

目次

| | |
|----------------------------------|----|
| 2.4 非臨床試験の概括評価 | 1 |
| 2.4.1 非臨床試験計画概略 | 1 |
| 2.4.2 薬理試験 | 2 |
| 2.4.2.1 <i>In vitro</i> 試験 | 2 |
| 2.4.2.2 <i>In vivo</i> 試験 | 2 |
| 2.4.2.3 投与用量及び投与間隔の検討 | 3 |
| 2.4.2.4 主要代謝物 OC 体に関する検討 | 3 |
| 2.4.2.5 安全性薬理試験 | 4 |
| 2.4.3 薬物動態試験 | 4 |
| 2.4.3.1 吸収及び分布 | 5 |
| 2.4.3.2 代謝 | 7 |
| 2.4.3.3 排泄 | 7 |
| 2.4.3.4 薬物動態学的薬物相互作用 | 8 |
| 2.4.4 毒性試験 | 8 |
| 2.4.4.1 単回投与毒性試験 | 8 |
| 2.4.4.2 反復投与毒性試験 | 9 |
| 2.4.4.3 遺伝毒性試験 | 10 |
| 2.4.4.4 がん原性試験 | 10 |
| 2.4.4.5 生殖発生毒性試験 | 10 |
| 2.4.4.6 局所刺激性試験 | 11 |
| 2.4.4.7 その他の毒性試験 | 11 |
| 2.4.5 総括及び結論 | 12 |
| 2.4.5.1 薬理試験 | 12 |
| 2.4.5.2 薬物動態試験 | 12 |
| 2.4.5.3 毒性試験 | 13 |
| 2.4.6 参考文献 | 18 |

略語一覧表

| 略語 | 省略していない表現又は定義 | |
|------------------|---|---|
| ASA | Active systemic anaphylaxis | 能動的全身性アナフィラキシー |
| AUC | Area under the drug concentration time curve | 血液中濃度 - 時間曲線下面積 |
| CCC 体 | Covalently Closed Circular | (CCC 体：閉環状 DNA) |
| cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid | 相補的 DNA |
| C _{max} | Maximum blood concentration | 最高血中濃度 |
| c-Met | Hepatocyte growth factor receptor | 肝細胞増殖因子受容体 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | デオキシリボ核酸 |
| DNase | Deoxyribonuclease | デオキシリボヌクレアーゼ |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酵素免疫測定法 |
| FDA | Food and Drug Administration | 米国食品医薬品局 |
| FGF | Fibroblast growth factor | 線維芽細胞増殖因子 |
| FOB | Functional Observational Battery | 機能観察総合評価 |
| 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 |
| HASMC | Human aortic smooth muscle cells | 正常ヒト血管平滑筋細胞 |
| Hetero-PCA | Heterologous passive cutaneous anaphylaxis | 異種受身皮膚アナフィラキシー |
| HGF | Hepatocyte growth factor | 肝細胞増殖因子 |
| Homo-PCA | Homologous passive cutaneous anaphylaxis | 同種受身皮膚アナフィラキシー |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cells | 正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 |
| ICH | International Conference on Harmonization | 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 |
| LacZ | β -galactosidase | β -ガラクトシダーゼ |
| LN 体 | Linear | (LN 体：直鎖 DNA) |
| OC 体 | Open Circular | (OC 体：開環状 DNA) |
| Q-PCR | Quantitative polymerase chain reaction | 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 |
| rh | Recombinant human | ヒト組換え |
| t _{max} | Time of maximum concentration | 最高血中濃度到達時間 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮細胞増殖因子 |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside | 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド |

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

HGF (hepatocyte growth factor : 肝細胞増殖因子) は肝細胞を増殖する因子として 1984 年に中村らによりタンパク質が発見され¹⁾、1989 年に cDNA がクローニングされた²⁾。HGF は、肝障害、腎障害に伴って障害臓器及び肺などの間葉系細胞によって産生され、障害臓器の上皮細胞系に働きかけて再生を促すことが知られており³⁾、組織器官の恒常性維持に重要な役割を果たしている。これらの作用に加えて HGF は、強力な血管内皮細胞増殖作用を有し、さらに *in vivo* において血管新生作用を有することが報告されている^{4),5)}。

コラテジェンはヒト HGF 遺伝子がコードされたプラスミド DNA であり、細胞内で転写・翻訳されてヒト HGF を産生・分泌し、HGF の持つ血管内皮細胞遊走・増殖及び管腔形成作用によって虚血部位に血管新生を誘導することにより治療効果を発揮する。したがって、効力を確認する試験としては、コラテジェンが活性のあるヒト HGF 産生能力を保有しているかについて培養細胞を用いた *in vitro* 試験で確認し、ラット下肢虚血病態モデルにおける血管新生作用の検討を行った。さらに HGF の血管新生作用様式を他の血管新生因子と比較する試験を実施した。また、*in vivo* 試験で最適な投与用量 (投与液濃度及び投与液量)、投与間隔及び筋肉組織中におけるプラスミド DNA 由来タンパク質の発現範囲について検討した。製造施設の異なる 2 種類の製剤についてヒト HGF 発現誘導能を比較する試験を行った。薬物動態試験の結果から、主要代謝物として Open Circular 体 (OC 体) が産生されることが分かったため、代謝物 OC 体の生物活性についても検討を実施した。生理機能に対する潜在的な影響を確認するため、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する安全性薬理試験を実施した。

薬物動態試験としては、薬理試験及び毒性試験に用いた動物種であるラットにコラテジェンを臨床投与経路である筋肉内又は静脈内投与した時の血液中濃度推移、分布、代謝及び尿中排泄 (静脈内投与時のみ) を検討した。また、毒性試験に用いた動物種であるサルにコラテジェンを筋肉内投与した時の血液中濃度推移を検討した。

開発初期に実施した薬物動態試験においては、コラテジェンの DNA 配列の一部 (■ bp) を増幅領域とするプライマーセットを用いた Quantitative polymerase chain reaction 法 (Q-PCR 法) により、コラテジェンの組織分布を検討した。しかしながら、この測定法では未変化体に加えて少なくとも Q-PCR 法による増幅領域が残存している代謝物も併せて定量していることから、ヒト HGF 発現誘導能を有するプラスミド DNA が組織中へ移行しているか否かを推察することができなかった。そこで、■ bp を増幅領域とするプライマーセットを用いた Q-PCR 法を新たに確立し、既存の Q-PCR 法 (■ bp) による測定結果と比較することにより組織分布を検討した。

毒性試験としては、コラテジェンが薬理学的作用を示す動物種であるラット及びサルを用いて、単回及び反復投与毒性試験では臨床投与経路である筋肉内投与に加えて、最大暴露時の毒性評価を行う目的で静脈内投与試験も実施した。また、コラテジェンが腫瘍形成又はがん化を誘導する可能性の評価として、ラット多臓器コメットアッセイ及び担がんマウスを用いた腫瘍増殖への影響確認試験を実施した。生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギを用いた胚・

胎児発生に関する予備試験を実施した。さらに、コラテジェンの局所刺激性及び抗原性についても検討した。これらの毒性試験は、担がんマウスを用いた腫瘍増殖への影響確認試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験、並びに ██████████ 社 (A*-B*) 製剤を用いた抗原性試験において実施した血清中抗コラテジェン抗体測定を除いて GLP を遵守して実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 *In vitro* 試験

コラテジェンを形質導入した細胞内から細胞培養上清に分泌されたタンパク質をウェスタンブロット法により解析した結果、陽性対照であるヒト組換え HGF (rhHGF) の α 鎖及び β 鎖と同一の位置に陽性のバンドが検出されたことから、コラテジェンは成熟型ヒト HGF を産生・分泌する活性を有していることが示された。

次に、標的細胞である正常ヒト骨格筋細胞を用い、コラテジェン導入によるヒト HGF 発現量を ELISA 法により測定した。コラテジェンを正常ヒト骨格筋培養細胞に導入したところ、24 時間後の培養上清中にヒト HGF が分泌されることが確認された。

さらに、コラテジェンにより発現するヒト HGF の生物活性について正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対する増殖活性を指標に検討した。コラテジェンを導入した細胞の培養上清から得られたヒト HGF は陽性対照である rhHGF と同様に、3~10 ng/mL で濃度依存的に HUVEC を増殖させた。

HGF 及び他の血管新生因子の血管新生メカニズムを検討する目的で、rhHGF、ヒト組換え VEGF₁₂₁ (rhVEGF₁₂₁) 及びヒト組換え basic FGF (rhbFGF) の HUVEC 及び正常ヒト血管平滑筋細胞 (HASMC) に対する増殖活性、並びに HASMC に対する遊走活性を比較した。HUVEC に対しては、いずれの血管新生因子においても 1~100 ng/mL の範囲で濃度依存的な増殖能亢進作用を示したが、HASMC に対しては、rhbFGF のみが増殖活性を持つことが示された。また、HASMC に対する遊走活性試験においては rhHGF のみが 1 ng/mL の濃度で対照群と比べ有意な遊走能の亢進作用を示した。正常血管の形成過程では、平滑筋細胞あるいは周皮細胞が遊走することで、増殖、伸展した内皮細胞を裏打ちし、血管壁を安定化すると考えられている。実際に、VEGF によって誘導された新生血管が浮腫を引き起こす可能性について報告されており、成熟血管形成において血管平滑筋細胞遊走作用が重要であることが考えられる。以上の結果から、HGF のみが成熟した血管を形成する可能性が示唆された。

2.4.2.2 *In vivo* 試験

ラット下肢虚血モデルを用いて、コラテジェンの血流改善効果を検討した。コラテジェンを 0.1 あるいは 1 mg/body の用量で虚血部位筋肉内投与後 26 日の下肢血流量を測定した結果、コラテジェン群では対照群と比較して有意な血流量の増加が認められ、1 mg/body 投与群で有意な血管数の増加が認められた。以上の結果から、コラテジェンは *in vivo* 下肢虚血モデルにおいて血管数及び虚血下肢の血流量を増加させることが示された。

*新再生医療等製品承認情報提供時に置き換え

また、製造施設の異なる 2 種類の製剤のヒト HGF 発現誘導能を比較した結果、ラットの下肢筋肉内投与時におけるヒト HGF 発現量は両製剤で差を認めないことが示された。

2.4.2.3 投与用量及び投与間隔の検討

ヒト HGF 発現誘導能を指標に、コラテジェン投与液濃度及び投与液量のヒト HGF 発現量に対する影響について検討し、さらに、投与間隔を検討する目的で、ヒト HGF 発現量の経時変化を観察した。また、筋肉組織におけるプラスミド DNA 由来タンパク質の発現範囲を予測する目的でコラテジェンと同じプラスミド骨格を有する p[REDACTED]/LacZ を筋肉内投与した時のβ-ガラクトシダーゼの発現部位について検討した。

投与液濃度の検討においては、コラテジェンの投与液量を 1 部位あたり 2 mL で固定して、0.01 mg (投与液濃度 0.005 mg/mL) あるいは 0.5 mg (同 0.25 mg/mL) をウサギの筋肉内に投与し、投与後 7 日の投与部位筋肉におけるヒト HGF 発現量を比較した。その結果、コラテジェンを 0.5 mg/2 mL で投与した群のヒト HGF 発現は、0.01 mg/2 mL 投与群の約 43 倍となった。また、投与液量の検討においては、ウサギ筋肉内に 0.5 mg/2 mL (0.25 mg/mL) あるいは 0.5 mg/0.5 mL (1 mg/mL) のコラテジェンを投与し、投与後 7 日の投与部位筋肉におけるヒト HGF 発現量を比較した。その結果、コラテジェンを 0.5 mg/2 mL 投与群のヒト HGF 発現量は 0.5 mg/0.5 mL 投与群の約 3 倍となった。以上の結果から、コラテジェンによるヒト HGF 発現量は投与液濃度及び投与液量に依存することが示唆された。

投与間隔について検討する目的で、コラテジェンのウサギ骨格筋内投与後の投与部位筋肉におけるヒト HGF 発現量の経時変化を観察した。その結果、コラテジェンによるヒト HGF 発現は投与後 1 日より観察され、投与後 7 日に最大となり、その後減少し、投与後 28 日でほとんどの個体で定量下限値未満となった。また、血清中ヒト HGF 濃度は、投与後 28 日までの全ての測定時点で定量下限値未満であった。

筋肉組織中プラスミド DNA 由来タンパク質の発現範囲を予測する目的で、p[REDACTED]/LacZ を筋肉内投与し、投与後 4 日の筋肉組織中β-ガラクトシダーゼの発現を X-gal 染色で評価した。その結果、組織標本の染色像において、β-ガラクトシダーゼの発現部位は筋肉組織中の一部に限局していたことから、プラスミド DNA 由来タンパク質は投与部位の近傍に局在することが考えられた。また、β-ガラクトシダーゼの発現範囲は投与液量に依存することが示された。

2.4.2.4 主要代謝物 OC 体に関する検討

コラテジェンの主要代謝物である OC 体の生物活性について、*in vitro* 及び *in vivo* におけるコラテジェンのヒト HGF 発現誘導能を指標に比較検討を行った。代謝物 OC 体は *in vitro* においてはコラテジェン (未変化体) と比較して 86.4%のヒト HGF 発現活性を示したが、*in vivo* 筋肉内投与におけるヒト HGF 発現活性は未変化体と比較して顕著に低かった。以上の結果から、代謝物 OC 体は生体内ではほとんど活性を示さないと考えられた。

2.4.2.5 安全性薬理試験

2.4.2.5.1 中枢神経系に及ぼす影響

コラテジェンを 0.5 及び 5 mg/kg の用量でラットに単回筋肉内投与しても、Functional Observational Battery (FOB) 法において一般状態、行動及び体温に影響を及ぼさなかった。また、コラテジェンを 0.25 及び 2.5 mg/kg の用量で無麻酔サルに単回筋肉内投与しても、行動に影響を及ぼさなかった。

2.4.2.5.2 呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響

コラテジェンを 0.25 及び 2.5 mg/kg の用量で無麻酔サルに単回筋肉内投与しても、血圧、心拍数及び心電図に影響を及ぼさなかった。また、呼吸数、並びに動脈血 pH、CO₂分圧、O₂分圧及び O₂飽和度に影響はみられなかった。

2.4.3 薬物動態試験

コラテジェンの薬物動態試験では、薬理試験及び毒性試験に用いた動物種であるラットにコラテジェンを筋肉内又は静脈内投与した時の血液中濃度推移、分布、代謝及び尿中排泄（静脈内投与時のみ）を検討した。加えて、毒性試験に用いた動物種であるサルにコラテジェンを筋肉内投与した時の血液中濃度推移を検討した。

臨床試験での投与方法は、投与対象肢の虚血部位に対して 1 箇所あたり 0.5 mg ずつ 8 箇所（合計 4 mg）への筋肉内投与であり、投与液量は 1 箇所あたり 3 mL である。なお、投与対象筋が小さい場合には 2 mL まで減じてよいとしている。ヒトの体重を 60~70 kg とすると体重あたりの投与量は約 0.06 mg/kg である。非臨床薬物動態試験におけるコラテジェンの投与量としては、ラットにおいては臨床用量の 0.06 mg/kg を低用量として公比 5 で増量し、中及び高用量をそれぞれ 0.3 及び 1.5 mg/kg とした。ラットにおける分布試験では、コラテジェンの投与量は臨床用量の約 25 倍である 1.5 mg/kg とした。サルでのコラテジェンの投与量は、サルの下肢筋肉へ投与可能な最大投与量である 2.5 mg/kg を高用量とし、公比 5 で低用量を 0.5 mg/kg とした。

ラット血液、尿、羊水及び組織並びにサル血液中コラテジェン濃度の定量には、Q-PCR 法を用いた。Q-PCR 法には、コラテジェンを構成する塩基配列の ■ bp 及び ■ bp をそれぞれ特異的に検出できる Q-PCR 法 A 及び Q-PCR 法 B の 2 種類の測定法を用いた。なお、Q-PCR 法を用いたコラテジェン濃度測定法の定量下限値は、血液で 10 copies/μL、尿で 50 copies/μL、羊水で 40 copies/μL、組織で 50 copies/μg DNA であった。FDA は、Q-PCR 法の定量下限として 100 copies/μg DNA 未満を推奨しており、本測定法は FDA が推奨する検出力を有していた（Guidance for Industry, Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications Contains Nonbinding Recommendations, 2007 年 11 月）。なお、薬物動態パラメータの算出にあたっては、コラテジェンの 1 copy の重量 5.68×10^{-6} pg を用いて血液中濃度をコラテジェン等量に換算した。

コラテジェンの代謝物組成分析は、コラテジェンを構成する塩基配列（全 5181 bp）のヒト

HGF cDNA 領域の部分領域 (■■■■ bp) を特異的に検出できるプローブを用いたサザンブロット法で行った。一般に、プラスミド DNA は高次構造の異なる 3 種の存在状態を示す: 1) Covalently Closed Circular 体 (CCC 体): 環状二本鎖プラスミド DNA がスーパーコイルを形成している状態、2) Open Circular 体 (OC 体): プラスミド DNA 分子内で少なくとも 1 ヵ所、2 本鎖の一方に切れ目 (nick) が生じたため、CCC 体の状態を保てなくなり、開いた環状になった状態、3) Linear 体 (LN 体): プラスミド DNA 分子内で 2 本鎖の両方に切れ目が入り、直鎖状になった状態。品質試験の成績から、製剤中のコラテジェンは大部分が CCC 体として存在していることが確認されている。

コラテジェンの臨床投与経路は筋肉内投与であり、薬物動態試験は基本的には筋肉内投与で実施した。加えて、コラテジェンを筋肉内投与した時の全身循環血中へ移行したコラテジェンの体内動態を明らかとすることを目的として、コラテジェンを静脈内投与した時の薬物動態に関しても検討した。

2.4.3.1 吸収及び分布

(1) 投与部位筋肉中コラテジェン濃度推移について

雄性ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した時の投与部位筋肉中コラテジェン濃度の消失半減期は 21 日であった (Q-PCR 法 A)。また、投与部位筋肉中コラテジェン濃度は投与後 60 日で定量下限値未満となった (Q-PCR 法 B)。雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した時の投与部位筋肉中コラテジェン濃度は、投与後 1 日でそれぞれ 3.01×10^7 及び 4.48×10^7 copies/ μ g DNA であり、投与量の 0.014~0.015%であった。

雄性ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で 1 ヵ月間隔 2 回筋肉内投与した時の投与部位筋肉中コラテジェン濃度は、同用量での単回筋肉内投与時と同様に推移し、消失半減期は 48 日であった (Q-PCR 法 A)。また、投与後 60 日における投与部位筋肉中コラテジェン濃度はわずかであった (Q-PCR 法 B)。

(2) 投与間隔について

雄性ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回及び 1 ヵ月間隔 2 回筋肉内投与した時の投与部位筋肉中コラテジェン濃度の消失半減期は、それぞれ 21 及び 48 日と、投与間隔と同様の 1 ヵ月程度を示し、投与後 60 日におけるそれは単回及び 1 ヵ月間隔 2 回筋肉内投与と同程度であった (Q-PCR 法 A)。このように、投与部位筋肉中コラテジェン濃度は、単回及び 1 ヵ月間隔 2 回筋肉内投与でほぼ同様に推移したことから、複数回投与の影響はないものと考えられた。Q-PCR 法 A 及び B を用いて測定した投与後 60 日の投与部位筋肉中コラテジェン濃度の比較より、筋肉内に投与されたコラテジェンは、大部分がヒト HGF 発現誘導能を持たない不活性な核酸断片になったと考えられた。また、コラテジェンを筋肉内投与した時に全身循環血中へ移行したコラテジェンの濃度推移を単回投与と 1 ヵ月間隔 2 回投与との間で比較した結果、単回及び 2 回目投与時の血液中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) に有意な差は認められなかったことから、複数回投与による暴露量の差は認められなかった。

(3) 主要分布組織について

雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/mL の用量で単回筋肉内投与した時の組織分布を Q-PCR 法 A を用いて検討した結果、投与後 1 日において投与部位筋肉、非投与部位筋肉、大脳、心臓、肺、腎臓、副腎、脾臓、膵臓及び小腸にコラテジェンが認められたが、投与後 4 日以降では投与部位筋肉を除く全ての組織においてコラテジェン濃度は定量下限値未満であった。一方、Q-PCR 法 B では、全ての測定時点で投与部位筋肉以外の中枢及び生殖器を含む全ての組織でコラテジェンは定量下限値未満であった。

雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した時の組織分布を Q-PCR 法 A を用いて検討した結果、投与後 1 及び 4 日ではコラテジェンは広範な組織に認められた。その後、組織中コラテジェン濃度は減少し、投与後 7 日では、心臓、肺、腎臓、脾臓、骨髄、筋肉、精巣及び卵巣にコラテジェンが認められた。一方、Q-PCR 法 B では、投与後 1 日で大脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、骨髄及び筋肉で認められた。投与後 4 日では、雄の脾臓においてのみコラテジェンがわずかに認められたが、投与後 7 日では全ての組織で定量下限値未満であった。

以上のことから、組織中に認められたコラテジェンは代謝物である不活性な核酸断片であると考えられ、ヒト HGF 発現誘導能を有するプラスミド DNA は組織へ分布していないと推測された。

(4) 筋肉内投与時の全身循環血中への移行について

雌雄ラットにコラテジェンを 0.06、0.3 及び 1.5 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した時の血液中コラテジェン濃度は投与後 0.31～6.5 時間に最大となり、その後、半減期 0.99～4.5 時間で低下した (Q-PCR 法 A)。また、雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で筋肉内投与した時の血液中コラテジェン濃度の AUC は、雄性及び雌性ラットに同用量で静脈内投与した時の AUC のそれぞれ 0.2%及び 0.7%であった (Q-PCR 法 A)。このことから、コラテジェンを筋肉内投与した時、コラテジェンはほとんど全身循環血中へ移行しないものと考えられた。

雄性サルにコラテジェンを 0.5 及び 2.5 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した時の血液中コラテジェン濃度は 2 峰性で推移し、それぞれ投与後 3.0 及び 0.50 時間で最大となった後、6.2 及び 11 時間の半減期で低下した (Q-PCR 法 A)。

(5) 性差について

雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した時の血液中コラテジェン濃度は雌雄ともに投与後 2 時間まで急速に減少し、その後、雄性及び雌性ラットでそれぞれ半減期 12 及び 7.0 時間で低下した (Q-PCR 法 A)。雌雄ラットの消失半減期に有意な差が認められたが、血液中コラテジェンの暴露量自体に雌雄で本質的な差はないことから、コラテジェンの薬物動態に性差はないものと考えられた。

(6) 種差について

ラット及びサルにコラテジェンを単回筋肉内投与した時の血液中濃度推移を比較すると、い

ずれの種においても最高血中濃度到達時間 (t_{max}) は同程度であり、全身循環血中へ移行した後の体内動態に種差ないものと考えられた。

(7) 胎盤移行性について

妊娠 6、8、10、13 及び 16 日のラットにコラテジェンを 0.15 (妊娠 13 日のみ) 及び 1.5 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した時の胎盤・胎児移行性について検討した結果から、コラテジェンはほとんど胎盤を通過しないと考えられた。

2.4.3.2 代謝

一般にプラスミド DNA は、高次構造の異なる CCC 体、OC 体及び LN 体の 3 種の存在状態をとることが知られている。また品質試験成績から、製剤中のコラテジェンは大部分が CCC 体として存在していることが確認されている。

(1) *In vitro* 代謝

ヒト及びラット血清中でのコラテジェン未変化体 (CCC 体) の代謝速度をサザンブロット法により比較した結果、コラテジェンはヒト及びラット血清中で速やかに OC 体及び LN 体に代謝され、それぞれの消失半減期は 37 及び 28 秒であった。このことから、CCC 体のヒト及びラット血清中における代謝速度に大きな差はなく、いずれにおいても速やかに代謝されることが明らかとなった。

(2) *In vivo* 代謝

雌雄ラットにコラテジェンを筋肉内投与した時の血液中コラテジェンの代謝様式をサザンブロット法により検討した。血液中にコラテジェンの未変化体である CCC 体は認められず、OC 体及び LN 体が検出された例があったが、その後、分解された核酸断片と考えられるスメアが検出された。また、同様に静脈内投与した時の血液中代謝物を検討した結果、投与後 1~5 分で CCC 体は検出されず、主として OC 体及び LN 体として検出された。さらに、投与後 15 分では OC 体及び LN 体も検出されず、さらに分解された核酸断片と考えられるスメアが検出されたのみであった。以上の結果から、コラテジェンは生体内にて、CCC 体から OC 体あるいは LN 体へ速やかに変換され、最終的には DNase により不活性な核酸断片へと代謝されると考えられた。

2.4.3.3 排泄

雌雄ラットにコラテジェンを 1.5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した時の投与後 168 時間までの尿中コラテジェン濃度は全ての時点で定量下限値未満であった (Q-PCR 法 A)。また、サザンブロット法を用いた代謝の検討結果より、全身循環血中ではコラテジェンは速やかに核酸の断片へと代謝されるため、尿中には短い核酸の断片として排泄される可能性が考えられた。

2.4.3.4 薬物動態学的薬物相互作用

非臨床薬物動態試験成績から筋肉内投与後のコラテジェンの全身循環血中への移行量は僅かであると考えられたこと、プラスミド DNA であるコラテジェンの代謝には DNase の関与が知られており、薬物代謝酵素に影響を及ぼさないと考えられたことから、薬物相互作用のリスクは低いと考えられたため、薬物相互作用を検討する試験は実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

コラテジェンはヒト HGF 遺伝子がコードされたプラスミド DNA であり、筋肉内投与後、細胞内で転写・翻訳されてヒト HGF を産生・分泌し、HGF の持つ血管内皮細胞遊走・増殖及び管腔形成作用によって虚血部位に血管新生を誘導することにより治療効果を発揮する。したがって、コラテジェンの毒性についてはコラテジェン及び発現産物であるヒト HGF それぞれに対してリスク評価を行った。

臨床投与経路である筋肉内投与では、ラット及びサルを用いた単回投与毒性試験、ラット（1 ヶ月間隔 4 回投与及び 1 週間間隔 5 回投与）及びサル（1 ヶ月間隔 4 回投与）を用いた反復投与毒性試験（回復性試験を含む）を実施した。また、ラットを用いた静脈内投与による単回投与毒性試験及び 14 日間反復投与毒性試験を行い、コラテジェンの全身性の毒性を検討した。

ICH-S6 ガイドライン「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」を参考として、通常の遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかったが、コラテジェンの発がんイニシエーション作用を検討することを目的として、ラットを用いた多臓器コメットアッセイを行った。また、コラテジェンの発現産物である HGF の受容体は、がん原遺伝子である c-Met であり、HGF/c-MET シグナルの活性化は、がん細胞の増殖、浸潤、転移への関与が知られていることから^{6,7)}、担がんマウスを用いた腫瘍増殖への影響確認試験を実施した。生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験を実施した。さらに、コラテジェンの局所刺激性及び抗原性を検討するため、ウサギを用いた筋肉局所刺激性試験、マウス及びモルモットを用いた抗原性試験をそれぞれ実施した。すべての毒性試験は 2.5 mg/mL に調製された製剤を用いて実施し、筋肉内投与による毒性試験では技術的に投与可能な量を高用量として設定した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

2.4.4.1.1 ラット単回投与毒性試験

コラテジェンを 10 mg/kg の用量で雌雄ラットの大腿部筋肉内に単回投与した結果、投与部位における単核細胞の浸潤がコラテジェン群のみに認められたが（雄：2/5 例、雌：1/5 例）、いずれもごく軽度から軽度な局所変化であった。コラテジェンを 10 mg/kg の用量で雌雄ラットの尾静脈内に単回投与した結果、ごく軽度の静脈の内膜肥厚がコラテジェン群の雌 1/5 例の投与部位で認められた。いずれの投与経路においても、コラテジェン投与に関連した全身性の変化は認められず、概略の致死量は 10 mg/kg を超える量であった。

また、製造施設の異なる 2 種類の製剤を 10 mg/kg の用量で雌雄ラットの尾静脈内に単回投与

した結果、いずれの製剤においてもコラテジェン投与に関連した変化は認められず、概略の致死量は 10 mg/kg を超える量であった。

2.4.4.1.2 サル単回投与毒性試験

コラテジェンを 2.5 mg/kg の用量で雄性カニクイザルの大腿部筋肉内に単回投与した結果、死亡例もなく、コラテジェン投与に関連した変化は認められなかった。概略の致死量は 2.5 mg/kg を超える量であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 ラット 1 ヶ月間隔 4 回筋肉内投与毒性試験

コラテジェンを 0.5、1.5 及び 5.0 mg/kg の用量で雌雄ラットの大腿部筋肉内に 1 ヶ月間隔で 4 回投与し、最終投与後 1 ヶ月に剖検した。また、剖検後 1 ヶ月間の回復性試験を行った。その結果、死亡例はなく、実施した全ての検査項目においてコラテジェン投与に関連した変化は認められなかった。血清中の抗ヒト HGF 抗体価の上昇が 1.5 及び 5.0 mg/kg 群の少数例で認められた。無毒性量は 5.0 mg/kg/月を超える量と判断された。

2.4.4.2.2 ラット 1 週間間隔 5 回筋肉内投与毒性試験

コラテジェンを 5.0 mg/kg の用量で雌雄ラットの大腿部筋肉内に 1 週間間隔で 5 回投与し、最終投与後 4 日に剖検した。また、最終投与後 4 週間（28 日間）の回復性試験を行った。その結果、コラテジェン群の投与部位（大腿筋）において、筋線維の変性・壊死・再生、間質の出血、単核細胞浸潤及び線維化が対照群と比較して高頻度に認められた。これらの変化はコラテジェンの刺激性に起因するものと考えられたが、ごく軽度な変化であり、また明らかな回復性が認められた。血清中に抗ヒト HGF 抗体はみられなかった。無毒性量は 5.0 mg/kg/週を超える量と判断された。

2.4.4.2.3 ラット 14 日間反復静脈内投与毒性試験

コラテジェンを 0.6、2.5 及び 10 mg/kg の用量で雌雄ラットの尾静脈内に 14 日間反復投与し、最終投与の翌日に剖検した。また、最終投与後 14 日間の回復性試験を行った。その結果、コラテジェン投与群の投与部位（尾）において、単核細胞浸潤が認められた。この変化はコラテジェンの刺激性に起因するものと考えられたが、ごく軽度な変化であり、また明らかな回復性が認められた。血清中に抗ヒト HGF 抗体はみられなかった。無毒性量は 10 mg/kg/日を超える量と判断された。

2.4.4.2.4 サル 1 ヶ月間隔 4 回筋肉内投与毒性試験

コラテジェンを 0.25、0.8 及び 2.5 mg/kg の用量で雌雄カニクイザルの大腿部筋肉内に 1 ヶ月間隔で 4 回投与し、最終投与後 1 ヶ月に剖検した。また、剖検後 1 ヶ月間の回復性試験を行った。その結果、2.5 mg/kg 群の雌 1/3 例で投与期間及び回復期間を通して下痢が認められたが、

コラテジェン投与との関連性は不明であった。その他の検査項目においてコラテジェン投与に関連した変化は認められなかった。血清中に抗ヒト HGF 抗体はみられなかった。無毒性量は 2.5 mg/kg/月を超える量と判断された。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

コラテジェンはプラスミド DNA であり、通常の *in vitro* 条件下では細胞内に入らないことから、*in vitro* 遺伝毒性試験は実施しなかった。一方、ラットにコラテジェンを単回静脈内投与した際、投与後 1 日では肺及び腎臓においてコラテジェンが比較的多く認められたことから、これらの臓器に対するコラテジェンの発がんイニシエーション作用を検討するため、ラットを用いた多臓器コメットアッセイを実施した。コラテジェンを 10 mg/kg の用量で雄性ラットの尾静脈内に 24 時間間隔で 2 回投与し、肺及び腎臓における DNA 初期損傷誘発性を検討した。その結果、いずれの臓器においても DNA 初期損傷誘発作用は認められなかった。

なお、コラテジェンからの発現産物はヒト HGF であり、細胞膜を通過して DNA や染色体成分に直接作用することは考えられないことから、ICH-S6 ガイドラインに基づいて、ヒト HGF を考慮した遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

ICH-S6 ガイドラインを参考として、通常のがん原性試験は実施しなかったが、HGF/c-MET シグナルの活性化は、がん細胞の増殖、浸潤、転移への関与が知られていることから^{6,7}、担がんマウスを用いた腫瘍増殖への影響確認試験を実施した。薬物動態試験の結果から、投与部位以外の遠隔臓器においてヒト HGF が発現誘導される可能性は極めて低いと考えられたが、投与部位の近傍に腫瘍が存在した場合にコラテジェン投与が腫瘍増殖に影響を及ぼす可能性は否定できない。したがって、ヒト腫瘍細胞株 (Mewo ; ヒト悪性黒色腫由来又は HT-29 ; ヒト結腸腺癌由来) を大腿部皮下に移植した雌性ヌードマウスを用いて、腫瘍近傍の大腿部筋肉内に投与したコラテジェンの腫瘍増殖に及ぼす影響を確認する試験を実施した。その結果、いずれの腫瘍細胞株においても腫瘍増殖促進作用及び腫瘍転移は認められなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

コラテジェンはプラスミドベクターを用いており、ベクターの宿主細胞染色体への組み込み能は「ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」(2006 年 10 月)では、「カテゴリー (ii) 組み込み機構を持たないが、細胞の核へ移行するベクター」に該当し、生殖細胞へ組み込まれるリスクは低いと考えられた。

ラットを用いた薬物動態試験結果から、コラテジェンを筋肉内投与した場合、投与部位以外の各臓器ではコラテジェンの代謝物であるヒト HGF 発現誘導能を持たない不活性な核酸断片が分布していると考えられたこと、実施した反復投与毒性試験では、毒性所見として投与部位反応のみが観察され、生殖器を含めて前進への影響は認められなかったことから、コラテジェンを臨床投与経路である筋肉内に投与した場合、コラテジェンが生殖器を含めて前進的に影響

を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

コラテジェンをウサギに筋肉内投与した後の血清中ヒト HGF 濃度は定量下限値未満であったこと、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）患者を対象とした臨床試験ではコラテジェン投与により生理的濃度を超える血清中ヒト HGF 濃度の上昇は認められていないことから、投与部位において発現したヒト HGF が生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

コラテジェンを妊娠ラットに単回筋肉内投与した時の胎盤移行性を検討した結果から、ヒト HGF を発現誘導可能なコラテジェンが受胎産物に分布する可能性は低いと考えられたこと、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験では、母動物及び胚・胎児発生においてコラテジェンの投与に関連した変化は認められなかったことから、コラテジェンを臨床投与経路である筋肉内に投与した場合、受胎産物においてヒト HGF が発現し、胚・胎児毒性が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

以上、コラテジェンの特性、並びに実施した薬物動態試験、毒性試験及び臨床試験で得られた結果から、1) コラテジェンはプラスミドベクターを用いており、生殖細胞へ組み込まれるリスクは低いと考えられたこと、2) 筋肉内投与した場合、投与部位以外の各臓器にヒト HGF 発現誘導可能なコラテジェンが分布し、生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられたこと、3) 投与部位において発現したヒト HGF が生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられたこと、4) 筋肉内投与した場合、ヒト HGF 発現誘導可能なコラテジェンが受胎産物に分布し、受胎産物においてヒト HGF が発現して、胚・胎児毒性が引き起こされる可能性は低いと考えられたことから、1 回あたり 4 mg (0.5 mg×8 箇所) を 4 週間間隔で 2～3 回筋肉内投与という臨床で想定される用法・用量を考えた場合、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）を対象とした製造販売承認申請において、生殖発生毒性試験の実施は不要と考えられた。本見解については、再生医療等製品非臨床相談（安全性）において、医薬品医療機器総合機構と合意が得られている。

2.4.4.6 局所刺激性試験

雄性ウサギを用いて製造施設の異なる 2 種類の製剤の筋肉局所刺激性を検討した。コラテジェンの 0.17 mg/mL 溶液（臨床使用濃度）1 mL をウサギの大腿外側広筋に単回投与し、投与後 2、7 及び 14 日に筋肉障害性について検討した。投与後 2 及び 7 日では、筋線維の変性／壊死、組織球・偽好酸球の浸潤及び出血が認められたが、投与後 14 日には、これらの所見は消失又は軽減した。投与後 2 日にみられた変化は、陰性対照の生理食塩液でも同程度認められた。いずれの製剤においても筋肉障害性は生理食塩液よりやや強い程度であった。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 抗原性試験

製造施設の異なる 2 種類の製剤の抗原性を確認するため、雄性マウスを用いた異種受身皮膚

アナフィラキシー試験（Hetero-PCA 試験）、雄性モルモットを用いた能動的全身性アナフィラキシー試験（ASA 試験）及び同種受身皮膚アナフィラキシー試験（Homo-PCA 試験）を実施した。また、感作したマウス及びモルモットの血清中抗コラテジェン抗体を ELISA 法で測定した。すべての試験結果は陰性であり、いずれの製剤にも抗原性はないと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

培養細胞を用いた *in vitro* 試験の結果から、コラテジェンが導入された細胞から成熟型ヒト HGF が産生・分泌されることが示された。さらに、コラテジェンにより産生されたヒト HGF はヒト血管内皮細胞の増殖を促進すること、及びヒト血管平滑筋細胞の遊走を促進することが示された。ラット下肢虚血モデルにおいてコラテジェンの筋肉内投与により血管数及び血流量が増加したという結果を考え合わせると、コラテジェンは筋肉内投与により骨格筋細胞に導入され、ヒト HGF を産生し、血管内皮細胞の増殖作用及び血管平滑筋細胞の遊走作用を介して血管新生を誘導したと考えられた。

コラテジェンの筋肉内投与におけるヒト HGF の発現様式の検討から、ヒト HGF の発現は投与液濃度及び投与量に対する依存性を示すこと、筋肉中ヒト HGF 濃度は投与後 7 日で最大となり、その後減少していくことが明らかとなった。また、p[REDACTED]/LacZ プラスミド DNA を用いた筋肉組織中の発現範囲の検討からプラスミド DNA 由来のタンパク質は投与部位の近傍に局在することが考えられ、コラテジェンのヒト HGF の発現範囲も投与部位の近辺に局限することが推察された。これらの結果から、コラテジェンの最大限の薬効を引き出すためには、投与量を増やし、かつ投与箇所数を増やすことが有効であることが示唆された。

また、主要代謝物である OC 体の生物活性について検討した結果、代謝物 OC 体は生体内ではほとんど活性を示さないと考えられた。

安全性薬理試験の結果から、コラテジェンは中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対して影響を及ぼさないことが確認された。

以上、コラテジェンは投与局所でヒト HGF を産生・分泌することで血管新生を誘導し、虚血部位の血流を改善させることが示唆された。従って、コラテジェンの適応症である慢性動脈閉塞症（バジャー病・閉塞性動脈硬化症）の患者に対し、有効性を示す可能性が示された。

2.4.5.2 薬物動態試験

ラットにコラテジェンを単回及び 1 ヶ月間隔 2 回筋肉内投与した時の投与部位筋肉中コラテジェン濃度はほぼ同様に推移し、かつ全身循環血中へ移行したコラテジェンの AUC に有意な差は認められなかったことから、コラテジェンの複数回投与による薬物動態への影響はないものと考えられた。

ラットにコラテジェンを単回筋肉内投与した時の組織分布を検討した結果、組織中に認められたコラテジェンは、代謝物である不活性な核酸断片と考えられ、ヒト HGF 発現誘導能を有するプラスミド DNA は組織へ分布しないと推測された。

ラットにコラテジェンを単回筋肉内投与した時の血液中コラテジェン濃度の AUC は、同用量で静脈内投与した時の AUC の 1%未満であり、コラテジェンを筋肉内投与した時にコラテジェンはほとんど全身循環血中へ移行しないと考えられた。

ラットにコラテジェンを単回筋肉内及び単回静脈内投与した時の血液中代謝物をサザンブロット法で検討した結果、全身循環血中へ移行した未変化体である CCC 体は速やかに代謝物である OC 体及び LN 体へ変換され、最終的には不活性な核酸断片へ代謝されると考えられた。

ラットにコラテジェンを単回静脈内投与した時の尿中コラテジェン濃度は投与後 168 時間までの全ての測定時点で定量下限値未満であった。また、ラットにコラテジェンを単回筋肉内投与した時の胎盤移行性の検討結果より、コラテジェンは胚・胎児及び羊水へ移行しないと考えられた。

2.4.5.3 毒性試験

ラットの単回筋肉内及び静脈内投与における概略の致死量は、いずれの投与経路においても 10 mg/kg を超える量であった。サル単回筋肉内投与における概略の致死量は 2.5 mg/kg を超える量であった。

ラット 1 週間間隔 5 回筋肉内投与毒性試験及びラット 14 日間反復静脈内投与毒性試験では、コラテジェン群の投与部位においてコラテジェンの刺激性に起因すると考えられる炎症性変化が認められたが、いずれもごく軽度な変化であり、また明らかな回復性が認められた。その他にコラテジェン投与に関連した変化は認められなかった。ラット 1 ヶ月間隔 4 回筋肉内投与毒性試験では、血清中の抗ヒト HGF 抗体価の上昇が 1.5 及び 5.0 mg/kg 群の少数例で認められた。無毒性量は、ラット 1 ヶ月間隔 4 回筋肉内投与毒性試験では 5.0 mg/kg/月を超える量、ラット 1 週間間隔 5 回筋肉内投与毒性試験では 5.0 mg/kg/週を超える量、ラット 14 日間反復静脈内投与毒性試験では 10 mg/kg/日を超える量、サル 1 ヶ月間隔 4 回筋肉内投与毒性試験では 2.5 mg/kg/月を超える量と判断された。

コラテジェンの臨床使用濃度 (0.17 mg/mL) における局所刺激性は、生理食塩液よりやや強い程度であった。

(1) がん原性

1) 染色体への遺伝子組み込みリスクについて

FDA のガイダンス“Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials – Observing Subjects for Delayed Adverse Events” (2006 年 11 月) では、プラスミド DNA の局所投与において染色体への遺伝子組み込みが起こるリスクは低いとの考えが示されている。コラテジェンをラットに単回筋肉内投与した時の組織分布を検討した結果、投与後 1 日において投与部位筋肉以外の組織中のコラテジェン濃度は定量下限値未満であり、また投与部位筋肉中コラテジェン濃度は投与後 60 日で定量下限値未満となった。コラテジェンをラットに単回静脈内投与した時の組織分布を検討した結果、投与後 7 日には全ての組織中のコラテジェン濃度は定量下限値未満となった。

以上の結果から、コラテジェンの筋肉内投与による遺伝子治療では、投与部位及び遠隔臓器において、染色体への遺伝子組み込みが生じるリスクは低いと考えられた。

2) コラテジェンのがん原性について

コラテジェンは分子量約 3,200 kDa (5,181 bp) のプラスミド DNA であり、コラテジェンの分子量及び性質からコラテジェンが細胞膜を通過して DNA や染色体に直接影響を及ぼす可能性は低いと考えられること、通常の *in vitro* 条件下ではコラテジェンは細胞内に入らないことから、*in vitro* 遺伝毒性試験は実施しなかった。一方、ラットにコラテジェンを静脈内投与した際、投与後 1 日では肺及び腎臓においてコラテジェンが比較的多く認められたことから、これらの臓器に対するコラテジェンの発がんイニシエーション作用を検討するため、ラットを用いた多臓器コメットアッセイを実施した。その結果、いずれの臓器においてもコラテジェンによる DNA 初期損傷誘発作用は認められず、コラテジェンには発がんイニシエーション作用はないことが確認された。さらに、実施した反復投与毒性試験において前腫瘍性変化が認められていないことから、コラテジェンの筋肉内投与による遺伝子治療では、投与部位及び遠隔臓器においてコラテジェンが腫瘍形成又はがん化を誘導する可能性は低いと考えられた。

3) ヒト HGF のがん原性について

HGF はヒトの内因性タンパク質であり、細胞膜を通過して DNA や染色体成分に直接影響を及ぼし、発がんイニシエーション作用を有するとは考えられないことから、ICH-S6 ガイドラインを参考として、ヒト HGF を考慮した遺伝毒性試験は実施しなかった。

HGF の受容体は、がん原遺伝子である c-Met であり、HGF/c-MET シグナルの活性化は、がん細胞の増殖、浸潤、転移への関与が知られていることから^{6),7)}、腫瘍細胞に対する直接的な増殖促進作用あるいは血管新生作用を介した間接的な作用を及ぼす可能性は否定できない。しかしながら、ラットを用いた筋肉内投与及び静脈内投与による薬物動態試験結果より、投与部位以外の主要臓器では不活性な核酸断片として存在していることが示されていることから、投与部位以外の遠隔臓器においてヒト HGF が発現誘導される可能性は低いと考えられた。また、ウサギ筋肉内投与後の血清中ヒト HGF 濃度はいずれの測定時点においても定量下限値未満であったこと、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）患者を対象とした臨床試験においてコラテジェン投与に関連した生理的濃度を超える血清中ヒト HGF 濃度の上昇は認められていないことから、投与部位において発現したヒト HGF が全身性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。さらに、実施した反復投与毒性試験において前腫瘍性変化が認められていないことから、コラテジェンを臨床投与経路である筋肉内投与した場合、投与部位及び遠隔臓器においてヒト HGF が腫瘍形成又はがん化を誘導する可能性は低いと考えられた。

薬物動態試験の結果から、投与部位以外の遠隔臓器においてヒト HGF が発現誘導される可能性は極めて低いと考えられたが、投与部位の近傍に腫瘍が存在した場合にコラテジェン投与が腫瘍増殖に影響を及ぼす可能性は否定できない。したがって、ヒト腫瘍細胞株を大腿部皮下に移植した雌性ヌードマウスを用いて、腫瘍近傍の大腿部筋肉内に投与したコラテジェンの腫瘍増殖に及ぼす影響を確認する試験を実施した。その結果、腫瘍増殖及び腫瘍転移への影響は認められなかった。以上の結果から、コラテジェンの筋肉内投与による遺伝子治療では、投与部位近傍に腫瘍が存在した場合においてもヒト HGF がそれらの腫瘍に対して増殖作用を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上より、1回あたり4mg(0.5mg×8箇所)を4週間間隔で2~3回筋肉内投与という臨床で想定される用法・用量においては、コラテジェンの発がん性のリスクは低いと考えられた。

(2) 生殖発生毒性

1) 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクについて

「ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」(2006年10月)に基づいて、物理的、化学的及び生物学的特性から、コラテジェンの生殖細胞に対する意図しない組み込みリスクについて考察した。

ベクターに関しては、コラテジェンはプラスミドベクターを用いており、ベクターの宿主細胞染色体への組み込み能は「カテゴリー(ii)組み込み機構を持たないが、細胞の核へ移行するベクター」に該当する。コラテジェンを雌雄ラットに筋肉内投与及び静脈内投与した時の組織分布を検討した結果、投与後1日の生殖器(精巣及び卵巣)中のコラテジェン濃度は定量下限値未満であったことから、筋肉内投与によりコラテジェンが生殖器へ分布し、生殖細胞へ組み込まれるリスクは低いと考えられた。

2) コラテジェンの生殖器及び次世代に及ぼす影響について

コラテジェンを雌雄ラットに単回筋肉内投与した時の組織分布を検討した結果、投与後1日において投与部位以外の組織中のコラテジェン濃度は定量下限値未満であった。コラテジェンを雌雄ラットに単回静脈内投与した時の組織分布を検討した結果、投与後7日には全ての組織中のコラテジェン濃度は定量下限値未満となった。この時、サザンブロット法を用いた検討により、コラテジェンは投与後速やかに血液中で代謝されて不活性化されることが示されていることから、投与部位以外の各臓器ではコラテジェンの代謝物であるヒトHGF発現誘導能を持たない不活性化核酸断片が分布しているものと考えられた。

ラットにコラテジェンを単回筋肉内投与した時の血液中コラテジェン濃度のAUCは、同用量で静脈内投与した時のAUCの1%未満であり、コラテジェンを筋肉内投与した時にコラテジェンはほとんど全身循環血中へ移行しないと考えられた。また、実施した反復投与毒性試験では、コラテジェンの刺激性に起因すると思われる炎症性変化が投与部位で観察された以外に毒性所見は認められていない。

以上の結果から、コラテジェンを臨床投与経路である筋肉内に投与した場合、投与部位以外の各臓器では代謝物であるヒトHGF発現誘導能を持たない不活性化核酸断片が分布しているものと考えられ、コラテジェンが生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

3) コラテジェンの胚・胎児発生に及ぼす影響について

コラテジェンを妊娠ラット(妊娠6、8、10又は16日)に単回筋肉内投与した時の胎盤移行性を検討した結果、投与後1日では一部の受胎産物(胎盤、胚・胎児及び羊水)又は胎盤においてコラテジェンが認められたが、投与後2日以降では定量下限値未満となった。胎児では全ての測定時点でコラテジェン濃度は定量下限値未満であった。この結果から、ヒトHGFを発現

誘導可能なコラテジェンが受胎産物に分布する可能性は低いと考えられた。

ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験では、母動物及び胚・胎児発生においてコラテジェンの投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、コラテジェンを臨床投与経路である筋肉内に投与した場合、受胎産物においてヒト HGF が発現し、胚・胎児毒性が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

4) ヒト HGF の生殖器及び次世代に及ぼす影響について

コラテジェンより発現するヒト HGF に関しては、ラットを用いた筋肉内投与及び静脈内投与による薬物動態試験結果から、投与部位以外の遠隔臓器においてヒト HGF が発現誘導される可能性は極めて低いと考えられた。また、ウサギ筋肉内投与後の血清中ヒト HGF 濃度はいずれの測定時点においても定量下限値未満であったこと、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）患者を対象とした臨床試験においてコラテジェン投与に関連した生理的濃度を超える血清中ヒト HGF 濃度の上昇は認められていないことから、投与部位において発現したヒト HGF が生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上、コラテジェンの特性、並びに実施した薬物動態試験、毒性試験及び臨床試験で得られた結果から、1) コラテジェンはプラスミドベクターを用いており、生殖細胞へ組み込まれるリスクは低いと考えられたこと、2) 筋肉内投与した場合、投与部位以外の各臓器にヒト HGF 発現誘導可能なコラテジェンが分布し、生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられたこと、3) 投与部位において発現したヒト HGF が生殖器を含めて全身性に影響を及ぼす可能性及び乳汁移行により次世代に影響を及ぼす可能性は低いと考えられたこと、4) 筋肉内投与した場合、ヒト HGF 発現誘導可能なコラテジェンが受胎産物に分布し、受胎産物においてヒト HGF が発現して、胚・胎児毒性が引き起こされる可能性は低いと考えられたことから、1 回あたり 4 mg (0.5 mg×8 箇所) を 4 週間間隔で 2～3 回筋肉内投与という臨床で想定される用法・用量を考えた場合、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）を対象とした製造販売承認申請において、生殖発生毒性試験の実施は不要と考えられた。本見解については、再生医療等製品非臨床相談（安全性）において、医薬品医療機器総合機構と合意が得られている。

(3) 免疫原性

コラテジェンの抗原性については、モルモット ASA 反応、モルモット Homo-PCA 反応及びマウスラット Hetero-PCA 反応はいずれも認められなかった。さらに、モルモット及びマウス血清で抗コラテジェン抗体の測定を行ったが、血清中に抗コラテジェン抗体は認められなかった。すべての試験結果は陰性であったことから、コラテジェンに抗原性はないと考えられた。

また、慢性動脈閉塞症（バージャー病・閉塞性動脈硬化症）患者を対象とした臨床試験において、血清中の抗 HGF 抗体又は抗 DNA 抗体の産生は認められず、アナフィラキシー反応は認められなかった。

以上のことから、筋肉内局所投与による遺伝子治療の場合、コラテジェンが免疫応答を惹起させる可能性は低いと考えられた。

(4) 代謝物の毒性

薬物動態試験からコラテジェンの主要代謝物は OC 体であることが確認されている。OC 体はコラテジェンの活性成分である CCC 体と高次構造は異なるが配列は全く同じ物質であり、また品質試験から製剤中に OC 体が含まれていることも確認されていることから、OC 体の毒性はコラテジェンの毒性試験で評価できると考え、新たな試験は実施しなかった。実施した毒性試験では、コラテジェンの刺激性に起因すると考えられる炎症性変化が投与部位で観察された以外に毒性所見は認められていない。

2.4.6 参考文献

- 1) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122:1450-1459.
- 2) Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Gohda E, Daikuhara Y, Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:967-973.
- 3) Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem (Tokyo).* 1996;119:591-600.
- 4) Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119:629-641.
- 5) Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1937-1941.
- 6) Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:915-925.
- 7) Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3657-3660.