

【別添様式】

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業
最終報告書（平成24年度～28年度）

研究機関名：国立がん研究センター

研究事業名	全ゲノム配列解読・分子イメージング技術を組み合わせた革新的創薬研究手法の開発と個別化医療の実現
分類	医薬品主体
1. 研究の概要 医薬品開発研究における薬物血中濃度と薬力学を評価する PK/PD 解析は、創薬シーズを基礎から臨床へ導入する際の至適投与量の決定、個人間変動の評価など有効性と安全性の保証に有用である。近年、質量分析技術を応用した MALDI 法を基盤とする質量分析イメージング (mass spectrometry imaging, MSI) が注目されている。本法は、他のイメージング技術と異なり、標識体無しで薬物の分布を可視化できるため、創薬研究における次世代 PK/PD 解析ツールとして期待される。更に、米国 FDA がデスクトップ型次世代シーケンサーを診断機器として認可したことから、ヒトゲノム解読・高速シーケンス技術開発を基盤としたゲノム医療の実現化が加速し、次世代ファーマコゲノミクスを応用した個別化治療が近い将来医療現場に導入される可能性が期待される。 本研究班では、PK/PD 解析データを統合解析する高度先駆的 PK/PD/PGx 解析を実現し、分子イメージング技術ならびに次世代シーケンサーを活用した創薬研究手法のガイドラインの作成と技術開発を実施した。これまでの研究により、質量分析イメージング技術は、小分子化合物においては実用レベルと考えられるが、抗体医薬の分析は感度において実用レベルには更なる改善が必要である。また、次世代シーケンサーを活用した遺伝子解析では、解析パネルの作成を行ったが、臨床研究での経験をさらに重ねて実用化に向けた検討を重ねる必要がある。 本研究班では、「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー」を取り纏め、平成 29 年度以降も国内製薬企業と連携して本技術の浸透・拡大に引き続き努めることとした。また、次世代シーケンサーを用いる遺伝子解析は、製販後の新規抗がん薬の安全性対策試験に用いることで有用性の解析を引き続き行い、実用化に向けた検討を進める。	
2. 研究の概要及び成果について (1) ガイドライン等の策定に必要な試験・研究 (平成 24 年度) ・質量分析イメージング装置 (Shimadzu) を導入し、医薬品のイメージング測定系構築の検討を行った。 ・実験動物モデルにおける分子イメージング装置の有用性検証	

- ・次世代高速シーケンサーを用いた遺伝子解析手法の検討として、薬剤反応性関連遺伝子群のゲノム解析を実施した

(平成 25 年度)

- ・質量分析イメージング解析の標準的測定法の探索（前処理方法の再現性）
- ・質量顕微鏡分析の改良と測定系の構築
- ・実験動物モデルにおけるマスイメージングの有用性検証
- ・臨床研究応用のためのパイロット試験

(平成 26 年度)

- ・質量分析イメージング解析手法の再現性と問題点の把握
- ・イメージング分析に用いる連続切片中の薬物濃度を定量し、画像の標準化を行う「定量イメージング(quantitative mass spectrometry imaging, qMSI)法」の検討開始
- ・実験動物モデルを対象とした基礎的検討と臨床試験を実施し再現性・有用性評価
- ・次世代シーケンサーを用いた解析の再現性の確認

(平成 27 年度)

- ・定量性を示す質量分析イメージング解析手法の構築
任意の部位をレーザマイクロダイセクションにて採取し、LC-MS/MS で組織中薬物量を測定し、同程度であることを確認（15%以下の誤差）
- ・再現性が高い標準解析手法の開発
実験動物モデル、ヒトを対象とした探索的試験により、解析結果の信頼性を確認。定量性を確保する質量分析イメージング手法の標準操作法(SOP)を決定し、リフレクションペーパー作成の参考資料とした。
- ・エルロチニブ、アレクチニブの分布を血液脳関門における輸送制御因子の一つである p 糖タンパク質により制御されることをイメージング技術で確認
- ・定量イメージング手法に従い、腫瘍組織での薬剤分布にバラツキがあることを確認
- ・抗体医薬は大分子であるため、直接的な質量分析を用いたイメージング解析は困難
- ・適切な前処理および酵素処理方法を実施することにより、検出可能であることが確認されたが、感度が実用レベルするには、測定感度の向上が必要
- ・NCC-PGx panel (Ver. 1) を用いたゲノム解析に基づく薬剤投与による有害事象との関連解析を実施
- ・薬物動態・薬力学関連 147 遺伝子のターゲットキャプチャーシークエンスによって、112,799 個の SNP を検出した。SNP データベース (dbSNP Build 138) に登録されているものが 3,536 種類、登録されていない新規のものが 1,082 種類あった。
- ・機能的変化を起こすと考えられる機能性 SNP 候補として、アミノ酸置換を伴う配列多

型を 135 遺伝子 11,475 個、ナンセンス配列多型を 10 遺伝子 73 個、スプライシング異常を伴う配列多型を 5 遺伝子 105 個、フレームシフトを伴う挿入欠失多型を 10 遺伝子 698 個、フレームシフトを伴わない挿入欠失多型を 6 遺伝子 99 個検出した。

- ・クリゾチニブ投与による有害事象を示した症例群との関連解析を行なった結果、グレード 3 以上の有害事象を示す遺伝子群を新たに見出した。

(平成 28 年度)

- ・定量性を示す質量分析イメージング解析手法の構築、ならびに再現性が高い標準解析手法の開発では、製薬協の協力を得て国内製薬企業各社に同一検体を送付して、イメージング分析および解析を行い、測定結果の再確認を行った。
- ・協力製薬企業は、独自に設定された分析手法にてイメージングを実施したが、同一のイメージング画像は得られていない。リフレクションペーパーに明記したように、前処理、測定、画像化の各ステップの影響を受けることが確認された。
- ・具体的には、検体前処理の違い、検体保管方法、内部標準物質使用の有無、バリデーション方法、イオン化補助剤の選択、塗布方法、溶媒の選択、など分析におけるハンドリングの違いに加えて、質量分析装置の違い（ブルカー、島津製作所、サーモフィッシャー、ウォーターズ）、質量分析装置の基本性能の違い（質量分解能、感度、精度、空間分解能）が影響すると考えられる。
- ・得られたマススペクトル情報を画像化するにあたり、解析ソフトのアルゴリズム（スペクトルのセントロイド処理の有無、各ピークの強度計算など）の影響を強く受けることが確認された。
- ・質量分析イメージングを用いた医薬品開発分野における薬物分布の可視化は、薬物動態研究に加えて、薬理学的な Proof of mechanism 解析においても有用な解析手法と考えるが、上記の問題点を改善する必要がある。
- ・以上纏めると、質量分析イメージングは、次世代の薬物動態・薬力学的解析として有用性および応用の可能性が高い技術であることから、医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関してリフレクションペーパーとして取り纏めた。技術利用として、他のイメージング技術との違いと有用性について、医薬品開発における技術医療の可能性について、分析時の留意点（妥当性の確認、条件設定、定量方法、画像処理）に関して示した。
- ・抗体医薬のモデル化合物としてトラスツズマブを用い、酵素消化処理で切断される配列の質量分析イメージングにおける信号検出効率化を試みた。質量分析イメージングにおいて消化済ペプチドを感度良く検出するためには、組織切片上での酵素処理 (on-tissue digestion) において組織上の標的分子を効率的に酵素消化する必要がある。しかしながら、実用レベルとするためには、測定感度のさらなる向上が必要

- ・ NCC-PGx panel を用いたゲノム解析に基づく薬剤投与による有害事象との関連解析
- ・ 1 回目の関連解析には機能性 SNP のみを用いて、グレード 3 以上の有害事象を示した群で TCF7L2 遺伝子を、グレード 3 以上の肝障害を示した群で FCGR2A 遺伝子を見出した。
- ・ 2 回目の関連解析では、アミノ酸置換を起こさない SNP 以外の全エクソン内配列多型と挿入欠失多型を用いた。グレード 3 以上の有害事象を示した群で、EPHX1 遺伝子と TCF7L2 遺伝子が検出された。グレード 3 以上の肝障害を示した群で、DPYD 遺伝子、SLC19A1 遺伝子、FCGR2A 遺伝子、EPHX1 遺伝子、EDN1 遺伝子が検出された。
- ・ 機能性 SNP のみを用いた場合は候補遺伝子が限られるため、PGx 解析にはより多くの候補遺伝子を検出する方法が適していると思われる。なお、TaqMan 法を用いたバリデーションによって FCGR2A 遺伝子 SNP の存在を確認した。
- ・ 次世代シーケンスのリード数に基づく遺伝子コピー数解析 (XHMM: eXome-Hidden Markov Model 法) を行い、18 遺伝子領域にコピー数多型を検出した。コピー数多型を用いて関連解析を行ったところ、グレード 3 以上の有害事象を示した群において FCGR3A のコピー数現象が有意差をもって検出された。しかしながら TaqMan 法による FCGR3A 遺伝子コピー数の測定値と不一致であった。原因は次世代シーケンスデータのマッピング過程において、FCGR3A 遺伝子と相同性の高い FCGR3B 遺伝子に誤ってマッピングされたためであることが判明した。相同領域によるミスアラインメントをなくすために、解析アルゴリズムの改良を行った。新しい手法によってコピー数多型があると評価された遺伝子と有害事象発症との相関を調べたが、有意差のある遺伝子は残らなかった。

(2) ガイドライン等の策定

(平成 24-26 年度)

- ・ ガイドライン作成に向けた研究段階
(平成 27-28 年度)
- ・ 研究事業の成果である「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー」の作成において、製薬協を通じて公募した国内製薬企業と共同で質量分析イメージング技術 (適応範囲、再現性、感度、装置特性) について共同研究を行った。新技術紹介であるリフレクションペーパーの紹介、ならびに本技術を用いた創薬研究の方向性に関して、日本バイオアナリシスフォーラム、日本薬物動態学会等とも連携し討論を実施し、最終案を取り纏めた。

3. 研究の組織体制及び人材交流実績等について

(1) 組織体制

(平成 24-26 年度)

総括研究者代表	藤原康弘（国立がん研究センター 中央病院）
副総括研究者代表	濱田哲暢（国立がん研究センター 研究所）
研究協力者	柴田龍宏（国立がん研究センター 研究所）
	田村研治（国立がん研究センター 中央病院）
	細田文恵（国立がん研究センター 研究所）
	新聞秀一（国立がん研究センター 研究所）
研究連携者	礪部威（島根大学医学部）
	南 博信（神戸大学医学部）
	岡本 勇（九州大学医学部）
協力製薬企業	佐藤孝明（島津製作所）
	嶋田崇史（島津製作所）

（平成 27-28 年度）

総括研究者代表	藤原康弘（国立がん研究センター 中央病院）
副総括研究者代表	濱田哲暢（国立がん研究センター 研究所）
研究協力者	柴田龍宏（国立がん研究センター 研究所）
	田村研治（国立がん研究センター 中央病院）
	細田文恵（国立がん研究センター 研究所）
	林 光博（国立がん研究センター 研究所）
	相川博明（国立がん研究センター 研究所）
協力製薬企業	第一三共、中外製薬、協和醗酵、田辺三菱、武田薬品、アステラス

（2）人材交流の状況・効果

（平成 24-26 年度）

国立がん研究センター 福田博政（平成 24 年 11 月より医薬品医療機器総合機構）

「医薬品医療機器総合機構・新薬審査第五部において、アカデミア発の新薬開発に貢献すべく、薬事戦略相談、対面助言、審査業務等を通し審査側の立場から、抗悪性腫瘍分野の新薬開発の流れや留意点について学び、国立がん研究センターの基礎研究者へのフィードバックをはかった。抗悪性腫瘍分野の薬理パートの審査員として、これまでの基礎研究者としての経験と知識を生かして機構の実際の審査業務に携わった。今後の進展が予想される個別化医療に対応した薬理審査のあり方についても機構内及び外部専門家との議論に参加し、機構科学委員会「抗がん剤の非臨床薬理試験に関する取りまとめ」作成に寄与した。

↓↑

医薬品医療機器総合機構 秦 利幸（平成 27 年 11 月より国立がん研究センター）

「国立がんセンター研究所において、抗悪性腫瘍薬等の臨床開発への応用を目指した、

イメージングマス等の最新の創薬研究手法について学んでいる。また、PK/PD 研究を始めとした薬物動態学的研究の基礎となる血中薬物濃度測定法について、現在汎用されている測定法の実際を学ぶために、LC-MS/MS を用いたクリゾチニブの測定法を構築し、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」を参考にバリデーションを実施した。また、当該測定法を用いて、クリゾチニブの PK/PD 研究に係る臨床研究 2 試験で採取された血漿検体の測定を実施した」

(平成 27 年度-28 年度)

国立がん研究センター 五十嵐 美德

(平成 27 年 4 月より医薬品医療機器総合機構)

「医薬品医療機器総合機構・新薬審査第五部において、アカデミア発の新薬開発に貢献すべく、初回治験届調査、対面助言、審査業務等を通し審査側の立場から、抗悪性腫瘍分野の新薬開発の流れや留意点、及びガイドライン作成について学び、「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー（案）」を作成に協力した。

↓↑

医薬品医療機器総合機構 中野慎太郎

(平成 27 年 9 月より国立がん研究センター)

「国立がん研究センター研究所において、抗悪性腫瘍薬等の臨床開発への応用を目指した、質量分析イメージングの最新の創薬研究手法について学んでおり、これまでの研究成果を取り纏めて、「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー（案）」を作成した。

4. その他（論文等を含む）

・医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー（最終案）添付する。協力製薬企業は、国立がん研究センターが提供する動物組織を用いて、クロスバリデーションを実施した。現状と今後の取組を以下に纏める。

【A 社】

・既知薬物を用いて、毒性の出ている部分に薬物が局在しているか検討し、測定スポットごとにイオン化が異なるか、定量法バリデーションを検討中

【B 社】

・海外 CRO を通じて、未変化体と代謝物の分布の差を検討中であるが、定量性でなく、定性的評価を中心に検討を進めている。

【C 社】

・ヒト血中濃度と薬効または毒性をつなぐ橋渡しの位置づけとして活用。現在の技術レベルで何ができるか、利点と限界を検討

【D社】

・社内化合物で検討中である。実験動物全身切片から細かい組織に至るまで検討している。組織毎にピーク強度が異なる化合物が見つかったが、実際の濃度を反映していないデータが得られたことがあった。定量性について検討

【E社】

・組織分布試験、標準品添加によるフィジビリティ試験を実施した。社内ワーキンググループを立ち上げ、他部署と情報交換している。定量法、ISの選択、定量範囲などについて検討

【注】

1. 報告書は、日本工業規格A4の用紙を用いて、各項目の記載量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして記載願います。
2. 報告書中2. 及び3. の項目については、これまでの経緯等を、原則、年度毎に記載願います。
3. 報告書は、要点を簡潔に記載し、参考情報等は、適宜、別添資料として添付願います。最終的に、厚生労働省HP等で公表を予定しています。