

標的タンパク質のノックダウンを起こ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 μ g/kg で動物に投与されている。また、DOPC リポソームで処方した 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 のデリバリーにリポ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ポ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、リポ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。

リポレックス 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洗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。

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 PPAR に対する siRNA のマウス *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脂肪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-FLI1 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。

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人が多い。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 の二重鎖は薬力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ボ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ボ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 の分解にはシノラブディス・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 (plk1 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。

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。

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 micro RNA 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。

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ソード 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 ISSUE 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。

2 臨床試験

RNAi は研究レベルから臨床試験まで急速に進展し、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 Ranizuzumab 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な呼吸器感染である RSV に対して行われた。ALN-RSV01 はウイルスのヌクレオカプシド (N) 遺伝子をターゲティングする siRNA である。臨床第一相試験のフォローアップで、この薬剤は噴霧器を用いた吸入により投与された。単回投与では ALN-RSV01 が 0.1 から 3mg/kg、複数回の投与治療群では 3 日間 1 日に 1 回 0.01 から 0.6mg/kg の範囲で評価され、重度あるいは重篤な有害事象は見られなかった。なお、吸入 ALN-RSV01 のデリバリー効率は非臨床試験モデルよりもヒトのほうで顕著に高かった。臨床第二相試験では、健康な成人を野生型 RSV 株に感染させ、ALN-RSV01 がウイルス接種前 2 日間と接種後 3 日間の合計 5 日間連続で鼻腔内に投与された。その結果、ALN-RSV01 は安全で十分耐容性であり統計的に有意な抗ウイルス活性を示すことが報告された。ALN-RSV01 はさらに自然に RSV に感染した成人患者の臨床第 2 相試験で評価される予定である。

siRNA の最初の全身投与として p53 腫瘍抑制遺伝子をターゲティングする AKIi-5 が開発されている。p53 遺伝子は損傷に反応して尿細

管細胞のアポトーシスを誘導することにより急性腎不全の発症に重要な役割を果たしている。AKIi-5は化学修飾 siRNA であり、急性腎損傷において p53 を一時的に抑制することにより生体の治療能力を惹起し細胞の損傷を回復させることが期待されるため、急性腎損傷の治療にも用いられる予定である。急性腎損傷の治療の非臨床試験がラットとサルで行われた。AKIi-5 の単回ボラス投与で治療したラットは虚血/再かん流により誘導される急性腎損傷から顕著に防御された。ラット及びサルにおける薬動力学、分布、毒性研究において AKIi-5 は好ましい毒性プロファイルを示し、腎臓において貯留時間は短かった。現在進行中の臨床第 1 相試験で、AKIi-5 は大規模な心臓手術を受けた患者に単回投与で静脈投与されている。

RNAi をベースにした NUCB-1000 の HBV 感染の治療の臨床第 1 相試験が全身投与で開始された。NUCB-1000 は異なった配列の HBV ゲノムをターゲティングする四つの異なった shRNA を RNA ポリメラーゼ III プロモーターの元で発現するようデザインされたプラスミド DNA であり陽性脂質デリバリー系で処方されている。

遺伝子治療と RNAi を組み合わせた HIV の治療の開発が臨床第 1 相で最近行われている。このアプローチは造血幹細胞である CD34⁺細胞を誘導後採取し、三つの HIV 関連遺伝子、trans-activator of transcription/regulator of virion (tat/rev), CCR5, transactivation-response genes をそれぞれ標的とする shRNA、リボザイム、RNA デコイをレンチウイルスベクターにより CD34⁺細胞に ex vivo でデリバリーし、その細胞を患者に戻すものである。非臨床試験では有望な安全性及び有効性に関する結果が得られており、造血幹細胞を正常に分

化できた。

TD-101は先天性爪肥厚症の治療を目的として皮膚における標的遺伝子発現を抑制するように設計された siRNA である。先天性爪肥厚症はケラチン遺伝子の変異により引き起こされるまれなドミナントネガティブの上皮脆弱性疾患である。変異ケラチンをターゲティングする単一ヌクレオチド特異的な siRNA により in vitro 及び in vivo において凝集の表現系が逆転することが示された。臨床第 1 相試験では、未修飾の siRNA が皮膚内に投与された。

3 克服すべき安全性及び特異性に関する懸念

RNAi における有害事象は 2003 年に報告された。最初にヒト細胞で RNAi の有効性が示されたすぐ後に多くのグループで siRNA 処理した細胞において IFN 反応が誘導されることが報告された。さらに、siRNA 及び shRNA による標的としない mRNA の望ましくないダウンレギュレーションという off-target 効果が報告された。その後、大規模の遺伝子発現プロファイルの研究により siRNA と off-target mRNA の 3'非翻訳領域の間でわずかに 6-7 ヌクレオチドの相同性があれば off-target 遺伝子の抑制が誘導されることが示され、その誘導は多くの場合 micro RNA (miRNA) を介した機構による起きると考えられた。また、siRNA-脂質複合体により TLR 特に形質細胞様樹状細胞において TLR7 の誘導が促進されることが報告され、この効果は細胞及び配列特異的であり siRNA の GU リッチな danger motif によることも明らかになった。その後、この効果は siRNA を最適化すること及びこれら細胞を標的としない処方を用いることにより回避できることが示唆された。同様に、多くの報告は siRNA の化学修飾により IFN 及びサイトカイ

ンの誘導を回避できることが示された。従って、このような有害事象は将来の臨床プロトコルでは完全に除去できる可能性が高いと考えられる。注目すべき点は RNAi に関連した有害免疫反応はこれまで培養細胞でしか見つかっていないということであり、*in vivo* においても起きるかどうかは不明である。さらに先天性免疫反応は動物とヒトにおいて複雑であるため、今後の siRNA デリバリー複合体を用いる場合はその治療の指標の正確な評価が確立されるまでにさらに臨床試験が必要である。

他方、最近のマウスの研究で RNAi 発現の新規の特異的な有害事象が明らかになった。この研究では先に示したマウスの肝臓で 49 種類の異なった shRNA のパネルを発現する非常に効率的な二重鎖 AAV-8 ベクターが用いられた。その中で 36 種類のベクターがレベルの異なる肝臓障害を引き起こし、そのほとんど半分で動物の疾病及び致死が起きた。この原因は高いレベルで shRNA が発現することにより内在性 miRNA 経路のステップが飽和されることによるものであり、その候補として前駆 miRNA と shRNA の細胞質への輸送を仲介する核の karyopherin exportin-5 が示唆された。なお、この *in vivo* の毒性は有効かつ安全な shRNA 発現カセット及び必要最小限に有効なベクターの投与量を選択することにより軽減できることが示された。このような選択を行った AAV/shRNA を用いるとトランスジェニックマウスで HBV が 5 ヶ月間ウイルスのタイターで 2 対数以上抑制され、各種のレポーター遺伝子も 1 年間強く抑制されることが示された。

同様な siRNA の多重投与により内在性 miRNA のレベルに影響を及ぼさないで顕著なターゲットとする肝臓遺伝子の抑制がマウスとハムスターにおいて得られた。このように

miRNA のレベルが影響を受けないのは、先ほどの飽和モデルに基づく siRNA は miRNA よりも下流の過程で RNAi 経路に入ることから、exportin-5 のような上流の成分の飽和が回避されたためと思われる。しかし、この知見は例えば 2 種類の siRNA をマウスに共投与すると *in vivo* でお互い競合し個々の有効性が阻害されるという初期の報告と一致しない。同様な結果が培養細胞でも報告されており、各種の標的 mRNA に対する多くの shRNA あるいは siRNA を共投与すると個々の RNA トリガーの有効性が低下した。高濃度の siRNA で細胞内 RNAi マシンが飽和される可能性を示す結果が得られている。それらのデータによると外から導入した siRNA を細胞内の RISC が集合させる能力は非常に限られており、RISC を化学量論的に滴定することが可能であることが示されている。このモデルにより観察された siRNA の間の競合がうまく説明可能である。したがって、複数の siRNA は細胞内の限られたプールの RISC 及び結合タンパク質とお互いに競合し、少なくとも特定の組織及び細胞では高投与量の siRNA により RNAi 経路を過剰に飽和させることが実行可能であると考えられる。このモデルと一致して、先のマウス肝臓における結果は RNAi 経路において exportin-5 のみが律速因子ではないことを示している。まだ証明されていないが他の律速タンパク質が RISC の slicer 成分である Ago-2 である可能性がある。Ago-2 は miRNA、shRNA、siRNA の作用発現に必要なタンパク質である。この RISC の飽和により先に示した siRNA の競合を示す知見が説明可能である。このモデルを支持する結果がヒト組織パネルにおける Ago-2 タンパク質の発現解析により得られた。この結果によると、Ago-2 タンパク

質は特に肝臓と肺で低いことが示された。

RNAi 治療薬を最適で安全なものとして開発する必要条件として内在性の RNAi 経路をより理解することも必要である。重要なステップは治療の標的となる組織あるいは細胞における各種の RNAi に関与する特定の因子の特性及び発現プロファイルの比較である。それにより多くのウイルスが感染細胞において RNAi 成分と相互作用しその機能を抑制するという知見に基づき RNAi 経路とヒトウイルスの自然に起こる相互作用をさらに解明することの助けになる。例えば、アデノウイルスはそのウイルス RNA により exportin-5 の機能を消失させ飽和する。これはベクターによりコードされる shRNA を高いレベルで発現する細胞において起きるものと似ており、ウイルス-RNAi 相互作用を更に研究することにより治療用 RNAi を最適化する機構及び概念が明らかになると思われる。同様に、in vivo における siRNA レベルを定量して比較する方法を考案するだけでなく、異なった RNAi トリガーをデリバリーし複数の利用可能なベクターを用いることが重要である。

同じ観点から多くの研究者により調節可能で組織特異的な RNA 発現を可能にする RNA ポリメラーゼ II をベースにした新規の RNAi プロモーターの開発が行われている。その最終目標はこれらのプロモーターの使用により内在性の miRNA 系特に exportin-5 及び RISC の過剰飽和のリスクを避けながら、核における shRNA の発現を十分高いレベルで厳密に調節し、強力で持続した RNAi を起こすことである。現在、可逆的あるいは永続的な変異体を含め様々な異なった遺伝子発現ベクター系の改変が行われている。内在性の miRNA は通常 RNA ポリメラーゼ II から発現するため多くの

場合ヘアピン RNA が天然の miRNA 構造に組み込まれるということが障害となる。この戦略ではヘアピン RNA の最も効率的な発現とプロセシングは保障されるが、ハイブリッド shRNA/miRNA 転写物の切断には核における Drosha が必要とされる。従って、他の細胞内 RNAi 成分が飽和されるリスクも同時に増加する。一般的に治療用 RNAi に適したベクターの最終のゴールはこのような最適なプロモーター系を最適なデリバリーベヒクルと結合させることである。このようなオプションはベクターをベースにした RNAi 発現系に限定されており、siRNA をベースにした戦略では適用できない。この組み合わせにより最終的に転写 RNAi の特異的なターゲティングだけでなく最大限の厳密な遺伝子導入が可能になることが期待される。このように、off-target 細胞における有害事象を除去することにより、最大の患者の安全性だけでなく最も高い有効性を保障することが可能となる。

4 新規の RNAi を基にした治療戦略

最も明白で直接的な臨床における RNAi 適用はヒトの疾患に関連した遺伝子あるいは mRNA を直接ターゲティングすることである。この概念の妥当性を検証している論文は急激に増加している。

4-1 組み合わせ RNAi

病原性のウイルスを標的として治療用 RNAi を用いる際の懸念は、過去において他の単独治療において直面した障害と同じである。最も大きな障害は高いウイルス変異率により急速に生じるウイルスのカプシドミュータントを調節することである。これは特に HCV および HIV のような RNA ウイルスに当てはま

る。HCVの場合1年間にウイルスヌクレオチド当たり103の変異を取り込む。また、HIVは全ての生物で急速に進化し発達している。不幸な事に、これらのケースではRNAiの優れた特異性が欠点となる。なぜならsiRNA/shRNAとウイルス標的mRNAの間の単一ヌクレオチドミスマッチにより認識と抑制を無効になるからである。ウイルスの変動の問題をうまく解決する方法は、siRNAのカクテルあるいは多くのshRNAを発現するベクターを用いてそのゲノムをターゲティングすることである。通常これらRNAiトリガーはウイルスゲノム内の異なった部位及び理想的にはウイルスファミリーの全てのメンバーの中で高度に保存されている配列を同時にターゲティングする。この考えに基づくこれらRNAiトリガーによりエスケープミュータントの形成が効果的に阻止できるはずである。実際多くの研究によりこの組み合わせRNAiのアプローチの妥当性が評価されており、わずか3種類あるいは4種類のsiRNA/shRNAの組み合わせによりHIVのような非常に変異するウイルスでも十分調節できることが示唆されている。抗ウイルス組み合わせRNAiのさらに可能性のある修飾はウイルスにハイジャックされる細胞の受容体や細胞質あるいは核タンパク質のような病原体の感染に寄与する細胞内タンパク質をコードする細胞内mRNAのようなウイルス標的を混合することである。

組み合わせRNAi戦略はがんを含む他のヒトの疾患の治療にも有望であることである。その例はBRAF及びSKP2の共抑制であり、結果的に単独治療よりも抗腫瘍効率は優っている。なお、これらの遺伝子はメラノーマ細胞でアップレギュレーション及び変異が起こる頻度が高い。改良型のがん特異的な組み合わせ

RNAiは通常のがん治療薬の有効性を増強させることを目的とした化学療法あるいは放射線に対する抵抗性に寄与するがん遺伝子及び遺伝子の相乗的な共抑制である。その例としてMDR1によりコードされるP-glycoproteinがある。結腸癌細胞においてP-glycoproteinのレトロウイルス/shRNAを介したサイレンシングにより細胞毒性薬剤に対する感受性が増強する。他の研究では、アデノウイルスベクターを介したshRNAの発現がHIF-1 α の抑制に用いられた。なお、HIF-1 α は低酸素条件下で急速に成長する腫瘍でアップレギュレートされる。この抑制によりマウスにおける腫瘍の成長が遅れるだけでなく、成長の遅れは同時に放射線を投与することにより相乗的に促進された。このようにがんの治療におけるベクターを介したRNAiの組み合わせの概念が有効であることが示されている。その他のRNAi組み合わせの修飾はリボザイム、アンチセンス、トランスドミナントタンパク質のような他の遺伝子発現の阻害剤のいずれかと組み合わせしてshRNAを発現するベクターをデザインすることである。注目すべき候補はHIV感染を撃退するためにデザインされたレンチウイルスベクターであり最近臨床試験に入っている。このトリプルベクターは抗HIV shRNA、細胞内HIV CC5 receptorに対するリボザイム、ウイルスTATタンパク質を隔離するためのHIV-TARデコイを共発現する。それに代わる将来の世代のベクターはレポーターあるいはマーカーとして用いるタンパク質あるいは相乗効果を有するタンパク質を共発現できる。最初の例は γ グロビンcDNAと共にヒト鎌状 β -グロビンに対するshRNAを共発現するレンチウイルスである。鎌状細胞貧血患者からの分化するCD34⁺細胞でこのベクターは β^0 を特異的に低

下させるが γ -グロブリンを発現し、幹細胞治療との関連で相乗的な遺伝子のサイレンシング/発現の戦略の可能性が提供された。

このように有望な成功例が示されているが、RNAi 組み合わせとベクターについてはさらに最適化が必要である。現時点における主な不明の点は複数の遺伝子を運ぶヘアピン RNA および関連するプロモーターの遺伝的安定性に関する懸念である。少なくとも DNA プラスミドに関しては、一つのプロモーターでも最大 10 個の shRNA コピーを連結させることは妥当と思われるが、ヘアピン RNA の数が 3 個を超えると不安定になるとの報告もある。これらのパラメーターには、一つあるいは数個のプロモーターにおける多数のヘアピンの位置および個々の shRNA を分離する配列の長さおよび構造のような他の因子も含めて徹底的な試験による最適化が必要とされる。最終的には、特定の疾患のターゲティングに多数の配列を用いる場合、RISC への個々の siRNA の取り込みにおいて有害な競合を避けることが重要であり、競合により特異的な siRNA の効果が制限され、RNAi の組み合わせ治療の最初概念が無効になる。

4-2 治療標的としての miRNA

最近の考えによると、哺乳類およびヒトにおける RNAi 経路の主な機能は内在的にコードされる miRNA の産生及びプロセッシングである。miRNA は、通常は 3'UTR にある部分的に相補性のある mRNA へ結合し阻害することによりおそらくは数千の遺伝子発現を転写後で調節する。これには明らかにオーバーラップするプロセスがあり、正確な機構は十分には解明されていないが、大部分は mRNA の分解よりもむしろ転写の阻害を介して起こる可能性

が高い。この結果、miRNA が分化、形質転換、あるいはウイルス感染のような多数の多様性のある良性あるいは悪性の細胞プロセスの重要なレギュレーターになる。したがって miRNA は疾患の治療戦略について幅広い可能性を提供する。最近の報告によると、一過性のあるいは安定な表現型の機能を消失させることを目的として、特異的かつ効率的に miRNA の機能を阻害する新規の方法論が導入された。その方法では、任意の miRNA あるいは全体の miRNA ファミリーの多くの 3'UTR に対する最大 7 個の直列の結合部位を有する強力なポリメラーゼ II (例えば CMV) あるいは III (例えば U6) から転写産物が発現される。導入した細胞で、miRNA スポンジと呼ぶこれらコンストラクトは相補的な 7 個の配列を有する miRNA と結合し選択的に阻害できた。その効果は標準的な条件で用いた場合、antagomir 及び locked nucleic acid (LNA) アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む過去に最も多く報告されている miRNA の阻害剤と少なくとも同等であった。重要なことは、スポンジも通常 miRNA により調節されている内在性標的を抑制できることから、ターゲティングの妥当性評価において非常に可能性のある手段であることが示唆される。実際、少なくとも一過性に導入した細胞におけるスポンジのコピー数は細胞当たり数千倍でありおそらくほとんどの miRNA を抑制するのに十分であると推定された。

治療用 RNAi の観点から、この新しい方法論はウイルスの治療用ベクターから発現されるトリガーを用いて miRNA の機能を抑制する多くのオプションを提供できるため非常に興味深い。適用が可能と考えられる例として腫瘍形成における miRNA の機能の評価、最終的に

は動物モデルおよび患者においてがんを引き起こす miRNA の抑制が含まれる。別の興味あるオプシオンは肝細胞で高発現し 5'UTR に対する結合により HCV の複製に必要である miRNA-122 (miR-122) の遮蔽に用いることである。これにより新規なウイルス肝細胞感染の抑制法が提供されるだけでなく、他の RNAi の組み合わせの例として他の抗 HCVshRNA およびその阻害剤を容易に組み合わせることができる。

しかしこの場合も、この系の多くのパラメーターを十分に特性解析し最適化する必要がある。例えば、理想的な miRNA 結合部位の数、スポンジ内におけるお互いの配置は不明である。これらの問題は今後動物実験で評価する必要がある。また、この新規方法論には安全性についてリスクがある。懸念の一つは特に一個の miRNA がおそらく数百あるいは数千の標的を調節するという事実から内在性 miRNA を完全かほぼ完全に遮蔽することにより細胞が有害な効果を受ける可能性があるということである。膨大な大部分の miRNA ファミリーの機能は不明であるので、多数の miRNA の同時抑制が細胞および生物体に耐容でない可能性は否定できない。

4-3 導入遺伝子の組織選択的な発現

先ほどの戦略と別に、強い新抗原である GFP のコーディング配列の 3'UTR に miRNA (mir-142-3p) の結合部位を挿入する戦略も取られている。この特異的な miRNA は血液系統の細胞に選択的に発現する。この考えは肝臓にベクターを全身的にデリバリーさせながら、過失により導入された血液細胞からの発現を選択的に消滅させるというものである。実際、免疫不全マウスにレンチウイルスでデリバリー

させると、GFP は造血系統ではなく非血液細胞、特に肝細胞および内皮細胞にのみ発現する。その結果、GFP は抗原提示細胞で発現しないためマウスは抗 GFP 免疫反応を起こさず、ベクターの発現は維持される。ごく最近のフォローアップ研究で、同じ原理が造血細胞における組換え clotting human factor IX (hFIX) の off-target 発現を抑制するために用いられた。これは抗原提示細胞における hFIX の発現を阻止し、通常マウスにおいて長期間の hFIX の導入を障害する抗 hFIX 特異的適応免疫反応の誘導を抑制する。実際、hFIX-mir-142-3p 融合ベクターで処理した免疫応答性血友病 B マウスは治療効果を有する hFIX 活性が 9 ヶ月持続した。過去における導入遺伝子の組織選択的な発現は例えば肝臓特異的なプロモーターのように転写のコントロールを介して主に行われた。従って、新規の RNAi を介した転写後の調節が加わればベクターを介した組織特異的な遺伝子発現戦略の見通しが明るくなる。

これらの研究では異なる種の間で導入遺伝子が用いられたので、ヒトには同様に当てはまらないように思われる。従って、shRNA 発現カセットを含む他の導入遺伝子とベクターの組み合わせでこのアプローチの可能性を確認する必要がある。実際、shRNA 配列と miRNA 結合部位を融合させることにより、理想的には全身的な RNAi ベクターの投与からでも望ましい標的細胞にのみ RNAi トリガーの選択的および特異的に発現を起こすことが理論上は可能である。このアプローチにより有効性と選択性を最大限に得るために、例えば細胞あるいは組織特異的なベクター及びプロモーターを用いて翻訳及び転写ターゲティング戦略を組み合わせることが可能である。他方、組織選択的な発現の方法論には例えば miRNA の結合

部位の理想的な数及び位置の同定などmiRNAスポンジとしての同様な最適化がさらに必要である。

RNAi をベースにした発現系の中で注目すべき点は調節領域の遺伝子配列に対する小さなdsRNAが転写レベルでその発現を停止させるという報告である。そのようなプロセスが哺乳細胞で実際に起こるなら、核においてこのようなdsRNAを短時間で一過性に発現させることにより遺伝子発現を止めることができるかもしれない。これを上記のmiRNAを基にした系だけでなく通常のRNAi戦略と組み合わせることにより、疾患に関連した遺伝子の発現を調節する新規の治療アプローチを提供できる可能性がある。この戦略については現在siRNAを核に効率よくデリバリーする技術はないのでウイルスベクターを用いることにより可能になるかもしれない。

D 結論

siRNAのデリバリーにおいては様々な方法が考案され有効性が示されている。さらに、これらの方法を用いた臨床試験でも一定の成果が得られている。また、ウイルスベクターを用いたshRNAなどのデリバリーについても様々な技術が開発されており期待できる。今後もこのようなRNAi技術は進歩をとげることが予想されるが、そのポイントになるものは臨床適応症、用いる投与ルート、標的とする細胞に着目したデリバリーのアプローチと考えられる。一方、RNAiに関連した飽和、競合、免疫反応の惹起を含めた毒性については不明の点が多く、今後も地道な基礎研究が必要と思われる。これら有効性および安全性に関する課題を克服しRNAiを用いた治療法がさらに発展して革新的な治療法となることを期待したい。

E. 健康危機情報

なし

F. 参考文献

- [1] de Fougerolles AR Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 125-32.
- [2] 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.
- [3] Liu G, Wong-Staal FLi QX Development of new RNAi therapeutics. *Histol Histopathol* 2007; 22: 211-7.
- [4] Akhtar SBenter IF Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117: 3623-32.
- [5] 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.
- [6] Nguyen T, Menocal EM, Harborth JFruehauf JH RNAi therapeutics: an update on delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10: 158-67.
- [7] Lu PYWoodle MC Delivering small interfering RNA for novel therapeutics. *Methods Mol Biol* 2008; 437: 93-107.
- [8] Ebbesen M, Jensen TG, Andersen SPedersen FS Ethical perspectives on RNA interference therapeutics. *Int J Med Sci* 2008; 5: 159-68.
- [9] Aigner A Applications of RNA

interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76: 9-21.

- [10] Novobrantseva TI, Akinc A, Borodovsky Ade Fougérolles A Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008; 11: 217-24.
- [11] Corey DR Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J Clin Invest* 2007; 117: 3615-22.
- [12] Hokaiwado N, Takeshita F, Banas AOchiya T RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs* 2008; 11: 274-8.
- [13] Grimm DKay MA Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest* 2007; 117: 3633-41.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 新見 伸吾, 原島 瑞, 日向 昌司, 山口 照英, 早川 堯夫: 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その1) *医薬品研究*, 39(1), 1-37(2008)
- 2) Fuminori Sakurai, Shin-ichiro Nakamura, Kimiyo Akitomo, Hiroaki Shibata, Keiji Terao, Kenji Kawabata, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi: Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration in nonhuman primates, *Mol. Ther.*, 16(4):726-33 (2008)
- 3) Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y, Abe Y, Taniai M, Nomura T, Kayamuro H, Nabeshi H, Sugita T, Imai S, Nagano K, Yoshikawa T, Fujita T, Nakagawa S, Yamamoto A, Ohta T, Hayakawa T, Mayumi T, Vandenamee P, Aggarwal BB, Nakamura T, Yamagata Y, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y.: Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist, *J Biol Chem*. 283(2):998-1007(2008)
- 4) 早川 堯夫: バイオ医薬品等をめぐる最近の動向と話題、*ヒューマンサイエンス*, 19, 32-37 (2008)
- 5) 早川 堯夫: バイオ医薬品等をめぐる最近の動向、*ジャピックジャーナル (JAPIC J)*, 11 (5), 41-64 (2008)
- 6) 新見 伸吾, 原島 瑞, 日向 昌司, 山口 照英, 早川 堯夫: 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その2) *医薬品研究*, 39(1), 359-387(2008)
- 7) 早川 堯夫: 医薬品の品質管理について、*大阪医薬品協会会報*, 712, 1-31 (2008)
- 8) 嶽北 和宏, 廣瀬 志弘, 鹿野 真弓, 早川 堯夫: 薬事承認と病理・再生医療の早期実用化に向けた細胞・組織利用製品の審査、病理と臨床 (印刷中)
- 9) Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry, *Biochemistry*, 47, 10132-54 (2008)
- 10) Sakurai F., Nakamura S-I., Akitomo K., Shibata H., Terao K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H.: Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates, *Gene Ther.* in press
- 11) Huang H., Sakurai F., Higuchi Y.,

Kawakami S., Hashida M., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Suppressive effects of sugar-modified cationic liposome/NF- κ B decoy complexes on adenovirus vector-induced innate immune responses. *J. Control. Release.*, in press.

- 12) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 127-132 (2009)
- 13) Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K. Comparative Studies on the Structural Features of O-Glycans between Leukemia and Epithelial Cell Lines. *J Proteome Res.* 8(2):521-537 (2009)
- 14) Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K. Structural characterization of multi-branched oligosaccharides from seal milk by combination of off-line HPLC-MALDI-TOF MS and sequential exoglycosidase digestion. *Anal Biochem.*, in press.

2. 学会等発表

- 1) Hayakawa T: Points to Consider on Effective Development of Cells/Tissue-Based Products, *BIOJAPAN 2008*, Regenerative Medicine, Stem Cell, Yokohama, JAPAN (2008.10)
- 2) Hayakawa T: Some Aspects of Evaluation and Control Regarding Subsequent-Entry Protein Products, *AusBiotech 2008*, Melbourne, Australia (2008.10)
- 3) Hayakawa T: Current Topics in Japan

on Evaluation and Control of Biotechnology Products, *WCBP 2009: Symposium on the Interface of Regulatory and Analytical Sciences for Biotechnology Health Products*, San Francisco, USA (2009.1)

- 4) 早川 堯夫: ヒト細胞組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針について、(財)先端医療振興財団 シンポジウム (2008.10)
- 5) 早川 堯夫: バイオ医薬品の現状と将来、近畿大学卒業後研修会、(2008.11)
- 6) 早川 堯夫: 再生医療実用化に向けて、BTJ プロフェッショナルセミナー、東京、(2008.11)
- 7) 早川 堯夫: 再生医療実用化に向けたガイドライン、第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、東京 (2008.12)
- 8) 早川 堯夫: バイオロジクスにおける品質とは一改めて思いつくままに、バイオロジクスフォーラム第6回学術集会、東京 (2009.2)
- 9) 早川 堯夫: iPS細胞等も考慮した細胞製品の指針の整備状況について、第2回 iPS細胞研究産業応用懇話会、京都(2009.2)
- 10) 早川 堯夫: 再生医療の規制基準動向、レギュラトリーサイエンスの視点、第4回再生医療の技術動向に関する調査委員会、東京 (2009.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所薬品部長
協力研究者 加藤くみ子 国立医薬品食品研究所薬品部

要 旨

ICH の品質分野のガイドラインのテーマとして、医薬品ライフサイクル全体を通じた製造科学とリスク管理に基づいた新しい品質管理システム構築が提案され、その方針に基づいて、Q8、Q8Annex、Q9、10 という一連の品質ガイドラインの国際調和活動が進んできた。さらに現在原薬の製法に関するガイドライン Q11 が、バイオテクノロジー応用医薬品（バイオテク応用医薬品）の専門家も参加する形で ICH で国際調和が開始された。Q8-Q10 ガイドラインはバイオテク応用医薬品を適用対象に含むものであったが、バイオテク応用医薬品については新しい製剤開発・品質管理アプローチ（QbD アプローチ）の概念の適用について議論されてこなかった。そこで、バイオテク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ともに、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有効成分、不純物、安定性等の要素は、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との関係の解析、とりわけ、相互作用を示す複数のパラメータの関係の解析によりデザインスペースの定義が可能と思われるケースは限定的であることが予想される。しかし欧米では生産培養工程、カラムクロマトグラフィー工程等についての検討が行われており、またモノクローナル抗体の製法に絞った検討を行うためのコンソシアムが立ち上がっている。

A. 研究目的

ICH 品質分野の国際調和活動では、化学合成医薬品の規格および試験法、不純物、安定性、分析バリデーション等の主要な技術テーマに関する各ガイドラインの国際調和は終了し、さらに CTD-Q として、新医薬品の製造販売承認

申請に際して提出する資料に記載すべき品質関連の項目がリストアップされた。同時に、バイオ医薬品については、規格および試験法、遺伝子発現構成体の分析、細胞基質、ウイルス安全性評価、安定性試験に関する各ガイドライン、さらには製法変更時の同等性・同質性評価ガイ

ドラインが作成された。このように、ICH 品質分野では製品の品質特性に関する主要な技術課題についての国際調和ガイドライン作成はほぼ完成したといえる。

引き続き新たなテーマの検討が開始され、化成品質グループを中心として、2003年7月のブラッセル会議 GMP ワークショップにおいて、「製造科学とリスク管理手法を統合したアプローチによる、医薬品のライフサイクル（開発から市販後）全般に適用する新しい品質管理システムの構築」が提案され、今後品質の中心テーマにすることに三極は合意した。その後この合意に従い、「製剤開発に関するガイドライン」(Q8) および「品質リスク管理に関するガイドライン」(Q9) の国際調和が進みステップ4に達するとともに、「製剤開発 Q8 付属書」(Q8(R1)) および「医薬品品質システムに関するガイドライン」(Q10) も専門家会議の間での合意（ステップ2）に至った。さらにこれに続いて今現在、化学合成医薬品およびバイオテク応用医薬品の両方を適用対象とした原薬製法ガイドライン(Q11)の作成に向けた動きが始まっている。

昨年度は、Q8R Annex によってより具体的な内容が明らかとなった QbD アプローチについて、バイオテク応用医薬品原薬への適用の可能性について考察した。今年度はさらに、ICH における Q8-10 のインプリメーション作業の過程、および Q11 ガイドラインのドラフト作成の過程で、主に欧米でなされているアプローチについて調査し、まとめた。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果および考察

(1) ICH-Q8 ガイドラインにおける QbD のインプリメンテーションおよび Q11 ガイドラインドラフト

ICH 品質分野においては、Q8-10 ガイドラインの国際合意をうけて、さらに各局における国内への取り込み（インプリメンテーション）が図られている。また Q11 原薬ガイドラインについては、ドラフトゼロの作成が開始された。インプリメンテーションについては、デザインスペースの設定例、リアルタイムリリースの実現にむけた例、リアルタイムリリーステストの例、PAT への応用可能な各種分析手法の検討、デザインスペースの各局規制制度への取り込み方法の検討など、様々な活動が開始されている。

一方 Q11 の議論はブラッセルでの EWG で本格的に開始されたが、Q8 ガイドラインおよび Q8 Annex 作成時にされた、Basement approach についての再検討が提案されており、QbD Approach に集中していた Q8、Q8 Annex の議論に揺り戻しが生じている。これは新たにバイオテク応用医薬品の専門家がドラフト作成に加わった影響が大きいと考えられる。バイオテク応用医薬品においては、昨年の報告にも記したように、製造方法の解析を通じて得られた情報を基に、工程管理によって品質の一定性をはかるといふ品質管理戦略はもともと馴染みの深いものであった。ただし、バイオテク応用医薬品の場合、デザインスペースを広く適用するには困難が伴うと思われる。即ち、

(1) 有効成分、不純物、混入物質、安定性 と

いう品質特性パラメータを特定する上で配慮すべき要素はバイオテク応用医薬品の場合多様であり、工程パラメータと品質特性パラメータの関係の解析が困難なものも少なくない；

- (2) 上記パラメータ間の相互作用についても、科学的な解析が可能なものは必ずしも多くない；
- (3) 有効性・安全性へ悪影響を及ぼさない（即ち同等・同質といえる）品質特性の変動幅を、臨床データなしに求めることはバイオテク応用医薬品では困難なことが多い

等の理由により、デザインスペースの定義にあたって、判定基準となる CQA (Critical Quality Attributes) は、第三相臨床試験に用いたロットの品質特性に縛られることとなり、論理的に設定できるデザインスペースは限定的なものになるものと予想される。

したがって、製造方法に関するガイドラインは定義可能な範囲が不明確なデザインスペースに重きをおく QbD アプローチに焦点をしばるより、現状ではほとんどの製品の開発の際にとられている Basement アプローチも取り上げるべきという考えをもつバイオテク応用医薬品の専門家がいることが、Q11 の議論の揺り戻しの原因と思われる。

とはいえ、本報告は、以下バイオテク応用医薬品の製法開発における QbD アプローチの議論を取り上げることとする。

(2) バイオテク応用医薬品の開発における欧米で行われているデザインスペースの議論

QbD アプローチはまず標的製品プロファイル（製剤の望ましい品質、ひいては安全性及び有効性を保証するために理論的に到達すべき製剤の品質特性についての先を見越した要約）の考察に始まる。次に望ましい品質、安全性、有効性に影響を及ぼす品質特性からなる重要品質特性 (CQA) の特定に進む。CQA の特定

には、Q9 で用意されているような各種リスク評価法を用いることとなる。その際、研究室レベルでのデータ、関連物質に関して得られている文献データ、非臨床試験の経験、臨床試験の経験が重要となる。特定した CQA については、さらに開発過程でも品質上、非臨床データ、臨床データ等をもとに、CQA を精査してゆく (Q8Annex では示されていないが、ここで最終的に確認された CQA を Product Design Space と称する論文もある)。

続いて、(1) CQA に影響を及ぼす原料特性及び工程パラメータをリスクアセスメントで特定する；(2) デザインスペースの理解・定義に役立つようなデータをとるために実験計画法 (design of experiments(DOE)) を利用して、研究をデザインする；(3) 研究が実行され、デザインスペースの定義および重要性が決定される。(3) においては 故障モードとその影響の解析 (Failure mode and effects analysis (FMEA)) の手法がしばしば解析に用いられる。(資料1)

デザインスペースの解析例としては、(1) 培養工程の原料特性、培養液のパラメータ、操作パラメータに関する解析、(2) 精製工程、特にカラムクロマトグラフィーへの、遊離液のグラジエント条件、pH、流出速度、温度、ベッドサイズ等のパラメータの解析、などがあげられる。

(3) バイオテク応用製品における QbD アプローチ研究の新しい流れ

もう一つの新しい流れとしては、FDA の QbD に対する積極的な取り組みに対応するものとして、業界側が抗体医薬を特定した QbD アプローチ研究が開始されたことである。これは、7つの製薬大手企業 (Amgen, Genentech, Abbotto Bio Mediimmune(AstraZeneca)), GlaxoSmithKline Bio, Eli Lilly Bio そして Pfizer Bio) が参加してコンソーシアムを立ち

上げ、ICH Q8-10 に示された考えを反映させた、架空ではあるが現実的なモノクローナル抗体の製造工程プログラムを検討するというものである(資料2)。

近年に市販され、今後も開発されるであろう抗体医薬の多くは遺伝子組換え技術を利用して開発したキメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体であり、またその多くはIgGである。したがって相補性決定領域(CDR)以外は構造上極めて類似している。そのため、製造工程は共通性の高いものであり、標準的製造工程を考える際の材料として最適である。

昨年暮れに公表された、EMAの「モノクローナル抗体およびその関連製品の開発、製造、特性解析、および規格に関するガイドライン」(資料3)においても、「Platform manufacturing」という概念であらわされた考えが打ち出されており、モノクローナル抗体の製造工程のように、製品間で共通性の高い製造工程については、バリデーションデータなどは共有化可能な場合があることが示されている。

上記の活動を反映した学術集会も企画、開催されつつある(資料4)。

D. 結論

以上のようにバイオテクノロジー応用医薬品開発へのQbDアプローチの具体的な検討は米国を中心に開始されている。製造工程でいえば、生産培養工程、および精製工程のカラムクロマトグラフィーなどについては、具体的な成果もでてきている。また共通性の高い製造工程で生産可能な抗体医薬を例にとった検討は、有用な情報を提供するものと思われる。

しかし、昨年度の報告書に記したように、バイオテク応用医薬品の場合、品質解析手法の限界、分子多様性の存在、解析すべきパラメータの多様性、非臨床試験による安全性予想の限界等のため、品質特性の変化のヒトにおける安全

性、有効性への影響予測は、化学合成医薬品に比べると格段に難しい。したがってデザインスペースの適用は極めて限られたものになる可能性が高い。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka, S., Aso, Y., Osako, T., Kawanishi, T.: Wide-ranging molecular mobilities of water in active pharmaceutical ingredient (API) hydrates as determined by NMR relaxation times, *J Pharm Sci.*, **97**, 4258-4268 (2008)
- 2) Suzuki, T., Tamehiro, N., Sato, Y., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Shinozaki, Y., Nishimaki-Mogami, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Inoue, K., Ohno, Y., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression, *J Pharmacol Sci.*, **107**, 285-94 (2008)
- 3) Kadoya, S., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Glass-state amorphous salt solids formed by freeze-drying of amines and hydroxy carboxylic acids: effect of hydrogen-bonding and electrostatic interactions, *Chem Pharm Bull.*, **56**, 821-6 (2008)
- 4) Itoh, S., Hachisuka, A., Kawasaki, N., Hashii, N., Teshima, R., Hayakawa, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry, *Biochemistry*, **47**, 10132-54 (2008)
- 5) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: