

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）

アルツハイマー病治療薬の非臨床評価基準策定のためのレギュラトリーサイエンス研究

アルツハイマー病創薬開発に関連する 非臨床評価ガイドライン作成のための 手引書ドラフト

国立大学法人 京都大学大学院医学研究科

平成 28 年 11 月

目次

1. 緒言	5
1.1 目的	6
1.2 背景	7
1.3 適用範囲	7
2. アルツハイマー病治療薬の開発における非臨床試験の試験項目について	8
2.1 アルツハイマー病治療薬開発における非臨床試験の実施に関するガイダンス	8
2.2 各国のガイドラインあるいはガイダンス（総称として以下、ガイドライン）の要約	14
3. DYRK1A 阻害剤の研究成果と手引	17
3.1 代謝安定な新規 DYRK1A 阻害剤の取得	20
3.2 分子イメージングに向けた DYRK1A 阻害剤の PET トレーサー化	22
3.3 新規アルツハイマー病動物モデルの作製	22
3.4 新規 DYRK1A 阻害剤の代謝安定性および安全性試験	23
3.5 第二世代 DYRK1A 阻害剤の安全性試験	26
3.6 バイオマーカー	31
4. アミロスフェロイドワクチン療法の研究成果と手引	33
4.1 治療標的としての A β の妥当性	34
4.2 A β ワクチン開発戦略	34
4.3 A β による神経毒性のメカニズム	37
4.4 5年間の成果	39
5. 注釈	46
6. 参考文献	47
7. レギュラトリーサイエンス研究委員会委員	57

略語一覧

AD	Alzheimer's Disease (アルツハイマー病)
AD dementia	Alzheimer's Disease dementia (認知症)
ADMET	Absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity (吸収、分布、代謝、排泄、毒性)
ADNI	The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative
APOE ϵ 4	Apolipoprotein E ϵ 4 allele
APP	Amyloid Precursor Protein (アミロイド前駆体タンパク質)
ARO	Academic Research Organization (アカデミック臨床研究機関)
ASPD	Amylospheroids
AUC	Area Under the blood concentration time Curve (濃度曲線下面積)
A β	Amyloid β protein (アミロイドベータータンパク質)
BPSD	Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (認知症の行動・心理症状)
Cmax	Maximum Plasma Concentration (最高血漿中濃度)
CCR4	C-C Chemokine Receptor type 4
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMC	Chemistry, Manufacturing and Control (化学、製造、品質管理) または Carboxymethyl Cellulose
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (精神障害の診断と統計の手引き)
DSCR	Down Syndrome Chromosome Region (ダウン症候群の染色体領域)
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-Regulated Kinase 1A
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (酵素結合免疫吸着アッセイ)
ES	Embryonic Stem cells (胚性幹細胞)
FDA	Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)
FDG-PET	¹⁸ F-Fluorodeoxy Glucose- Positron Emission Tomography
FOB	Functional Observational Battery (機能観察総合評価法)
GCP	Good Clinical Practice (医薬品の臨床試験の実施の基準)
GL/GD	Guideline/Guidance (ガイドライン/ガイダンス)
GLP	Good Laboratory Practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)
GMP	Good Manufacturing Practice (医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準)

GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
IC50	Half maximal (50%) inhibitory concentration (50%阻害濃度)
iPS	induced Pluripotent Stem cell (人工多能性幹細胞)
JST	Japan Science and Technology Agency (科学技術振興機構)
Kd	Kinetic parameters (dissociation constant)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法)
mAb	Monoclonal antibody (モノクローナル抗体)
MCI due to AD	Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease (軽度認知障害)
MFD	Maximum Feasible Dose (投与可能な最大用量)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (磁気共鳴画像法)
MTD	Maximum Tolerated Dose (最大耐量)
NAK α 3	Na(+)/K(+)-ATPase α 3 subunit
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (非ステロイド性抗炎症薬)
OCTGT	Office of Cellular, Tissue and Gene Therapies
PET	Positron Emission Tomography (陽電子 放射断層撮影)
PiB-PET	Pittsburgh compound-B- Positron Emission Tomography
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (医薬品医療機器総合機構)
POC	Proof Of Concept (概念実証)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (一塩基多型)
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography (単一光子放射断層撮影)
T1/2	T half (消失半減期)
TK/PK	Toxicokinetics/ Pharmacokinetics (トキシコキネティクス/ファーマコキネティクス)
5xFAD	five Familial Alzheimer's Disease

1. 緒言

基礎医学研究や薬学研究などの貴重な成果を臨床応用するためには、純粋な基礎研究だけでなく、目的物質の決定、安全性、毒性の確認や用量・用法の設定のための非臨床試験、そして臨床試験を実施する必要がある。目的物質の準備のためには、その規格や安定性などのデータを取得し、GMP に準じた製造方法の確立が必要である。また、非臨床試験は通常専門の受託機関で実施することが多いが、目的物質の剤型や臨床における適応疾患をよく考えて、動物実験を実施する適切なデザインを考える必要がある。非臨床試験のデータの信頼性保証のためには、GLP に準拠した試験の実施が推奨されている。これらの試験結果をもとに、臨床試験を実施することになる。臨床試験は初めて人体へ投与するために、十分に安全性を重視し科学的、倫理的に妥当でなければならない。臨床現場における専門家と適切な設備を整えた質の高い医療実施体制は、被験者保護の観点からも重要である。その試験実施に関する内容は GCP が定められており、臨床現場を客観的に評価するための各種規定の整備や、適切なモニタリングが必要となっている。また、得られた臨床試験データは、適切なデータマネージメントを経て、統計解析がなされる。

このような基本的な医薬品開発においては、企業と異なりアカデミアではとくに GMP、GLP、データサイエンスに関する専門家は極めて少なく、外部の有識者との連携が重要となるが、とくに基礎データを基に医薬品の製造販売を目的とした承認申請を行う企業を早期に選定し、動物愛護の観点からも必要な各種データ取得に重複や欠損がないように注意することが肝要である。しかしながら、厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業などによって大学病院等で ARO が整備されつつあり、また医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業によって、アカデミアと PMDA の交流や情報交換が進み、上記の弱点は克服されつつあるといえる。また、文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業などにより、アカデミアの化合物ライブラリーやスクリーニング設備も充実しつつあり、アカデミア発の創薬シーズが増加するものと期待される。

新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特性を検討するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール、提出書類のフォーマットなどを標準化することにより、製薬企業による各種試験の不必要な繰り返しを防いで医薬品開発・承認申請の非効率を減らし、結果としてよりよい医薬品をより早く患者のもとへ届けるために ICH ガイドラインが整備されている。非臨床評価に関しては ICH にて新医薬品の品質(Quality)・安全性(Safety)・複合領域(Multidisciplinary)に関する分野において統一した 65 ガイドラインが検討整備されている(2015年11月現在)。しかしながら、病態(疾患)によっては ICH ガイドラインに合致しない場合があり、臨床評価ガイドライン(有効性)で整備された降圧薬のように各病態(疾患)に関する非臨床評価ガイドライン整備の要望がある。

1.1 目的

本資料の目的は、アルツハイマー病（以下 AD）治療薬開発における非臨床試験プログラム用の情報を適切に提供することにある。本資料はオープンイノベーションに基づいたアカデミア創薬（アカデミアが主体となってヒット化合物の発見、最適化、最適化合物での有効性の検証（in vivo POC））を前提として安全性と有効性の評価系に関する science technology をデリバーするとともに諸問題への手引をとりまとめたものである。

1.2 背景

認知症は徐々に認知機能の低下や人格の変化等の症状を呈し、その数は世界的に急増している。日本においては 2010 年では 200 万人程度と推計されるが、今後高齢者人口の急増とともに認知症患者数も増加し、2020 年には 325 万人まで増加するといわれている¹⁾。患者数の増加は、社会全体の経済活動の低下に繋がり、介護費用の負担と合わせて、我が国の経済及び産業に大きな負担となる。このような背景をうけ、的確な実態把握、診断技術の向上と治療方法の開発が最重要課題として位置づけられている²⁾。日本における認知症の原因疾患は AD が最も多いとされているが、現時点での AD の薬物治療はコリンエステラーゼ阻害剤や NMDA 受容体阻害剤など AD の臨床症状を緩和する症状改善薬（注釈 1）にとどまり、AD を根治することが可能な薬物療法は存在しない。臨床現場では、AD を始めとする認知症患者における精神症状や行動障害といった周辺症状（BPSD）の治療には、抗精神病薬が適応外使用でしばしば用いられてきた。一方で、2005 年から高齢患者における抗精神病薬使用に伴う死亡リスクの増大に関する警告が各国の規制当局から繰り返し発出され、その安全性についての懸念が示されている³⁻⁶⁾。日本における高齢患者での使用実態については、ドネペジル処方外来患者における抗精神病薬の使用実態を、保険薬局の調剤データベースを用いて調査し、Segmented regression model を用いて⁷⁾日本における AD 患者における抗精神病薬処方の使用実態を明らかにした。その結果、各国規制当局によって死亡リスクの増大が繰り返し警告されてきたにも関わらず³⁻⁶⁾、いずれの薬剤クラスの処方動向にも有意な変化は認められなかった。また、米国精神医学会ガイドライン⁸⁾で推奨される用量より高用量の処方を受けている患者や 3 ヶ月を超えて抗精神病薬が漫然と継続使用される患者が多いなど、適正使用に関わる問題を明らかにした⁹⁻¹¹⁾。これらの現状より、AD 型認知症に対して有効な治療薬・予防薬の開発が急務となっている。AD の原因や病態に関する様々な仮説に基づき、様々な創薬標的が想定されてきた。AD 治療薬の標的として想定されているメカニズムから大別すると、①シナプス伝達促進、②神経細胞死抑制、③A β 蓄積抑制、④タウ蛋白蓄積抑制、⑤抗炎症、などが挙げられる。AD 型認知症症状の進行を抑制する薬剤として現在上市されているのは、コリンエステラーゼ阻害薬と NMDA 阻害薬の 2 種類で、前者は①を、後者は②を想定して開発されたが、その効果は限定的である。現在は、

③、④、⑤のメカニズムで作用する新薬が開発途上であり、その効果が期待されている。また、酸化ストレス/小胞体ストレス誘導アポトーシスを防ぐ薬剤が、ADを含む認知症や神経変性疾患の根本的治療法・予防法になる可能性も検討されている。しかしながら、ひと口にAD型認知症と言っても、様々な病態の患者が含まれ、有効な治療薬がそれぞれの病態で異なる可能性がある。病態に即したバイオマーカーを見出して、効果が期待できる患者群に対して選択的に臨床試験を行うことが、今後のAD治療薬開発の成否の鍵となると予測される。こうした観点から、典型的な若年性ADの臨床・病理像を示すが、通常より20年以上発症が早く頻度も5倍以上高いダウン症患者の若年性ADにおいて、タウリン酸化酵素の一つであるDYRK1Aの活性が、通常より50%高いことは注目に値する。ダウン症患者以外のAD患者死後脳でも、DYRK1Aが高活性であることが報告されており、脳内のDYRK1Aの活性レベルを何らかの方法で測定できれば、有用なバイオマーカーとなる可能性が高い。

AD創薬が抱える課題は、その動物モデル構築の難しさである。AD発症は段階的であり、疾患初期のシナプス変性の段階と、神経細胞死により認知症が顕在化する段階がある。シナプス変性については、既知のAβ凝集体がグルタミン酸受容体に作用した結果とされているが、これら既知の凝集体では試験管内でも動物個体でも神経細胞死は起こらない¹²⁾。また、Aβを過剰発現させた既知のADモデルはその何れもが、ヒトのADの病態を反映していないとの報告もあり¹³⁾、これら既存の病態モデルマウスを用いて開発された薬剤が、何れも治験で成果が上がらず治療戦略の見直しが求められている¹⁴⁾。

1.3 適用範囲

本資料はADに由来する軽度認知障害(MCI due to AD)（注釈2）及び認知症(AD dementia)を有する患者の治療を目的として開発される創薬に関する情報を提供する。また、その内容はアカデミア創薬に立脚した非臨床試験プログラムに関する情報であり、ヒトに投与する前に最低限考慮すべき事項である。

2. アルツハイマー病治療薬の開発における非臨床試験の 試験項目について

2.1 アルツハイマー病治療薬開発における非臨床試験の実 施に関するガイダンス

AD 治療薬としては、合成低分子医薬品、バイオ医薬品に加え、核酸医薬品や治療ワクチンが主となるものと考えられるが、可能性のある天然高分子医薬品およびペプチドミミックについても含め、非臨床試験の実施のためのガイダンスを表 1 に列挙した。

また、各非臨床試験の実施時期について、ICH M3(R2)に基づいて図 1 にまとめた。

さらに、非臨床試験の実施に関わるガイドライン／ガイダンスについて表 2 にまとめた。基本的には ICH で合意されたものであるが、一部我が国独自のガイドラインも含まれる。特に、一般毒性試験に関しては、ICH ガイドラインを補完する形で毒性試験全般に関して記された“医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドライン”が有用である(後述)。

[表 1] アルツハイマー病治療薬に関する非臨床試験の実施のためのガイダンス

GL/GD 医薬品 ^a	毒性試験全般 ^b (薬審1第24号)	一般毒性試験 ^c (ICH S4)	遺伝毒性試験 (ICH S2)	がん原性試験 (ICH S1)	生殖発生毒性試験 (ICH S5)	免疫毒性試験 (ICH S8)	光安全性評価 (ICH S10)	安全性薬理試験 ^d (ICH S7)	不純物の毒性評価 (ICH Q3)	変異原性不純物の評価 (ICH M7)	TKと薬物動態試験 (ICH S3)
合成低分子医薬品	○	○	○	△ ^g	○	△ ^j	○	○	△ ^m	○ ⁿ	○
バイオ医薬品 (ICH S6)	○	○	× ^f	× ^h	△ ⁱ	○ ^k	× ^l	○	×	×	○
核酸医薬品 ^e	○	○	○	× ^h	○	△ ^j	× ^l	○	△ ^m	×	○
治療ワクチン ^e	○	○	× ^f	× ^h	△ ⁱ	△ ^k	× ^l	○	×	×	○
天然高分子医薬品 ^e	○	○	×	× ^g	△ ⁱ	△ ^k	× ^l	○	×	×	○
ペプチドミミック ^e	○	○	○	× ^h	△ ⁱ	△ ^k	× ^l	○	×	×	○

○：基本的に GL/GD への対応が必要，△：必要に応じて GL/GD への対応が必要，×：一般的に GL/GD への対応は不要（必要となる場合もあることに留意）

- a. 原則として新有効成分含有医薬品を対象とする（H 17. 3. 31 薬食発 0331015 別表 2—(1)参照）
- b. 我が国における非臨床毒性試験に関する各種ガイドラインを集約し、「医薬品毒性試験法ガイドライン」として刷新されたもの
- c. 局所刺激性評価を含む
- d. 中枢神経系への影響については、依存性試験や FOB（機能観察総合評価法）等による検討も考えられる
- e. 組換え DNA 由来のタンパク質ワクチン，化学合成ペプチド，血漿由来製剤，ヒト組織から抽出した内在性のタンパク質及びオリゴヌクレオチド製剤にも，バイオ医薬品ガイドラインの原則を適用し得る（ICH S6 (R1)）
- f. 遺伝毒性に懸念がある医薬品（例えば，複合タンパク製剤内に有機性の結合分子が存在する場合）については，実施可能かつ適切な試験系での試験実施が必要（ICH S6 (R1)）
- g. 臨床における最長の投薬期間（6 ヶ月間以上），がん原性に関する懸念の有無，適用患者集団，がん原性に関する事前調査結果，患者における全身曝露の程度，内因性物質との類似（相異）点，試験計画の妥当性，臨床試験との関連における実施時期などを考慮して必要性を判断（ICH S1A）
- h. 臨床での投与期間，適用患者集団，その生物学的活性（例えば，増殖因子，免疫抑制剤等）によってはがん原性の評価を行う必要があり得る（S6(R1)）
- i. 適切な動物種がヒトを除く霊長類のみで，生殖発生毒性作用に関する多くの公表情報が存在する場合には，通

常の生殖発生毒性試験の必要性はない (ICH S6 (R1))

- j. (1)標準の毒性試験から得られた所見, (2)薬剤の薬理学的性質, (3)適応患者集団, (4)既知の免疫調節剤との構造の類似性, (5)薬物の分布, (6)臨床情報等を考慮し, 免疫毒性試験の必要性を判断する (ICH S8)
- k. バイオ医薬品, その他の生物学的製剤等には ICH S8 は適用されない (ICH S8)
- l. 一般的に, ペプチド, 蛋白質, 抗体薬物複合体あるいはオリゴヌクレオチドには適用されない (ICH S10)
- m. 新製剤中の不純物のうち原薬の分解生成物又は原薬と医薬品添加物若しくは直接容器/施栓系との反応による生成物のみを対象としており, 安全性確認の要/不要の判定基準が例示されている (ICH Q3B (R2))
- n. 進行がんを適応症とする医薬品の原薬及び製剤には適用されない (ICH M7)

	前臨床	第 I 相	第 II 相	第 III 相	申請
急性毒性試験(独立した試験は推奨されない)				↑	
反復投与毒性試験					
臨床開発	臨床試験	≤2週間	2週間~6ヵ月	>6ヵ月	
	毒性試験期間	2週間	臨床試験期間	6 / 9ヵ月	6ヵ月: げっ歯類 9ヵ月: 非げっ歯類
申請	臨床使用期間	≤2週間	2週間~1ヵ月	1ヵ月~3ヵ月	>3ヵ月
	毒性試験期間	1ヵ月	3ヵ月	6ヵ月	6 / 9ヵ月
生殖発生毒性試験				↑	
受胎能試験				↑	
胚・胎児試験			↑		↑(mAbの場合)
出生前・後試験					↑
遺伝毒性試験			↑		
がん原性試験					↑
局所刺激性試験(独立した試験は推奨されない)				↑	
免疫毒性試験				↑	
光安全性評価				↑	
依存性試験				↑	
TK/PK		↑(in vitro TK)		↑(ADME)	
安全性薬理試験		↑			

↑: 試験が終了しているべきとされている時期

[図 1] 臨床試験のための非臨床試験の実施時期 (ICH M3 (R2)より)

[表 2] 非臨床試験の実施に関わるガイドライン／ガイダンス

項目	通達/コード	表 題	通知日
毒性試験全般	薬審1第24号	医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて https://www.pmda.go.jp/files/000206737.pdf	1989.9.11
がん原性試験	S1A	医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス https://www.pmda.go.jp/files/000156340.pdf (原文) Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals https://www.pmda.go.jp/files/000156176.pdf	1997.4.14
	S1B	医薬品のがん原性を検出するための試験に関するガイダンス https://www.pmda.go.jp/files/000156682.pdf (原文) Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals https://www.pmda.go.jp/files/000156195.pdf	1998.7.9
	S1C (R2)	(原文) Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals https://www.pmda.go.jp/files/000156959.pdf S1C (R2)に基づき改訂されたがん原性試験ガイドライン https://www.pmda.go.jp/files/000156718.pdf	2008.11.27
遺伝毒性試験	S2 (R1)	医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて https://www.pmda.go.jp/files/000155984.pdf (原文) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use https://www.pmda.go.jp/files/000156595.pdf	2012.9.20
トキシコキネティクスと薬物動態	S3A	トキシコキネティクス(毒性試験における全身的暴露の評価)に関するガイダンス https://www.pmda.go.jp/files/000156720.pdf (原文) Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity	1996.7.2

		Studies https://www.pmda.go.jp/files/000156031.pdf	
	S3B	反復投与組織分布試験ガイダンス http://www.pmda.go.jp/files/000156579.pdf#page=1 (原文) Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies https://www.pmda.go.jp/files/000156614.pdf	1996.7.2
一般毒性試験	S4	医薬品毒性試験法ガイドラインの改正 ([1]単回投与毒性試験、 [2]反復投与毒性試験) https://www.pmda.go.jp/files/000156723.pdf	1993.8.10
	S4A	医薬品毒性試験法ガイドラインの改正 ([2]反復投与毒性試験) / 動物を用いた慢性毒性試験の期間についてのガイドライン http://www.pmda.go.jp/files/000156632.pdf (原文) Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing) http://www.pmda.go.jp/files/000156229.pdf	1999.4.5
生殖発生毒性試験	S5A, S5B	S5B 医薬品毒性試験法ガイドラインの改定 ([3]生殖発生毒性試験) http://www.pmda.go.jp/files/000156245.pdf	1997.4.14
	S5B (M)	医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正 http://www.pmda.go.jp/files/000156783.pdf (原文) Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2) http://www.pmda.go.jp/files/000156671.pdf	2000.12.27
バイオテクノロジー応用医薬品	S6 (R1)	バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価 http://www.pmda.go.jp/files/000156471.pdf (原文) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals http://www.pmda.go.jp/files/000156596.pdf	2012.3.23
安全性薬理試験	S7A	安全性薬理試験ガイドライン	2001.6.21

験		http://www.pmda.go.jp/files/000156827.pdf (原文) Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals http://www.pmda.go.jp/files/000156011.pdf	
	S7B	ヒト用医薬品の心室再分極遅延 (QT 間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価 http://www.pmda.go.jp/files/000156281.pdf (原文) The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals http://www.pmda.go.jp/files/000156513.pdf	2009.10.23
免疫毒性試験	S8	医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン http://www.pmda.go.jp/files/000156849.pdf (原文) Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals http://www.pmda.go.jp/files/000156956.pdf	2006.4.18
光安全性評価	S10	医薬品の光安全性評価ガイドラインについて http://www.pmda.go.jp/files/000156697.pdf (原文) PHOTOSAFETY EVALUATION OF PHARMACEUTICALS http://www.pmda.go.jp/files/000156202.pdf	2014.5.21
臨床試験のための非臨床試験の実施時期	M3 (R2)	医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス http://www.pmda.go.jp/files/000156948.pdf (原文) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals http://www.pmda.go.jp/files/000156128.pdf 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集 (Q&A) http://www.pmda.go.jp/files/000156908.pdf (原文) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals	2010.02.19
			2012.08.16

		Questions & Answers (R2) http://www.pmda.go.jp/files/000156455.pdf	
不純物の安全性評価	Q3A (R2)	新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン http://www.pmda.go.jp/files/000156108.pdf 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの一部改定 http://www.pmda.go.jp/files/000156885.pdf (原文) Impurities in New Drug Substances http://www.pmda.go.jp/files/000156346.pdf	2002.12.16 2006.12.4
変異原性不純物評価	M7	潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理ガイドライン (原文) ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK	2015.11.10

2.2 各国のガイドラインあるいはガイダンス (総称として以下、ガイドライン) の要約

現在 AD に特化した非臨床試験 (有効性および安全性) のガイドラインは海外においても制定されていない。以下に現在制定されているガイドラインの中から、AD 治療薬の開発において考慮が必要と考えられる非臨床試験のガイドラインについて記載する。各ガイドラインにはその適用範囲 (例えば、低分子医薬品のみ) が明記されているものもあるため参照にあたっては留意されたい。

なお、AD 治療薬を対象としたため、小児を対象とした医薬品のための非臨床試験、悪性腫瘍等特定の疾患を対象とした試験、皮膚/皮膚光感作性試験、マイクロドーズ試験等のガイドラインは割愛している。また、品質に関するガイドラインも記載対象としていないが、特にバイオ医薬品に関しては品質 (生物学的同等性、適合性等) に関する多くのガイドラインが発出されていることを付記する。

① 日本のガイドライン

ICH ガイドラインの他に下記のようなガイドラインが定められている。

薬物動態試験では、開発製品の体内動態 (吸収、分布、代謝および排泄) を明らかにす

るための試験法を示したガイドライン¹⁵⁾および薬物相互作用の検討方法について説明した文書が発出されている¹⁶⁾。

毒性試験では、医薬品の承認申請に必要な非臨床安全性試験を定めたガイドライン（医薬品毒性試験ガイドライン）が制定されており¹⁷⁾、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験等について標準的な実施方法が示されている。このガイドラインは、上述したICHの各ガイドラインの発出に合わせてその都度改訂され、該当部分についてICHガイドラインの内容に置き換えられているが、単回投与毒性試験の具体的な方法等ICHガイドラインでカバーされていない内容も含まれている。また、遺伝毒性試験方法およびがん原性試験方法について、各々ガイドライン^{18,19)}が定められており、これらはICHガイドラインとの整合性を図りながら、より具体的な試験方法について記載したものである。これら日本の非臨床試験ガイドラインについては、「医薬品 非臨床試験ガイドライン 解説 2013」²⁰⁾に詳しいので、必要に応じて参照されたい。

なお、日本の医薬品に関するガイドラインの主なものは医薬品医療機器総合機構のホームページ（<http://www.pmda.go.jp/index.html>）から、厚生労働省が発出した法令は厚生労働省ホームページの法令検索データベース

（<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/html/tsuchi/contents.html>）から入手可能である。

② 日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）

薬理試験では安全性の観点から、コアバッテリー試験と呼ばれる中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価するための安全性薬理試験のガイドラインが定められている²¹⁾。特に心血管系に対しては、心室再分極を遅延させる可能性を評価するためのガイドラインも定められている²²⁾。

薬物動態試験では、トキシコキネティクス試験とファーマコキネティクス試験のガイドラインが各々定められている^{23,24)}。トキシコキネティクス試験は全身暴露データの評価を目的としており、通常、毒性試験の一部として実施される。トキシコキネティクスデータの裏付けが必要とされているのは、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖毒性試験である。一方、ファーマコキネティクス試験は開発製品の吸収、分布、代謝ならびに排泄に関するデータを評価するものであるが、このガイドラインでは反復投与でのファーマコキネティクス試験を考慮すべき状況と試験実施の指針が述べられている。

毒性試験では、反復投与毒性試験、がん原性試験、遺伝毒性試験、生殖毒性試験、免疫毒性試験および光安全性評価のガイドラインが定められている。これらのガイドラインでは、それぞれの試験における、目的、試験法（in vivo or in vitro）、投与方法（投与経路、投与期間、投与濃度）、観察および検査等について標準的な試験実施要項と考え方が示されている。

反復投与毒性試験のガイドライン²⁵⁾では、慢性毒性試験における投与期間に関する考え

方が示されている。がん原性試験のガイドラインとして、がん原性試験の必要性に関するガイドライン²⁶⁾、がん原性を検出するための試験方法に関するガイドライン²⁷⁾及びがん原性試験の投与量選択に関するガイドライン²⁸⁾が定められている。遺伝毒性試験ではガイダンス²⁹⁾として、細菌を用いる復帰突然変異試験、染色体異常試験および小核試験等の各種試験の基本的な組み合わせや結果の解釈が示されている。生殖発生毒性試験のガイドライン³⁰⁾では、生殖機能および胚・児の発生に対する影響を評価する標準的な試験方法として、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生および母体の機能に関する試験、胚・胎児発生に関する試験の方法と評価の考え方が示されている。免疫毒性試験のガイドライン³¹⁾では免疫毒性を検出するための基本的な試験方法と評価の考え方が示されている。光安全性評価のガイドライン³²⁾では医薬品の光毒性及び光アレルギー検出のために行われる安全性評価の望ましい実施方法が示されている。

さらに、バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）の非臨床試験についてのガイドライン³³⁾が定められている。このガイドラインが適用されるバイオ医薬品はタンパク質、ペプチド、抗体製剤であり、核酸医薬品は参考とすることができる。遺伝子治療薬や感染症予防ワクチンは本ガイドラインに適用されない。バイオ医薬品では、従来の低分子化合物で一般的に実施される非臨床試験ではその安全性を適切に評価できない場合が考えられるため、その製品の特性に合わせた柔軟な対応が必要とされている。このため、このガイドラインでは上述した種々の非臨床試験におけるバイオ医薬品での留意点が述べられ、バイオ医薬品の非臨床安全性評価において推奨される基本的な枠組みが示されている。

また、医薬品開発における各非臨床試験の内容と実施のタイミングは、対象疾患（患者背景等）および臨床試験の実施計画（被験者、投与期間等）によって異なり、臨床試験の進行に合わせて実施時期を定める必要がある。ヒトへの投与に先だつて必要とされる試験種および各試験の実施時期についての考え方はM3(R2)ガイダンス³⁴⁾で定められている。

上述したガイドラインにはコンセントペーパーやQ&Aが併せて発出されているものもあり、これらはICHのホームページ（<http://www.ich.org/>）から入手可能である。

③ 米国のガイドライン

ICHガイドラインの他に下記のようなガイドラインが定められている。

薬物動態試験では、開発製品の代謝物の同定と安全性評価に関する基本的な考え方および代謝物の安全性を評価することが推奨される各種毒性試験が示されたガイダンス³⁵⁾が定められている。

毒性試験では、単回投与毒性試験法について定めたガイダンス³⁶⁾や免疫毒性に関して、通常行われる試験の他に追加試験が必要な場合の考え方を示したガイダンス³⁷⁾、内分泌系への影響を評価するためのドラフトガイダンス³⁸⁾がある。さらに、各種毒性試験で得られた結果の評価に関するものとして、がん原性試験結果の統計学的解釈についてのドラフトガイダンス³⁹⁾、生殖発生毒性試験や遺伝毒性試験のように細分化された複数の試験で構成される試験の場合に、個々の試験から得られた結果の統合評価に関するガイダンス^{40,41)}が

ある。

また、治療用ワクチン等、米国食品医薬品局（FDA）の The Center for Biologics Evaluation and Research(CBER)/Office of Cellular, Tissue and Gene Therapies(OCTGT)が管轄する開発製品にのみ適用されるガイダンス⁴²⁾があり、対象とする開発製品の非臨床試験に対する考え方が示されている。

なお、米国の医薬品に関するガイドラインはFDAのホームページ

(<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>) から入手可能である。

④ 欧州のガイドライン

ICH ガイドラインの他に下記のようなガイドラインが定められている。

薬物動態試験では、開発製品およびその代謝物のファーマコキネティクスと安全性評価に関するガイドライン⁴³⁾がある。

毒性試験では、単回投与毒性試験ガイドライン廃止に関する考え方を示した Q&A⁴⁴⁾、反復投与毒性試験の標準的な方法を示したガイドライン⁴⁵⁾、がん原性評価におけるモデル動物使用に関するガイドライン⁴⁶⁾やがん原性ポテンシャル評価に必要な試験デザインを示したガイダンス⁴⁷⁾、非臨床生殖発生毒性試験で認められた所見の人への影響に対するリスクアセスメントに関するガイドライン⁴⁸⁾、さらに特定の器官に対する影響を評価する試験での留意点を示したガイダンス⁴⁹⁾および肝毒性評価に関する文書⁵⁰⁾が定められている。

さらに、バイオ医薬品に関するガイドラインとして、バイオ医薬品の開発において注意すべき一般的事項を記載したガイドライン⁵¹⁾がある。ワクチンについては、薬理および毒性評価方法を示したガイダンス⁵²⁾および使用されるアジュバントの毒性評価に関するガイドライン⁵³⁾が定められている。

なお、欧州の医薬品に関するガイドラインは欧州医薬品庁（European Medicines Agency）のホームページ

(http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000043.jsp&mid=WC0b01ac05800240cb) から入手可能である。

3. DYRK1A 阻害剤の研究成果と手引

アミロイドβによる神経細胞死誘導メカニズムとして注目を集めているのは、微小管結合タンパク質タウのリン酸化である⁵⁴⁾。アミロイドβがタウリン酸化酵素を活性化、その後リン酸化タウが蓄積することによって神経細胞死が惹起されると考えられており、様々なタウリン酸化酵素に対する阻害剤が開発されてきたが成功していない（図2）。



2012年8月6日
 ファイザー
 ジョンソン・エンド・ジョンソン
 アルツハイマー病治療薬バピヌズマブ
 (bapineuzumab)の開発を取り止め



2012年8月27日
 イーライリリー
 アルツハイマー型認知症治療薬Solanezumab
 の第III相臨床試験において認知機能および
 日常生活機能に関する主要評価項目は達成
 できなかったと発表

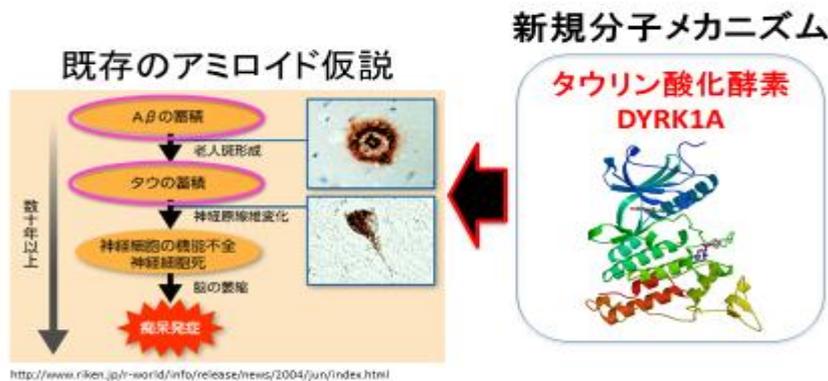
抗アミロイドβ抗体薬



[図2] アルツハイマー病治療薬開発の現状

さらに、代表的なタウリン酸化酵素である GSK3β に対する阻害剤は副作用として腫瘍形成が起こることが明らかとなった。

そこで我々は、GSK3β によるタウリン酸化に先立って起こるプライミングリン酸化を担う DYRK1A に着目し、研究を開始した (図3)。



[図3] アミロイド仮説とDYRK1A

DYRK1A は、ダウン症候において余分な 21 番染色体上にあり、ダウン症候群で高発現していることが知られている。さらに高頻度のアルツハイマー病発症との関連が指摘されている (図 4)。

**ダウン症候群に關与する
タンパク質リン酸化酵素DYRK1A**

ダウン症候群
第21番染色体が
一本余分にある(合計3本)



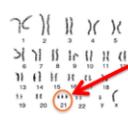
リン酸化酵素DYRK1Aの過剰発現
早期(35歳頃)から発症する
アルツハイマー病の原因と推定
健康人の5倍以上の発症頻度



アルツハイマー病が早期に発症する人々

ダウン症候群:
症状: アルツハイマー病を早期に発症
 > 30歳前後で知能低下がはじまる
 > 35歳以上の約25%がアルツハイマー病を発症(健康人の5倍以上の発症頻度)
 奇形、発達障害、知的障害、

原因: 21番目染色体がトリソミー、部分的重複となってダウン症クリティカル領域(DSCR)が転座



↓

ダウン症では21番染色体が3本あり、DYRK1Aは21番染色体のダウン症クリティカル領域(DSCR)に存在する

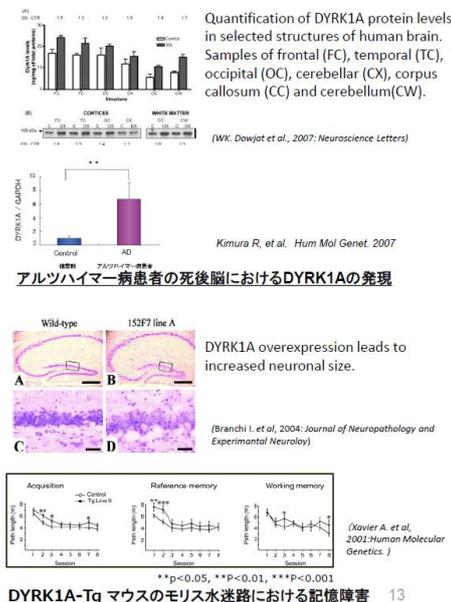
ダウン症候群(疫学): 全出産では1/800人の発生率。35歳以上の出産では1/400の発生率。
最も頻度の高い染色体異常疾患

[図 4] DYRK1A とダウン症候群

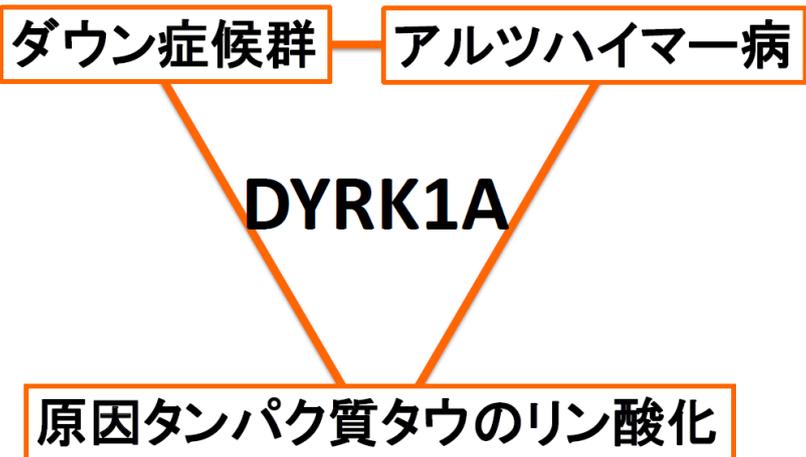
さらに DYRK1A は、アルツハイマー病患者の脳内で遺伝子の過剰発現が報告されており、一般のアルツハイマー病発症への関与も指摘されている (55-58) (図 5, 6)。

DYRK1Aとアルツハイマー病

- ダウン症患者の脳内ではDYRK1Aの発現が亢進
- アルツハイマー病患者の脳内ではDYRK1Aの発現が亢進している
- DYRK1A の過剰発現マウスは脳の異常形成を示す
- DYRK1A の過剰発現マウスは学習・行動障害を呈する



[図 5] DYRK1A とアルツハイマー病

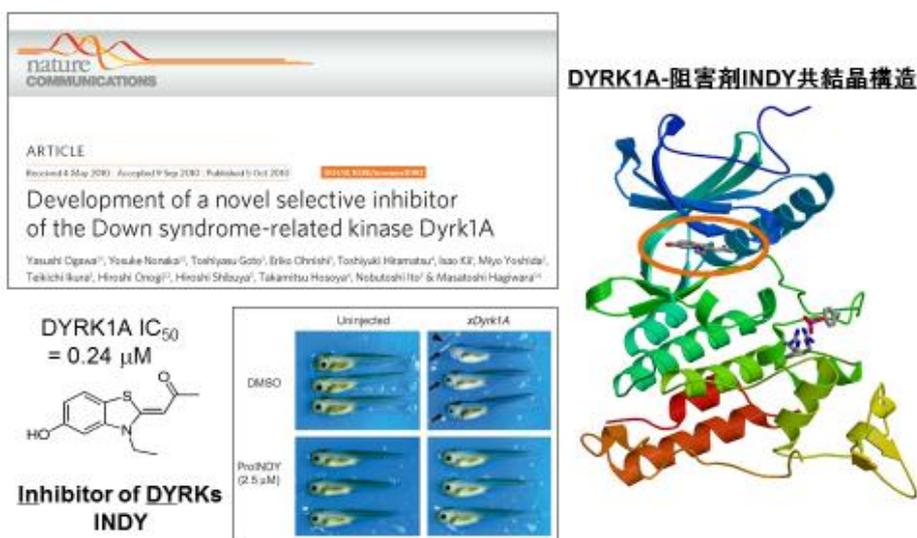


[図 6] DYRK1A はダウン症候群及びアルツハイマー病に関連する

我々は、リン酸化タウ蓄積による神経細胞死を抑制することを目的として、DYRK1A に対する特異的な低分子阻害剤の開発を進め、5年間での成果を実例として手引書を作成した。

3.1 代謝安定な新規 DYRK1A 阻害剤の取得

2010年に我々が発表⁵⁹⁾したDYRK1A阻害剤INDYを基盤に、JST A-STEP等の支援を受け、阻害活性の強化および代謝安定性の向上を目指した合成展開を進めた(図7)。



[図 7] DYRK1A 阻害剤の創製

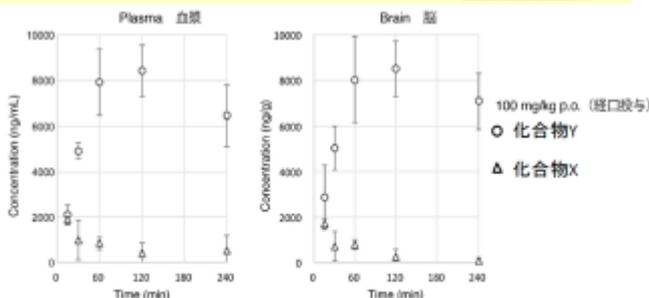
具体的には、INDY の代謝を受けやすい化合物構造部位を同定し、その部位を代謝から守るための設計を行い、第二世代 DYRK1A 阻害剤の創製に成功した (図 8)。本阻害剤は、INDY を遥かに凌駕する阻害活性を有し、in vivo ストレスモデルにおいても薬効が確認された。また血中安定性・脳移行性・経口吸収性を備えていた (図 9)。

DYRK1A阻害剤の合成展開

1. 阻害活性強化(代謝安定性向上)

試験管内DYRK1A 阻害能(IC50) INDY: 240nM 化合物X: 49nM 化合物Y: 40nM

2. 血中安定性、脳内移行性、経口吸収性向上



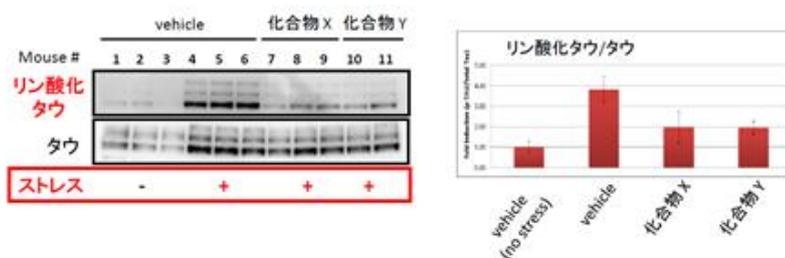
化合物Yは優れた経口吸収性、脳内移行性を有することを確認した。

[図 8] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の創製

2. ストレスモデルによる in vivo 薬効



Stress-induced hyperphosphorylation of tau in the mouse brain.
Okawa Y. et. al. FEBS Lett. 2003 Jan 30;535(1-3):183-9.



化合物X, 化合物Yは in vivo でタウ蛋白質のリン酸化を抑制する

[図 9] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の薬理試験

本阻害剤は、INDY を遥かに凌駕する阻害活性を有し、*in vivo* ストレスモデルにおいても薬効が確認された。また血中安定性・脳移行性・経口吸収性を備えていた (図 9)。

【手引】

薬物動態

動物における吸収・分布・代謝・排泄に関するデータは臨床開発と並行して入手すべきであるが、特に脳への分布に関する情報は重要である。

3.2 分子イメージングに向けた DYRK1A 阻害剤の PET トレーサー化

本阻害剤の PET プローブ化では、INDY で用いた方法が使えないため、新規の合成経路の探索を進め、アセチル化を介した ^{11}C の導入経路の開発に成功した。PET プローブの齧歯類・霊長類への投与により正確な体内動態が明らかとなり、より定量的な投与計画の算定が可能となった。

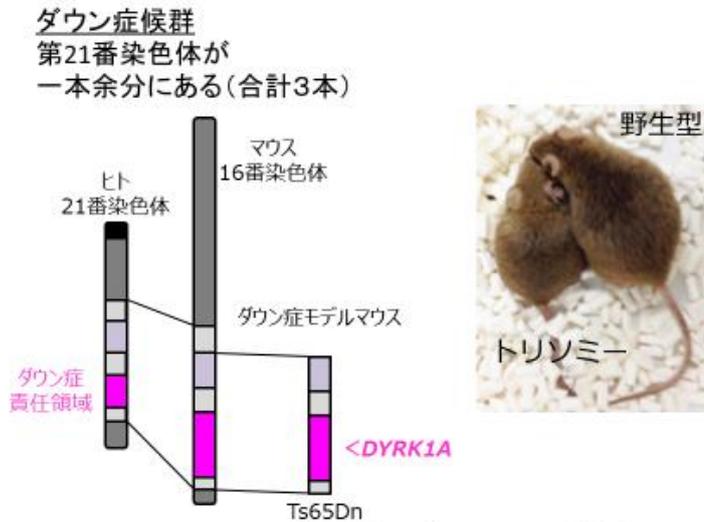
【手引】

薬物動態

ヒトに投与する前に非臨床試験で使用する動物種での最高血中濃度(C_{max})、濃度曲線下面積(AUC)及び半減期(t_{1/2})等の一般的な薬物動態学的パラメーターの評価は重要であり、PET プローブによる評価も一つの手段となる。

3.3 新規アルツハイマー病動物モデルの作製

DYRK1A とタウによるアルツハイマー病の発症メカニズムを生体内で解析することを目的に、DYRK1A とタウの同時発現遺伝子改変マウスの作製を進めた。これらの因子の同時発現は、個体の行動様式に異常が認められ、その結果として繁殖に著しい問題が生じることが明らかとなった。これらの結果は、DYRK1A とタウにより繁殖行動を含めた生存行動に影響が出るほど神経系に異常を来すことを示唆している (図 10)。



[図10] ダウン症モデルマウスの作製

【手引】

薬理試験

AD のモデル動物は現在のところ存在しないが、比較的類似した動物モデルとして急性ストレスモデル^{60, 61)}、A β 注入モデル⁶²⁾やダウン症モデルマウス^{63, 64)}が利用可能である。薬理試験で得られる情報として、作用機序、投与スケジュールの指針、バイオマーカーの選択に関する情報、動物種の選択に関する情報、併用投与の妥当性に関する情報等があるが、安全性の面から一般状態の注意深い観察は必須である。

【手引】

生殖発生毒性試験

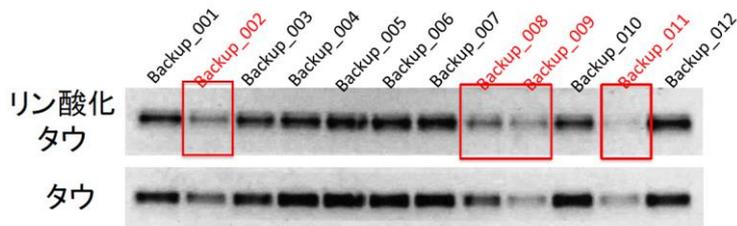
AD では若年性 AD や MCI 等のケースも考えられることから、本試験の必要性・実施時期等に関しては、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) 薬事戦略相談を活用する。ヒトに投与する前に必要な試験ではない。ICH S5(R2)ガイドライン³⁰⁾参照。

3.4 新規 DYRK1A 阻害剤の代謝安定性および安全性試験

第二世代 DYRK1A 阻害剤からの更なる構造展開を進め、第三世代 DYRK1A 阻害剤の創製に成功した (図 11)。第三世代は、第二世代と比較し、高い阻害活性及び代謝安定性を有する (図 12-15)。さらに第三世代は、第二世代合成時に問題となった合成ステップの複雑さを解消し、より簡単に合成が可能な化合物となっているため、スケールアップ合成への展開が容易であり、大規模な動物投与実験および GMP 合成へのルートが確保しやすいという特徴を有する。

バックアップ化合物の探索

細胞内でタウのリン酸化を阻害する化合物を探索

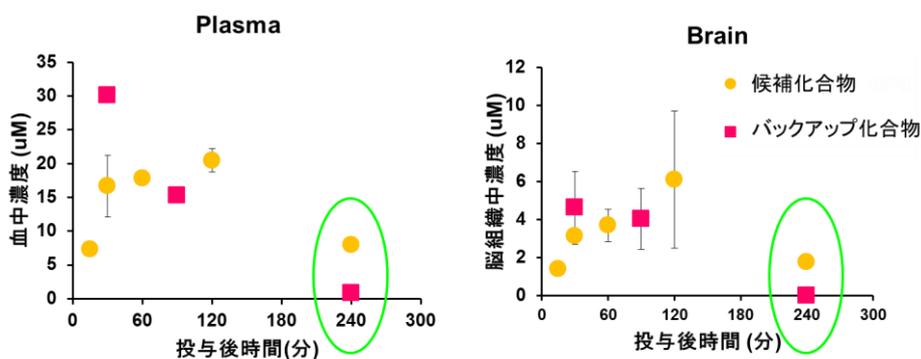


➡ 複数の候補化合物を取得

[図 11] 第三世代 DYRK1A 阻害剤の創製

標的リン酸化酵素および基質共発現系においてバックアップ化合物の薬効評価を行った。細胞を化合物で 16 時間処理後、サンプルを回収し、ウェスタンブロッティング法により基質であるタウタンパク質のリン酸化を検出した (図 11)。

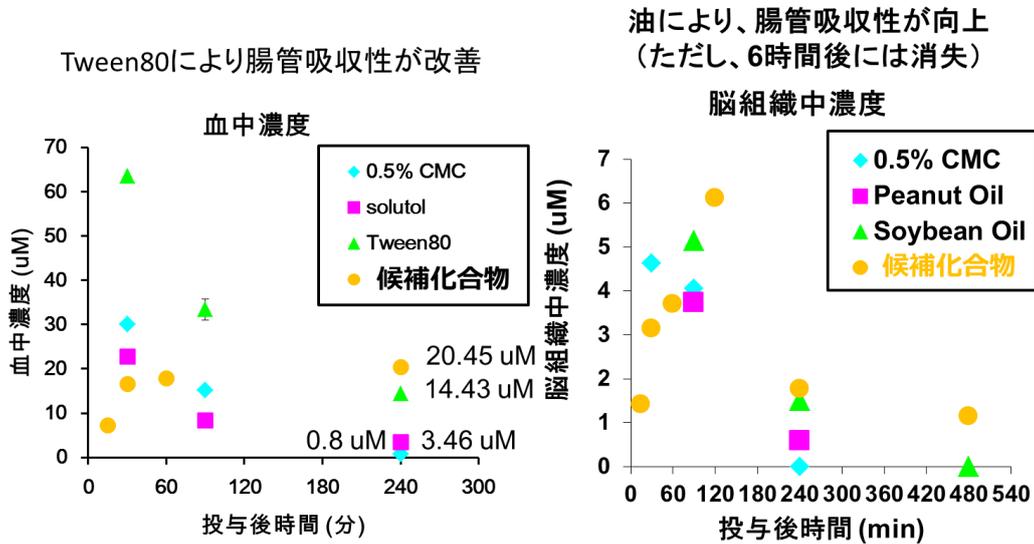
体内動態解析 (投与後4時間・経口投与) 開発候補化合物 vs バックアップ化合物



バックアップ化合物は投与後4時間後には消失
(LC-MS/MS検出限界以下)

[図 12] 第三世代 DYRK1A 阻害剤の体内動態

溶媒の検討



[図 13] 第三世代 DYRK1A 阻害剤の体内動態に及ぼす溶媒の検討

候補化合物の膜透過性 (in vitro ADMET)

Caco-2 細胞を用いた膜透過性の検討

	膜透過性*
KUADME_001 =backup_008	0.78
KUADME_002	0.70
KUADME_003	0.75
KUADME_004	N/A
KUADME_005	0.50
KUADME_006	0.82
KUADME_007	0.62

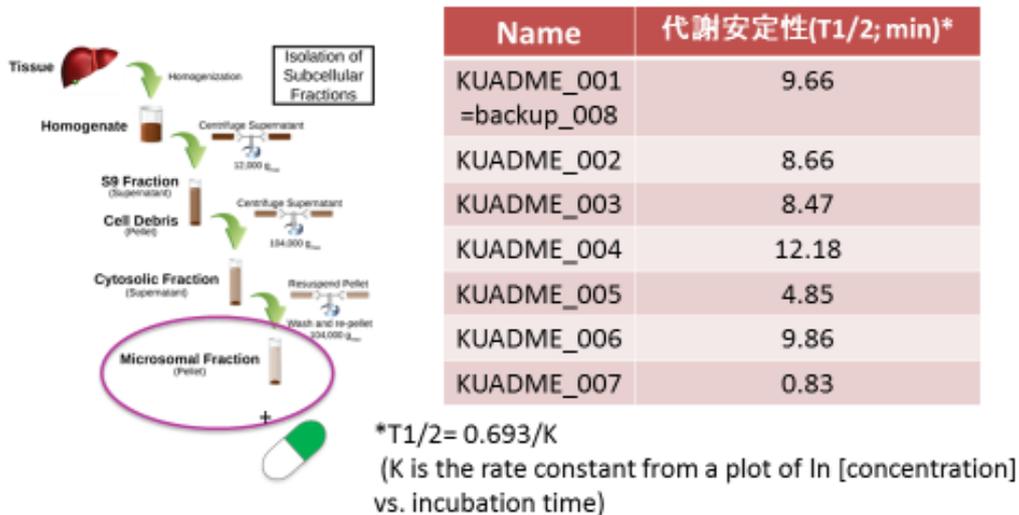
*膜透過性=Papp(B-A)/Papp(A-B)

**Drug permeability: $Papp = (VA / (Area \times time)) \times ([drug]_{accepter} / ([drug]_{initial, donor} \times Dilution Factor))$

[図 14] 第三世代 DYRK1A 阻害剤の膜透過性(in vitro)

バックアップ化合物の代謝安定性 (in vitro ADMET)

肝ミクロソームを用いた代謝安定性の検討



[図 15] 第三世代 DYRK1A 阻害剤の代謝安定性(in vitro)

【手引】

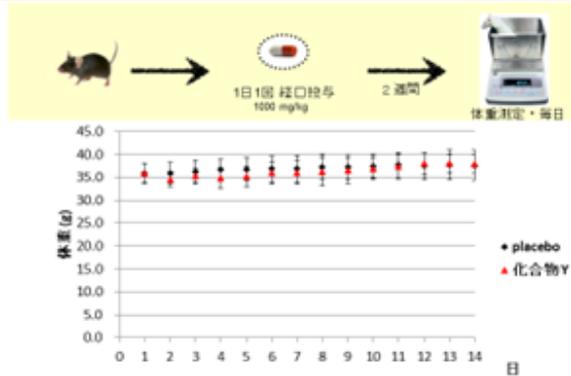
薬物動態

最適化合物に至る研究には 3R（注釈 3）の観点から in vitro ADMET 等を考慮する。In vitro ADMET にて化合物の水溶性、膜透過性、代謝安定性及び肝クリアランスの予備的評価が可能となる。

3.5 第二世代 DYRK1A 阻害剤の安全性試験

開発候補化合物の動物個体への連続投与による安全性試験を行った。その結果、肝臓重量増加が見られた。この毒性については外部委員を含めた協議の結果、ホスホリピドーシスが起こることが明らかとなったが、休薬期間や投与量の検討により回避可能であるものと判断されるに至った（図 16）。さらに、安全性薬理試験の一環として行動解析を実施したところ、本化合物は目立った行動異常を惹起しないことに加え、鬱病等の神経疾患に対して効果を有することが判明した（表 3、図 17-22）。この成果は、開発候補化合物がアルツハイマー病以外の疾患においても有効であることを示し、かつ今後の臨床開発に向けた適応疾患の拡大に成功したことを示している。

**DYRK1A阻害剤の研究開発：
齧歯類を用いた安全性試験**



**1,000mg/kg・14日間の反復投与試験では、
溶媒投与群と比較して体重推移には異常なし。**

**化合物Yの7日間連続投与で約1.7倍の肝重量増加が認められたが、
2週間の休薬によりコントロール群と同程度に回復した。**

[図 16] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の 2 週間ラット反復経口投与試験

[表 3] 第二世代 DYRK1A 阻害剤のマウス行動解析

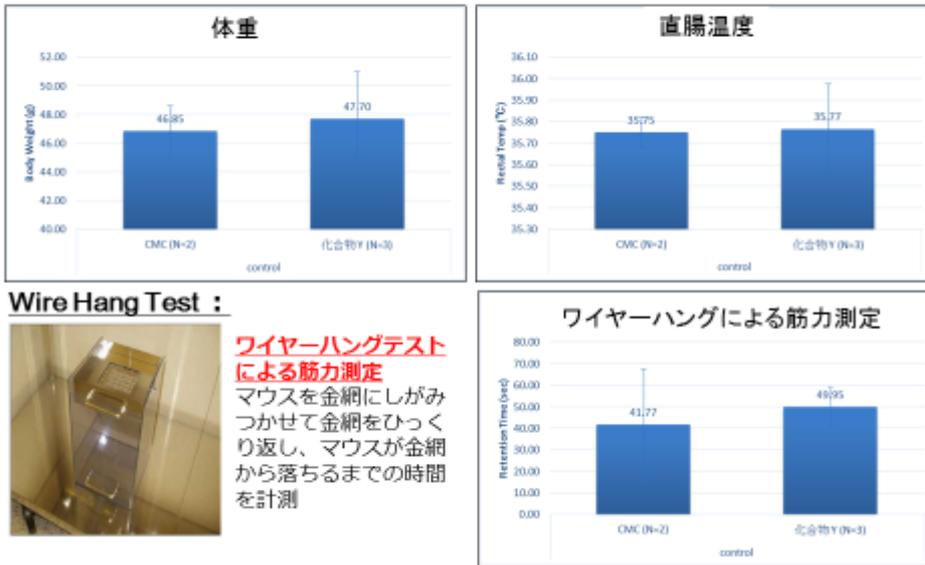
化合物Yの長期投与による個体への影響

実施した行動解析テスト一覧

番号	テスト	測定項目
1	General health/neurological screen	体重・直腸温測定・髭や毛皮の状態・各種反射
2	Wire hang	筋力
3	Grip strength test	筋力
4	Light/dark transition	不安様行動
5	Open field	活動量・不安様行動・薬物感受性
6	Elevated plus maze	不安様行動
7	Hot plate	痛覚感受性
8	Social interaction (Crawley's version)	社会的行動
9	Rotarod	協調運動・運動学習
10	Y Maze	自発的交替行動
11	Prepulse inhibition/startle response	感覚-運動ゲーティング・聴覚・驚愕反応
12	Cued and contextual fear conditioning	文脈記憶など
13	Tail suspension test	うつ様行動
14	Eight-arm radial maze	作業記憶・参照記憶・固執傾向など
15	Barnes maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など

化合物Yの長期投与による行動変容はみられない

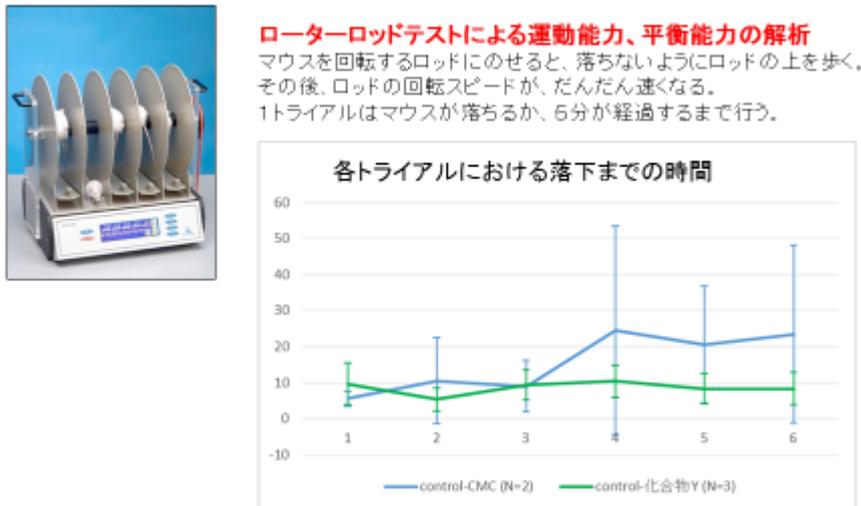
化合物Yの長期投与による個体への影響



化合物Yの長期投与による体重・直腸温度・筋力への影響はみられない

[図 17] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Wire Hang Test)

化合物Yの長期投与による個体への影響



化合物Yの長期投与による運動能力・平衡能力への影響はみられない

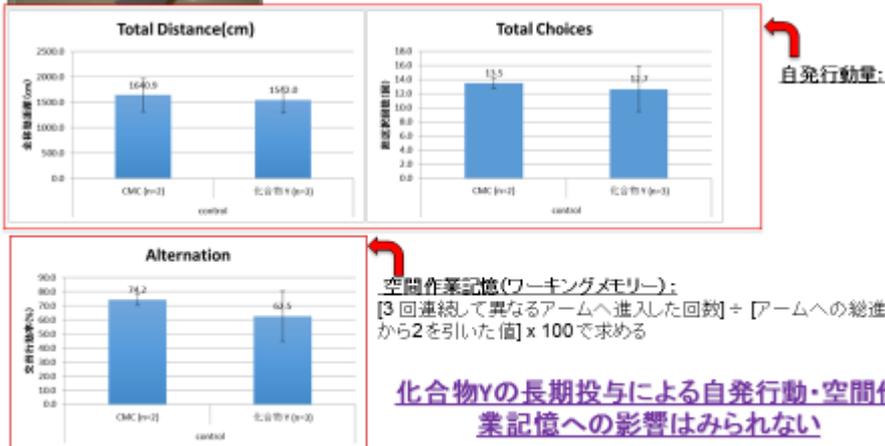
[図 18] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Rotarod Test)

化合物Yの長期投与による個体への影響: Y 迷路



Y迷路による自発行動量と空間作業記憶の評価

自発的交替行動はマウスが探索行動で自発的に異なるアームに入る性質を利用した試験方法。
マウスは既に入ったアームを記憶していることにより評価可能となる。



[図 19] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Y Maze Test)

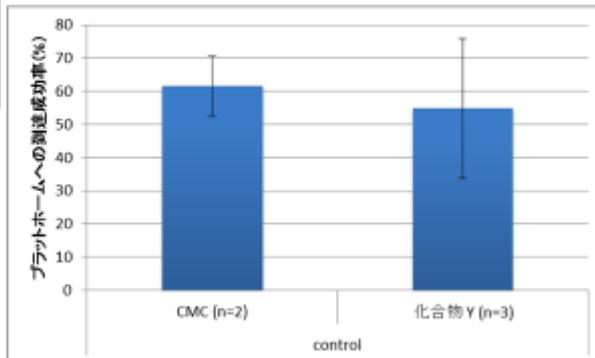
化合物Yの長期投与による個体への影響: バーンズ迷路



避難ボックス
(Escape box)

バーンズ迷路による空間記憶の評価

円盤状テスト台の12個の穴のうち、1つの穴の下にある避難ボックスの位置を学習させることにより、空間学習を評価する。



化合物Yの長期投与による空間記憶・参照記憶への影響はみられない

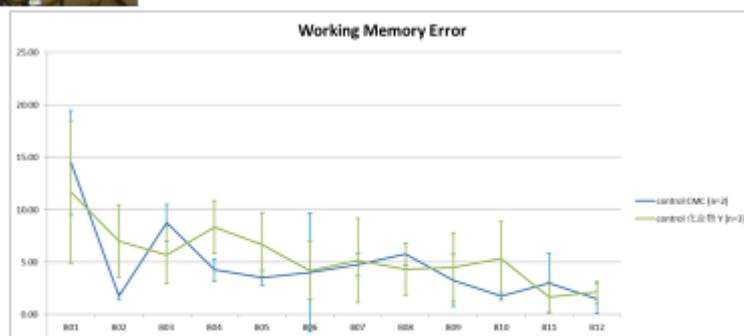
[図 20] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Barnes Maze Test)

化合物Yの長期投与による個体への影響:八方向迷路



八方向迷路による空間学習・作業記憶の解析

8本のアームで構成された迷路におかれた餌を、視覚情報をもとに効率よくマウスが食べに行くことで、空間作業記憶を評価する。



化合物Yの長期投与による空間記憶・参照記憶への影響はない

[図 21] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Eight-arm Radial Maze Test)

化合物Yの長期投与による個体への影響:恐怖学習

恐怖条件付け情動・記憶の解析

マウスを箱にいれ、音と電気ショックを組み合わせることで恐怖条件付けを行う。箱に入れて/音を聞かせて、フリージングする時間を恐怖を感じている指標として評価する。

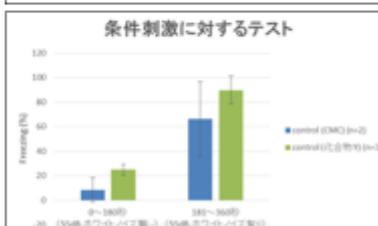
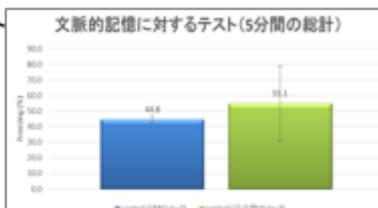
音+電気ショック
→恐怖条件付け



1) 状況試験:文脈記憶テスト



2) 音試験:条件記憶テスト



化合物Yの長期投与による恐怖条件付け学習への影響はみられない

[図 22] 第二世代 DYRK1A 阻害剤の行動解析(Prepulse Inhibition/Startle Response 及び Cued and Contextual Fear Conditioning Test)

【手引】

一般毒性試験

急性毒性試験は通常、げっ歯類及び非げっ歯類における臨床適用経路及び非経口的な投与経路での単回投与毒性試験とされているが、反復投与毒性試験から急性毒性に関する情報が得られる場合は独立した急性毒性試験を必要としない。

反復投与毒性試験は通常、げっ歯類及び非げっ歯類における臨床適用経路にて行われ、ADでは一般に長期間投与されることから最短期間はげっ歯類で6ヶ月、非げっ歯類で9ヶ月を必要とする。

一般的に、毒性試験においては最大耐量 (MTD) までの用量を用いるが、遺伝毒性の指標が一般毒性試験に組み込まれる場合には、適切な最高用量は最大用量 (MFD)、MTD あるいは 1000mg/kg/日の限界量に基づいて設定される。

なお、ICH M3(R2)ガイドライン³⁴⁾では、早期探索的臨床試験の実施までに推奨される非臨床試験を定めているので、参照する。

安全性薬理試験

安全性薬理試験のコアバッテリーには、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用の評価が含まれており、生命維持に重要な器官への影響に関する情報は重要である。ADについても同様で、AD特有の試験は必要ない。ヒトに投与する前にコアバッテリーの評価は必須である。

一方、ADについて行動解析による評価は有益なデータを与える。

3.6 バイオマーカー

① アルツハイマー病の診断および治療薬の有効性とバイオマーカーについて

1990年にFDAよりAD型認知症治療薬の有効性を評価するために、「認知症治療薬の臨床的評価のためのガイドライン(案)」⁶⁵⁾が発出され、AD型認知症患者における治療薬の臨床的評価においては認知機能や臨床症状を有効性の主要評価項目として報告している。その後ADの診断は、DSM-IVや米国 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)などに準拠して行われていたが、ADの診断に対してNINCDS-ADRDAの"probable"ADは感度0.81(0.49-1.00)、特異度0.70(0.47-1.00)であり、診断法の特異度に問題⁶⁶⁾があることなどが指摘された。その後、画像検査機器の進歩もありMRIやSPECTなどを利用した検査も行われた⁶⁷⁾。近年の研究によりADの発症機序としてアミロイド仮説⁶⁸⁾が提唱され、アミロイドの脳皮質への沈着から一連の病態が進展すると考えられた。このため、これらを客観的に評価するためのバイオマーカー(脳脊髄液中のAβ(Aβ40・Aβ42)・総タウ蛋白・リン酸化タウ蛋白など)の研究が進み、そのバイオマーカーを組み込んだ形で無症候期からの病態進展に対応した新しい診

断基準が 2011 年 3 月に NIN-AA⁶⁹⁾ より報告された。これは上述のバイオマーカー研究の進歩に伴い 27 年ぶりに改訂されたものである。

② アルツハイマー病におけるバイオマーカーの実際

現在 AD に関するバイオマーカーとしては脳脊髄液に含まれる A β やタウなどや、画像によるバイオマーカー(FDG-PET・アミロイド PET、MRI 等)が主に報告されている。

AD の発症・進展に係ると報告されている各種バイオマーカーは臨床試験及び非臨床試験において重要となるが、これらバイオマーカーの採取・保存・測定方法やカットオフ値が確立されていないなど、様々な問題点が指摘されている。また治療介入効果の評価として、従来の認知機能や行動機能検査とどの程度相関があるのかいまだ不明な所も多い。その他、非臨床試験後に臨床試験への実施を考慮する際には、ヒトと非臨床試験で使用した動物においてはバイオマーカーなどの反応の種差が大きく現れる可能性もあり、十分に注意を要する。

<脳脊髄液中のバイオマーカーについて>

複数の研究から AD の発症・進展に係るバイオマーカー(A β ・総タウ・リン酸化タウなど)が有用であると報告⁷⁰⁾ されている。しかし脳脊髄液を採取することは侵襲を伴う検査であり、また AD の臨床試験の対象は高齢者であることから、若年者よりも検査時の合併症のリスクが高いことが想定されるため注意を要する。

<画像バイオマーカーについて>

FDG-PET^{71,72)} やアミロイドイメージングの一つである PiB-PET⁷³⁾、脳 SPECT 検査⁷⁴⁾ などが AD の画像バイオマーカーとして有用なものと考えられている。しかし画像の読影のみならず、撮像機種やタイミングなどの条件の違いによりそもそも画像の質に関して測定施設間の違いが生じる可能性がある。現在 FDG-PET や PiB-PET などについては、PET 画像の画質や定量性を確保するため 2013 年 8 月日本核医学会にて認知症 PET 検査の標準化を推進するために脳 PET 撮像のプロトコル⁷⁵⁾ の策定などの対策が行われている。

また PiB-PET などにおいては、¹¹C-PiB の半減期の短さから検査を実施できる施設は限られており、臨床試験を行う際には問題となることもある。

<血清学的バイオマーカー>

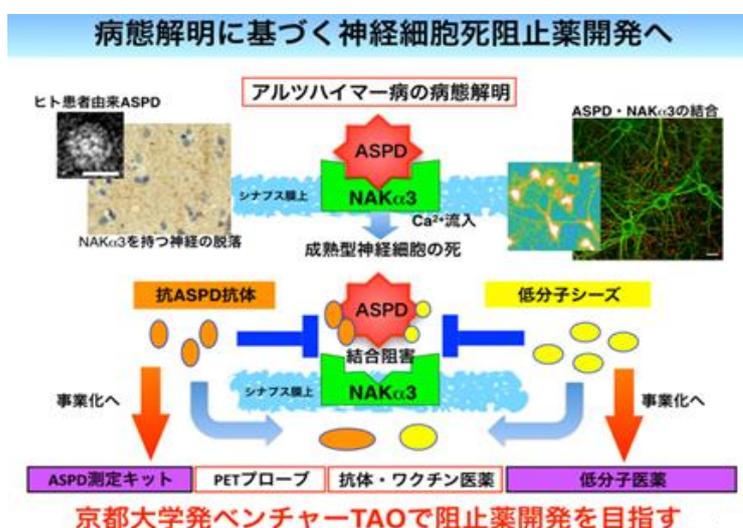
AD の発症・進展に関与している血清学的バイオマーカーは確立されておらず、いまだ不明であるが、血清 A β 42 と A β 40 の比などに関する報告⁷⁶⁾ がある。

<分子生物学的バイオマーカー>

APOE ϵ 4 アレルは 1990 年代より AD の発症のリスクと関連すると知られて⁷⁷⁾ おり、近年の臨床試験⁷⁸⁾ においても利用されている。また SNP のタイピング技術の進歩などに伴い、AD の発症や治療反応性と関連する遺伝子などの報告^{79,80)} も散見され、今後分子生物学的バイオマーカーの活用は広がる可能性がある。

4. アミロスフェロイドワクチン療法の研究成果と手引

長寿社会を迎えて、健康に老いるための最大の難関が、癌とADだが、癌の治験第I相への登録が5000件程度ある中で、ADは100件を切る状況であり、治験第I相から上市に至る確率が10%未満であることを考えると、治験第I相に至る例数が増えることが何よりも重要であることが理解される。臨床開発の段階と異なり、非臨床開発は「オリジナルなメカニズム」に基づいて研究開発される段階であるため、臨床開発のガイドラインのように画一化することは困難である。しかしながら、多少なりとも創薬開発の促進に貢献すべく我々の開発を実例として手引書を作成した。



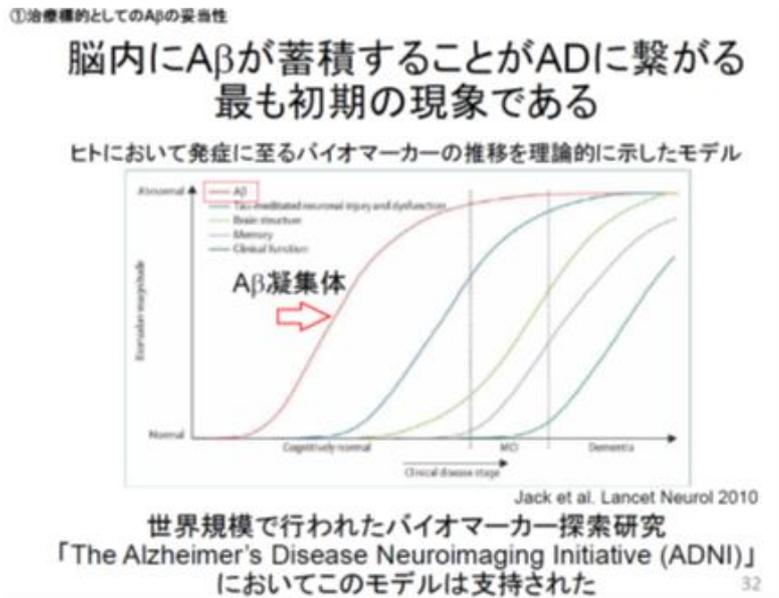
【図23】 アミロスフェロイド (ASP) の開発

アミロスフェロイド (ASP) は、AD 患者の脳より星が発見したアミロイド β ($A\beta$) 凝集体であり、 $A\beta$ が約 30 個集合することで非常に特異的な立体構造を持つようになり、図 23 に示したように神経細胞の生存と機能に非常に重要な役割を示す Na, K-ATPase α 3 (NAK α 3) サブユニットに結合し、その機能を阻害することで神経細胞死を引き起こす。京都大学発ベンチャーである TAO ヘルスライフファーマ株式会社 (TAO) では図 23 に示したように主に 2 つのアプローチで AD の神経細胞死を阻止する治療薬の開発を目指している。

ASP は、患者脳に存在するが、それと同質のものを試験管で合成出来る技術確立していたため、本プロジェクトでは、TAO の協力のもと、ASP を使ったワクチン療法の開発を試みた。

4.1 治療標的としての $A\beta$ の妥当性

脳内に $A\beta$ が蓄積することが最終的に AD に繋がる最も初期の現象であることは間違いがなく(図 24)、 $A\beta$ を治療標的とすること自体は妥当であると考えられる。



[図 24] AD の発症に至るバイオマーカーの推移 (Jack et al. Lancet Neurol 2010 より引用) ⁸¹⁾

4.2 $A\beta$ ワクチン開発戦略

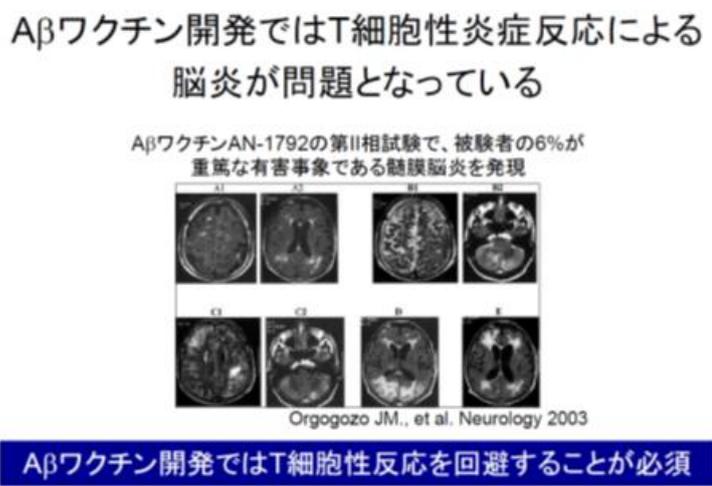
ワクチン開発において重要なことは T 細胞性反応を回避することであり、そのためには

- (1) 古典的アジュバントを含まないワクチン製剤を開発する。
- (2) ワクチン製剤そのものが T 細胞エピトープを含まないことが必要である。

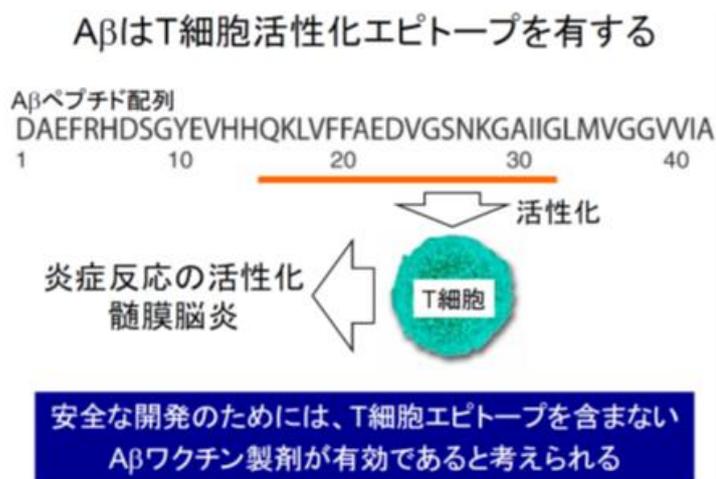
$A\beta$ に対する最初のワクチンとして AN-1792 ($A\beta$ 1-42 を抗原とし、QS21 をアジュバントとする) の臨床試験が実施されたが、第 II 相試験で被験者の 6% が重篤な有害事象である髄膜脳炎を発現したことで中止となった ⁸²⁾。髄膜脳炎の発現が T 細胞の応答性と強く関連したことから、さらに後に実験的に $A\beta$ 7-42 ($A\beta$ 16-33 近傍) に T 細胞エピトープ候補が見いだされたことから ^{83,84)}、 $A\beta$ による T 細胞介在性自己免疫応答の関与が強く示唆されている。有効性については、症例数は極めて少ないが、抗体価の上昇とアミロイド斑の除去には相関が認められたが、アミロイド斑の除去により必ずしも認知症の進行は抑制されていなかった。但し、抗体価が十分に上昇した被験者において高度認知症への進行抑制は認められていたため、ワクチン投与により産生された抗アミロイド抗体には AD の進行抑制効果があると考えられている。

上記を踏まえると、 $A\beta$ ワクチンの開発においては、T 細胞エピトープを含まない $A\beta$ 由

来特異的抗原部位により T 細胞非存在下で抗体を誘導するワクチン製剤が、ヒトにおいて安全で有効であると考えられる(図 25、26)。



[図 25] Aβ ワクチンによる脳炎の発症



[図 26] Aβ ワクチンと T 細胞活性化エピトープ

【手引】

1 原薬の基本情報

最も重要なことは、(1) T 細胞エピトープを含まないこと、(2) 基本的に Aβオリゴマーは単一の分子ではなく、ある一定のサイズ分布を持つ近縁の構造体の集団であるため、品質を保証するためには、それぞれのオリゴマーのサイズについて平均値と標準偏差を用いてその範囲を規定する必要があり、さらに、特異的抗体などを用いてもものとしての同一性を担保する必要がある。(3) 抗原性を担保する必要がある。

具体的には、T 細胞エピトープを含むかどうかは NMR などの構造解析、あるいは Aβオリゴマーの表面を特異的に認識する抗体のエピトープマップにより検証可能である。品質保証としては、大きさや形状は電子顕微鏡や溶液原子間力顕微鏡が活用出来る。分子サイズについては、A

β が糖鎖と相互作用することからゲル濾過やゲル電気泳動は適切ではなく、溶液中でそのまま測定出来るレーザー散乱法あるいは蛍光相関法が好ましく、グリセロール密度勾配遠心なども適用可能である。ものとしての同定のためには、その A β オリゴマーに特異的な構造を認識する立体構造認識抗体による同定などが必要である。抗原性については、適切な動物を用いて抗体が誘導されることを確認する必要があり、その際に合わせてアジュバントが必要であるかどうかの検討を行うことが望ましい。

ASPDワクチンの品質管理

- (1) T細胞エピトープを含まない凝集体が製造可能
ASPDワクチンでは、構造表面にT細胞エピトープが露出しない
- (2) A β 凝集体のサイズ分布の範囲を規定し、同一性を担保する
NMR等の構造解析
A β 凝集体表面に対する特異的抗体によるエピトープマッピング
電子顕微鏡、溶液原子間力顕微鏡
レーザー散乱法、蛍光相関法
グリセロール密度勾配遠心
- (3) 抗原性を担保する
ウサギ等の適切な動物を用いて抗体が誘導されることを確認
アジュバントの必要性についても同時に検討

これらはASPD以外のA β ワクチンへも敷衍出来る
一般性の高い品質管理基準の策定

17

【手引】

2 原薬の製造工程と規格

GMP に従った製造工程により原薬を製造する。その際に最も留意すべきことは、原材料として A β 1-42 を用いる場合は、ワクチン製剤から T 細胞を活性化する原因となりうる A β 1-42 モノマーを除去することである。予め T 細胞エピトープを除去した A β の部分配列を用いたワクチン製剤の場合、上記の配慮は不要となるが、その場合は抗原性が十分高い一定の立体構造を持つワクチン製剤を作ることが出来るかどうかが課題となる。上記以外は基本的には低分子の製剤と同じであり、製剤化方法を定め、試験期間に応じた安定性を確認する。

規格については主な検査項目（試験方法と判断基準）としては、以下の様なものが挙げられ、品質保証に研究開発時から適応できる。

(1) 性状・物理化学的性質

形状（物理的な状態）および色について定性的に規定する。物性の確認として pH、濁度等の設定も行う。

(2) 確認試験

確認試験は目的物質を特異的に確認できる方法とすべきである。分子構造上の特徴その他の特有の性質に基づいて設定する必要がある。同一性を確認するためには、2 種類以上の方法（理化学試験、生物学的試験、免疫化学的試験）の組み合わせにより、特異性を保証する必要がある場合もある。

Ex. アミノ酸分析、(A β)抗体を利用した K_d 値の設定等

(3) 力価・定量法（含量）

適切なバリデーションされた力価試験が必要である。

質量で表される物質量は、保存中に出現する分解生成物などの不純物によって妨害されることのない特異的な分析方法を設定する必要がある。 Ex. HPLC 法等

(4) 純度試験（純度と不純物）

生物薬品の場合、絶対的な純度を規定するのは困難な場合があり、純度は複数の分析方法の組み合わせにより評価される。目的物質、関連物質及び不純物（目的物質由来、製造工程由来）を相互に分離する事に重点を置き設定を行う。

(5) 安定性、その他

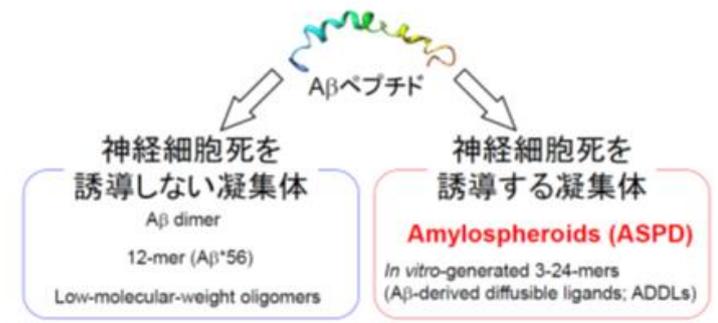
臨床試験期間に応じ、必要な期間の設定が必要となる他、注射剤の場合は、最終の臨床試験薬剤での無菌性評価・判定基準、その他、水分含量等の設定が必要となる。

また、使用時に混合するアジュバントが必要な場合には、アジュバントの規格は独立して設定されるべきである。

4.3 A β による神経毒性のメカニズム

A β 自体は、正常人においてもアミロイド前駆体タンパク質（APP）から切り出される生理的ペプチドであるが、その役割については確定していない。AD発症においては、A β が凝集することで生理的には存在しない構造体を作り神経の機能を阻害し最終的に神経細胞死を引き起こすと考えられている。孤発例ではA β の産生が増えるという報告はないため、A β がなぜ凝集するようになるかは不明だが、脳内には2量体から数百量体までの様々な凝集体が存在することが解っている。研究の進展により、その中で、従来発症原因と見なされてきた線維状凝集体よりも、オリゴマーと呼ばれるより小さい凝集体により強い神経毒性があると考えられるようになった。さらに、A β オリゴマーには複数の構造体があり、比較的サイズが小さいA β オリゴマー（2量体・12量体）はグルタミン酸受容体を最終的に經由して神経のシナプスを障害するが直接神経細胞死を起こさないこと⁸⁵⁾、一方、比較的大きいサイズのA β オリゴマー（～30量体のAmylospheroids (ASPD)^{86,87)}などはグルタミン酸受容体を經由することなく直接神経細胞死を起こすこと⁸⁸⁾が解っており、構造が異なるA β オリゴマーはバイオ活性も異なることが明らかになりつつある(図27)。

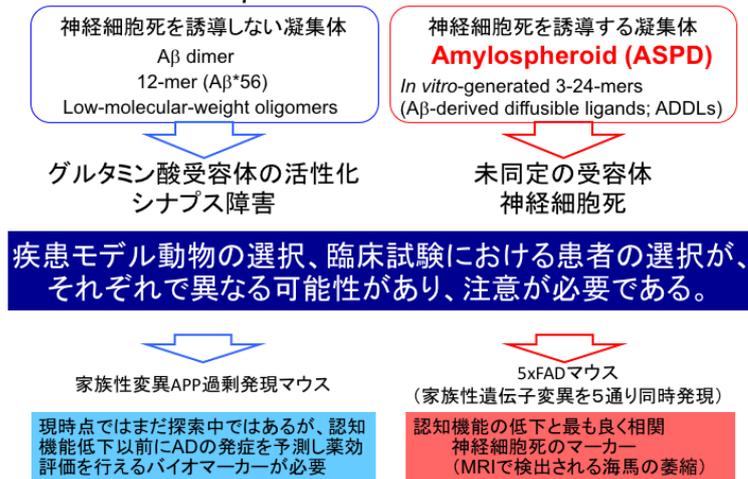
Aβ凝集体は「神経細胞死を誘導しないもの」と「誘導するもの」に分けられる



[図 27] Aβ ワクチンと神経細胞死

従って、Aβ ワクチン開発において、シナプス毒性を持つ Aβ オリゴマーを開発ターゲットにする場合と、神経細胞死を起こす Aβ オリゴマーを開発ターゲットにする場合では、疾患モデル動物の選択、将来的には臨床試験における患者の選択が異なる可能性があり、注意が必要である(図 28)。

構造が異なるAβオリゴマーはバイオ活性も異なる



[図 28] Aβ による神経毒性のメカニズム

例えば、AN-1792 を初めとする多くの Aβ に対する免疫療法の開発においては、ヒト APP に家族性 AD の原因となる遺伝子変異を組み込み過剰発現させたマウスを疾患モデルとして用いているが、これらのマウスはヒトにおける疾患の初期病態に近く、シナプス変性などの機能障害は認められるが、神経細胞死は殆どの場合には認められず、シナプス変性に関わる Aβ オリゴマーが主に蓄積している。従って、これらはシナプス毒性を持つ Aβ オリゴマーを開発ターゲットにする場合には適したモデルと言えるが、神経細胞死をターゲットにする場合には適さない。図 24 に示したように、Aβ の病態は認知機能低下以前から認められ

ており、シナプス変性については神経細胞死に先行することから、将来の臨床試験の設計において、シナプス毒性を持つ A β オリゴマーを開発ターゲットにする場合は、疾患のターゲットゾーンをより初期に設定する必要があると考えられる。そのためには、現時点ではまだ探索中ではあるが、認知機能低下以前に AD の発症を予測し薬効評価を行えるバイオマーカーが必要となる。神経細胞死を起こすオリゴマーを開発ターゲットにする場合は、図 6 のとおり認知機能の低下と最も良く相関するのは神経細胞死のマーカー、特に MRI で検出される海馬の萎縮であり、この神経細胞死のマーカーの改善を指標に神経細胞死が起きるリスクを減らす、あるいは阻止する療法の開発が望ましいと考えられる。これについては、現状では神経細胞死を伴うげっ歯類疾患モデルが殆どいないことから動物モデルの選択に注意が必要である。

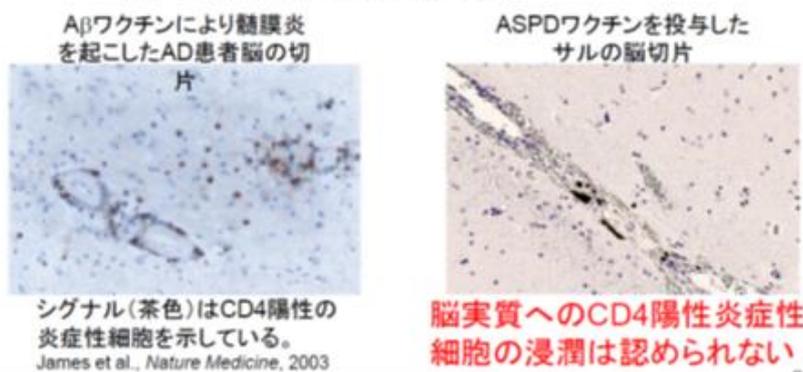
4.4 5年間の成果

5年間で実施したこととその結果は以下のとおりである。

- 1：試験管における ASPD の調製方法を改良し、製造効率を上げた。
- 2：製造された ASPD の評価方法を決定した。
- 3：ヒトと同じ A β 配列を持つウサギへの投与で、アジュバントが不要であることを示した。
- 4：アジュバントを使わない高齢サルへ3頭への頻回投与の結果、血液検査を含む一般的な検診、脳の MRI、剖検脳の組織学検査（炎症性マーカー）の結果より、安全性には問題がないことを示した(図 29, 表 4)。

サルを用いたASPDワクチンによる炎症性反応の有無の検討

- (1) Aβに特異的な炎症性T細胞応答
免疫細胞の浸潤や活性化を免疫組織染色で検証
- (2) ミクログリアの活性化など脳の炎症の有無
- (3) 脳微小出血の有無などの検証
- (4) 血中サイトカインの上昇の有無



[図 29] ASPD ワクチンによるサル CD4 炎症性反応

ASPД ワクチンによるサル脳の組織学的解析 ASPД ワクチンは、炎症性反応を惹起しない

ASPД ワクチンを投与した老齢サルの脳の組織学的解析
前回未検討であった3つの項目の解析を完了した

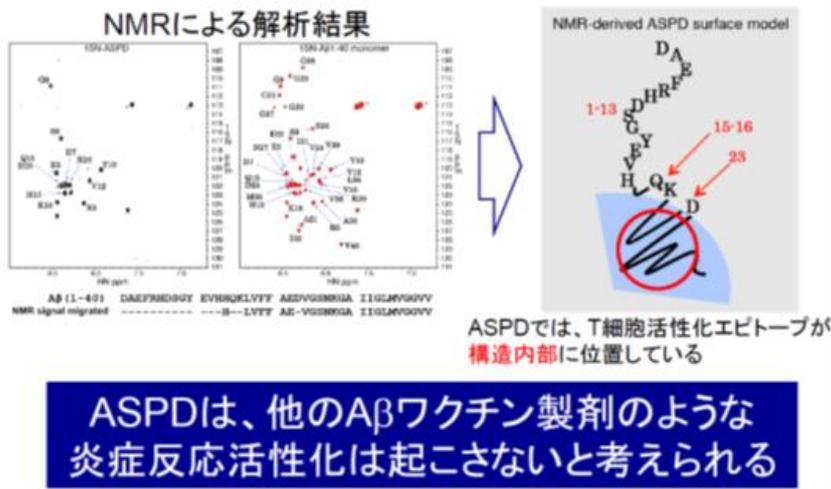
試験	ターゲット	抗原	clone	supplier	老齢サル(解析分)	結果
安全性試験	炎症性細胞	CD3 (T細胞)	rabbit poly	abcam	negative (脳実質)	安全である
		CD4 (T細胞)	OKT4	affimetrix	negative (脳実質)	安全である
		CD8 (T細胞)	rabbit poly	abcam	negative (脳実質)	安全である
		CD20 (B細胞)	L26	abcam	negative (脳実質)	安全である
		CD79a (B細胞)	JCB117	DAKO	negative (脳実質)	安全である
		CD68 (activated microglia)	KP1	abcam	negative (脳実質)	安全である
		Iba1 (resting, activated microglia)	rabbit poly	WAKO	positive	—

**ASPД ワクチンは、これまでのAβワクチンと比較し
高い安全性を有すると考えられる**

5 : 上記の投与において、神経の活動を示す FDG の PET で投与により神経機能が保持される (症状が進まない) という予備的結果を得た。これと相関して、食物回収課題のバッテリーにおいても、投与前に比べてやや改善傾向を示した。

6 : ASPД の NMR による構造解析 (図 30) より、ASPД では炎症性の反応を惹起するエピトープが凝集体の内側に折り畳まれて表面に出ていないことが明らかとなった。

NMR解析によるASPD立体構造の解明

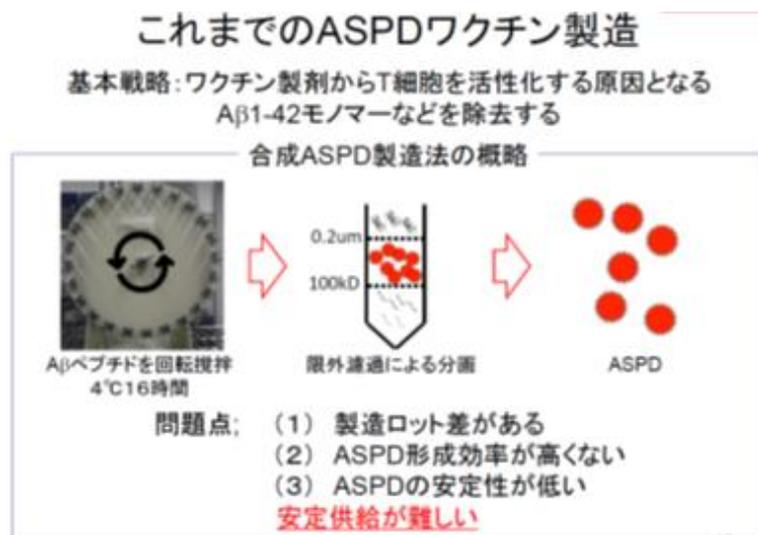


[図 30] ASPD の NMR 構造解析

上記のとおり、最初の予備的検証では、ASPD ワクチンが安全で有効である感触を得ることが出来た。特にアジュバントが不要である点、炎症性のエピトープが表に出てないことは(図 30)、安全性の面から非常に重要な点である。

しかしながら、これを治療法とする上では課題として以下の点が上げられた。

1 : 現行の試験管 ASPD の作製方法では工業スケールへのスケールアップが困難(図 31)。



[図 31] ASPD の製造方法

2 : ASPD にならないモノマーAβを除去する必要があり、製造効率が悪い。

この点を改良すべく ASPD の形成機構を調べたところ驚くべきことが明らかとなった。

1 : ASPD は特定の神経細胞のゴルジ体で形成され分泌される。

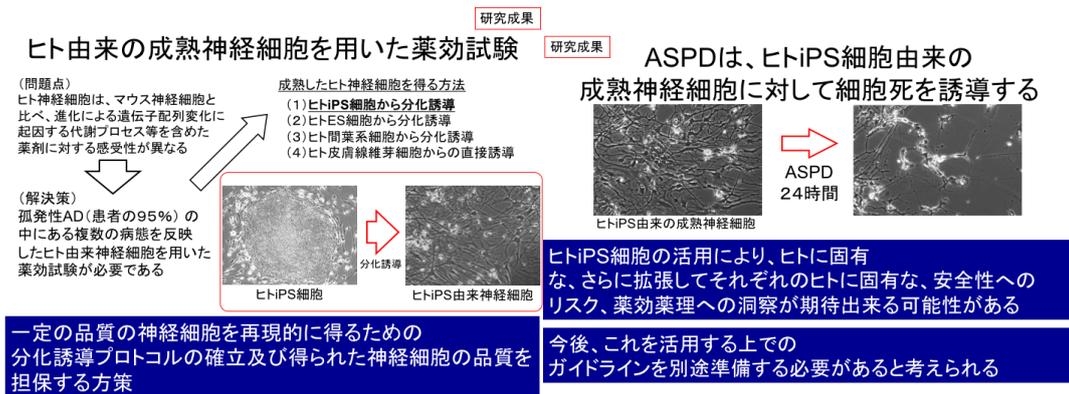
2 : ASPD の前駆体である APP のある部位の 1 つのアミノ酸を変換するだけで、切り出された A β がほぼ全て ASPD になる変異体を見出した。

3 : 上記の突然変異を含んだ APP を持つ CHO 細胞から ASPD を培養上清に分泌型 ASPD として回収出来ることを示した。

4 : 変異型 A β による ASPD はオリジナルと同等の毒性を持ち、ターゲットである NAK α 3 に結合することが明らかとなった。

CHO 細胞は医薬品開発の実績が数々あり、今これに切り替えたワクチン療法の開発を進めている。今後、早い段階で PMDA との間で CHO 由来分泌型 ASPD の CMC の考え方について相談したいと考えている。

ASPD の創薬開発についての課題としては上記以外に、AD の治療法開発を困難にしている 1 つの要因は、ヒトの病態を再現する代表的な動物モデルが現時点では存在しないことである。ヒトでは 95% 以上が遺伝的な突然変異を伴わない孤発例である一方で、げっ歯類疾患モデルにおいてヒト AD の診断基準を満たす病理学的特徴（神経細胞死・アミロイド病変・神経原線維変化）の全てが発現するようにするためには、3~5 種類の遺伝子を同時に変異させる必要がある。そもそも野生型のげっ歯類ではアミロイド斑の蓄積が報告されていないことから、げっ歯類とヒトでは AB の代謝を始めとする AD の背景をなす生物学的機構が異なる可能性があり、げっ歯類の結果をヒトに外挿するに当たってはことさらに注意が必要と考えられる。さらに、A β オリゴマーはシナプス変性であれ神経細胞死であれ、神経細胞の表面にある何らかの分子に結合して毒性を発揮していると考えられているが、その分子の構造及び機能がモデル動物とヒトの間で保存されているかどうかの確認が必要である。もし保存されていない場合、ワクチンが誘導する抗体の効果を調べる上で、ヒト由来神経を用いる必要がある。成熟したヒト神経細胞を得るためには、(1) ヒト iPS 細胞から分化誘導、(2) ヒト ES 細胞から分化誘導、(3) ヒト間葉系細胞から分化誘導、(4) ヒト皮膚線維芽細胞からの直接誘導、などの分化誘導系が活用可能である(図 32)。



[図 32] iPS を用いた薬効試験

上記の内、(1)が現在最も幅広く活用が期待出来る手法であるが、分化誘導系の場合、一定の品質の神経細胞を再現的に得るためのプロトコルの確立、確立されたプロトコルに従った場合、その系の品質をどのように担保するか、という問題が現在の課題である。

一方、実際に(1)のヒトiPS細胞から分化誘導したヒト神経細胞の解析によって、ヒトiPS細胞由来神経細胞の薬剤応答性がこれまでマウス等の実験系で想定されていた薬剤濃度と異なっていること、 γ セクレターゼ阻害剤では予想とは逆に $A\beta$ 量を増加させる濃度領域があること⁸⁹⁾、ADモデルマウスにおいて $A\beta$ 量や記憶障害の改善が認められている様々なNSAID型 γ セクレターゼ調節剤をAD患者iPS由来神経細胞に添加し、高濃度NSAID型 γ セクレターゼ調節剤は確かに $A\beta_{42}$ 量を減少させる一方、薬剤のヒト生体内動態と同程度の低濃度NSAID型 γ セクレターゼ調節剤は全く効果を示さないこと⁹⁰⁾が判明している。以上の結果は、ヒト神経細胞はマウス神経細胞と比べ代謝プロセスを含めた薬剤に対する感受性が大きく異なることを示唆している。また、遺伝子変異が明らかでない孤発例AD患者の神経細胞へのアプローチは、患者自身から(1)~(4)の方法で誘導する必要がある。ヒトiPS細胞から神経細胞を分化誘導し、 $A\beta$ を解析することによって、孤発性AD患者神経細胞で、遺伝性AD患者神経細胞と同様の $A\beta$ 代謝表現型が検出される場合がある^{91,92)}。以上の結果から、 $A\beta$ 代謝の観点から、孤発性ADの中には複数の病態があることが考えられ、将来的なAD薬剤開発において、個別化医療につながるアプローチの重要性を示唆している。上記のとおり、ヒトiPS細胞の活用により、ヒトに固有な、さらに拡張してそれぞれのヒトに固有な、安全性へのリスク、薬効薬理への洞察が期待出来る可能性がある。従って、これを活用する上でのガイドラインを別途準備する必要があると考えられる。

安全域を決定するためのモデル動物をどうするかということがあったが、最近、ASPДを蓄積し、神経細胞脱落が起きる齧歯類モデル動物を得ることが出来た。高齢サルと合わせて動物二種については検証が可能となった。もう1つの課題は、これはAD

全体の課題であるが、AD ではより早期の治療法開発を目指しており、ハーバード大学においては、A β の蓄積すら始まっていない人達を対象とした検証、A β の蓄積初期の人達を対象にした検証、軽度認知症の人達への検証と、3段階を電話での初期スクリーニングを効果的に用いることで、実際に着手している。このように、どうやって対象者を選別してくるのかというのが大きな問題である。ASPD については、今回、分泌されていることが初めて解ったため、血中診断系の開発を今後進める予定にしている。

【手引】

3 薬効薬理試験

ワクチンの評価として、(1) 動物における免疫原性の確認、(2) 開発ターゲットである A β オリゴマーの機能に応じた試験が必要である。(1) については、ヒトと同じ A β 配列を持つウサギで検証し、併せてアジュバントの必要性を検証することが望ましい。次に、サルを用いて抗体価が上がることを確認することが必要である。(2) については、アミロイド斑の減少を目的とする場合には家族性突然変異を持つ APP 過剰発現マウスを用いた試験が可能であり、神経細胞死をターゲットにする場合には、5x FAD マウスなどのように家族性の遺伝子変異を5通り同時発現させたマウスを用いた試験が必要となる。A β オリゴマーの毒性をワクチンが誘導する抗体が阻止するかどうかについては、培養神経細胞を用いた評価が可能であり、その際に iPS などから分化誘導したヒト神経細胞を用いることは有効である。投与量と投与頻度は、予定している臨床試験の投与量と同程度、投与頻度はそれを越える条件で検討することが必要である。

【手引】

4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、必要不可欠な生理機能（例えば中枢神経系、心血管系、呼吸器系など）に対する好ましくない作用の可能性を検討する目的で計画される。ワクチンが誘導する抗体が、治療ターゲット以外の自身の組織に交差することで、必要不可欠な生理機能が障害を受ける引き金になる可能性がある。従って、動物から得たワクチン誘導血清を用いて（この場合、ヒト A β と同一の配列を持つウサギがモデル動物となりうる）、ヒト組織切片に対する組織交差反応性試験を実施し、治療標的以外の構造体への抗体の特異的結合の有無を検証する必要がある。特異的結合が認められた場合は、動物モデルにおいて特にその臓器への影響を解析する必要がある。さらに、標準的な毒性試験を実施し、生命維持機能を有する器官系に対する急性あるいは慢性の有害作用の有無を検証する必要がある。これらを踏まえて安全性薬理試験を実施する

【手引】

5 作用機序に関連する安全性試験

動物モデルを用いて、A β に特異的な炎症性 T 細胞応答（T 細胞の浸潤や活性化を免疫組織染色で検証）、ミクログリアの活性化など脳の炎症の有無、脳微小出血の有無などの検証が必要であ

る。可能であれば血中サイトカインの上昇の有無についても確認する。

【手引】

6 非臨床安全性試験

バイオテクノロジー応用医薬品及びワクチンの開発に関する欧州における指針 (CPMP/ICH/302/95, CPMP/SWP/465/95)に従って非臨床安全性試験を計画する必要がある。これについては最初の臨床試験を実施するに当たり、局所忍容性、発熱性、急性投与、反復投与、抗体の交差反応性の評価が必要である。局所忍容性の評価については、上記のとおりヒトと同じ $A\beta$ を持つヒトと相同な動物モデルと考えられるウサギを用いた反復投与毒性試験を実施することが望ましい。ワクチンそのものの副作用を検討する急性毒性試験はラットを用いることが可能である。発熱性物質試験は品質管理の一環として実施することが可能である。疾患の特性を考慮すると、生殖発生毒性試験は最初の臨床試験を実施するに当たり必要ではないと考えられ、原薬の化学的特性によっては遺伝毒性試験及びがん原性試験は省略可能である。

【手引】

7 アジュバント

上記のとおり T 細胞性反応を回避するためには、アジュバントを使わないことが最も望ましい。しかしながら、加齢により免疫応答性が落ちている可能性が十分考えられることから、必要性に応じて安全性の高いアジュバントを使う場合も考えられる。これについては用いるアジュバントに応じて別途ガイドラインを設け慎重に対応する必要がある。

加齢による免疫応答性の低下を補うための
アジュバントの使用について

加齢 → 免疫応答性の低下

アジュバント
(T細胞性反応の懸念)

留意事項5:
必要性に応じて安全性の高いアジュバントを使う場合も考えられるが、用いるアジュバントに応じて別途ガイドラインを設け慎重に対応する必要がある

36

本資料は医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業（Initiative for Accelerating Regulatory Science in Innovative Drug, Medical Device, and Regenerative Medicine）の補助金による成果である。

なお、本資料はPMDAの公式見解ではない。

利益相反関係について、研究委員の萩原正敏は、自ら創業したキノファーマ社の未公開株式を約 20%保有するが、本研究に関しキノファーマ社の決定に参加しない。研究委員の川上浩司は、株式会社新日本科学、オリンパス株式会社の科学技術顧問であり、大日本住友製薬株式会社、バイエル薬品株式会社、オリンパス株式会社、ステラファーマ株式会社、協和発酵キリン株式会社と京都大学との共同研究契約に基づいた研究費を獲得している。研究委員の星美奈子は、京都大学の利益相反審査委員会の審議を経て、TAO ヘルスライフファーマ株式会社の技術顧問を務めている。研究委員の中村祐は、ノバルティス ファーマ株式会社、第一三共株式会社、武田薬品工業株式会社、ヤンセンファーマ株式会社、小野薬品工業株式会社、エーザイ株式会社、持田製薬株式会社、田辺三菱製薬株式会社、富山化学工業株式会社、大塚製薬株式会社からの講演料等を伴う会議への出席・発表を行っており、武田薬品工業株式会社、グラクソ・スミスクライン株式会社、第一三共株式会社から奨学寄付金を獲得している。研究員の堀井郁夫は、堀井サイエンスアソシエイト株式会社を介してファイザー株式会社、昭和大学、ケンブリッジ大学、大連医科大学の科学的なコンサルタントを務めているが、すべて委託契約のもとでの活動範囲内のものである。その他の研究者には利益相反関係はない。

5. 注釈

（注釈 1）症状改善薬(Symptomatic drug) AD の臨床症状を緩和する効果はあるが、病態の進行は抑制しない薬剤

（注釈 2）健常者と認知症の人の中間の段階（グレーゾーン）にあたる症状に、MCI（Mild Cognitive Impairment：軽度認知障害）がある。MCI とは、認知機能（記憶、決定、理由づけ、実行など）のうち1つの機能に問題が生じてはいるが、日常生活には支障がない状態のことで、MCI には、「健忘型」と「非健忘型」の2つの型がある。記憶障害があるかどうかの違いがあるが、MCI の多くは健忘型である。非健忘型では、記憶障害ではなく失語や失行などの症状が多く見られる。健忘型 MCI は進行するとアルツハイマー病になることが多く、非健忘型 MCI は前頭側頭型認知症やレビー小体型認知症に進行することが多いと言われている。以下が MCI の定義となる。

MCI 5つの定義

1. 記憶障害の訴えが本人または家族から認められている
2. 日常生活動作は正常
3. 全般的認知機能は正常
4. 年齢や教育レベルの影響のみでは説明できない記憶障害が存在する
5. 認知症ではない

(注釈 3) 3R 使用動物数の削減/苦痛の軽減/代替法の利用

(注釈 4) 疾患修飾薬(Disease-modifying drug) AD の病態機序に作用することで神経変性や神経細胞死を遅延させ、その結果として臨床症状の進行を抑制する薬剤

6. 参考文献

- 1) 下方浩史 我が国の疫学統計 日本臨床増刊号 痴呆症学 3 62 増刊号 4, 121-125 (2004)
- 2) 認知症の医療と生活の質を高める緊急プロジェクト報告書：厚生労働省（平成 20 年 7 月）
- 3) The US Food and Drug Administration (2005) Public Health Advisory: deaths with Antipsychotics in elderly patients with behavioral disturbances.
- 4) The Federation of Pharmaceutical Manufacturers' Associations of Japan (2005) Drug Safety Update No.141 [In Japanese]. Tokyo
- 5) The US Food and Drug Administration. FDA news: FDA Requests Boxed Warnings on Older Class of Antipsychotic Drugs. (cited 16 February 2010) Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116912.htm>
- 6) The Federation of Pharmaceutical Manufacturers' Associations of Japan (2009) Drug Safety Update No.176 [In Japanese].Tokyo
- 7) Wagner AK., Soumerai SB., Zhang F. et al. Segmented regression analysis of interrupted time series studies in medication use research. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 27, 299-309 (2002)
- 8) American Psychiatric Association Work Group on Alzheimer's Disease and Other Dementias (2007) Practice Guideline for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease and Other Dementias (2nd-Eds.) American Psychiatric Association, Arlington
- 9) Urushihara H., Kobayashi S., Honjo Y. et al. Utilization of antipsychotic drugs in elderly patients with Alzheimer's disease seen in ambulatory practice in Japan. Science Postprint 1, e00014 (2014)
- 10) Department of Nursing Insurance, Health and Welfare Bureau for the Elderly, The

Ministry of Health, Labour and Welfare. Outline of an insured long-term care project, a 2010 yearly status report. Tokyo (2010)

- 11) Schneider LS., Tariot PN., Dagerman KS. et al. Effectiveness of atypical antipsychotic drugs in patients with Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 355, 1525-1538 (2006)
- 12) Shankar GM., Li S., Mehta TH. et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837-842 (2008)
- 13) Schwab C., Hosokawa M., McGeer PL. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Experimental Neurology*, 188, 52-64 (2004)
- 14) Golde TE. The therapeutic importance of understanding mechanisms of neuronal cell death in neurodegenerative disease. *Molecular Neurodegeneration* 4:8 doi: 10.1186/1750-1326-4-8 (2009)
- 15) 非臨床薬物動態試験ガイドラインについて（平成 10 年 6 月 26 日 医薬審第 496 号）
http://www.whoirei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe2.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=SEARCH&SMODE=NORMAL&KEYWORD=%94%f1%97%d5%8f%b0%96%f2%95%a8%93%ae%91%d4&EFSNO=4108&FILE=FIRST&POS=0&HITSU=3
- 16) 薬物相互作用の検討方法について（平成 13 年 6 月 4 日 医薬審発第 813 号）
http://www.whoirei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe2.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=SEARCH&SMODE=NORMAL&KEYWORD=%96%f2%95%a8%91%8a%8c%dd%8d%ec%97%70&EFSNO=4402&FILE=FIRST&POS=0&HITSU=114
- 17) 医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて（平成元年 9 月 11 日 薬審 1 第 24 号） <https://www.pmda.go.jp/files/000205438.pdf>
- 18) 医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて（平成 11 年 11 月 1 日 医薬審第 1604 号） <http://www.pmda.go.jp/files/000156267.pdf#page=1>
- 19) 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（平成 20 年 11 月 27 日 薬食審査発第 1127001 号） <http://www.pmda.go.jp/files/000156718.pdf#page=1>
- 20) 医薬品 非臨床試験ガイドライン解説 2013、医薬品非臨床ガイドライン研究会編、薬事日報社（2013 年 7 月 30 日）
- 21) SAFETY PHARMACOLOGY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS, S7A (Recommended for Adoption at Step 4 dated 8 November 2000)

- <https://www.pmda.go.jp/files/000156011.pdf>
- 22) THE NON-CLINICAL EVALUATION OF THE POTENTIAL FOR DELAYED VENTRICULAR REPOLARIZATION (QT INTERVAL PROLONGATION) BY HUMAN PHARMACEUTICALS, S7B (Current *Step 4* version dated 12 May 2005)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156513.pdf>
- 23) NOTE FOR GUIDANCE ON TOXICOKINETICS: THE ASSESSMENT OF SYSTEMIC EXPOSURE IN TOXICITY STUDIES, S3A (Recommended for Adoption at Step 4 dated 27 October 1994)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156031.pdf>
- 24) GUIDANCE FOR REPEATED DOSE TISSUE DISTRIBUTION STUDIES, S3B (Recommended for Adoption at Step 4 dated 27 October 1994)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156614.pdf>
- 25) DURATION OF CHRONIC TOXICITY TESTING IN ANIMALS (RODENT AND NON RODENT TOXICITY TESTING), S4 (Current Step 4 version dated 2 September 1998)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156229.pdf>
- 26) GUIDELINE ON THE NEED FOR CARCINOGENICITY STUDIES OF PHARMACEUTICALS, S1A (Recommended for Adoption at Step 4 dated 29 November 1995)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156176.pdf>
- 27) TESTING FOR CARCINOGENICITY OF PHARMACEUTICALS, S1B (Recommended for Adoption at Step 4 dated 16 July 1997)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156195.pdf>
- 28) DOSE SELECTION FOR CARCINOGENICITY STUDIES OF PHARMACEUTICALS, S1C(R2) (Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994, Addendum on a Limit Dose dated 17 July 1997 and incorporated in November 2005, Revised on 11 March 2008)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156959.pdf>
- 29) GUIDANCE ON GENOTOXICITY TESTING AND DATA INTERPRETATION FOR PHARMACEUTICALS INTENDED FOR HUMAN USE, S2(R1) (Current Step 4 version dated 9 November 2011)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156595.pdf>
- 30) DETECTION OF TOXICITY TO REPRODUCTION FOR MEDICINAL PRODUCTS & TOXICITY TO MALE FERTILITY, S5(R2) (Current Step 4 version Parent Guideline dated 24 June 1993, Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005)

- <https://www.pmda.go.jp/files/000156671.pdf>
- 31) IMMUNOTOXICITY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS, S8
(Recommended for Adoption at Step 4 dated 15 September 2005)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156956.pdf>
- 32) PHOTOSAFETY EVALUATION OF PHARMACEUTICALS, S10 (Current Step 4
version dated 13 November 2013)
<http://www.pmda.go.jp/files/000156202.pdf>
- 33) PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED
PHARMACEUTICALS, S6(R1) (Parent Guideline dated 16 July 1997, Current
Step 4 version Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June
2011) <https://www.pmda.go.jp/files/000156596.pdf>
- 34) GUIDANCE ON NONCLINICAL SAFETY STUDIES FOR THE CONDUCT OF
HUMAN CLINICAL TRIALS AND MARKETING AUTHORIZATION FOR
PHARMACEUTICALS, M3(R2) (Current Step 4 version dated 11 June 2009)
<https://www.pmda.go.jp/files/000156128.pdf>
- 35) Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites (Final Guidance,
02/14/2008)
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/
Guidances/UCM079266.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079266.pdf)
- 36) Guidance for Industry, Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals
(Final Guidance, 08/01/1996)
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/
Guidances/UCM079270.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf)
- 37) Guidance for Industry, Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs
(Final Guidance, 10/01/2002)
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/
Guidances/UCM079239.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079239.pdf)
- 38) Guidance for Industry, Endocrine Disruption Potential of Drugs: Nonclinical
Evaluation (Draft Guidance, 09/19/2013)
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/
Guidances/UCM369043.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM369043.pdf)
- 39) Guidance for Industry, Statistical Aspects of the Design, Analysis, and
Interpretation of Chronic Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals
(Draft Guidance, 05/08/2001)
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/
Guidances/UCM079272.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079272.pdf)

- 40) Guidance for Industry, Reproductive and Developmental Toxicities — Integrating Study Results to Assess Concerns (Final Guidance, 09/22/2011)
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079240.pdf>
- 41) Guidance for Industry and Review Staff, Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results (Final Guidance, 01/03/2006)
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079257.pdf>
- 42) Guidance for Industry, Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (Final Guidance, November 2013)
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM376521.pdf>
- 43) Pharmacokinetics and Metabolic Studies in the Safety Evaluation of New Medicinal Products in Animals (3BS11A) (Adopted Guideline, April 1994)
- 44) Questions and answers on the withdrawal of the 'Note for guidance on single dose toxicity' (EMA/CHMP/SWP/81714/2010) (24 June 2010)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094590.pdf
- 45) Guideline on repeated dose toxicity (CPMP/SWP/1042/99 Rev. 1 Corr.) (Adopted Guideline, 1 September 2010)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf
- 46) CHMP SWP Conclusions and recommendations on the use of genetically modified animal models for carcinogenicity assessment (CPMP/SWP/2592/02 Rev 1) (Adopted Guideline, June 2004)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003257.pdf
- 47) Note for guidance on carcinogenic potential (CPMP/SWP/2877/00) (Adopted Guideline, Jan 2003)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003258.pdf
- 48) Guideline on Risk Assessment of Medicinal Products on Human Reproduction and Lactation: From Data to Labelling (EMEA/CHMP/203927/05) (Adopted Guideline, Jan 2009)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003307.pdf

- 49) Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00) (Adopted Guideline, Feb 2001)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003315.pdf
- 50) Reflection paper on non-clinical evaluation of drug-induced liver injury (DILI) (CHMP/SWP/150115/06) (Adopted Guideline, 24 Jun 2010)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094591.pdf
- 51) Development Pharmaceuticals for Biotechnological and Biological Products - Annex to Note for Guidance on Development Pharmaceuticals (CPMP/BWP/328/99) (Adopted Guideline, Apr 2000)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003603.pdf
- 52) Note for guidance on pre-clinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95) (Adopted Guideline, June 1998)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004004.pdf
- 53) Guideline on adjuvants in vaccines for human use (CHMP/VEG/134716/04) (Adopted Guideline, July 2005)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003809.pdf
- 54) Small SA, Duff K, Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60, 534-542 (2008)
- 55) Ferrer I, Barrachina M, Puig B, Martinez de Lagran M et al. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiology of Disease* 20 (2005) 392– 400
- 56) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A et al. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* (2007)15-23
- 57) Altafaj X., Dierssen M, Baamonde C, MartiE, Visa J, Guimera J, Iset M, Gonzalez JR, Florez J, Fillat C and Estivill X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet.* (2001) 1915-

1923.

- 58) Branchi I, Bichler Z, Minghetti L, Maurice J, Malchiodi-Albedi F, Gonzalez MC, Chettouh Z, Nicolni A, Chabert C, Smith DJ, Rubin EM, Migliore-Samour D, Alleva E. Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *Journal of Neurophatolgy and Experimental Neurology* (2004) 64, 429-440
- 59) Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N and Hagiwara M. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nature Communications* 1 (2010) doi:10.1038/ncomms1090
- 60) Okawa Y., Ishiguro K., Fujita SC. Stress-induced hyperphosphorylation of tau in the mouse brain. *FEBS Letters* 535, 183-189 (2003)
- 61) Feng Q., Cheng B., Yang R. et al. Dynamic changes of phosphorylated tau in mouse hippocampus after cold water stress. *Neuroscience Letters* 388, 13-16 (2005)
- 62) Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* (1994) 170, 63-66.
- 63) Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schimdt Cm Bronson RT, Davisson MT. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature Genetics* (1995) 11, 177-184.
- 64) Meunier J., Ieni J., Maurice T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid b25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ 1 receptor. *British Journal of Pharmacology* 149, 998-1012 (2006)
- 65) Leber P. Guidelines for the clinical evaluation of antidementia drugs. (1990)
- 66) Knopman DS., DeKosky ST., Cummings JL. et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 56, 1143-1153 (2001)
- 67) Wahlster P., Niederlander C., Kriza C. et al. Clinical Assessment of Amyloid Imaging in Alzheimer's Disease: A Systematic Review of the Literature. *Dementia and*

- geriatric cognitive disorders. 36, 263-278 (2013)
- 68) Sperling RA., Aisen PS., Beckett LA. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's dementia: the journal of the Alzheimer's Association.* 7, 280-292 (2011)
- 69) McKhann GM., Knopman DS., Chertkow H. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's dementia: the journal of the Alzheimer's Association.* 7, 263-269 (2011)
- 70) Bateman RJ., Xiong C., Benzinger TLS. et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New Engl J Med.* 367, 795-804 (2012).
- 71) Kawashima S., Ito K., Kato T. Inclusion criteria provide heterogeneity in baseline profiles of patients with mild cognitive impairment: comparison of two prospective cohort studies. *BMJ open.* 2:e000773 (2012)
- 72) Ota K., Oishi N., Ito K. et al. A comparison of three brain atlases for MCI prediction. *Journal of neuroscience methods.* 221, 139-150 (2014)
- 73) Jack CR. Jr., Lowe VJ., Senjem ML. et al. 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain : a journal of neurology.* 131(Pt 3), 665-680 (2008)
- 74) Ito K., Mori E., Fukuyama H. et al. Prediction of outcomes in MCI with (123)I-IMP-CBF SPECT: a multicenter prospective cohort study. *Annals of nuclear medicine.* 27, 898-906 (2013)
- 75) 日本核医学会分子イメージング戦略会議: アミロイドイメージング剤を用いた脳 PET 撮像の標準的プロトコール. August 2013
<http://www.jsnm.org/files/pdf/guideline/2013/%E8%84%B3%E3%82%A2%E3%83%9F%E3%83%AD%E3%82%A4%E3%83%89%E6%A8%99%E6%BA%96%E6%A4%9C%E6%9F%B%E3%83%97%E3%83%AD%E3%83%88%E3%82%B3%E3%83%AB130814.pdf>
- 76) van Oijen M., Hofman A., Soares HD. et al. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet neurology.* 5, 655-660 (2006)
- 77) Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ et al. Increased amyloid beta-

- peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 9649-9653 (1993)
- 78) Salloway S., Sperling R., Nick C. et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine* **370**, 322-333 (2014)
 - 79) Guo X., Tang P., Liu P. et al. Meta-analysis of the association between two neprilysin gene polymorphisms and Alzheimer's disease *J Neurol Sci.* **346**, 6-10 (2014)
 - 80) Braga ILS, Silva PN, Furuya TK. et al. Effect of APOE and CHRNA7 Genotypes on the Cognitive Response to Cholinesterase Inhibitor Treatment at Different Stages of Alzheimer's Disease *Am J Alzheimers Dis & Other Demen.* **30**, 139-144 (2014)
 - 81) Jack CR. Jr., Knopman DS., Jagust WJ. et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9, 119-128, doi:10.1016/S1474-4422(09)70299-6 (2010).
 - 82) Orgogozo JM., Gilman S., Dartigues JF. et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54 (2003).
 - 83) Cribbs DH., Ghochikyan A., Vasilevko V. et al. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *International immunology* 15, 505-514 (2003).
 - 84) Monsonego A., Zota V., Karni A. et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 112, 415-422, doi:10.1172/JCI18104 (2003).
 - 85) Larson ME. & Lesné SE. Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 125-139, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07478.x (2012).
 - 86) Hoshi M., Sato M., Matsumoto S. et al. Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6370-6375 (2003).
 - 87) Matsumura S., Shinoda K., Yamada M. et al. Two distinct amyloid beta-protein (Abeta) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses. *The Journal of biological chemistry* 286, 11555-11562, doi:10.1074/jbc.M110.181313 (2011).
 - 88) Noguchi A., Matsumura S., Dezawa M. et al. Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 284, 32895-32905, doi:M109.000208 [pii]10.1074/jbc.M109.000208 (2009).
 - 89) Yahata N., Asai M., Kitaoka S. et al. Anti-A β drug screening platform using human

iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's Disease. PLoS ONE 6, e25788 (2011)

- 90) Mertens J., Stuber K., Wunderlich P. et al. APP processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based γ -secretase modulation. Stem Cell Reports 1, 491-498 (2013)
- 91) Israel MA., Yuan SH., Bardy C. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. Nature 482, 216-220 (2013)
- 92) Kondo T., Asai M., Tsukita K. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. Cell Stem Cell 12, 487-496 (2013)

レギュラトリーサイエンス研究委員会委員

委員名	所属
萩原 正敏	京都大学大学院医学研究科・形態形成機構学 教授
川上 浩司	京都大学大学院医学研究科・薬剤疫学 教授
星 美奈子	京都大学大学院医学研究科・形態形成機構学 准教授
井上 治久	京都大学 iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門 教授
保野 慎治	京都大学医学部附属病院・臨床研究総合センター・EBM 推進部 助教
小林 亜希子	京都大学大学院医学研究科・形態形成機構学 助教
澤田 照夫	京都大学大学院医学研究科・形態形成機構学 研究員

外部委員

委員名	所属
中村 祐	香川大学医学部・精神神経医学講座 教授
小野寺 博志	医薬品医療機器総合機構・毒性領域 テクニカル エキスパート
堀井 郁夫	昭和大学薬学部 客員教授
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 部長