

200838002A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品等の品質・安全性に係る
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新見伸吾

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品等の品質・安全性に係る
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新 見 伸 吾

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

医薬品等の品質・安全性に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 ----- 1

新 見 伸 吾

- 資料 1 Anurag S. Rathore & Helen Winkle: Quality by design for biopharmaceuticals, *Nature Biotech.*, 27, 26-34 (2009)
- 資料 2 <http://stage.www.pharmamanufacturing.com/industrynews/2008/155.html>
- 資料 3 GUIDELINE ON DEVELOPMENT, PRODUCTION, CHARACTERISATION AND SPECIFICATIONS FOR MONOCLONAL ANTIBODIES AND RELATED PRODUCTS (EMEA/CHMP/BMP/157653/2007, 2008/12/18)
- 資料 4 <http://www.pda.org/MainMenuCategory/GlobalEventCalendarandRegistration/European-Events/PDAs-2nd-Monoclonal-Antibodies-Workshop-QbD-Science-to-Submission-Approaches.aspx>
- 資料 5 Spok A, Twyman RM, Fischer R, Ma JK, Sparrow PA. Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends in biotechnology.* 26(9), 506-17, 2008
- 資料 6 EMEA. Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/CHMP/BWP/48316/2006) .
[cited: Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606enfin.pdf>]
- 資料 7 Q10 ガイドライン ステップ 4 原文
- 資料 8 発表スライド: Hidemoto Kazama and Yukio Hiyama, Implementation of 2005 Pharmaceutical Affairs Law and ICH Q8-Q10 in Japan, ISPE annual meeting, Boca Raton, USA, October 2008
- 資料 9 2008 年 11 月 IWG ブリュッセル会議で仮採択された Q&A 案
- 資料 10 Q-IWG Q&A 案にたいする意見募集案内
- 資料 11 2008 年 12 月北京 ICH ワークショップ次第

II. 分担研究報告

1. 国際的動向を踏まえた医薬品の品質・安全性確保に関する研究 ----- 171

—RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望—

早 川 堯 夫

2. 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究 ----- 191

川 西 徹

資料 1 Anurag S. Rathore & Helen Winkle: Quality by design for biopharmaceuticals,
Nature Biotech., **27**, 26-34 (2009)

資料 2 <http://stage.www.pharmamanufacturing.com/industrynews/2008/155.html>

資料 3 GUIDELINE ON DEVELOPMENT, PRODUCTION, CHARACTERISATION AND
SPECIFICATIONS FOR MONOCLONAL ANTIBODIES AND RELATED PRODUCTS
(EMEA/CHMP/ BMP/157653/2007, 2008/12/18)

資料 4 [http://www.pda.org/MainMenuCategory/GlobalEventCalendarandRegistration/
European-Events/PDAs-2nd-Monoclonal-Antibodies-Workshop-QbD-Science-to-
Submission-Approaches.aspx](http://www.pda.org/MainMenuCategory/GlobalEventCalendarandRegistration/European-Events/PDAs-2nd-Monoclonal-Antibodies-Workshop-QbD-Science-to-Submission-Approaches.aspx)

3. 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究 ----- 219

川 崎 ナ ナ

4. トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関
する研究 ----- 227

石 井 明 子

5. バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究 ----- 246

—抗体医薬品の品質・安全性確保のための規制動向に関する研究—

山 口 照 英

6. 遺伝子治療薬の品質・安全性評価に関する研究 ----- 261

—腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保について—

内 田 恵 理 子

資料 ICH considerations: Oncolytic Viruses; <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4929.pdf>

檜 山 行 雄

資料1 Q10 ガイドライン ステップ4 原文

資料2 発表スライド: Hidemoto Kazama and Yukio Hiyama, Implementation of 2005 Pharmaceutical Affairs Law and ICH Q8-Q10 in Japan, ISPE annual meeting, Boca Raton, USA, October 2008

資料3 2008年11月IWGブリュッセル会議で仮採択されたQ&A案

資料4 Q-IWG Q&A案にたいする意見募集案内

資料5 2008年12月北京ICHワークショップ次第

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 335

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 337

医薬品の品質・安全性に係わる国際的動向を踏まえた評価に関する研究

主任研究者 新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第三室長

新規医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術・品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究と関連する評価技術開発に関する以下の研究を行った。

- 1) RNA interference (RNAi) を用いた医薬品の開発の現状と展望として、RNA interference を用いた医薬品の動物モデル及び臨床試験における有効性及び安全性に関する最近の知見および今後克服すべき問題点を明らかにした。現在 RNAi を用いた治療法が有用であることが動物モデルで示されておりすでに数種類の臨床試験が進行中である。今後、RNAi が新しい治療法として利用するには off-target 効果、1 型インターフェロン反応の惹起、細胞内 RNAi コンポーネントとの競合、*in vivo* のデリバリーの問題を克服する必要がある。
- 2) バイオテクノロジー応用医薬品原薬の製法開発における QbD アプローチの適用に関する国際動向を調査すると共に、適用の可能性について考察を行った。QbD アプローチは一般的な概念としてはバイオテクノロジー応用医薬品の製法開発においても共通して適用できるものであるが、タンパク質性医薬品原薬の品質特性を構成する要素は化成品に比較して複雑であり、品質特性と工程パラメーターの関係の解析によりデザインスペースの定義が可能であるケースは限定的であることが予想される。
- 3) 低分子量ヘパリンの類似性を確認する方法、及びその他のムコ多糖類の混入を評価する方法として、酸加水分解により低分子量ヘパリンを単糖及びオリゴ糖とし、HPLC を行う方法を検討した。その結果、低分子量ヘパリンを酸加水分解した後、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーパルス電気化学検出法 (HPAEC-PAD) を行うことにより、低分子量ヘパリン間の還元末端及び非還元末端の構造、平均分子量に関する類似性を評価できること、並びにコンドロイチン硫酸エステル/デルマトン硫酸エステル等の混入を検出できることを見出した。
- 4) トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品について、開発状況を調査するとともに、品質・安全性の評価に関する規制環境整備の国際的動向を明らかにするため、EMA から公表されたガイドラインに関する検討を行った。さらに、トランスジェニック・バンク作製および出発原料調製に至る工程について、適格な出発原料の供給のために求められる要件を考察した。
- 5) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、ICH 遺伝子治療専門家会議より発出された「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」を基に腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験や臨床試験で考慮すべき事項について検討した。
- 6) バイオテクノロジー応用医薬品の一つとしてモノクローナル抗体医薬品を取り上げ、そのブ

ラットホーム技術の有用性を調査すると共に製法の確立や、品質特性解析、規格試験法の設定においてその技術をどのように適用すべきかについて明らかにした。

- 7) ICH 医薬品品質システムガイドライン (Q10) 作成の経過を精査し、Q8、Q9 ガイドラインとともに導入に際しての課題がどのような構図を持つかを考察した。医薬品品質保証のあるべき未来をガイドラインとして示すことが期待される。一方、品質システムを円滑に運営していくために、国際的には他の領域の品質の基準作成を進めることと国内においては基準の統一化が必要と考える。

分担研究者

早川 堯夫 近畿大学薬学部総合研究所
所長
川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部 部長
川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第一室長
石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第二室長
山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 部長
内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 第一室長
檜山 行雄 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部 第三室長

協力研究者

加藤くみ子 国立医薬品食品研究所
薬品部 第四室長
原園 景 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官
多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 研究員
鈴木 琢雄 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官

A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテク

ノロジー等の先端技術をより高度に応用した新規医薬品の研究開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開がわが国においても急速に進んでいる。また、これらの新規医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、より高度な品質・安全性評価法、品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著しい外国での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新規医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術・品質確保技術について、外国での進捗状況を調査するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究と関連する評価技術開発を行うものである。今年度は以下の項目について研究を行った。

- 1) 新規医薬品の品質基準の評価、特性・品質基準等に関する研究—RNA interferenceを用いた医薬品開発の現状と展望—
- 2) 医薬品の製造方法の評価に関する国際動

向研究

- 3) 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究
- 4) トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究
- 5) バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究－抗体医薬品の品質・安全性確保のための規制動向に関する研究－
- 6) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究－腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保について－
- 7) 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

B. 研究方法

B. 1 国際的動向を踏まえた医薬品の品質・安全性確保に関する研究－RNA interferenceを用いた医薬品開発の現状と展望－

RNA interferenceを用いた医薬品の開発の現状と展望として、RNA interferenceを用いた医薬品の動物モデル及び臨床試験における有効性及び安全性に関する最近の知見および今後克服すべき問題点について、以下の参考文献を中心に調査および研究を行った。

- de Fougerolles AR Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 125-32.
- Huang C, Li M, Chen CYao Q Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 637-45.
- Liu G, Wong-Staal FLi QX Development of new RNAi therapeutics. *Histol Histopathol* 2007; 22: 211-7.
- Akhtar SBenter IF Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117: 3623-32.
- de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore JLieberman J Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 443-53.
- Nguyen T, Menocal EM, Harborth JFruehauf JH RNAi therapeutics: an update on delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10: 158-67.
- Lu PYWoodle MC Delivering small interfering RNA for novel therapeutics. *Methods Mol Biol* 2008; 437: 93-107.
- Ebbesen M, Jensen TG, Andersen SPedersen FS Ethical perspectives on RNA interference therapeutics. *Int J Med Sci* 2008; 5: 159-68.
- Aigner A Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76: 9-21.
- Novobrantseva TI, Akinc A, Borodovsky Ade Fougerolles A Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008; 11: 217-24.
- Corey DR Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J Clin Invest* 2007; 117: 3615-22.
- Hokaiwado N, Takeshita F, Banas AOchiya T RNAi-based drug discovery

and its application to therapeutics. *IDrugs* 2008; 11: 274-8.

- Grimm DKay MA Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest* 2007; 117: 3633-41.

B. 2 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

以下の資料を中心に医薬品の品質に関連する既存の ICH 国際調和ガイドライン、米国 FDA の関連文書、EMEA CHMP の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国および欧州の関連情報、また医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見等を参考に、QbD アプローチをバイオテク応用医薬品の製法開発に適用する場合の可能性および問題点等を考察した。

● 資料 1

Anurag S. Rathore & Helen Winkle:
Quality by design for biopharmaceuticals,
Nature Biotech., 27, 26-34 (2009)

● 資料 2

<http://stage.www.pharmamanufacturing.com/industrynews/2008/155.html>

● 資料 3

GUIDELINE ON DEVELOPMENT,
PRODUCTION, CHARACTERISATION
AND SPECIFICATIONS FOR
MONOCLONAL ANTIBODIES AND
RELATED PRODUCTS (EMEA/CHMP/
BMP/157653/2007, 2008/12/18)

● 資料 4

<http://www.pda.org/MainMenuCategory/GlobalEventCalendarandRegistration/Europ>

[ean-Events/PDAs-2nd-Monoclonal-Antibodies-Workshop-QbD-Science-to-Submission-Approaches.aspx](#)

B. 3 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究

1. 試薬

L-フコース (Fuc) 及び D-マンノース (Man) はフルカより、D-ガラクトサミン (GalN) 及び D-グルコサミン (GlcN) は生化学工業より、D-ガラクトース (Gal) 及び D-マンノサミン (ManN) はナカライテックより、2,5-アンヒドロ-D-マンニトール (2,5anhMan-ol)、L-イズロン酸 (IdoA) はトロントリサーチケミカルより、D-キシロース、D-グルクロン酸 (GlcA)、50%水酸化ナトリウム溶液及びトリフルオロ酢酸 (TFA) は、和光純薬より購入した。

バルナバリンナトリウムはローヘバ注(味の素)及びミニヘバ注(伊藤ライフサイエンス)、ダルテバリンナトリウムはダルテバリンナトリウム静注(メルク製薬)及びダルテバン静注(日医工)、レビバリンナトリウムはクリバリン注(アボットジャパン)、並びにエノキサバリンナトリウムはクレキササン皮下注キット(サノフィー・アベンティス)を購入して使用した。

その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

2. 酸加水分解

100 IU 相当量の各低分子量ヘパリンをアセトン沈殿し、沈殿物を 400 µl の 2 N TFA、2 N 塩酸又は 4 N 塩酸に溶解し、100℃で、指定した時間加熱した後、遠心減圧乾燥した。メタノールを 100 µl 加え、遠心減圧乾燥した。水 400 µl に溶解し、水で適当に希釈し、0.5 IU に相当する量を HPAEC-PAD に供した。

3. HPAEC-PAD の方法

HPAEC-PAD 装置は、ICS-3000 ion Chromatography system (Dionex Co.)を用いた。カラムは CarboPac™ PA1 (Dionex Co., 4 x 250 mm) をガードカラム (4 x 50 mm) と共に使用した。試料はループを用いて 75 µl 注入し、流速 1.0 ml/min で、20 分間 16 mM NaOH を用いてイソクラティック溶出した後、5 分かけて 100 mM NaOH へ変更し、その後 30 分間に酢酸ナトリウム濃度を 0 から 500 mM に直線的に上げるグラジエント条件で溶出させた。5 分間 500 mM の酢酸ナトリウムを含む 100 mM 水酸化ナトリウムでカラムを洗った後、16 mM の水酸化ナトリウム溶液に戻し、20 分間平衡化した後、次の試料の測定を行った。

PAD の電圧の条件は、1 サイクルを 0.5 秒とし、0 から 0.4 秒まで 0.1 V とした後、0.41 秒に -2 V とし、-0.42 秒まで -0.2 V とした後、0.43 に 0.6 V と上げ、0.44 秒に -0.1 とし 0.5 秒まで -0.1 V とした。電圧は直線的に変化させた。0.2 秒から 0.4 秒の間の電流を積分し、検出値とした。

4. ウロン酸の定量

ウロン酸の定量はカルバゾール硫酸法にて行った。

B. 4 トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究

製品開発状況に関しては、学術雑誌に掲載された論文 (資料 5)、およびトランスジェニック植物で製造した組換えタンパク質性医薬品を開発している企業からの公開情報を参考に調査を行った。また、EMEA から公表されたガイドライン“Guideline on the quality of biological active substances produced by

stable transgene expression in higher plants (EMEA/ CHMP/BWP/48316/2006; 24 July 2008)” (資料 6) をもとに、規制環境の整備に関する国際動向を検討した。バイオ医薬品の製造に関連する ICH ガイドライン (Q5A 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」、Q5B 「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析」、Q5D 「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」) も適宜参考にした。

資料 5 Spok A, Twyman RM, Fischer R, Ma JK, Sparrow PA. Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. Trends in biotechnology. 26(9), 506-17, 2008

資料 6 EMEA. Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/CHMP/BWP/48316/2006) . [cited; Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606enfin.pdf>

B. 5 バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究—抗体医薬品の品質・安全性確保のための規制動向に関する研究—

欧米の抗体医薬品の品質・安全性に関するガイドライン等を調査研究の対象とした。

B. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究—腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保について—

2008年11月13日付けで発出された「ICH見解：腫瘍溶解性ウイルス」(ICH

considerations: Oncolytic Viruses : <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4929.pdf>) 及び腫瘍溶解性ウイルスに関する論文や関連資料を基に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保のあり方、特性解析、非臨床試験、臨床試験において考慮すべき事項について検討した。

B. 7 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

ICHQ10 の最終合意と日本への導入の課題、並びに Q8-Q10 導入に係わる議論の進捗を報告し考察した。なお本研究においては以下の資料を参考にした。

添付資料

資料 7 Q10 ガイドライン ステップ 4 原文

資料 8 発表スライド: Hidemoto Kazama and Yukio Hiyama, Implementation of 2005 Pharmaceutical Affairs Law and ICH Q8-Q10 in Japan, ISPE annual meeting, Boca Raton, USA, October 2008

資料 9 2008 年 11 月 IWG ブリュッセル会議で仮採択された Q&A 案

資料 10 Q-IWG Q&A 案にたいする意見募集案内

資料 11 2008 年 12 月北京 ICH ワークショップ次第

(倫理面への配慮)

本研究は、調査研究およびヒト由来サンプル及び動物を使用していない研究であるので倫理面での問題はない。

C. 研究結果および考察

C. 1 国際的動向を踏まえた医薬品の品質・安全性確保に関する研究—RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望

C. 1. 1 デリバリー

薬剤として最適化され強力な活性を有する siRNA が同定されると、次は適切な標的細胞に siRNA を効果的にデリバリーするという問題を克服する必要がある。今まで、単純なものから非常に複雑なものまで多くの *in vivo* のアプローチが公表されている。動物実験における siRNA のデリバリーとしては生理食塩水を用いるかコンジュゲート、リボソーム/リボレックス、あるいはペプチド、ポリマー、抗体との複合体が用いられている。siRNA の投与ルートも局所、直接デリバリーから全身静脈投与まで様々ある。局所に対する直接デリバリーは特にこの分野における技術の開発の進歩が目覚しく期待できる。siRNA を標的組織あるいは標的組織の近くに投与すると全身投与に比べて有効性を示すために必要な siRNA の投与量を低くすることができる。また、直接的な投与により全身デリバリーで起こる可能性の高い副作用を回避できる。全身的な siRNA のデリバリー、特にコレステロールとのコンジュゲート、リボソーム、ポリマーをベースにしたナノ粒子のアプローチも広く研究されており、ある程度は有効性が示されている。その他に抗体、ペプチド、アプタマーを用いる他のアプローチも報告されている。本項では siRNA に用いる各種のデリバリーのアプローチについて概説する。

C. 1. 1. 1 裸の siRNA

例えば眼、肺、中枢神経系のような組織に裸の siRNA 二重鎖を直接デリバリーすることにより *in vivo* で RNAi を効果的に起こすことに成功している報告がある。なお、裸の siRNA という用語は生理食塩水及び 5% デキストロースのような単純な賦形剤で siRNA (非修飾あ

るいは修飾)をデリバリーすることを本稿では意味する。裸の siRNA の組織に対する直接的なデリバリーは剤形及び投与が容易であり有効な治療戦略となっている。

多くの例で眼に対する直接的な siRNA のデリバリーが有効であることが示されている。裸の siRNA の直接投与により眼後の細胞を標的にすることが可能であり、眼の血管新生及び瘢痕化モデルにおいて生理食塩水及び脂質をベースにした剤形により病気を改善させることが可能である。VEGF を標的とする最適化された siRNA を用いて、酸素により誘導されるラットの網膜症モデルにおいて病理的な網膜の血管新生に対して頑健で特異的な阻害が示されている。生理食塩水で処方した VEGF siRNA を単回硝子体内に投与すると、正常な硝子体の血管に影響を与えないで病理的な血管新生が 75%以上阻害される。この阻害効果は投与量に依存しており、ミスマッチの siRNA は阻害を示さなかったため VEGF に対して特異的である。脂質で処方した VEGF siRNA を用いた研究では加齢性黄斑変性症 (AMD) のマウスモデルでレーザーにより誘導される脈絡膜の血管新生の低下が示された。VEGF 受容体 1 をターゲティングする生理食塩水で処方した siRNA を硝子体内へ投与すると二種類のマウスモデルにおいて脈絡膜で血管新生が起こっている領域が 3 分の 1 から 3 分の 2 に低下した。これら動物モデルにおいて有効性が示されたことにより、VEGF の経路を標的とする AMD に対する siRNA の臨床試験が開始された。

siRNA を鼻内及び経口気管内に局所投与すると肺において顕著に標的遺伝子のサイレンシングが起こり病態の改善を示すことが明らかになった。一般的に、siRNA はウイルスあ

るいは内在性の疾患に関連した遺伝子を標的としマウス一匹当たり 100 µg 投与される。肺に対して siRNA を直接デリバリーして成功した例の多くは生理食塩水、D5W あるいは肺表面活性剤のような賦形剤で裸の siRNA をデリバリーしたものである。肺において上皮細胞は siRNA が近づきやすいためこのようなアプローチの標的となる主要な細胞である。マウスのウイルス感染モデルで、ウイルス標的に対する siRNA の鼻腔内注入 (処方しないか TransIT-TKO と複合体を形成) により小児及び免疫低下患者における重要な病原体である呼吸器合胞体ウイルスとパラインフルエンザウイルスの肺におけるウイルス負荷が特異的にかつ 10 の 3 乗以上低下し、副作用を起こすことなく病状が完全に回復することが示された。同様なアプローチを用いて D5W で処方した siRNA が重症急性呼吸器症候群コロナウイルス感染の非ヒトげっ歯類モデルで鼻腔内に投与された。ウイルス感染前、ウイルス感染時、ウイルス感染後に繰り返しマカクザルに siRNA を投与するとウイルス感染症状の重篤度の重要な指標である体温上昇の低下が緩和される。さらに、siRNA の投与により呼吸気管におけるウイルス複製の阻害、間質の浸潤の顕著な低下、肺に対する病理的な変化が起きた。これらの研究から呼吸器系におけるウイルス感染の治療に対して RNAi 治療は有効である可能性が示された。

ウイルス遺伝子だけでなく特定の疾患において内在性の遺伝子を siRNA によりサイレンシングできることが多くの研究で示されている。虚血再かん流マウスモデルにおいて鼻腔内に siRNA 投与して Heme oxygenase-1 (HO-1) をサイレンシングするとアポトーシスが促進される。虚血再かん流マウスモデルに

おいては多くの器官において HO-1 が誘導されるが、鼻腔内投与後における HO-1 抑制は肺に限定される。さらに最近、酸素過剰に基づいた急性肺損傷のマウスモデルにおいてアンジオポエチン-2 (Ang-2) に対する siRNA を生理食塩水で処方し鼻腔内投与すると酸素過剰により誘導されるオキシダント傷害、細胞死、炎症、血管の透過性、死亡が特異的にかつ顕著に改善される。このモデルにおいて Ang-2 の発現は肺上皮細胞において劇的に誘導され、その誘導は Ang-2 siRNA により特異的に阻害されるがコントロール siRNA では阻害されない。興味深いことに同じ研究で解析された Ang2 欠損マウスにおける表現型は Ang2 siRNA で処理したマウスと本質的に同じであることが示された。以上の結果から、裸の siRNA が内在性の肺遺伝子を効果的に抑制し、疾患を緩和する可能性が示された。

中枢神経系でも生理食塩水で処方した siRNA の直接デリバリーにより *in vivo* において疾患標的に対する有効性が確認されている。脳室内、くも膜下腔、脳実質内へ生理食塩水で処方した siRNA を直接デリバリーすると末梢及び中枢神経系の多数の領域において特異的なニューロンの mRNA 標的が抑制される。裸の siRNA の直接的な投与は筋肉内、皮内、鼓室にも適している可能性がある。実際、マウスの足趾に siRNA を皮内投与するとベクターをベースにした mRNA の発現が特異的に阻害される。

C. 1. 1. 2 リボソームとリボレックス

リボソームは薬剤の薬動学的な性状の増加あるいは毒性プロファイルの低下を目的として従来から用いられている処方である。現在このリボソームを用いて siRNA を細胞にデリ

バリーする例が急増している。リボソームはリン脂質二重層の中に水相部分が取り囲まれた小胞であり、通常薬剤は中心の水相に封入されている。二重相は複数の成分から構成され、それには陽性あるいは融合脂質を含む場合が多い脂質の部分、コレステロール、ポリエチレン脂質が含まれる。形成されたリボソームは薬物デリバリーに適した安定な物理化学的な性状を有するベヒクルを形成する。対照的にリボレックスは陽性脂質と負に荷電した核酸の相互作用により自然に形成される。リボレックスを用いた市販のトランスフェクション試薬には例えばリポフェクタミン 2000 及び TransiK-TKO のようなものがある。リボレックスは構造的に不均一であり不安定であり長期間溶液中に置くと凝集するので、使用する直前に通常調製する。このような不安定さはリボレックスを用いた処方を治療薬として開発するうえにおいて障害となる可能性がある。

リボソームを介した siRNA の *in vivo* におけるデリバリーの成功例が以下に示すように多く報告されている。siRNA を用いた治療薬を開発するうえにおいて最も重要な知見の一つは siRNA を安定な核酸-脂質粒子 (SNALP) で処方し全身にデリバリーするとマウスと非ヒトげっ歯類でアポリポプロテイン B を顕著に抑制できるという報告である。カニクイザルに SNALP で処方した siRNA を 1 回当たり 2.5mg/kg で投与すると肝臓で 90%以上 ApoB の mRNA レベルを抑制することができた。それに伴い血中のコレステロール及び低比重リポプロテインはそれぞれ 65%及び 85%以上低下した。注目すべきことに、SNALP 処方の siRNA を 2.5 mg/kg で単回静脈内投与すると抑制が少なくとも 11 日持続することが示された。SNALP で処方した siRNA の肝臓へのデ

リバリーの有効性は B 型肝炎ウイルス、エボラウイルス感染の動物モデルでも示されている。他の陽性リボソーム系ではマーモセットで GB ウイルス B の複製をうまく抑制することが示されている。C 型肝炎ウイルス感染のモデルのサロゲートマーカーとして G 型肝炎ウイルスを用い、リボソームで処方した G 型肝炎ウイルスに対する siRNA を 1 回 5 mg/kg 投与すると、ウイルスの複製が完全に阻害されることも示されている。

このように、脂質をベースにした siRNA の処方を全身投与に使用することにより、極めて近い将来において特に肝細胞に対する RNAi 治療薬が開発される可能性が高いと思われる。

脂質をベースにした核酸のデリバリーでは負に荷電した siRNA 骨格と結合する陽性脂質をよく用いるが、中性のリボソームデリバリー系も効果的であることが証明されている。中性の dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) をベースにしたデリバリー系を用いて、Epha2 および焦点接着キナーゼに対する siRNA が卵巣がんの同所性マウスモデルにおいて特異的な標的タンパク質のノックダウンを起し腫瘍の成長を阻害することが示されている。これらの研究で、処方された siRNA は 3 週間週に二回、一回の投与量当たり 150 µg/kg で動物に投与されている。また、DOPC リボソームで処方した neuropilin-2 に対する siRNA がマウスの肝臓に移植した結腸直腸がんの成長を阻害できることも示されている。中性脂質を基にした処方是一般的に十分耐容性なので、これらの結果は有望である。

調製および使用が容易であることから、多くの研究では *in vivo* において siRNA のデリバリーにリボレックスが用いられている。siRNA は本来不安定性であることを考えると、siRNA

の *in vivo* に対するデリバリーとしてリボレックスは局所の直接適用に最も適しているかもしれない。実際、リボレックスの局所投与は眼、肺、神経系の細胞を標的とする siRNA のデリバリーで有効性が示されている。このような直接的な RNAi 適用における脂質をベースにしたデリバリーの必要性は標的細胞そして疾患に応じて個々で評価する必要がある。眼、肺、神経系では siRNA がこのような試薬を使用しないで効果的にデリバリーされる例もある。

リボレックス siRNA を膣及び腸のような粘膜表面にデリバリーすると特異的な遺伝子のサイレンシングが起きることも報告されている。単純ヘルペスウイルス 2 に対する siRNA を脂質と複合体を形成し致死量のヘルペスウイルス感染前後で膣内にデリバリーするとマウスを感染に対して防御できる。ラミニン A/C 及び CCR5 に対する siRNA をリポフェクタミン 2000 と複合体を形成し投与するとこれら遺伝子が特異的にサイレンシングされるという報告もある。リポフェクタミン処方では TNF-α に対する siRNA を直接デリバリーすると TNF-α レベルを低下させるだけでなく浣腸に伴う結腸の炎症を抑制することも示されている。これら脂質をベースにした siRNA の膣内及び結腸内への投与はマウスで十分耐容性であり、毒性あるいはインターフェロン反応の活性化を示す知見は報告されていない。

C. 1. 1. 3 ポリマー

動的ポリコンジュゲート及びシクロデキストリンをベースにしたナノ粒子という二つのポリマーのアプローチを用いて siRNA の *in vivo* 適用における成功例が示されている。動的ポリコンジュゲートを用いた例では、ApoB および PPA R に対する siRNA のマウス *in*

in vivo に対する効果的なデリバリーとこれら遺伝子のサイレンシングが可能であった。動的ポリコンジュゲートは多くの成分から構成されるポリマーである。それには siRNA がジスルフィド結合を介して共有結合する膜活性型ポリマーが含まれ、荷電をマスクする PEG と肝細胞の標的である N-アセチルガラクトサミンが pH 感受性接着を介して連結することが重要な特長である。siRNA とポリマーの複合体が肝細胞に結合しエンドソームに入ると、この複合体は低 pH 環境で分解され、ポリマーが陽荷電に暴露されてエンドソームから逃れる。その結果、ポリマーから siRNA が細胞質に遊離される。N-アセチルガラクトサミンをマンノースグループに置き換えると肝臓に対する標的を肝細胞から類洞内皮およびクッパー細胞へ変えることができる。他のアプローチとしてシクロデキストリンを含むポリカチオンナノ粒子を用いたポリマーのトランスフェリンを標的とするアプローチが含まれる。このナノ粒子で処方された EWS-FLII に対する siRNA はトランスフェリン受容体を発現するユーイング肉腫瘍細胞でこの遺伝子をサイレンシングし、非ヒトげっ歯類で十分耐容性であることが示された。これら二つの戦略は標的デリバリーとエンドソームにおける逃避機構の両方を用いたアプローチという点で特徴がある。

これら以外にもプロテアーゼ処理したコラーゲンであるアテアロコラーゲンとキトサンで *in vivo* において siRNA を効果的にデリバリーすることが報告されている。アテアロコラーゲン・siRNA を全身投与すると骨転移だけでなく皮下腫瘍異種移植において顕著な抑制効果を示した。キトサンは十分耐容性である天然の生分解性のポリマーであり、核酸と陽性の複合体を形成する。キトサンで処方した EGFP

に対する siRNA を EGFP トランスジェニックマウスの鼻腔内に投与すると細気管支上皮細胞で EGFP の効果的なサイレンシングが得られた。同様に、キトサンで処方した RhoA に対する siRNA をヌードマウスの静脈に投与すると皮下移植した乳がん細胞で Rho の効果的なサイレンシングが得られた。

C. 1. 1. 4 コンジュゲート siRNA

適切な標的細胞に薬剤がデリバリーできるようデザインされた分子と siRNA を直接コンジュゲートする方法は魅力的なアプローチである。siRNA が二重鎖から構成されていることを考えると、不活性鎖あるいはセンス鎖はそのような分子とのコンジュゲートに理想的な部位である。アンチセンス鎖の活性を壊さないことが必要なのでセンス鎖に分子をコンジュゲートするケースが多い。一般的に、分子はセンス鎖の 5'あるいは 3'側にコンジュゲートする。場合によってはアンチセンス鎖に付加することも可能である。多くの異なった標的領域を有する分子を直接 siRNA にコンジュゲートした二重鎖は RNAi を介した抑制活性を保持できる。これまで、脂溶性及びアプタマーをベースにしたコンジュゲートが *in vivo* で活性を示すことが明らかになっている。

2004 年に初めてコレステロールをコンジュゲートした ApoB に対する siRNA 二重鎖をマウスの静脈に投与すると特異的な ApoB のサイレンシングが示された。コレステロールをコンジュゲートした ApoB に対する siRNA は 50 mg/kg で ApoB 発現の主要な部位である肝臓及び空腸でそれぞれ ApoB mRNA を約 55% 及び 70% 低下させた。一方、コレステロールとコンジュゲートしたコントロール siRNA は抑制活性を示さなかった。このような ApoB

mRNA の低下が RNAi を介していることは mRNA の特異的な分解生成物である 5'RACE の存在から証明された。ApoB mRNA の低下に伴い血漿中の ApoB タンパク質レベルが 70%に低下し、さらに、ApoB を構成成分とする血清コレステロールのレベルが 35-40%減少した。

一方、コレステロール非コンジュゲートの ApoB に対する siRNA は急速に除去され mRNA の抑制効果を示すことができなかった。したがって、コレステロールとのコンジュゲートにより siRNA の二重鎖は薬動学的及び細胞取り込みの性状が付与されたといえる。コレステロールとのコンジュゲートにより細胞内取り込みが促進される機構の一つとしてコレステロールとコンジュゲートした siRNA が血液に循環しているリポプロテイン粒子に取り込まれ、リセプターを介した過程で肝細胞にデリバリーされることが示されている。また、コレステロールとコンジュゲートした siRNA が血液に循環しているリポプロテインに予め結合することでマウスにおける抑制の効率が顕著に改善され、LDL に結合した粒子は主に肝臓に運搬されるが HDL に結合した粒子が広い組織分布パターンを示すことも示されている。これら脂質性の siRNA コンジュゲートの分布は LDL 受容体あるいは scavenger 受容体 BI (SR-BI)がないマウスでは低下することが明らかになっている。また、コレステロールコンジュゲート siRNA の *in vitro* 取り込みおよび標的 mRNA の分解にはシノラプディス・エレガンス Sid1 受容体の哺乳類相同体が必要であることも示されている。コレステロールでみられた *in vivo* の有効性が胆汁酸及び長鎖脂肪酸のような他のコンジュゲートでも起きることも示されている。

コレステロールとのコンジュゲート siRNA が他の組織や細胞に効果的にデリバリーされるかどうか興味のある点である。変異ハンチントン遺伝子を発現するマウスにおいてコレステロールとのコンジュゲートのハンチントンに対する siRNA を線条体内に単回投与することにより標的 mRNA の抑制、ニューロンの病状を低下、ハンチントン病のウイルストランスジェニックマウスにおける急速な発病で観察される異常な挙動の表現系の遅延が示されている。

脂溶性コンジュゲートに加え、RNA アプタマーも *in vivo* で siRNA のデリバリーに有効である。前立腺に特異的な膜抗原 (PMSA) は前立腺がん細胞及び腫瘍血管内皮に過剰発現している細胞表面受容体であるがこれに対するアプタマーを用いた *in vitro* 及び *in vivo* における有効例が報告されている。PMSA アプタマーは直接 siRNA に連結するかあるいはストレプトアビジンを介してコンジュゲートすると *in vitro* において特異的な細胞の取り込み及び RNAi を介した標的 mRNA のサイレンシングを促進できる。PMSA アプタマーと直接連結させた生存遺伝子 (p1k1 及び bcl-2) に対する siRNA を用いると、これら RNA キメラは細胞に取り込まれ、RNAi を介して標的 mRNA のサイレンシング及び細胞死が起きる。活性型の siRNA と連結した変異非結合型の PMSA アプタマーは抑制を示さず、機能を有する PMSA アプタマーとコンジュゲートした非活性型の siRNA も抑制を示さなかったため、標的抑制は siRNA とアプタマーの両方に特異的であることが明らかになった。PMSA アプタマーでみられた有効性が他のアプタマー及び他の受容体経路を用いて起きるかどうかは不明である。しかし、これらの結果は siRNA

を特異的な受容体へターゲティングすることにより siRNA の細胞内取り込み及び細胞質への十分な遊離が起き、結果的に RNAi を介した抑制を惹起する可能性を示している。

C. 1. 1. 5 ペプチド及びタンパク質コンプレックス

正に荷電したペプチド及びタンパク質と siRNA のコンプレックスを形成させることが研究室レベルで成功している。一般的に、正の荷電を持ったペプチド及びタンパク質は siRNA 二重鎖の負に荷電したリン酸骨格と複合体を形成する。これらの系はポリエチレンジアミン(PEI)ポリマー及び細胞透過性ペプチドのような領域を用いて非特異的なターゲティングに用いることができる。または、これらのコンプレックスは受容体特異的なペプチドあるいは抗体のような標的因子を取り込むことができる。

PEI ポリマーはプロトン形成できるアミノグループ及び高い正荷電密度を有する合成の直線あるいは分岐構造である。PEI ポリマーは siRNA と複合体を形成後電気的な相互作用を介して細胞表面と相互作用しエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれエンドソームの低い pH に対して緩衝作用を及ぼす。エンドソームから PEI ポリマー・siRNA 複合体の逃避はプロトンスポンジ効果により起こると仮定されている。細胞内で PEI はプロトンと水の流入を促進することにより、エンドソームの不安定化及び浸透圧によるコンプレックスの細胞質への遊離を促進する。PEI ポリマー・siRNA 複合体は *in vivo* において多く使用されているが、PEI を治療デリバリー小胞として用いる場合には非常に強い毒性が高い投与量で見られることが懸念となる。そのため、PEI

の物理的な構造を最適化するか他の合成ポリカチオンを用いることにより siRNA の *in vivo* におけるデリバリーを改善させようとする試みが数多くなされている。その他の非特異的なターゲティングのアプローチとして Tat のような細胞透過性ペプチドを用いた研究が広く行われている。このアプローチは広い範囲の細胞種に対する siRNA の *in vitro* のデリバリーには効果的であるが、*in vivo* における抑制については成功の報告がない。

これら非特異的なコンプレックス形成をベースにしたデリバリーとは対照的に、受容体特異的な標的リガンドを用いた成功例が報告されている。siRNA の *in vivo* におけるデリバリーの成功例として、狂犬病ウイルス糖タンパク質のカルボキシ末端に存在する 29 個のアミノ酸から成るペプチドに 9 個のアルギニン残基を結合させた合成ペプチド (RVG-9R ペプチド) を用いた例が報告されている。なお、この 29 個のアミノ酸から成るペプチドはニューロン細胞に発現するアセチルコリン受容体と特異的に結合する。このように正に荷電した RVG-9R ペプチドと siRNA のコンプレックスを形成後静脈投与するとニューロン細胞にデリバリーされ特異的な遺伝子サイレンシングを起こすことが示された。さらに、日本脳炎に対する siRNA を RVG-9R と複合体を形成させてマウスに投与すると致死的な感染が防御されることが示された。

組換え抗体とプロタミンの融合タンパク質を用いて特定の細胞を標的とする抗体と siRNA のコンプレックスを荷電の相互作用により形成させる戦略もある。そのひとつの例では、プロタミン・抗体融合タンパク質は HIV のエンベロープを発現する B16 メラノーマ細胞あるいは HIV に感染した CD4+T 細胞に

siRNA を特異的にデリバリーできた。この場合、プロタミンは核酸との結合、Fab フラグメントは gp160HIV エンベロープタンパク質を発現する細胞に対する本タンパク質を介した特異的な結合に用いられた。さらに、gp160-B16 細胞異種移植モデルで、siRNA-抗体-プロタミン複合体を直接腫瘍内あるいは静脈にデリバリーすると siRNA が腫瘍に特異的にデリバリーされ腫瘍の成長が遅れた。インテグリン LFA-1 に対する抗体とプロタミンとの融合タンパク質は siRNA をリンパ球、単球、樹状細胞に効果的にデリバリーされ特異的に遺伝子をサイレンシングできた。さらに LFA-1 の活性化に依存した構造変化を認識する抗体とプロタミンの融合タンパク質では siRNA により活性化したリンパ球のみ遺伝子のサイレンシングを起した。同様な活性化 LFA-1 に特異的なターゲティングが K562 細胞肺異種移植マウスモデルでも示された。これらの研究から *in vivo* の細胞に siRNA を選択的にターゲティングさせる場合に抗体とプロタミンの融合タンパク質が有用である可能性が示唆された。

C. 1. 1. 6 shRNA 発現のための遺伝子デリバリーベヒクル

このように siRNA を用いたデリバリーは有効性を示しつつあるが、例えばウイルス感染部位及び悪性腫瘍の発症部位は一般的に siRNA が近づきにくく、その治療には内在性の遺伝子を長期間にわたり抑制することが必要である。従って、siRNA とは異なった RNAi の戦略が求められる場合も考えられる。このような場合に有望な治療戦略が RNAi と遺伝子治療の組み合わせである。基本となるのは short hairpin RNA (shRNA) のような人工的な

RNAi トリガーをウイルスベクターにパッケージングし輸送することである。この場合、shRNA は生体に存在するプレカーサー microRNA と同様な役割を示し、細胞内 RNAi マシンにより活性のある siRNA にプロセスされる。

ウイルスベクターを用いた shRNA の投与は siRNA に比べて多くの利点がある。まず、全ての使用可能なベクターの主なもの臨床第一相安全性試験で既に評価されており、その多くは臨床第 2/3 相試験で有効性も評価されている。これら臨床試験で得られた経験は今後のベクターをベースにした RNAi のデザインを評価するうえで大きな助けになる。二番目に任意の標的に対してそれにふさわしいウイルスベクターを選択することにより siRNA を上回る有効性及び特異性を得ることができる。三番目に、ウイルスベクターでは shRNA を適切なプロモーターの元で発現させることにより組織分布及び shRNA の細胞内レベルを調節できる。適切なウイルスカプシドあるいは shRNA プロモーターを用いることにより導入及び転写ターゲティングを組み合わせたオプションが得られ、高い特異性の *in vivo* RNAi が期待される。

C. 1. 1. 6. 1 shRNA デリバリーのためのウイルスベクター

病気の治療に適したベクターの選択はそれぞれのベクターが本来有する性状により決まる。RNAi のキャリアとして最近開発中のウイルスベクターの中で、最も有力な候補の一つは最新世代の偽型二重鎖アデノ随伴ウイルス (AAV) であり、約 4.7kb の長い単鎖 DNA ゲノムを有し、非エンベロープ性の約 20 nm のタンパク質外郭構造に封入されている。一般的に、野生型の AAV はヒトにおいて非病原性で

あり多様な分裂及び非分裂細胞に持続的に感染できるため、AAV は遺伝子治療ベクターとしては魅力的である。最も重要なことに、AAV は一般的にレンチウイルスのような染色体へインテグレーションされるのではなくエピゾーマル DNA 分子を形成することにより持続性を確立する。最近の臨床試験から明らかになっているランダムなベクターのインテグレーションによる挿入変異のリスクというレトロウイルスベクターの欠点を AAV の場合は最小限に抑えることが可能なため患者の安全性から重要である。また重要なことは AAV ベクターを用いた結果はウイルスの血清型及び標的に依存するが、*in vivo* では T 細胞を介した免疫反応を誘導しないか誘導してもほんのわずかであることである。これまでの臨床試験における抗-AAV 免疫反応の最も注目すべき結果は無症候性の一過性の臨床症状無しの肝臓酵素の漏れであり、これは例えばアデノウイルスベクターにおけるかなり重篤な有害作用の知見と対照的である。このように AAV ベクターは既存のウイルスベクターの中で最も安全で有望なウイルス遺伝子デリバリーベヒクルである。

RNAi に関していえば、AAV は以下に示す理由で現時点では最適のベクターと考えられる。一つは本来備わっているウイルスゲノムが小さいため、他のウイルスベクターでは効率の良いゲノムのパッケージングに必要である *stuffer* 配列を必要とすることなく、単独あるいは複数の shRNA 発現カセットのパッケージングに理想的である。AAV 粒子は無害なため高い投与量が可能であり、その結果治療用発現カセットを複数のコピー細胞に導入できるため非常に高い濃度の shRNA が容易に得られる。

RNAi デリバリーのための AAV が有用である可能性はこの領域における二つの最近の進

歩によりさらに顕著に増加した。一つは、ベクターゲノムを天然の 1 本鎖とは異なり二重鎖としてパッケージングするように設計されたことであり、粒子を介した最大限に早くかつ頑健に導入遺伝子の発現を起こすことが可能となった。さらに、100 以上の天然に存在するウイルス血清型を有する偽型 AAV ベクターゲノムに関する戦略が進展し、その血清型の多くは固有の特異的な組織指向性あるいは他の関連する性状を有することが明らかになった。このように二重鎖の偽型 AAV ベクターは全身性の治療用 RNAi の非常に期待できる新たなオプションである。

例えば、B 型肝炎ウイルス及びマウスの肝臓で発現する各種のレポーターを含む肝臓の標的に対する shRNA を発現する AAV 血清型 8 カプシドを有する二重鎖 AAV ベクターが設計された。なお、このベクターは肝臓において高い有効性を示すことにより選択された。持続的な HBV 感染のトランスジェニックマウスでは、この抗 HBV ベクターの単回低投与量で全身投与すると HBV 発現と複製が少なくとも 5 ヶ月持続的に抑制された。本結果は他の AAV-8 を基にしたベクターを用いた同様なマウスモデルで確認された。先に述べたように AAV ベクターを RNAi 発現に用いる利点は特異的にテイスチュエンジニアリングすることによりウイルスカプシドのどれかを有効に利用できることである。例えば shRNA を網膜で非常に有効である AV 血清型 5 カプシドの二重鎖ゲノムから眼特異的なプロモーターで発現及びデリバリーし *in vivo* でラット網膜における内在性遺伝子を抑制することが可能になった。その他の注目すべき知見として、脊髄小脳失調のモデルにおいてマウスの脳に RNAi 発現のため AAV 血清型を用いた例、抗 HIV shRNA の発

現に AAV-2 を基にしたベクターを用いること例がある。

AAV 以外にも非常に期待されているウイルスベクターの候補がある。その一つが HIV を遺伝的に改変し特にヒト胎児あるいは造血幹細胞に RNAi を伝播できる可能性のあるレンチウイルスベクターである。その詳細については臨床試験を参考にされたい。最近開発されているウイルス RNAi ベクターの三番目の例はアデノウイルスである。アデノウイルスはウイルスカプシドが免疫原性を有すること、必要な stuffer DNA を含むためウイルスゲノムが約 36Kb と大きなサイズであること、少なくとも第一世代のアデノウイルスベクターでは保持されているウイルス関連 RNA により RNAi 経路が阻害されるため、shRNA 発現のベクターとしては理想的とは思われない。しかし、アデノウイルスベクターは RNAi による特異的な治療、特に各種がんの治療の期待される候補となっている。特に興味深いのは腫瘍細胞の中で選択的複製し腫瘍細胞を溶解させるよう変異させたウイルスの遺伝変異体である。例えば、VEGF に対する shRNA を発現するように改変された腫瘍崩壊アデノウイルスベクターは従来型のベクターと比較すると、グリオーマの異種移植においてより有効な抗腫瘍効果を示した。

C. 1.2 臨床試験

RNAi は研究レベルから臨床試験まで急速に進歩し、数種類の siRNA が今後近いうちに臨床試験に入る予定である。最初の臨床試験では siRNA の直接的な局所デリバリー、湿式型の AMD の治療の VEGF 経路そして呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の治療の RSV ゲノムのような十分妥当性が評価された治療標的に焦

点が向けられている。眼の適応症に開発されている RNAi 治療は siRNA を眼後に対して効果的にターゲティングするために全て硝子体の空洞への直接投与を用いる。なお、硝子体への siRNA 投与は内在性ヌクレアーゼが低いため分解されにくいという利点がある。一方、RSV RNAi 治療は肺への直接デリバリーを用いる。

Bevasiranib は全ての VEGF-A のスプライシングされたイソ型をターゲティングする未修飾 siRNA である。Bevasiranib は重篤な進行性湿式型 AMD の患者の臨床第 2 相試験が終了し視覚及び損傷範囲を含む各種エンドポイントの投与量に関連した治療効果が得られている。この化合物の臨床第 3 相試験が湿式型 AMD で実施されており、Bevasiranib の 8 から 12 週間毎に投与と FDA により承認されたヒト型抗 VEGF-A 抗体フラグメントである Ranizumab の 4 週間毎の投与の比較で有効性が比較される。

AGN-745 は VEGF 受容体-1 をターゲティングする化学修飾 siRNA である。AGN-745 は湿式型 AMD の患者で臨床第 1 相試験が終了し十分耐容性であり一部の患者で視力を安定化及び改善することが報告されている。この分子の臨床第 2 相試験が湿式型 AMD で実施されている。

RTP801i-14 は低酸素誘導性遺伝子 RTP801 をターゲティングする化学修飾 siRNA であり、最近湿式型 AMD の治療の臨床 I/II 相試験が行われている。前臨床のマウス及び霊長類モデルにおいて、RTP801i-14 は硝子体内投与により脈絡膜の血管新生及び血管漏出を阻害し、VEGF をベースにした薬剤と協調的あるいは相乗的に作用することが示された。

最初の siRNA を用いた肺疾患の治療に関する研究は新生児及び免疫不全症において重篤