新薬紹介総説

アプタマーの医薬品への応用:加齢黄斑変性治療薬 ペガプタニブナトリウム(マクジェン[®])の薬理学的特徴と臨床成績

永岡 真¹⁾, 田原 誠¹⁾, 江坂 悦子²⁾, 大石 昌代²⁾, 中根 正己²⁾

要約: ペガプタニブナトリウムは、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) 阻害薬である。その活性本体はアプタマーと呼ばれる核酸分子であり、アプタマー部分が VEGF に結合することで VEGF の VEGF 受容体への結合を阻害する。VEGF は血管新生および血管透過性亢進に関与しており、加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration: AMD) のうち、脈絡膜新生血管 (Choroidal Neovascularization: CNV) を本態とする滲出型 AMD において、CNV 形成と関連していることが報告されている。その中でも VEGF₁₆₅ は炎症誘発性が高く、眼内における病的血管新生に関与していると考えられている。ペガプタニブナトリウムは、*in vitro* 試験において VEGF₁₆₅ の受容体への結合とそれに伴う受容体機能を選択的に阻害し、動物モデルにおいて血管新生および血管漏出を抑制した。国内外の臨床試験の結果、0.3 mg から 3 mg のペガプタニブナトリウムの投与により視力低下抑制作用が確認され、臨床推奨用量は最小用量である 0.3 mg となった。主な副作用は角膜浮腫、前房の炎症、飛蚊症、硝子体混濁であったが、国内外とも発現率は同程度であり、用量による明らかな増加はみられなかった。硝子体注射に伴う有害事象の頻度は高かったが、その多くは軽度または中等度であり、忍容性は良好であった。薬物動態の検討の結果、1 mg でも初回投与の結果から予想された蓄積係数の 1.06 倍を超える累積は確認されなかった。以上の特徴から、ペガプタニブナトリウムは滲出型 AMD に対する新規作用機序を有する治療薬として期待される。

1. はじめに

ペガプタニブナトリウムは本邦で初めて承認取得した核酸医薬品で、血管内皮増殖因子 (Vascular Endo-

thelial Growth Factor: VEGF) 阻害薬である。ペガプタニブナトリウムは、アプタマーと呼ばれる標的タンパク質に特異的に結合する核酸分子を活性本体とし、アプタマー部分である 28 個の核酸塩基からなる合成ヌクレオチドにポリエチレングリコールが結合した構造を有している (図 1)。VEGF は血管新生および血管透過性亢進に関与し (1, 2)、ヒトにおける主要なアイソフォームとして、VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ および VEGF₂₀₆ が知られている。これらアイソフォームのうち、VEGF₁₆₅ は炎症誘発性が高く、眼内における病的血管新生に関与していると考えられている (3, 4)。ペガプタニブナトリウムはこの VEGF₁₆₅ に対して高い選択性で結合し、VEGF₁₆₅ の VEGF 受容体への結合を阻害する。

ペガプタニブナトリウムは加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration: AMD) を適応症として開発された。近年、AMD のうち、脈絡膜新生血管 (Choroidal Neovascularization: CNV) を本態とする滲出型 AMD において、CNV 形成と VEGF の関連が報告されている (5-9)。加齢黄斑変性は、加齢により黄斑に現われる慢性的で進行性の疾患で、中心視力の低下をきたし失明の危険性を伴う疾患である。黄斑は図 2 に示すように網膜の中央の小さな領域であるが、鋭敏な中心視を担っており、文字、顔および色を認識する重要な機能を有している。AMD に罹患すると、周辺部の視力は保持されるものの、視野中央部においてかすみ、暗点、歪みを生じる。進行すると文字が読めない、人の顔が認識できない、車の運転ができない等の問題を引き起こす。そのため、日常生活動作にも助けが必要となり、社会的孤立、自尊心や生活への満足感の低下、うつ病に罹患するリスクを伴う (10) ことから、本疾患は高齢患者にとって大きな精神的ダメ

キーワード: 核酸医薬品, アプタマー, 血管内皮増殖因子, 加齢黄斑変性, 脈絡膜新生血管

ファイザー株式会社¹⁾ 非臨床開発研究部, ²⁾ クリニカル・リサーチ統括部 (〒151-8589 東京都渋谷区代々木 3-22-7)

E-mail: Makoto.Nagaoka@pfizer.com 原稿受領日: 2009 年 4 月 7 日, 依頼原稿

Title: Application of aptamers to medicine: pharmacological profile and results of clinical trials on pegaptanib sodium (Macugen[®]) for age-related macular degeneration. Author: Makoto Nagaoka, Makoto Tahara, Etsuko Esaka, Masayo Oishi, Masami Nakane

図1 ペガプタニブナトリウムの構造

ージとなると考えられる。

AMDは黄斑に色素上皮および脈絡毛細血管板の萎縮病巣が形成される萎縮型と、CNVを伴う滲出型に分けられる。萎縮型AMDは滲出型AMDに比べて罹患する割合が高いが、視力予後は比較的良い。一方、滲出型AMDは、黄斑の網膜色素上皮細胞-Bruch膜-脈絡膜の変化により発生するCNVとその増殖変化を本態とする疾患で、脈絡膜から網膜色素上皮あるいは感覚網膜下にCNVが伸展し、出血や滲出性病変を生じる。CNVは未熟な血管網であり、滲出型AMDではCNVからの出血や脂肪を含んだ血漿成分の漏出が、神経網膜の機能を低下させる直接の原因であるといわれている(11)。そして最終的には萎縮瘢痕組織を形成し、高度の永続する視力低下を生じる(12, 13)。

欧米では滲出型AMDは高齢者の失明原因として主要な疾患であり(14, 15)、日本でも高齢者人口の増加に伴う本疾患の発症率の上昇から、年々医学的な重要性が高まっている(16)。

滲出型AMD患者のうち中心窩下にCNVを伴う患者では、これまで有効な治療法が非常に限られていた。レーザー光凝固療法は中心窩外における病変に有効な治療法であるが、中心窩下の病変に適用すると、中心暗点が生じ、視力低下を来す可能性が高いため実施することができない。中心窩下CNVに対する治療法として、ベルテポルフィンと低出力レーザーを組み合

わせた光線力学療法 (photodynamic therapy : PDT) が行われていた。PDTは、光感受性物質であるベルテポルフィンを静注後、熱変化を生じない程度の低出力レーザーをCNVに照射し、活性酸素の発生によりCNVの内皮細胞を障害させ、血栓による血管閉塞を起こし、CNVを退縮させる方法である。この方法はCNV周囲の網膜や脈絡膜に対する障害が抑えられるため、中心窩下CNVに対しても治療が可能である。しかしながら、PDTは中心窩下CNVを伴うAMDの3つの病変サブタイプ^{注1)}のうち、predominantly classicに対する有効性は検証されているが、minimally

図2 眼球の断面図

classic および occult with no classic では、病変部が大きい場合、臨床試験でプラセボとの差が認められていない(17)。また、CNV 病変部の大きさはレーザーの照射面積（乳頭面積）よりも小さい必要があり、照射部位は視神経乳頭から 200 μm 以上離れていなければならない等の病変部の大きさおよび位置に制約がある。さらに、PDT は 0.6 以上の視力良好例で治療後に急性視力低下を起こすことがあり、逆に 0.1 未満の低視力が長期続いた症例では視機能改善に限界があるため、適用となる患者の視力を 0.1 ～ 0.5 としている(18)。この他、PDT 施行後、患者は直射日光や強い光への暴露を避ける必要があり、外出などの日常生活が制限される。加えて、特定の波長(689 nm) のレーザーを照射できる専用機器の導入およびその維持・管理が必要である。すなわち、PDT は有効な治療法として期待されるものの、すべての患者に対して効果が期待できるわけではなく、また日常生活の制限および専用機器の導入等の負担があり、すべての滲出型 AMD に対して有効かつ安全に投与できる治療薬が求められていた。

ベガブタニブナトリウムは、眼内における病的血管新生に関与していると考えられている VEGF₁₆₅ に対して高い選択性で結合し、VEGF₁₆₅ の VEGF 受容体への結合を阻害する。したがって、ベガブタニブナトリウムの投与により、眼内あるいは全身における VEGF の正常な生理機能に影響を及ぼすことなく、VEGF の病的活性のみが阻害され、滲出型 AMD における視力低下が抑制されることが考えられ、滲出型 AMD に対してレーザー処置を伴わない新規作用機序を有する治療薬として期待される。以下、ベガブタニブナトリウムの薬理学的特徴、臨床試験成績、薬物動態について概説する。

2. 薬理学的特徴

1) 作用機序

VEGF 受容体である Flt-1 (VEGFR-1) および KDR (VEGFR-2) は内皮細胞表面に存在する。VEGF が VEGF 受容体に結合すると、受容体のチロシンキナーゼが活性化し、血管透過性の亢進および血管内皮細胞の増殖が誘発され、血管新生が行われる(19, 20)。また、もう 1 つの VEGF 受容体である NP-1 は、KDR の共受容体であり、VEGF が KDR に結合して起こるシグナル伝達を増強させる(21)。滲出型 AMD の病的血管

新生には VEGF が関与していると考えられている(22, 23)。VEGF には、複数のアイソフォームが存在する。各アイソフォームはアミノ酸の数で区別され、ヒトでの主要なアイソフォームは VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ および VEGF₂₀₆ である(24, 25)。VEGF アイソフォームの中で特に VEGF₁₆₅ は、眼内血管増殖疾患における病的血管新生に関与していることが報告されている(3, 26, 27)。ベガブタニブナトリウムは、VEGF₁₆₅ と選択的に高い親和性で結合し、かつ VEGF₁₂₁ と結合しないよう SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法を用いて最適化された合成オリゴヌクレオチドである。この選択性により、ベガブタニブナトリウムは VEGF₁₆₅ と結合を通じて VEGF₁₆₅ が Flt-1, KDR および NP-1 受容体に結合するのを阻害し、治療が必要な VEGF₁₆₅ が関与する病的血管新生に対して阻害作用を示す一方で、VEGF₁₂₁ が関与する正常な血管新生に対しては影響を及ぼさないことが期待される。

①非 PEG 化アプタマーの VEGF₁₆₅ に対する選択性

ベガブタニブナトリウムの非 PEG 化アプタマーの VEGF₁₆₅ に対する選択性を、結合試験により検討したところ、非 PEG 化アプタマーは、解離定数 49 ± 6 pmol/L (平均 $\pm$ 標準誤差) でヒト VEGF₁₆₅ と結合した。また、ヒト VEGF₁₆₅ のオーソログであるマウス VEGF₁₆₄ に対する親和性はヒト VEGF₁₆₅ に対する親和性と同程度であったが、ヒト VEGF₁₂₁ およびヒト胎盤増殖因子 (PlGF)₁₂₉ に対しては 100 nmol/L でも結合しなかった。

同様に、ヒト血小板由来増殖因子 (PDGF)-BB, ヒト VEGF₁₂₁, またはヒト VEGF 関連因子 (VEGF-B₁₆₇, VEGF-C, PlGF) との結合を調べたところ、非 PEG 化アプタマーはヒト血小板由来増殖因子 (PDGF)-BB に対して弱い親和性を示したが、ヒト VEGF₁₂₁ およびヒト VEGF 関連因子 (VEGF-B₁₆₇, VEGF-C, PlGF) には結合しなかった(図 3)。一方、非 PEG 化アプタマーとマウス VEGF アイソフォーム (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈) との結合を Far Western Blot 法で検討した結果、非 PEG 化アプタマーはヒト VEGF₁₈₉ のオーソログであるマウス VEGF₁₈₈ に対しても、ヒト VEGF₁₆₅ と比較して弱かったが親和性を示した(図 4)。

注 1) 病変サブタイプの分類: predominantly classic (classic CNV の割合: 50% 以上), minimally classic (classic CNV の割合: 1 ～ 49%), occult with no classic (classic CNV の割合: 0%)。ただし、これらの分類における classic CNV とは、フルオレセイン蛍光眼底造影 (fluorescein angiography: FA) 写真において認められる蛍光が明瞭な場合を示し、FA 写真において蛍光が不明瞭な場合は occult CNV と呼ぶ。

図3 各種増殖因子に対する非 PEG 化アプタマーの結合能

^{32}P -非PEG 化アプタマー (65×10^6 cpm/L) を、0.0169 ~ 1000 nmol/L (3 段階階希釈) のヒト血小板由来増殖因子 (PDGF)-BB, ヒト VEGF₁₂₁, またはヒト VEGF 関連因子 (VEGF-B₁₆₇, VEGF-C, PlGF) と 37°C で 1 時間インキュベートし、ニトロセルロース膜を用いたろ過により増殖因子と結合している ^{32}P -非PEG 化アプタマーのみを回収した後、その放射能を計測し解離定数を算出した。

② VEGF₁₆₅ の受容体との結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害

VEGF は、その受容体である Flt-1 および KDR と結合する (28)。VEGF の Flt-1 に対する親和性は、KDR と比較して高いが、KDR は VEGF と結合したとき、Flt-1 と比較して強いチロシンキナーゼ活性を示す (29)。VEGF が各受容体と結合すると自己リン酸化によりチロシンキナーゼを活性化させ、血管透過性の亢進および内皮細胞の分裂促進が誘発され、血管形成が行われる (19, 20, 28)。一方、NP-1 は、チロシンキナーゼ活性を持たない膜貫通型の VEGF 受容体であり、VEGF のエクソン 7 にコードされているヘパリン結合部位を介して VEGF₁₆₅ と結合するが、このヘパリン結合部位を持たない VEGF₁₂₁ とは結合しない (30)。NP-1 は、VEGF が KDR に結合して起こるシグナル伝達を増強すると考えられている。ヒト VEGF₁₆₅ のこれら受容体結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害作用を検討した。

② -1 無細胞系における VEGF の受容体結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害

VEGF₁₆₅ とその受容体 (Flt-1, KDR および NP-1) との結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害作用

図4 Far Western Blot 法による非 PEG 化アプタマーの VEGF アイソフォームの結合

非 PEG 化アプタマー 0.45 pmol とマウス VEGF アイソフォーム 0.5 μg (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈) との結合を Far Western Blot 法で検討した。

を、抗ヒト IgG 抗体および ^{125}I -VEGF₁₆₅ を用いた放射免疫測定法で検討した。ペガプタニブナトリウムは、VEGF₁₆₅ の Flt-1, KDR および NP-1 への結合を阻害し、その IC₅₀ 値は、Flt-1 に対して 0.47 nmol/L, KDR に対して 1.10 nmol/L, NP-1 に対して 0.23 nmol/L であった (表 1)。

② -2 細胞系における VEGF の受容体結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC) の細胞表面には Flt-1 および KDR が存在するため、VEGF₁₆₅ と HUVEC 細胞との結合に対するペガプタニブナトリウムの阻害作用を ^{125}I -VEGF₁₆₅ を用いた結合試験で検討した。ペガプタニブナトリウムは VEGF₁₆₅ の HUVEC への結合を濃度に応じて阻害し、その IC₅₀ 値は 0.03 ~ 1.41 nmol/L であった (表 1)。同様に、抗 VEGF モノクローナル抗体 (mAb) の IC₅₀ 値は、7.36 nmol/L であった。

③ VEGF 受容体機能に対するペガプタニブナトリウムの阻害

VEGF₁₆₅ によって惹起される HUVEC における VEGF 受容体機能に対するペガプタニブナトリウムの阻害作用を、細胞増殖、細胞内カルシウム動員および組織因子の mRNA 発現を指標に検討した。

③ -1 HUVEC の増殖

VEGF₁₆₅ 誘発 HUVEC 増殖に対するペガプタニブナトリウムの阻害作用を DNA への ^3H -チミジン取り込み量を指標に検討した。その結果、VEGF₁₆₅ は 10 ng/mL 以上で HUVEC の増殖を促進した。ペガプタ

表1 ベガブタニブナトリウムの VEGF に対する in vitro 阻害作用

試験系	標的受容体 / 細胞活性	化合物	IC ₅₀ (nmol/L)
VEGF ₁₆₅ の受容体結合に対する阻害作用	Flt-1 受容体	ベガブタニブナトリウム	0.47
	KDR 受容体	ベガブタニブナトリウム	1.10
	NP-1 受容体	ベガブタニブナトリウム	0.23
	HUVEC	ベガブタニブナトリウム	0.03 ~ 1.41*
VEGF ₁₆₅ による HUVEC の細胞活性に対する阻害作用	細胞増殖	ベガブタニブナトリウム	0.43 ~ 2.90*
		抗-VEGF mAb	0.07 ~ 0.11*
	カルシウム動員	ベガブタニブナトリウム	0.74 ~ 3.18*
		抗-VEGF mAb	2.66
	組織因子 mRNA 発現	ベガブタニブナトリウム	
		培地	0.39 ~ 0.64*
		50% ヒト血漿含有培地	0.53 ~ 1.38*

IC₅₀ = 50% 阻害濃度, *: 複数回実施した各試験で算出した IC₅₀ 値を範囲で示した.

無細胞系における VEGF の受容体結合に対するベガブタニブナトリウムの阻害作用: 放射免疫測定法で検討した. 0.001 ~ 2000 nmol/L (Flt-1 および NP-1) または 0.0005 ~ 1000 nmol/L (KDR) で 5 倍段階希釈したベガブタニブナトリウムおよび ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ (0.01 μCi) を, 37℃ (Flt-1 および KDR) または室温 (NP-1) で 15 ~ 20 分インキュベートした後, 抗ヒト IgG 抗体を介して受容体が固定化されたマイクロプレートに添加し, 37℃ (Flt-1 および KDR) または室温 (NP-1) で 2 ~ 3 時間インキュベートした後, 放射能を計測した.

細胞系における VEGF の受容体結合に対するベガブタニブナトリウムの阻害作用: ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ を用いた結合試験で検討した. マイクロプレート上で 24 ~ 48 時間培養した HUVEC に, 1 fmol/L ~ 1000 nmol/L (10 倍段階希釈) のベガブタニブナトリウムまたは抗 VEGF モノクローナル抗体 (mAb) および 10 ng/mL の ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ を加え, 室温で 1.5 時間インキュベートした後, 細胞を破碎し放射能を計測した.

VEGF₁₆₅ による HUVEC の細胞増殖に対する阻害作用: ³H-チミジン取り込み量を指標に検討した. マイクロプレート上で 20 ~ 24 時間培養した HUVEC に, 0.0001 ~ 1000 nmol/L (10 倍段階希釈) のベガブタニブナトリウムまたは 0.033 ~ 330 nmol/L (3 倍段階希釈) の抗 VEGF モノクローナル抗体 (mAb) および 10 ng/mL の VEGF₁₆₅ を加えインキュベートを行い, インキュベート終了の 24 ~ 30 時間前に ³H-チミジンを添加し, 計 48 ~ 50 時間インキュベートした後, 細胞を破碎し放射能を計測した.

VEGF₁₆₅ による HUVEC のカルシウム動員に対する阻害作用: HUVEC 内のカルシウム濃度を指標として検討した. Indo-1-AM で標識した HUVEC に, 0.3 ~ 30 nmol/L (3 倍段階希釈) のベガブタニブナトリウムまたは 0.1 ~ 30 nmol/L (3 倍段階希釈) の抗 VEGF モノクローナル抗体 (mAb) および 10 ng/mL の VEGF₁₆₅ を加えインキュベートを行い, 細胞内カルシウム濃度を測定した.

VEGF₁₆₅ による HUVEC の組織因子 mRNA 発現に対する阻害作用: RT-PCR 法を用いて検討した. マイクロプレート上で一昼夜培養した HUVEC にベガブタニブナトリウム (0.05, 0.35, 2.5, 12, 120, 840 nmol/L) および 12.5 ng/mL の VEGF₁₆₅ を加え, 37℃ で 1 時間インキュベートした後, 全 mRNA を抽出し RT-PCR 法により VEGF₁₆₅ 誘発組織因子の mRNA を定量した.

ニブナトリウムは VEGF₁₆₅ 誘発細胞増殖を濃度に応じて阻害し, その IC₅₀ 値は 0.43 ~ 2.90 nmol/L であった (表 1). 同様に, 抗 VEGF mAb の IC₅₀ 値は 0.07 ~ 0.11 nmol/L であった.

③ -2 カルシウム動員

VEGF が細胞増殖および血管透過性を誘発するとき, 細胞内へのカルシウム動員 (31, 32) が惹起される. そこで, VEGF に対するベガブタニブナトリウムの阻害作用を HUVEC 内のカルシウム濃度を指標として検討した. ベガブタニブナトリウムは VEGF₁₆₅ 誘発カルシウム動員を濃度に応じて阻害し, IC₅₀ 値は 0.74 ~ 3.18 nmol/L であった (表 1). 同様に, 抗 VEGF mAb の IC₅₀ 値は 2.66 nmol/L であった.

③ -3 血液凝固系組織因子 mRNA の発現

第 VII 因子と複合体を形成して血液凝固系の細胞内イニシエーターとなる組織因子 (33, 34) は, 眼内血管増殖疾患 (脈絡膜新生血管, 糖尿病性網膜症) および腫瘍における血管新生との関連性が報告されている (35, 36). VEGF₁₆₅ は HUVEC における組織因子を発現させることから, VEGF₁₆₅ に対するベガブタニブ

ナトリウムの阻害作用を, 組織因子の mRNA 発現量を指標として RT-PCR 法を用いて検討した. ベガブタニブナトリウムは HUVEC における VEGF₁₆₅ 誘発組織因子 mRNA の発現を濃度に応じて阻害し, IC₅₀ 値は 0.39 ~ 0.64 nmol/L であった (表 1).

④ In vivo におけるベガブタニブナトリウムの作用

④ -1 マウス未熟児網膜症モデル

低酸素条件により作製されるマウス未熟児網膜症モデルでは, 網膜で VEGF の発現が増加して血管新生が誘発される (37, 38). この血管新生は, VEGF 中和タンパクおよび VEGF に対するアンチセンス DNA によって阻害される (39, 40). そこで, 本モデルにおける網膜血管新生に対するベガブタニブナトリウムの阻害作用を検討した. その結果, ベガブタニブナトリウムは用量に応じて網膜血管新生を阻害し, ED₅₀ 値は 3.70 mg/kg, IC₅₀ 値は 0.21 nmol/L であった (表 2).

④ -2 マウス角膜血管新生モデル

マウスの角膜を水酸化ナトリウム処理後に角膜上皮を切除することで血管新生を惹起させ, 角膜血管新生モデルを作製した. ベガブタニブナトリウムは用量に

表2 ペガブタニブナトリウムの VEGF に対する in vivo 阻害作用

試験系	投与方法 (期間)	結果
マウス未熟児網膜症モデルに対する血管新生阻害作用	0.625, 1.25, 2.5, 5, 25 mg/kg (1日1回5日間腹腔内投与)	ED ₅₀ = 3.70 (3.53 ~ 3.88)* mg/kg IC ₅₀ = 0.21 (0.06 ~ 0.68)* nmol/L
マウス角膜血管新生モデルに対する血管新生阻害作用	5, 10, 50, 100, 200 mg/kg (1日2回10日間腹腔内投与)	ED ₅₀ = 22.50 (12.11 ~ 41.85)* mg/kg IC ₅₀ = 0.59 (0.004 ~ 98.3)* nmol/L
モルモット皮膚血管漏出モデルに対する血管透過性阻害作用	ペガブタニブナトリウム: 10, 30, 100, 300, 1000 nmol/L 非 PEG 化アプタマー: 100, 1000 nmol/L	ペガブタニブナトリウムは, 100 nmol/L 以上で血管漏出をほぼ完全に阻害。ペガブタニブナトリウムの阻害作用は, 非 PEG 化アプタマーと比較して強い。

ED₅₀ = 50% 有効用量, IC₅₀ = 50% 阻害を示す組織内濃度, *: 95% 信頼区間

マウス未熟児網膜症モデルに対する血管新生阻害作用: 7日齢のマウスを5日間高酸素状態に置き, その後正常な酸素状態に戻し低酸素状態とすることで作製し, ペガブタニブナトリウム (0.625, 1.25, 2.5, 5 および 25 mg/kg) またはリン酸緩衝生理食塩液 (PBS, 溶媒) を1日1回5日間腹腔内投与した。網膜血管新生は, 内境界膜から硝子体に伸びる上皮細胞の核数に基づいて測定し, 各投与群での眼内ペガブタニブナトリウム濃度を測定した。これらの値から 50% 有効用量 (ED₅₀) および 50% 阻害を示す眼内濃度 (IC₅₀) を算出した。

マウス角膜血管新生モデルに対する血管新生阻害作用: マウスの角膜を水酸化ナトリウム処理後に角膜上皮を切除することで血管新生を惹起させ, 角膜血管新生モデルを作製した。角膜上皮を切除した日からペガブタニブナトリウム (5, 10, 50, 100 および 200 mg/kg) または PBS (溶媒) を1日2回10日間腹腔内投与した。角膜血管新生は抗 PECAM-1 抗体を用いて検出し, 各投与群での角膜内ペガブタニブ濃度を測定した。これらの値から ED₅₀ および IC₅₀ を算出した。

モルモット皮膚血管漏出モデルに対する血管透過性阻害作用: モルモットにエバンスブルーを静脈内投与した後, モルモットの背部および側部に VEGF₁₆₅ (20 nmol/L) およびペガブタニブ (10, 30, 100, 300 および 1000 nmol/L) または非 PEG 化アプタマー (100 および 1000 nmol/L) の混合液 (40 μL) を皮内投与した。その後, 皮内投与部位におけるアルブミン-エバンスブルー複合体の血管外漏出量を測定した。

応じてこの角膜血管新生を阻害し, ED₅₀ 値は 22.50 mg/kg, IC₅₀ 値は 0.59 nmol/L であった (表2)。

④ -3 モルモット皮膚血管漏出モデル

モルモットに VEGF を皮内投与し血管漏出モデルを作製し, 皮膚の血管透過性亢進に対するペガブタニブナトリウムおよびその非 PEG 化アプタマーの阻害作用を検討した。ペガブタニブナトリウムは, 10 および 30 nmol/L で VEGF₁₆₅ 誘発血管漏出をほとんど阻害しなかったが, 100, 300 および 1000 nmol/L で血管漏出をほぼ完全に阻害し, この作用は抗 VEGF mAb を 1000 nmol/L 投与したときと同程度であった (表2)。これに対して, 非 PEG 化アプタマーの血管漏出に対する阻害作用は, PEG 化されたペガブタニブナトリウムと比較して弱かった。

3. 臨床試験成績

AMD の臨床試験における有効性の主要評価項目は視力であるが, 視力の測定には通常, 米国の大規模臨床試験 Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) のために開発された ETDRS 視力表が用いられている。ETDRS 視力表は, 図5に示すように, 各段ごとの文字の縮小率が対数で等間隔になっており, 統計処理に適している。また, 視力を文字数で評価するため検査間, 検者間のバラツキが減少し, 視力の統計処理が容易になると考えられている(41)。

ペガブタニブナトリウムは硝子体内注射により投与される。硝子体内注射は図6に示すように, 結膜 (白眼の表面) から眼球内の硝子体 (図2参照) に直接注射する方法で, 本剤で初めて厚生労働省から承認され

た投与経路である。

海外の主要臨床試験では, 本剤 0.3 mg, 1 mg または 3 mg を6週ごとに9回硝子体内注射し, Sham 注射 (針を付けない注射器を使った偽注射) を実施した Sham 群を対照として, 二重盲検下で最終投与後6週間まで計54週間 (約1年間), 視力の推移を検討した。その結果, 本剤投与群では対照群に比べて視力低下の抑制がみられ (図7), 54週間後の視力変化は 0.3 mg 群で -8.0 文字, 1 mg 群で -7.3 文字, 3 mg 群で -9.8 文字で, 対照群の -15.0 文字と比べて有意 (0.3 mg 群および 1 mg 群: $P < 0.0001$, 3 mg 群: $P = 0.0017$)

図5 ETDRS 視力表

(Precision Vision 社のホームページより転載 (42))

図6 硝子体内注射

であった。0.3 mg から 3 mg では用量と有効性の関係はプラトーに達していると推測され、臨床推奨用量は最小用量である 0.3 mg となった。なお、病変サブタイプまたは病変サイズ、投与開始時の視力などを問わず、本剤はすべての被験者において有効であった。

国内では、Sham 群は設定せず、本剤 0.3 mg または 1 mg を海外と同様に 6 週ごとに 9 回硝子体内注射し、二重盲検下で 54 週間（約 1 年間）、視力の推移を検討した。その結果、0.3 mg 投与群および 1 mg 投与群の視力低下は軽微であり（図 8）、54 週間後の視力変化は 0.3 mg 群で -3.8 文字、1 mg 群で -4.3 文字と、海外の主要臨床試験と比べて同等以上の成績であった。海外と同様、明らかな用量相関性はみられず、国内においても臨床推奨用量は最小用量である 0.3 mg となった。

副作用は、海外の主要臨床試験では 0.3 mg 群 27%

Gragoudas ES, et al. N Engl J Med. 2004;351:2805-2816

Copyright © 2004 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Translated with permission.

図7 海外の主要臨床試験における視力の平均変化

図8 国内臨床試験における視力の平均変化

(79/295 例), 1 mg 群 30%(90/301 例), 3 mg 群 33%(98/296 例), Sham 群 19%(57/298 例) にみられ, その主なものは硝子体混濁, 硝子体浮遊物, 視力低下であった. 国内臨床試験では 0.3 mg 群 32%(15/47 例), 1 mg 群 27%(13/48 例) にみられ, 主な副作用は角膜浮腫, 前房の炎症, 飛蚊症, 硝子体混濁であった. 国内外とも発現率は同程度であり, 用量による明らかな増加はみられなかった.

副作用の他に硝子体注射に起因する有害事象が, 海外の主要臨床試験では 0.3 mg 群 80%(236/295 例), 1 mg 群 77%(233/301 例), 3 mg 群 80%(238/296 例), Sham 群 66%(196/298 例) にみられ, その主なものは眼痛, 点状角膜炎, 硝子体浮遊物であった. 国内臨床試験では 0.3 mg 群 87%(41/47 例), 1 mg 群 88%(42/48 例) にみられ, その主なものは結膜出血, 点状角膜炎, 表層角膜炎であった.

硝子体注射に伴う有害事象の頻度は高かったが, その多くは軽度または中等度であり, 国内外とも被験者の約 90% は 1 年間に硝子体注射を 8~9 回 (規定は 9 回) 受けており, 忍容性は良好であった.

4. 薬物動態

国内臨床試験において, 本剤を硝子体内注射した患者から採血し, 薬物動態を検討した. 血漿中ペガプタニブ濃度は, 初回投与後 7 日以内に最高血漿中濃度 (C_{max}) に到達し, $t_{1/2}$ は 0.3 および 1 mg とともに約 10 日であった. 初回投与後の C_{max} および初回投与後次の投与時までの AUC (AUC_T) はそれぞれ, 0.3 mg で 11.96 ng/mL および $2.51 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, 1 mg で 37.21 ng/mL および $8.56 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ であり, 投与量

に比例して増加した. 反復投与時の各投与直前のトラフ値は 0.3 mg 群ではほとんどの被験者で定量限界未満 (定量限界 0.5 ng/mL) であったが, 1 mg 群では平均値は一定の値 (約 1.5 ng/mL) を示した (図 9). 1 mg 群でも初回投与の結果から予想された蓄積係数 (R) 1.06 倍 (見かけの消失半減期を 10 日, 投与間隔を 6 週間として算出) を超える累積は確認されなかった.

サルに本剤を静脈内投与したときの血漿中ペガプタニブ濃度の消失半減期は 9.3 時間であったが, 硝子体内投与したときの消失半減期は 94 時間と延長した (43, 44). このことから, 硝子体内投与後の体内からの消失の律速過程は, 硝子体から血漿への移行であると考えられ, フリップ・フロップ (吸収部位から血漿への移行速度が真の消失速度と比較して遅い場合, 見かけの終末相より得られる消失速度が, 真の消失速度ではなく吸収部位から血漿への移行速度を示すこと) が起こっていると考えられる. ヒトにおいて, 静脈内投与は行われていないが, 硝子体内投与後の血漿中からの消失が緩慢であり, ヒトにおいてもフリップ・フロップが起こっていると考えられる. 本剤の硝子体内での滞留時間の延長には, 血小板増殖因子に特異的なアプタマーの場合と同様 (45), アプタマーの PEG 化が寄与していると考えられる.

ペガプタニブはヒト血漿タンパクとほとんど結合せず, ヒト血漿において内因性の核酸と同様にエンドおよびエキソヌクレアーゼで代謝される (46). ペガプタニブのヒトにおける排泄は検討されていないが, ウサギを用いた検討から, ペガプタニブの主たる排泄経路は尿中であることが示されている (46).

図 9 日本人滲出型 AMD 患者にペガプタニブナトリウム 0.3 および 1 mg を 6 週ごと 9 回 (48 週まで) 反復片眼硝子体内投与したときの平均血漿中ペガプタニブ濃度推移

42 日目までは初回投与後の血漿中濃度推移, 84 日目以降は反復投与時の投与直前値, 投与量はペガプタニブのオリゴヌクレオチドの量として示す.

このように、本剤を硝子体内投与したとき、硝子体から全身循環への移行は緩慢であり、硝子体内濃度が長時間に渡り高濃度で維持されるのに対し、全身循環へ移行後は速やかに代謝され、血漿中濃度は硝子体内濃度と比較し低濃度である。VEGF₁₆₅に対する高い選択性に加え、この薬物動態プロファイルも、全身性副作用がほとんど認められないという本剤の安全性プロファイルに寄与していると考えられる。

5. おわりに

滲出型 AMD は欧米では高齢者の失明原因として主要な疾患であり、日本でも高齢者人口の増加に伴う本疾患の発症率の上昇から、年々医学的な重要性が高まっている。レーザー光凝固療法や PDT は、一部の滲出型 AMD に対しては有効であるものの、日常生活の制限および専用機器の導入等の負担があり、すべての滲出型 AMD に対して有効かつ安全に投与できる治療薬が求められていた。ベガブタニブナトリウムは、眼内における病的血管新生に関与している VEGF₁₆₅ に対し高い選択性を有する VEGF 阻害薬であり、*in vitro* および *in vivo* 試験において VEGF 阻害作用を示すと同時に、国内外での臨床試験の結果、有意な視力低下抑制作用が確認され、病変サブタイプまたは病変サイズ、投与開始時の視力などを問わず、本剤はすべての被験者において有効であった。

ベガブタニブナトリウムはアブタマー製剤であり、学術的にも重要な基盤技術が実用化されたという点で非常に意義深い。また、本剤は本邦初の核酸医薬品でもあり、そのプロファイル、特に薬物動態および安全性のプロファイルは、今後の核酸医薬品の開発・承認プロセスに極めて有用な情報を提供する。

以上のように、ベガブタニブナトリウムは滲出型 AMD に対する新規作用機序を有する治療薬として画期的であると同時に、核酸医薬品として先駆的な役割を担うものとして期待される。

文 献

- 1) Aiello LP, et al. Arch Ophthalmol. 1995;113:1538-1544.
- 2) Manley PW, et al. Expert Opin Investig Drugs. 2002;11:1715-1736.
- 3) Usui T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:368-374.
- 4) Ishida S, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:2155-2162.
- 5) Kliffen M, et al. Br J Ophthalmol. 1997;81:154-162.
- 6) Kvant A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37:1929-1934.
- 7) Lip P-L, et al. Ophthalmology. 2001;108:705-710.
- 8) Lopez PF, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37:855-868.
- 9) Wells JA, et al. Br J Ophthalmol. 1996;80:363-366.
- 10) Williams RA, et al. Arch Ophthalmol. 1998;116:514-520.
- 11) 石田晋, 他. 眼科. 2006;48:187-192.
- 12) 川村昭之, 他. あたらしい眼科. 2005;22:613-620.
- 13) Green WR, et al. Ophthalmology. 1993;100:1519-1535.
- 14) Munoz B, et al. Arch Ophthalmol. 2000;118:819-825.
- 15) Congdon NG, et al. JAMA. 2003;290:2057-2060.
- 16) 中江公裕, 他. 医学のあゆみ. 2008;225:691-693.
- 17) (財)日本医薬品情報センター編. 医療用医薬品集. JAPIC. 2007:2218-2221.
- 18) 高橋寛二. あたらしい眼科. 2005;22:621-629.
- 19) Sato Y, et al. Ann NY Acad Sci. 2000;902:201-207.
- 20) Cross MJ, et al. Trends Biochem Sci. 2003;28:488-494.
- 21) Zachary I, et al. Cardiovasc Res. 2001;49:568-581.
- 22) Kvant A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37:1929-1934.
- 23) Krzystolik MG, et al. Arch Ophthalmol. 2002;120:338-346.
- 24) Tischer E, et al. J Biol Chem. 1991;266:11947-11954.
- 25) Robinson CJ, et al. J Cell Sci. 2001;114:853-865.
- 26) Ishida S, et al. J Exp Med. 2003;198:483-489.
- 27) Spilsbury K, et al. Am J Pathol. 2000;157:135-144.
- 28) Tolentino MJ, et al. Ophthalmology. 1996;103:1820-1828.
- 29) Waltenberger J, et al. J Biol Chem. 1994;269:26988-26995.
- 30) Zachary I, et al. Cardiovasc Res. 2001;49:568-581.
- 31) Bates DO, et al. Am J Physiol. 1997;273:H687-H694.
- 32) Mukhopadhyay D, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1996;229:733-738.
- 33) Viles-Gonzalez JF, et al. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:25-30.
- 34) Morrissey JH. Thromb Haemost. 2001;86:66-74.
- 35) Grossniklaus HE, et al. Mol Vis. 2002;8:119-126.
- 36) Ishibashi T. J Jpn Ophthalmol Soc. 1999;103:923-947.
- 37) Smith LEH, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:101-111.
- 38) Aiello LP, et al. Arch Ophthalmol. 1995;113:1538-1544.
- 39) Aiello LP, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:10457-10461.
- 40) Robinson GS, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:4851-4856.
- 41) 前田直之. 神経眼科. 2001;18:272-276.
- 42) http://www.precision-vision.com/index.cfm/product/43_40/4-me-ter-original-series-etdrs-chart-r.cfm (accessed: 2009.2.23)
- 43) Tucker CE, et al. J Chromatogr Biomed Appl. 1999;732:203-212.
- 44) Drolet DW, et al. Pharm Res. 2000;17:1503-1510.
- 45) Akiyama H, et al. J Cell Physiol. 2006;207:407-412.
- 46) マクジェン添付文書: <http://products.pfizer.co.jp/documents/lpd/mac011pd.pdf>.