になるが、これは決して患者の治療の選択肢を狭めるものではない。なぜならば、我々の目指すところは、様々な病態/分子変化に対応できる、多くの分子標的治療薬を提供することにあるからである。治療薬が十分に取り揃えられた時、「患者病態の特徴に合わせた、適切な治療薬の選択」との言葉に置き換えることができ、それが真の個別化医療となるはずである。

このように、今後の新たな挑戦にはバイオマーカーの開発と用途が大きく関わってくると考えられる。非臨床研究から臨床応用へと、トランスレーショナルリサーチを牽引するバイオマーカー戦略を十分に活用し、一刻も早い個別化医療の確立を目指したい。

文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group. Clin Pharmacol Ther. 2001;69:89-95.
- 2) Xia Z et al. Biochem. Pharmacol. 1997;53:1521-1532.
- 3) Halstead BW et al. J. Appl. Toxicol. 2006;26:169-177.