

mRNA製品の品質・安全性評価について
Quality and safety issues on mRNA medicinal
products

金沢工業大学／日本薬科大学

山口照英

国立医薬品食品衛生研究所

内田恵理子

mRNA医薬品

- mRNA医薬品 (*in vivo*投与)
 - タンパク質—過性発現／ワクチン／がんワクチン
mRNA単独投与 vs. DDS
- Ex vivo mRNA導入細胞
 - がんワクチン(樹状細胞)
 - 再生医療等製品(分化/増殖誘導、血管新生等)
- ゲノム編集
 - CRISPR/CAS9
 - *in vivo* vs. *in vitro*

再生医療製品

遺伝子治療製品

mRNA医薬品（タンパク質一過性発現）

*in vivo*投与による一過性タンパク質発現による疾患治療

- Vasopressin-mRNA尿崩壊（多尿症）
- Erythropoietin-mRNA（貧血）
- VEGFA-mRNA（心筋梗塞における血管新生）
- 間葉系幹細胞でのNotch発現による神経細胞誘導

特徴：遺伝子治療と比較して迅速なタンパク質発現が可能。
容易に多様なmRNA候補品をデザインすることが可能
／プロモータ等による発現制御ができない

再生医療等製品

ex-vivo 投与

- 樹状細胞へのIL-4 mRNA投与（自己免疫性糖尿病）
- PBリンパ球へのCAR mRNA投与（白血病）

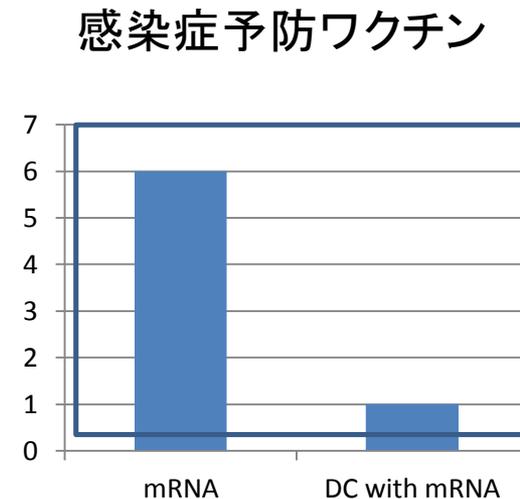
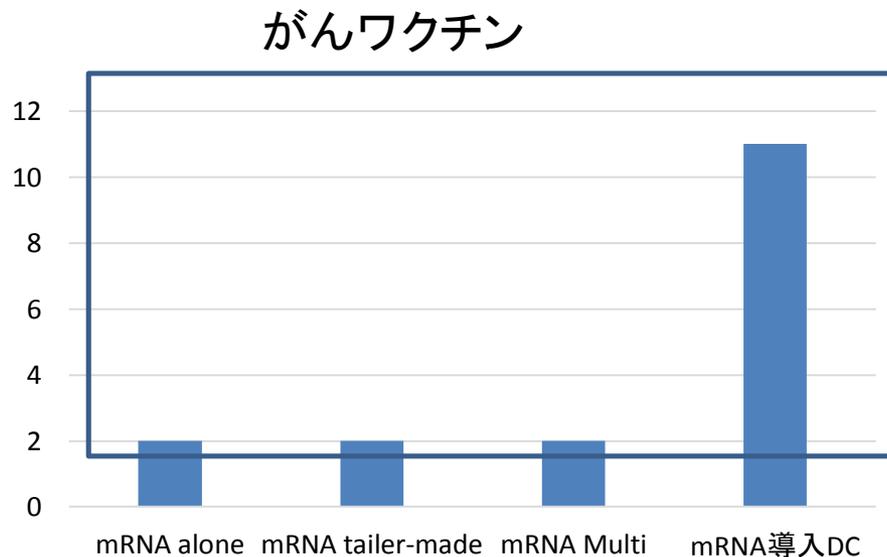
mRNA製品の投与

- 投与形態
 - mRNA単独投与
 - mRNA + Protein
(protamine)
 - mRNA + PEI
 - mRNA + Liposome
- 局所投与(投与部位)
 - 皮内
 - 皮下
 - 筋肉内
 - リンパ節
- 全身投与(静脈内)

■ mRNAの細胞内への取込を促進する製剤化が実施されている

mRNAワクチンを用いた臨床プロトコール数(NIH Clinical-Trials)

- 多くのがんワクチン臨床試験は抗原提示細胞への導入による*ex-vivo*細胞療法
- 一方、感染症予防ワクチンはmRNAの*in vivo*直接投与
- がんワクチンでは*in vivo*でも*ex vivo*でも複数のmRNAを用いた多抗原刺激によるがん免疫誘導を目指した臨床試験が実施されている



- Multi-target mRNAが使用される場合には、品質特性解析等によりどのような発現制御がなされているのかの評価が必要(確認試験や力価設定)

mRNA 感染症予防ワクチン

- mRNAの*in vivo*投与が主
- 液性免疫と細胞性免疫の両方を刺激
- PDマーカー
 - 液性免疫
 - 中和抗体産生試験(血清中の中和抗体量)
 - 細胞性免疫
 - 抗原特異的CD4+及びCD8+T細胞反応
 - IFN- γ 産生CD4+細胞
- *in vivo*評価法
 - チャレンジ試験(フェレット等を用いた高病原性インフルエンザウイルスの感染防御能の測定)

mRNAがんワクチン

- 多くが*ex vivo*細胞治療として実施
- 樹状細胞(DC)へmRNAを導入することにより、標的抗原の提示
- 液性免疫と細胞性免疫の両方を刺激
 - 液性免疫
 - 代替マーカーとしての抗体産生
 - 細胞性免疫
 - 抗原特異的CD4+及びCD8+T細胞反応
 - IFN- γ 産生CD4+細胞
 - テトラマーアッセイ

複数のmRNAを用いる製品

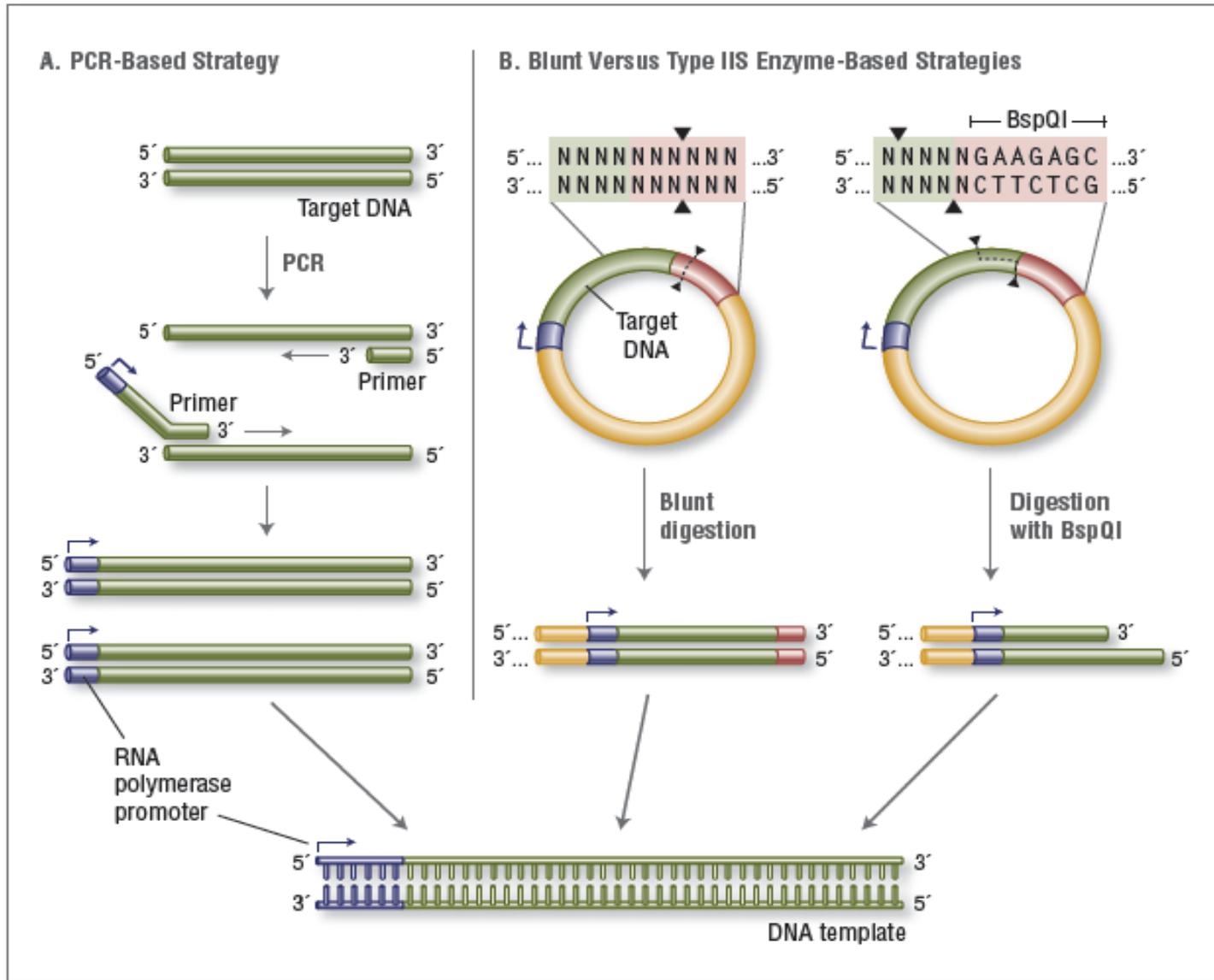
A、B、C、D、EのmRNAの混合

- 特性解析：
 - 物理化学的解析
 - A～EのmRNAの構成比(電気泳動、qRT-PCR)
 - 生物活性
 - 各mRNAが設計通りの発現をしていること
 - 抗体誘導活性
- 規格試験：
 - 各構成mRNAの確認試験、含量設定

ターゲット分子	分子量
• Melan-A	20-24kDa
• MAGE-A3	48kDa
• MAGE-A1	46kDa
• Survivin	16kDa
• GP100	70kDa
• Tyrosinase	70-84kDa
• GM-CSF	17kDa

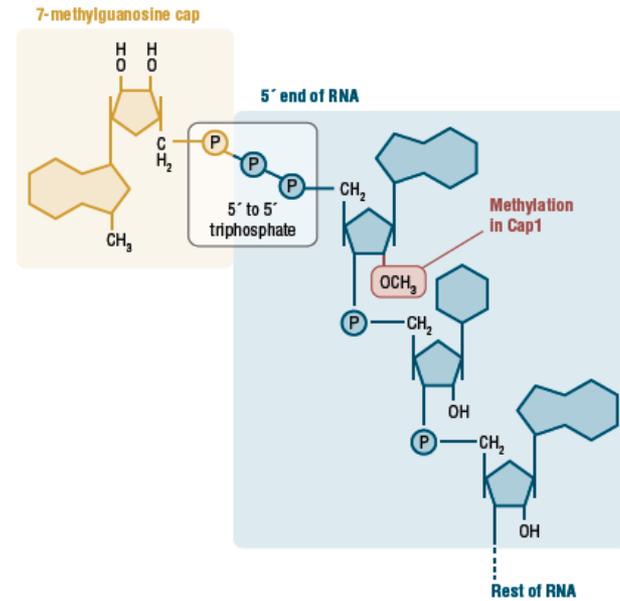
mRNAの製造方法

- mRNA医薬品の生産に関していくつかの製法が利用されている
- 製法に依存して評価すべき品質特性項目や管理項目が異なってくる



mRNA医薬品の製造

- mRNAの構造設計
 - CAP構造
 - 3'-UTRs構造
 - コドンの最適化
 - ポリA Tail
- *in vitro*転写システムによる製造
- Template
 - 直鎖プラスミド
 - PCR Product
- mRNA合成酵素
 - T7 RNAポリメラーゼ
 - SP6 RNAポリメラーゼ



New England Bio-Labs

- 工程由来不純物
 - 酵素や修飾核酸原料
- 目的関連物質＋目的関連不純物
 - ポリAの長さの違い

mRNA医薬品及びmRNAを利用した細胞製品の 特性解析と規格

mRNA医薬品

- 特性解析試験
 - 物理化学的
 - Agarose 電気泳動
 - 配列解析
 - 生物活性
 - 目的タンパク質の生産性
 - 抗体誘導活性(ワクチン)
- 規格試験
 - 確認試験
 - 示性値
 - 純度試験
 - 感染因子
 - 含量試験
 - 生物活性

感染予防ワクチン／がんワクチン、
たんぱく質の一過性発現等

mRNAで加工した細胞製品

- 特性解析試験
 - 目的タンパク質の発現
 - 細胞特性(膜抗原)
 - 生物活性
 - クロスプレゼンテーション
- 規格試験
 - 確認試験
 - 純度試験(目的外細胞)
 - 感染因子
 - 生細胞数
 - 含量試験(目的細胞含量)
 - 生物活性(抗原提示)

がんワクチン等

mRNA医薬品及びmRNAを利用した細胞製品の特性解析と規格

mRNA医薬品

- 特性解析試験
 - 物理化学的
 - Agarose 電気泳動
 - 配列解析
 - 生物活性
 - 目的タンパク質の生産性
 - 抗体誘導活性(ワクチン)
- 規格試験
 - 確認試験
 - 示性値
 - 純度試験
 - 感染因子
 - 含量試験
 - 生物活性

mRNAで加工した細胞製品

- 特性解析試験
 - 目的タンパク質の発現
 - 細胞特性(膜抗原)
 - 生物活性
 - クロマトグラフィー
- 規格試験
 - 確認試験
 - 純度試験
 - 感染因子
 - 生細胞数
 - 含量試験(目的細胞含量)
 - 生物活性(抗原提示)

mRNAは細胞加工のためのMaterial. 製品は細胞. 用いるmRNAについて詳細な品質特性解析が必要では

感染予防ワクチン／がんワクチン、
たんぱく質の一過性発現等

がんワクチン等

どのような品質管理が必要か？（荒戸先生の課題への提案）

品質の試験（出荷試験）：核酸医薬品⇔mRNA医薬品⇔遺伝子治療

	核酸医薬品（原薬）	mRNA医薬品	遺伝子治療（プラスミドの場合）
修飾の有無	非修飾、修飾	非修飾・修飾（CAPなど）	非修飾（天然）
参考となる指針・事例など	ヌシネルセン審査報告書		遺伝子治療用製品の品質及び安全性の確保に関する指針 改訂案
性状	○	○	○
確認試験	MS、液クロ、LC-MS	電気泳動、RT-PCR	制限酵素マップ、塩基配列、サイズ等
カウンターイオン	○	—	—
純度試験	<ul style="list-style-type: none"> ・オリゴヌクレオチド類縁物質 ・残留溶媒 ・元素不純物 	<ul style="list-style-type: none"> ・目的物由来不純物 + 目的物質関連物質（類縁物質） ・工程由来不純物 	<ul style="list-style-type: none"> ・目的物由来不純物（OC体、LN体） ・宿主由来タンパク質、DNA、RNA ・工程由来不純物（培地成分、添加物、溶菌剤、溶媒等）
エンドトキシン	○	○	○
感染性因子	微生物限度	微生物限度（工程）	微生物限度（工程）
定量法（含量）	LC-MS	RNA含量等	DNA含量（260nm吸光度）等
生物学的活性試験	—	In vitro発現試験	生物活性（遺伝子発現、タンパク質機能等）
その他			プラスミド均一性試験



非臨床試験

- Biodistribution (血中動態や排出は不要)
- 薬理試験
- 安全性薬理試験
- 一般毒性試験 (単回／反復投与毒性試験)
- 遺伝毒性試験
- 生殖発生毒性試験
- がん原性試験
- 免疫毒性試験

非臨床試験

核酸医薬品 (化学合成医薬品)	mRNA医薬品	遺伝子治療製品 (プラスミド)
ADME	Biodistribution	Biodistribution
POC(有効性)検証・ 効果効能裏付試験	POC(有効性)検証・ 効果効能裏付試験	POC(有効性)検証・ 効果効能裏付試験
一般毒性試験	一般毒性試験	一般毒性試験
遺伝毒性試験	遺伝毒性試験	
生殖発生毒性試験	生殖発生毒性試験	生殖細胞の染色体への組 込みリスクの評価
がん原性試験	がん原性試験	
(免疫毒性試験)	(免疫毒性試験)	

Biodistribution (BD)

- mRNAの*in vivo*投与後の動物で体内分布の解析：
目的及び目的外の細胞/組織への分布とその持続性の解析
- 主な検出手法
 - qRT PCR、TMA、DNA-branch法などの核酸増幅法 (NAT)、タンパク質発現 (IHCなど)
- 目的
 - mRNAの体内分布とその持続性から薬理学的効果を評価
 - 目的外細胞/組織への分布は安全性データの解釈に利用
 - 持続性がない場合、毒性試験の省略や簡略化を検討

mRNA医薬品の非臨床安全性評価

- mRNA医薬品：細胞/組織内でタンパク質発現により薬理作用を示す
 - 天然型mRNA
 - 通常のmRNAと同様の作用によりタンパク質発現
 - 発現したタンパク質は ICH S6 (バイオテクノロジー応用医薬品の安全性ガイドライン) に沿ってオンターゲット毒性を評価
 - 非天然型mRNA
 - 細胞内で通常のmRNAと同様の作用によりタンパク質発現
 - 新規性の高い修飾の場合、ICH M3ガイドラインに沿って、新規化学物質として安全性を評価
 - DDS(リポソーム等)を用いる場合
 - 新規性等を考慮してICH M3ガイドラインの適用を考慮

安全性薬理試験

- コアバッテリー臓器（心血管系、呼吸系および中枢神経系）への影響を評価
 - 天然型mRNA
 - 発現するタンパク質に注目して、ICH S6ガイドライン沿って評価（一般毒性試験の中で評価可能）
 - hERG試験は、通常必須ではない
 - 非天然型mRNA
 - 発現するタンパク質に注目して、天然型と同様に評価
 - 新規性の高い修飾の場合、ICH S7A及びS7B（安全性薬理試験ガイドライン）に沿って、新規化学物質として安全性を評価
- 安全性薬理試験の評価にあたっては、臨床試験での用法・用量を踏まえて検討することが必要

免疫毒性

- 反復投与毒性試験等で、意図しない免疫毒性が示唆された場合、免疫毒性試験の実施を考慮する
- mRNAに対するTRL活性化の可能性がある
 - 既存情報を活用して、TLR活性化の有無について構造をデザイン

例

- 感染症予防ワクチン・がんワクチン: TLR活性化 あり
- ワクチン以外: TLR活性化 なし

他の非臨床安全性試験

- 遺伝毒性試験
 - 天然型
 - 不要
 - 非天然型
 - 新規性の高い修飾の場合、ICH M2(遺伝毒性試験ガイドライン)に沿って評価
- 生殖発生毒性
 - ヒトで全身性の曝露リスクがある場合には試験実施を検討
 - 天然型
 - 非天然型
 - ICH S5(生殖発生毒性試験ガイドライン)に沿って評価
- がん原性試験
 - ヒトで長期曝露リスクがある場合には試験実施を検討
 - 天然型
 - ICH S6ガイドラインを踏まえて、原則として不要
 - 非天然型
 - 新規性の高い修飾の場合、ICH S1(がん原性試験ガイドライン)に沿って実施

どのような安全確認が必要か？（荒戸先生の宿題への回答案）

非臨床安全性試験：核酸医薬品⇔mRNA医薬品⇔遺伝子治療

	核酸医薬品	mRNA医薬品		遺伝子治療(プラスミド)
修飾の有無	非修飾 修飾	非修飾	修飾(CAPなど)	非修飾
参考となる指針など	ICH S6対応研究班による医薬品医療機器RS誌への投稿論文	ICH S6	ICH S6+M3	遺伝子治療用製品の品質及び安全性の確保に関する指針(改正案)
毒性評価の考え方	<ul style="list-style-type: none"> ・オンターゲット毒性 ・狭義のオフターゲット毒性 ・広義のオフターゲット毒性(クラスエフェクト:自然免疫活性化など) 	<ul style="list-style-type: none"> ・発現タンパク質の毒性 	<ul style="list-style-type: none"> ・発現タンパク質の毒性 + ・修飾核酸やその代謝産物の毒性 	<ul style="list-style-type: none"> ・ベクターによる毒性 ・発現タンパク質による毒性(免疫原性など)
一般毒性試験	動物種:2種	適切であれば1種で	2種	1種で十分な場合がある
遺伝毒性試験	○	—	○	—
生殖発生毒性試験	○	△	△	△
がん原性試験	○	—	△	遺伝子組込み評価
安全性薬理試験	○	—	○	—
その他	サロゲートの利用	相同遺伝子の利用		相同遺伝子の利用



*ex-vivo*でmRNAを導入した細胞

- mRNA
 - 細胞製造における重要な原材料として評価
 - mRNA単独での非臨床安全性評価は原則不要
- 導入したmRNAの発現産物
 - 安全性上の懸念があれば、ICH S6ガイドラインに沿って、毒性試験を検討
- *ex-vivo*でmRNAを導入した細胞
 - 最終製品を細胞加工製品として安全性評価

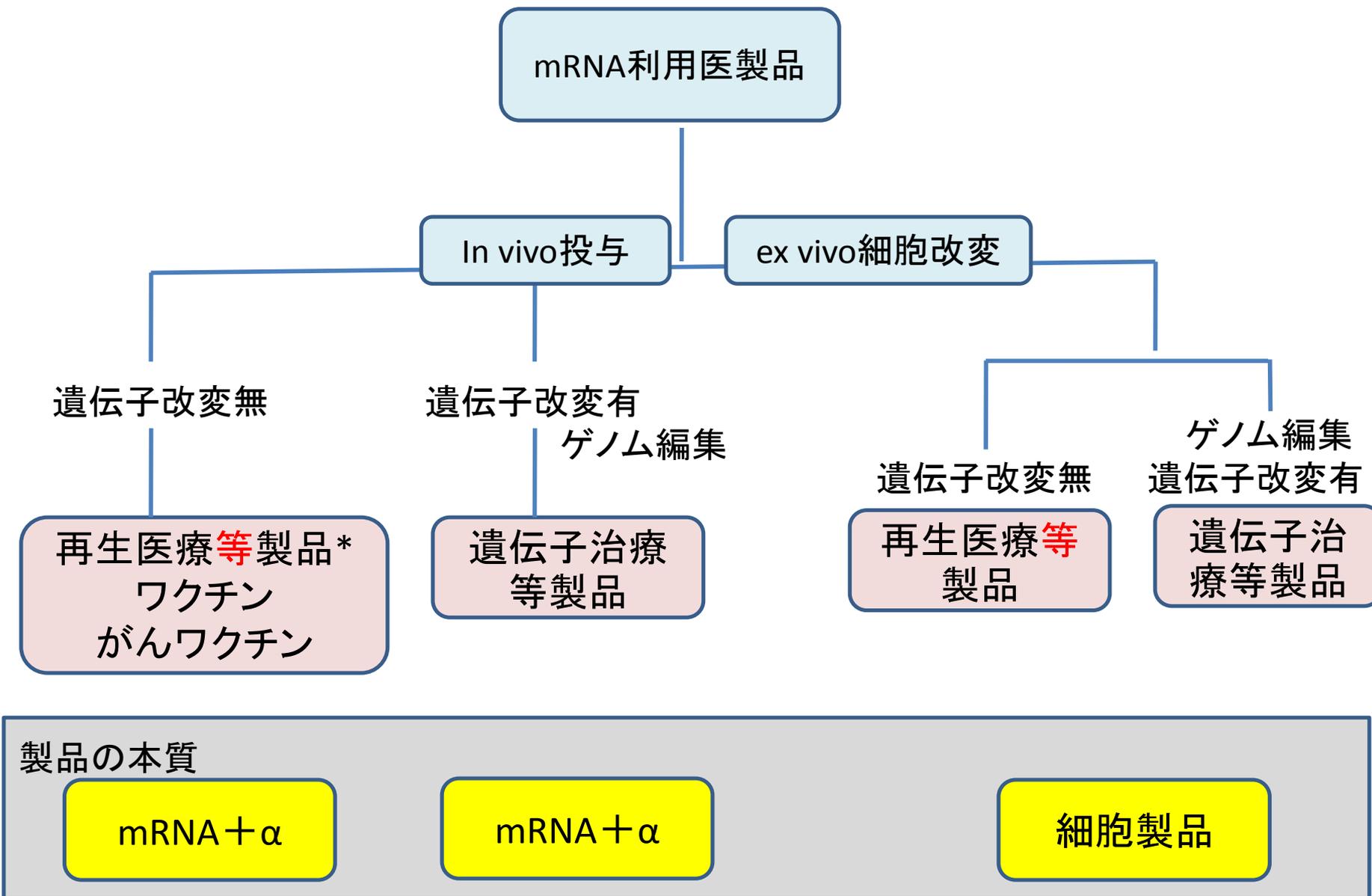
まとめ

- 特徴
 - 一過性のタンパク質発現を*in vivo*, *ex vivo*で迅速に誘導可能
- 品質特性評価
 - プラスミド製品との類似した評価が可能であるが、**新たな解析手法も必要**
 - 修飾mRNAの解析では、不均一性についても評価
- 非臨床安全性評価
 - <*In vivo*で導入>
 - 天然型
 - 発現するタンパク質に注目して、バイオ医薬品を参考に安全性を評価
 - 非天然型
 - 発現するタンパク質に注目して、天然型と同様に評価
 - 新規性の高い修飾の場合、化学合成医薬品を参考に安全性を評価
 - <*Ex vivo*で導入>
 - mRNAは細胞加工に用いる原料とみなす
 - 最終製品を細胞加工製品として安全性を評価

ご静聴ありがとうございました

謝辞： 非臨床試験につきましては医薬品
医療機器総合機構・真木一茂先生の意
見を参考にさせていただきました

予備



*: mRNAによる一過性タンパク質発現を行い製品も再生医療等製品に分類される

DDS化されたmRNA医薬品

- Liposomeの物理化学的特性
- 脂質2重構造 (Uni-lamellar、Multi-lamellar)
- 表面構造
- ゼータ電位 (表面荷電)
- 粘度
- 粒子径
- リポソームの相転移温度

ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー. 薬食審査発0110第1号 平成26年1月10日

Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Control; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. US FDA Guidance for Industry April 2018

POC(有効性)検証・効果効能裏付試験

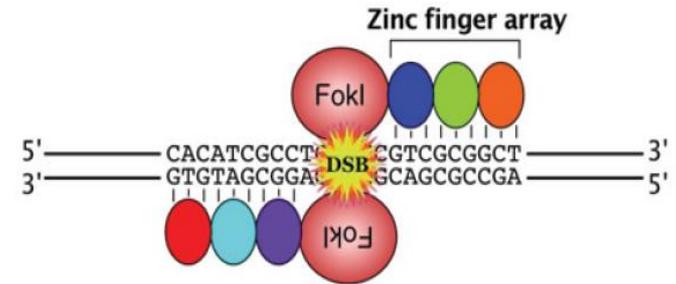
- *in vitro* ヒト細胞での目的mRNAからのタンパク質発現
 - 目的とする細胞内分布; 膜タンパク質、分化誘導や増殖活性
- *in vivo* モデル動物でのタンパク質発現
 - 必要に応じてモデル動物の相同タンパク質をコードするmRNAの導入
 - 腫瘍免疫の誘導
 - テトラマーアッセイ、ELISPOTアッセイ、抗体産生、DHL、

ゲノム編集技術の種類

第一世代: ZFN 1996~

(Zinc Finger Nuclease)

はさみ(人工ヌクレアーゼ:タンパク質)2種類を
標的配列毎に作製して認識・切断

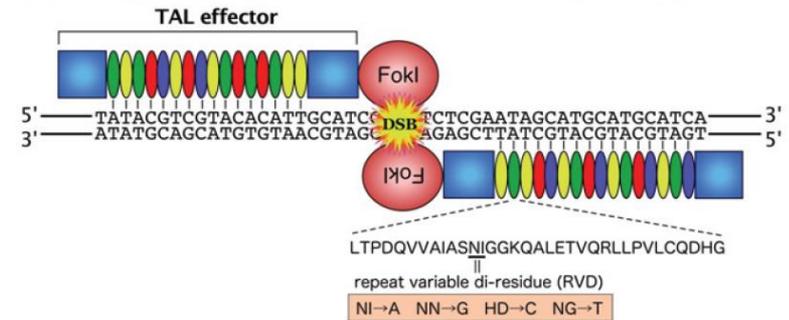


第二世代: TALEN 2010~

(Transcription Activator Like Effector Nuclease)

植物に感染する細菌の転写因子由来

はさみ(人工ヌクレアーゼ:タンパク質)2種類を
標的配列毎に作製して認識・切断

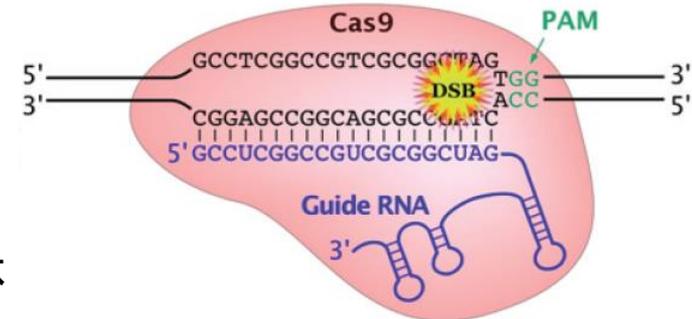


第三世代: CRISPR/Cas 2012~

(Clustered Regularly Interspaced Short
Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein)

(古)細菌の獲得免疫機構を基に開発

はさみはヌクレアーゼ(タンパク質)とガイドRNAの複合体
標的配列毎にガイドRNAを作製して認識・切断



ゲノム編集技術の種類

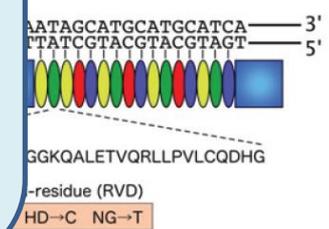
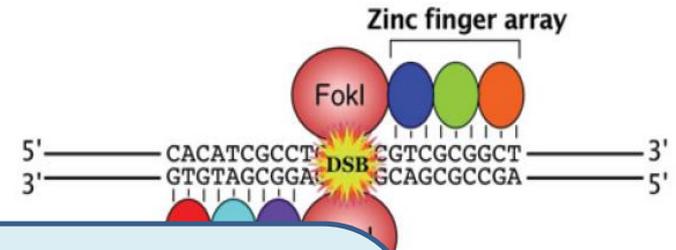
第一世代: **ZFN** 1996~
(**Z**inc **F**inger **N**uclease)

はさみ(人工ヌクレアーゼ:タンパク質)2種類を
標的配列毎に作製して

第二世代: **TALEN**
(**T**ranscription **A**ctivating **N**uclease)
植物に感染する細菌

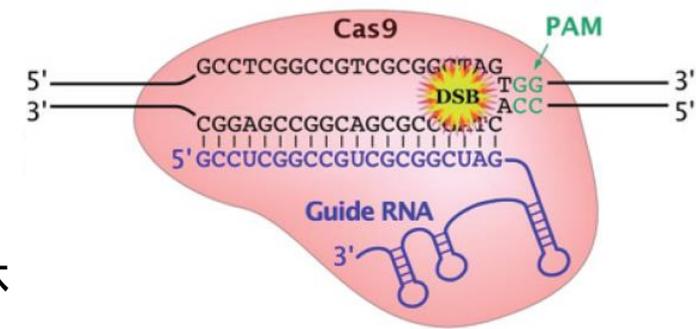
はさみ(人工ヌクレアーゼ)
標的配列毎に作製して

ZFN、TALEN、CRISPR/CAS9をコードするmRNAを導入することによりプラスミドやウイルスベクターを用いなくても遺伝子改変が可能に



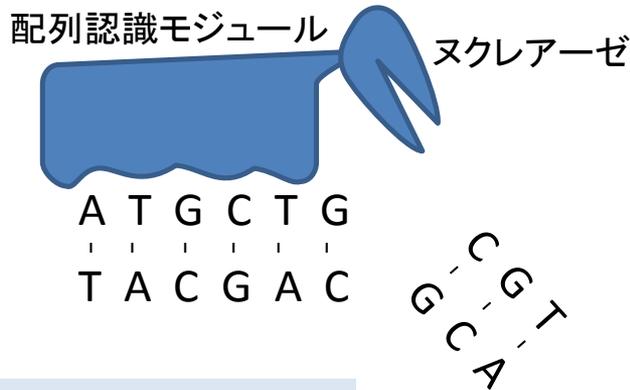
第三世代: **CRISPR/Cas** 2012~
(**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort
Palindromic **R**epeats / **C**RISPR-**a**ssociated **p**rotein)
(古)細菌の獲得免疫機構を基に開発

はさみはヌクレアーゼ(タンパク質)とガイドRNAの複合体
標的配列毎にガイドRNAを作製して認識・切断



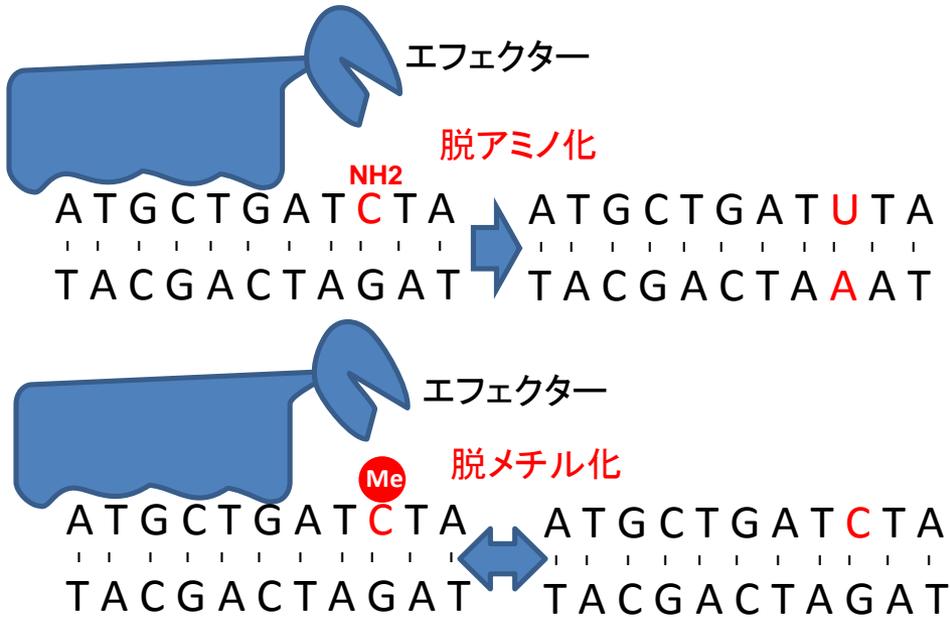
ゲノム編集の遺伝子治療としての定義及び遺伝子治療の範囲

ゲノム編集による遺伝子切断



DNA二本鎖切断 → 欠失／挿入
相同組換え

切断しないゲノム編集



脱アミノ化 (デアミナーゼ)
リコンビナーゼ → 点変異
組換え

遺伝子改変に該当

DNAメチル化/
脱メチル化
転写制御因子
ヒストン修飾

遺伝子治療の範囲

遺伝子発現制御

現時点では含めない
が明確にはせず

ゲノム編集の遺伝子治療としての定義及び遺伝子治療の範囲

ゲノム編集による遺伝子切断

遺伝子治療臨床研究指針

配列認識モジュール



A T G C T
| | | |
T A C G A

第二用語の定義

—この指針において「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること、**もしくは種々の方法により人の目的遺伝子を改変/修飾又は目的遺伝子を改変/修飾した細胞を人体内に投与することをいう。**

切断しないゲノム編集

エフ

脱アミノ化

ATGCTGAT ^{NH2}C TA → ATGCTGAT ^HTA
TACGACTAGAT → TACGACTAGAT

脱アミノ化 (デアミナーゼ)

点変異

遺伝子改変に該当

エフェクター

脱メチル化

ATGCTGAT ^{Me}C TA → ATGCTGAT
TACGACTAGAT → TACGACTAGAT

ヒストン修飾

遺伝子治療の範囲

発現制御

遺伝子治療としての審査

現時点では含めないが明確にはせず