

Dexamethasone 単独のフェーズⅢ試験では、組み合わせ治療を受けた患者の 45%で悪性度 3 (重篤) あるいはそれ以上の血栓症、発疹、神経障害、あるいは悪性度 4 (生死にかかわる) あるいはそれ以上の有害事象が起こった。

その他にもいくつかの肯定的な結果が固形腫瘍で得られ、部分的ではあるが肯定的な結果が悪性度の高い神経膠腫患者の治療で得られた。いくつかの有望な結果がカポジ肉腫、前立腺癌、骨髄様化生の骨髄線維症および神経線維腫症でも得られた。転移性黒色腫の患者における単独の薬剤として Thalidomide の抗腫瘍活性および毒性を評価するために設計されたフェーズⅡ試験では弱い活性しか示さなかったが毒性は許容できるものであった。腎癌において Thalidomide の活性を示す幾つかの証拠があったが、抗腫瘍活性に必要な投与量では強い毒性が起こり腎癌の治療には使用が勧められなかった。転移性乳癌の治療では肯定的な結果は得られなかった。フェーズⅢの最近の臨床試験結果では、多形成脳転移で頭蓋に放射線照射を受けた患者において Thalidomide は生存を改善しなかった。最近 50 以上もの Thalidomide の臨床試験が行われている。それは前立腺癌、卵巣癌、腎癌、小細胞肺癌および多形成骨髄腫のフェーズⅢ、多形成骨髄腫、血液癌、神経膠腫、グリア芽腫、肝癌、骨髄異形成症候群、子宮肉腫および小細胞肺癌のフェーズⅡで標準的な治療との組み合わせで評価が行われている。

C. 1. 7. 16 Lenalidomide

Thalidomide の有効性を改善し毒性を低下させる努力により、Lenalidomide が開発された。Lenalidomide は Thalidomide と類似した構造であるが、毒性プロファイルは極めて異

なっている。これまでの全ての試験における Lenalidomide の主要な投与量を制限する有害事象は骨髄機能抑制である。Thalidomide と異なり、Lenalidomide は鎮静および便秘を起こさず、神経毒性をほとんど誘導しない。動物モデルでは催奇形性を示さなかったが、Thalidomide と化学構造が類似していることから妊娠において禁忌である催奇形性を起こす懸念は十分にある。

以下にフェーズⅠ試験の結果を示す。再発性あるいは難治性多発性骨髄腫の患者 27 人において Lenalidomide の用量漸増試験フェーズⅠ試験が行われた。この試験では、少なくとも過去に他の薬剤のレジメンには反応しなかった患者が選択された。Lenalidomide の投与量は 1 日 1 回経口で 5、10、25、50 mg であった。この試験のデザインは 3 人の患者集団の投与量漸増であった。3 人の患者が最初の投与レベルに登録された。用量規定毒性の存在あるいは非存在を元に、患者がさらに同じあるいは次の投与レベルに登録された。登録された 27 人の患者のうち、25 人が Lenalidomide の治療を受けた。最初の 28 日の評価期間では、用量規定毒性はどの投与レベルでも確認されなかった。なお、25 mg の集団では患者の 1 人が悪性度 3 の血小板減少症 (血小板数 < 50,000) および患者の 1 人で悪性度 4 の好中球減少症 (好中球の絶対数 < 500 mm³) で試験から除かれた。治療が 28 日続いた後、50 mg 集団の患者 13 人のうち 12 人で悪性度 3 あるいは 4 の骨髄機能抑制が起きた。投与量が低下され増殖因子による支援治療が行われた。患者 12 人の全てにおいて 1 日 25 mg で治療を忍容することができた。したがって、1 日 25 mg が最大忍容投与量と規定された。全体として全患者の 60% および 16% がそれぞれ悪性度 3 あるいは

は4の好中球減少が起き、20%の患者で悪性度3の血小板減少症が起きた。他の最も共通な有害事象は足の痙攣、発疹、倦怠感、立ちくらみであり、全ては軽度から中程度の有害事象であった。薬物動態解析により、Lenalidomideは投与後1-1.5時間で血漿濃度が最大に達し、消出は単相であり消出の半減期が3.1-4.2時間であることが示された。治療した25人の患者のうち、24人である程度のレベルの反応が示された。24人の患者のうち、17人で少なくとも25%パラプロテインレベルが減少した。それには患者4人における50-75%の減少および患者3人における75%以上の減少が含まれている。この結果は腫瘍の負荷が低下したことを示している。最良の反応の中央値は2箇月であり、反応の中央値は6箇月であった。15人の患者の2番目のフェーズI試験でも同様な結果が示されると共に用量規定毒性が確かめられ、フェーズIIの1日の経口投与量は25 mgと確認された。

以下にフェーズII試験の結果を示す。フェーズIからの結果に基づき、フェーズII試験は再発性あるいは難治性の多発性骨髄腫におけるLenalidomideの有効性が評価された。試験では二つのレジメン、1日当たり経口で30 mgおよび1日に2回経口で30 mgが比較された。なお、フェーズI試験で用量規定毒性が25 mgであることが示されたのにもかかわらず、研究者が1日の全投与量として30 mgを選択した理由は不明である。両方のレジメンは28日を1サイクルとして21日行われた。治療2サイクル後に反応の評価が行われた。患者の病勢が進行あるいは安定化した場合、Dexamethasoneが14日毎に4日間毎日40 mgで経口投与された。登録された患者は過去に平均四つの治療を受けていた。61%の患者

は過去に幹細胞移植を、76%の患者はThalidomide治療を受けていた。最初は70人の患者がこの研究に登録され、それぞれの投与群で35人が治療された。暫定的な解析が57人の患者で行われた。この解析では1日1回の投与群に比べ1日2回の投与群では有意に悪性度3あるいは4の骨髄抑制が示された(41%対13%)。このような差異が生じた原因は不明である。したがって、2番目の32人の患者では1日当たり30 mgが投与された。

全ての患者の全奏成功率は25%であった。1日に1回の投与群において、全奏成功率は24%であり、6%が完全寛解し、12%が部分奏功に達した。さらに、43%で病勢が安定化した。1日2回の投与群では完全寛解はなく、部分奏功が14%であった。1日2回の投与群における病勢の安定は40%であった。無憎悪期間の中央値は1日に1回の投与群および2回の投与群でそれぞれ19と23箇月だった。登録した102人の患者のうち68人の患者(67%)でこの治療にDexamethasoneが付け加えられた。そのような治療を受けた1日に2回の投与群の患者のうち8人が組み合わせ治療に反応した(部分奏功6人、やや有効2人、病勢の安定1人)。1日1回の投与群の患者41人のうち12人が組み合わせ治療に反応性を示した(完全寛解1人、部分奏功8人、やや有効3人、病勢の安定13人)。治療に対する反応性を評価する際、過去のThalidomideによる治療がLenalidomideに対する反応に悪影響を及ぼすことを示す事例はなかった。全てのグループにおける全生存期間の中央値は27箇月であった。無憎悪生存期間は全体で平均4.6箇月であった。1日に1回の投与群における無憎悪生存期間は1日に2回の投与群よりも少し高かった(7.7箇月対3.9箇月)。Lenalidomide

治療に Dexamethasone を付け加えても生存に有意な変化を示すようにはみえなかった。二つの治療において最も共通した有害事象は好中球減少および血小板減少であり、それぞれ患者の 61%および 31%で示された。1日2回のグループの患者では血液学的な有害事象の始まりがより早いことが示された。また、神経障害および便秘の割合は1日に1回投与のグループよりも1日に2回投与のグループのほうが高かった。静脈血栓塞栓症が3人の患者で起き、そのうち1人が1日1回の投与グループ、2人が1日2回の投与グループであった。全てこれらの事象は Dexamethasone 添加後に起きた。要約すると、この試験により Lenalidomide の安全性プロファイルがさらに確かめられると共に多発性骨髄腫の治療における有効性が示され、フェーズIII試験でさらに検討するためのドアが開かれた。

以下にフェーズIII試験の結果を示す。難治性多発性骨髄腫の患者において Lenalidomide+Dexamethasone の組み合わせと Dexamethasone 単独を比較する二つのフェーズIII無作為試験の結果が2005年の米臨床腫瘍学会の年会で示された。MM-009 はアメリカおよびカナダの48の施設で行われた東アメリカ試験であり、MM-010 は海外の51の施設で行われたヨーロッパの試験である。二つの試験で、705人の患者が無作為に振り分けられ、28日を1サイクルとして1-21日 Lenalidomide を25 mg 経口でそして1-4日、9-12日、17-20日デキサメタゾン40 mg 経口であるいは同量の Dexamethasone 単独を経口で投与された。治療4サイクル後、Dexamethasone の投与量は28日毎1-4日40 mg に減量された。本研究では、少なくとも1度他のレジメンの治療を受けた患者を対象に

した。研究の主要評価項目は無憎悪期間であり、副次的評価項目は全生存、奏功率および安全性であった。

暫定解析では反応者が50%に達した時、Lenalidomide+Dexamethasone の組み合わせは Dexamethasone 単独よりも優れていることが証明された。北アメリカの試験において、組み合わせ治療における全奏功率は59.4% (完全寛解 12.9%、部分奏功 46.5%)、Dexamethasone 単独治療における全奏功率は23% (完全寛解 0.6%、部分奏功 20.5%) であった ($p<0.001$)。無憎悪期間は組み合わせ治療で有意に良好であった(15箇月対5箇月)。全生存も組み合わせ治療のほうが優っていた(29.6箇月対20箇月、 $p<0.0001$)。MM-010 試験でも同様な結果が示された。完全寛解は Lenalidomide+Dexamethasone の治療を受けた患者で13.6%、Dexamethasone 単独の治療を受けた患者で4%であった。ほとんど完全寛解および部分奏功がそれぞれ44%および20.6%であった。無憎悪期間も同様に異なっていた (Lenalidomide+Dexamethasone で15箇月、Dexamethasone 単独で5箇月)。これら暫時的な有効性のデータに基づき、両方の試験のデータの安全性をモニタリングする委員会から、試験を中止して全ての患者に Lenalidomide による治療を提供すべきであるとの勧告がなされた。

試験でみられた最も共通な有害事象は発疹、倦怠感、立ちくらみ、足の痙攣でありその程度は事実上軽度であった。悪性度3-4の有害事象には血球減少特に好中球減少が含まれた。MM-009 試験では、組み合わせ治療の患者の36%で悪性度3-4の好中球減少、11%で悪性度3-4の血小板減少が起きた。Lenalidomide を投与された患者では神経障害の頻度が高か

ったが、Thalidomideにおいてこれまで報告された頻度よりもはるかに低かった。全体として、神経障害、便秘、鎮静作用は Lenalidomide 治療を受けた患者の 5%以内で起こった。実際、Dexamethasone 単独の治療を受けた患者よりも Lenalidomide の治療を受けた患者のほうが下痢の出現する傾向は高かった。Lenalidomide のグループでは患者の 5.6%で心房細動を含む心臓に対する有害事象があった。

免疫調節薬剤治療により血栓塞栓症が起きる可能性は多くの報告がある。MM-109 試験では Lenalidomide を投与された患者は Dexamethasone 単独を投与された患者に比べて血栓症の発現が約 5 倍高いことが示された (15.3%対 3.5%)。MM-010 試験において静脈血栓塞栓症発症率の違いは依然有意ではあるが (8.5%対 4.5%)、それほど大きくはなかった。また、同時に行うエリスロポエチンの治療と静脈血栓塞栓症の頻度の増加が相関することが指摘された。

再発性あるいは難治性骨髄腫の治療において他の薬剤と共に Lenalidomide を評価する試験がさらに行われた。62 人の患者のフェーズ I および II 試験では Lenalidomide とリポソームの Doxorubicin hydrochloride (40 mg/m²) が 1 日目に静脈投与、Vincristine sulfate (2 mg) が 1 日目に静脈投与、Dexamethasone が 28 日毎に 1-4 日経口投与された。その結果 7.5 箇月の中間フォローアップで全奏成功率は 75%であった。反応がみられた患者の 29%は完全寛解あるいはほぼ完全寛解であった。しかし、組み合わせ投与における Lenalidomide の 1 日最大忍容投与量はわずか 10 mg であることがわかった。用量規定毒性は非好中球減少敗血症であった。全生存期間の中央値は決定でき

なかったが、無増悪生存期間は 12 箇月であることがわかった。別の再発性あるいは難治性骨髄腫のフェーズ I 試験では Lenalidomide + Bortezomib ± Dexamethasone が評価された。この組み合わせでは、Lenalidomide は 1 日当たり経口で 15 mg および Bortezomib は静注で 1 mg/m² が最大忍容投与量であることがわかった。36 人の患者における全奏成功率は 58%であった。奏功期間の中央値は 8 箇月であった。これらの研究で高い奏成功率が示されたことから、Lenalidomide と化学療法の組み合わせについてさらに研究する必要性が示されたが、組み合わせ治療における毒性プロファイルは有意に高いため、Lenalidomide と化学療法を組み合わせる場合には注意する必要がある。

以下に新たに診断された多発性骨髄腫における臨床試験の結果を示す。再発性あるいは難治性の設定における Lenalidomide 試験の結果が非常に良好であったことから、新たに多発性骨髄腫と診断された患者における評価が行われるようになった。フェーズ II 試験が新たに多発性骨髄腫と診断された 34 人の患者で行われた。公表された試験の最新の結果が米血液学会の 2006 年の年会で示された。患者は標準的な投与量の経口 Lenalidomide および Dexamethasone (28 日を 1 サイクルとし 1-21 日に 25 mg の Lenalidomide、1-4 日、9-12 日、17-20 日に経口で 40 mg の Dexamethasone ; 4 サイクルの治療後 Dexamethasone の投与量を 28 日毎に 1-4 日経口で 40 mg に減少) で治療された。深部静脈血栓症のリスクを軽減させるため、患者は予防的に毎日経口で 81 mg あるいは 325 mg のアスピリンを投与する必要があった。研究の主要評価項目は治療に対する反応性であった。反応の評価基準には、非常に良好な部分奏功およびほぼ完全に寛解という二

つの新たな評価項目が骨髄腫における反応の評価に取り入れられた。登録された 34 人の患者のうち 31 人で治療に対する反応が示された（完全寛解 6 人、非常に良好な部分奏功 13 人、部分奏功 12 人）。34 人の患者のうち 13 人で治療に対する反応が得られ、その後自己幹細胞移植の開始を選んだ。残りの 21 人の患者は平均 19 サイクルの治療を受けた（範囲、2-30）。これら 21 人の患者のうち 67%で完全寛解あるいは非常に良好な部分奏功が示された。無憎悪期間、パイパー疲労自己報告スケールおよび全生存期間の中央値は発表の時点では達さなかった。悪性度 3 あるいはそれ以上の非血液毒性が患者の 55%で起こった。最も共通な非血液毒性には倦怠感、筋力低下、不安神経症、肺炎、血栓塞栓症が含まれた。患者の 1 人が深部静脈血栓症を発現したが、その頻度は血栓塞栓症から予想されるものよりも低く、再現性はなかった。進行性の疾患の Lenalidomide の試験で見られた毒性に比べると、重篤な血液毒性が起きる率は有意に低かった。悪性度 3-4 の好中球減少が患者の 12%で起こり、全ての血小板減少は悪性度 1-2 であった。米国東海岸臨床試験グループおよび南西臨床試験グループは現在新たに多発性骨髄腫と診断された患者において Lenalidomide + Dexamethasone 対 Dexamethasone 単独の大規模無作為 2 重盲験プラセボコントロール試験を行っている。南西臨床試験グループの試験は 2006 年 3 月終了する見込みであり、まだ治療していない患者に対して継続されている。

以下に FDA により表示された適応症を示す。MM-009 および MM-010 試験のデータに基づいて、FDA は過去に 1 回治療を受けた多発性骨髄腫の患者において Dexamethasone との組み合わせ治療で Lenalidomide を 2006 年 6

月に承認した。

C. 1. 1. 7. 17 CAI

CAI (Carboxyamido-Triazole) は低分子量の合成化合物であり、細胞内カルシウムの流入を阻害する。CAI は内皮の接着および伸展の抑制、遊走の抑制およびアポトーシスの誘導を介して内皮細胞の増殖および浸潤を阻害する。CAI は *in vitro* における MMP2 および VEGF の発現、動物モデルにおける VEGF および IL-8 の発現を減少させる。CAI はカルシウム依存的な血管新生 NO 合成酵素 VEGF 経路をブロックすることにより、Matrigel および大動脈輪アッセイにおいて血管の形成、ニワトリ絨毛尿膜アッセイにおける血管新生を阻害する。

臨床試験において、CAI は *in vitro* において細胞のシグナルを調節する範囲の血漿濃度で腫瘍の容積および転移速度を安定化し、場合によっては低下させた。CAI の抗血管新生および抗転移活性は、経口投与の可能性を含めて進行性固形腫瘍あるいは難治性リンパ腫の患者のフェーズ I 試験において Paclitaxel との組み合わせで最近評価されている。

C. 1. 7. 18 NM-3

NM-3 は経口投与が可能な Isocoumarin 誘導体であり、ヒト繊維芽細胞および多くの腫瘍セルラインで低酸素誘導性の VEGF 発現を抑制する。NM-3 は *in vitro* において HUVEC の増殖を阻害し、その濃度は正常繊維芽細胞あるいは腫瘍細胞 (HT29、MKN28 および MCF-7) の阻害に必要な濃度の 1/10 以下である。この効果は反応性酸素種の産生を介している。NM-3 は *in vitro* において内皮の発芽および管腔形成を阻害し、ルイス肺癌およびヒト腫

瘍の異種移植に対して *in vivo* の活性を示し、有害事象を増加させないで化学療法および放射線療法の抗腫瘍効果を増強させる。NM-3 は進行性固形腫瘍の患者のフェーズ I 臨床試験で最近評価されている。

C. 1. 7. 19 Tecogalan

Tecogalan は *Arthobacter* バクテリアの培養上清から分離されたポリサッカライドペプチドグリカン複合体である。Tecogalan は *in vitro* のウシ脈絡膜内皮細胞の bFGF により誘導される増殖、遊走および管腔形成を阻害する。Tecogalan はニワトリ絨毛尿膜における血管新生、bFGF により誘導される角膜の新血管形成、マウス腫瘍 M5076 細胞により誘導される皮下血管新生を阻害する。Tecogalan は皮下移植 B16 メラノーマ細胞の成長を顕著に阻害し、ヒト乳癌細胞の腫瘍異種移植の成長を阻害する。Tecogalan の抗血管新生活性は u-PA および MMP1 の阻害だけでなく特に bFGF のようなヘパリンに結合する血管新生促進因子の抑制に関係していることが提案された。Tecogalan は化学療法に難治性の腫瘍を有する患者のフェーズ I で試験された後開発は中止された。

C. 1. 7. 20 Aeroplysinin-1

Aeroplysinin-1 は各種の海綿動物から分離される Bromotyrosine である。Aeroplysinin-1 は主に内皮細胞の分化を阻害することにより、*in vitro* および *in vivo* において血管新生を阻害する。Aeroplysinin-1 は増殖している内皮細胞においてアポトーシスを誘導し、そのタンパク質分解のバランスを変化させることにより浸潤のフェノタイプを低下させ、*in vitro* における内皮細胞の遊走および浸潤を抑制する。

Aeroplysinin-1 の抗腫瘍および抗血管新生活性の評価および作用機構の解明に関する研究が *in vivo* において現在も継続して行われている。

C. 1. 8 RNAi を用いた治療薬のデリバリー

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. 8. 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三分の一から三分の二に低下した。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 μ g 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、肺に対する病理性的な変化が起きた。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. 8. 2 リポソームとリポレックス

リポソームは薬剤の薬動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。現在このリポソームを用いて siRNA を細胞にデリバリーする例が急増している。リポ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。形成されたリポ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。対照的にリポ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。リポ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。リポ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ポ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。

リポソームを介した 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

ポタンパク質はそれぞれ 65%及び 85%以上低下した。注目すべきことに、SNALP 処方した siRNA を 2.5mg/kg で単回静脈内投与すると抑制が少なくても 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。他の陽性リポソーム系ではマーマセツドで 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、リポソームで処方した G 型肝炎ウイルスに対する siRNA を 1 回 5mg/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、中性のリポ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 150µg/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することも示されている。中性脂質を基にした処方は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 を膈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膈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 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 の膈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. 8. 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 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. 8. 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) が無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。

C. 1. 8. 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. 8. 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。

C. 1. 8. 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ヘ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ィッシ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. 1.9 RNAi を用いた治療薬の臨床試験

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 投与は内在性ス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-RAV01 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癒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。

C. 1. 10 今後の課題

C. 1. 10. 1 抗血管新生治療薬

C. 1. 10. 1. 1 抗血管新生治療薬が最大の治療効果をもたらす最適なタイミング

抗血管新生治療薬のデリバリーに伴い血管の正常化が起きるが、それが最適に起きるある特定の期間が存在することに注意する必要がある。VEGFR2 に対する抗体を評価するマウスの研究で、血管の正常化が起きる最適な期間は約6日間続き、腫瘍の酸化および血管周皮細胞の被覆の増加が特徴であった。この考えと一致して、VEGF および bFGF のシグナルをブロックする薬剤である thalidomide で動物をその最適な期間処理すると、腫瘍の酸化およびマウス繊維肉腫の放射線に対する反応性が増加することが示された。このように最大限の治療効果を得るため、将来の研究は化学療法剤あるいは放射線と共に抗血管新生治療薬を投与する最適なタイミングの特定に焦点を合わせる必要がある。

C. 1. 10. 1. 2 抗 VEGF 戦略における潜在的な落とし穴

VEGF を標的とする分子の臨床における成功から、この治療はヒト癌の治療において正当であることが立証されている。しかし、広範囲のヒト癌に対してこの戦略が一般的に適用できるかどうかについては不安がある。難治性乳癌におけるペバシズマブ治療の有効性を調べるフェーズIII臨床試験、VEGF チロシンキナーゼ阻害剤である SU516 の臨床試験でみられるように、VEGF を標的とすることは全ての

タイプの癌について十分な治療効果を得るといふ観点では単純に満足できるものではないかもしれない。

VEGF はヒト癌の約 60%で発現するかアップレギュレートされているが、残りの VEGF を発現していない約 40%では抗 VEGF 戦略に影響されない。癌は bFGF、PDGF、EGF のような VEGF 以外の血管新生促進因子を発現して血管新生を促進する。さらに、ほとんどのタイプの癌は 1 種類以上の血管新生促進因子を発現し、腫瘍の進行の過程においてこれら血管新生促進因子の発現が変化する。VEGF を標的とする分子は成功しているが、抗腫瘍戦略および単独の抗 VEGF 戦略を用いる場合には癌の表現系を考慮に入れる必要がある。

C. 1. 10. 1. 3 抗血管新生療法の有効性を増加させる戦略

先に述べたことと関連するが、血管新生は多くの分子が関与する複雑なプロセスである。さらに、そのプロセスには複数の分子が関与する可能性があり、血管の発達の間様々な因子が異なる時間で作用する。腫瘍の血管新生におけるその重要性から、最近の治療は VEGF のブロックに主に焦点が合わされてきたが、将来の抗血管新生治療はそれに加えて他の血管新生経路も標的にすることを考える必要がある。例えば、抗 HER2 抗体トラスツズマブ (Herceptin) は複数の血管新生経路をブロックすることが最近示された。また、単一の増殖因子のみを標的として治療した患者では腫瘍内に変異が生じ、他の血管新生タンパク質の活性化を導く。その結果、治療に対して抵抗性が生じる。したがって、複数の血管新生メディエーターの機能を同時に標的とする戦略が必要である。

化学療法剤による抗腫瘍効果を増大させる方法としてメトロノーム療法が注目されている。この療法は腫瘍内皮細胞に対する感受性を高めるために、化学療法剤をメトロノームのようにあるいは少量を再度にわたって投与すると、抗血管新生効果が増強されるというものである。このようなより治療効果の高い化学療法と抗血管新生治療薬の組み合わせにより、有害効果を最小限にした状態で最大限の治療効果が得られる。

C. 1. 10. 1. 4 血管新生に関する理解の進歩

ここ数年間で血管新生についての理解に関する急速な進歩がシグナル伝達系およびその調節に関して得られた。これにより有望で興味ある薬剤を開発することが可能となったが、さらなる進歩がこの領域で待たれる。特に最近興味深い知見は、p53 タンパク質の変異がヒト癌の 50% で観察され、その結果抗血管新生治療に対する抵抗性が低下することである。また、低酸素誘導性アポトーシスに対して抵抗性になる。さらに、腫瘍細胞の酸素要求性が低下した結果、新血管形成における酸素の依存性が低下する。アポトーシス抵抗性に関与する遺伝子である bcl-2 の誘導も観察されている。今後、異なったシグナル伝達系のクロスオーバーによる活性化の機構もさらに明らかにする必要がある。

C. 1. 10. 1. 5 抗血管新生治療薬の有害効果の低減

今後化学療法と抗血管新生治療薬のより治療効果の高い組み合わせが開発されると思われる。その際、あまりにも効果的にブロックしすぎることによる安全性の懸念（例、創傷治癒の傷害、腎臓、甲状腺、肺、脳および心臓にお

ける有害効果）と完全な血管新生のブロックにおいてバランスをとることが重要となる。複数の経路を標的として抗血管新生治療薬を慎重に投与することにより、有害作用を誘導しないで最適な治療効果を得ることが可能になると思われる。

抗血管新生治療の最適な投薬量は将来の研究において重要な問題である。最大耐量を用いるという概念は先に述べた治療法には適用できないことが非臨床のデータから示唆されている。ある研究では、VEGF 活性を抑制すると複数の器官における正常血管に有害作用が及ぼされる。VEGF ブロックの初期の用漸増臨床試験では用量の増加により抗血管新生活性に直接関連する有害効果が増加する場合があることが示唆されている。

C. 1. 10. 1. 6 抗血管新生治療薬の適切なエンドポイントの設定

これまでの抗血管新生臨床試験において成功に導く妨げとなっている原因の 1 つは、投薬および有効性が評価可能な信頼できるエンドポイントが不足していることである。これまでの化学療法レジメンの最大耐量はフェーズ I の用量規定毒性により決定されるが、その値はその後の臨床試験において活性を有する投与範囲を示す。この範囲における活性は腫瘍切片断面積における 50% の低下が設定した期間内に得られるなら、許容できる有効性は客観的な奏功により評価される。これら投薬および結果の基準は抗血管新生治療薬に適応することが困難な場合がある。

投与を限定するような毒性は天然由来の抗血管新生治療薬ではほとんどみられず、その活性は研究した最大投与量以下で十分である。血管新生阻害による増殖抑制により短期間では

腫瘍のサイズは低下しない。症状の安定および無増悪期間は妥当なエンドポイントであるが、このようなエンドポイントは長いインターバルで示されても初期の臨床試験では示されない。したがって天然由来の抗血管新生治療薬において推定される最適生物学的投与量はフェーズ I で決定され、有効性は無増悪期間および生存に関するデータが得られる前にフェーズ II/III 試験で示されるために、有効性の指標となるサロゲートマーカーが必要となる。そこで最近有用なサロゲートマーカーに関する検討が行われている。

抗血管新生治療薬の投与前および投与後組織におけるバイオマーカーの発現は活性を有することの証拠になる。レーザースキャニングサイトメトリー (LSC) は研究治療薬の標的タンパク質、アポトーシスを受けた内皮細胞の割合、腫瘍血管密度を含む血管新生に関連した組織バイオマーカーの定量的な評価に用いられる。LSC を用いたエンドスタチンのフェーズ I 臨床試験で、中間の投与レベルで治療した患者において内皮細胞死および微小血管密度の統計的に有意な変化が起こり、その中の 2 人は軽微な抗腫瘍奏功を示した。しかし、繰り返しの生検を行う場合、生検を腫瘍から採取することが必ずしも容易ではないこと、生検に固有のリスクが患者にあることから非侵襲性的方法を考案する必要性があることが指摘されるようになった。

血管新生促進因子は癌患者の血清、血漿および尿において検出可能であり、抗血管新生治療における発現の変化は有効性を示す指標となる可能性がある。エンドスタチンの三つのフェーズ I 試験で、軽微ではあるが客観的な抗癌奏功が示された。しかし、血漿あるいは尿における ELISA を用いた VEGF、bFGF、vascular

cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) あるいは E-selectin の測定で治療効果の推移とは関連しなかった。血漿 VEGF における有意な低下が転移性腎臓癌の IM862 のフェーズ II 試験で示されたが、奏功とは関連しなかった。治療効果とは矛盾する結果がアンジオスタチンで示され、尿中 VEGF および bFGF の減少を引き起こす治療では有意な治療効果はなかった。したがって、現在これらサロゲートマーカーにより治療効果を判定することは妥当ではないように思われる。これは血管新生の不均一性によるもので、腫瘍により血管新生促進タンパク質の依存度が異なると共に血管新生を得るための系およびその能力も異なる。腫瘍の血管新生状態を正確に決定するには、このような個別のマーカーよりもむしろ血管新生に関与する一連のメディエーターを測定する必要がある。これは全タンパク質のプロファイルが分析できるプロテオミクスを用いたアプローチが進歩すれば達成可能である。これに関連し、血清プロテオミクスの変化によりアンジオスタチン、carboplatin、paclitaxel を用いた非小細胞肺癌の治療効果を予測する試みとして、Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS) の有用性が報告されている。また、同様なプロテオーム研究で、尿道の外側を含む様々なヒト癌の感度の良いバイオマーカーとして尿中の MMP が有用であり、a disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM-12) のような MMP のレベルと疾患の程度との間に直接的な相関があることも示されている。

VEGF により誘導される血液循環内皮前駆細胞の動員は腫瘍の新しい血管形成に重要な役割を果たしている。血管新生の阻害剤は血液

循環内皮前駆細胞の数を減少させ、傷害を受けた腫瘍内皮の脱落により遊離される血液循環内皮細胞を増加させる。これら細胞型のフローサイトメーターを用いた測定により抗血管新生治療薬の有効性が示されるかもしれない。エンドスタチンのフェーズII試験において、治療により5人で症状が安定し1人で軽微な奏功を示す7人の患者のうちの6人で、最初の2ヶ月以内に血液循環内皮細胞が2倍以上に増加することが示された。血液循環内皮前駆細胞および血液循環内皮細胞が進行中の天然由来の抗血管新生治療薬の試験で最近評価されている。放射断層撮影法(PET)、動的造影増強磁気共鳴イメージング(DCE-MRI)、三次元超音波のような非侵襲的なイメージング技術により腫瘍の血流、血管の透過性の変化が解析できる。また、PETにより代謝の変化の解析ができる。フェーズI試験においてDCE-MRIおよびPETによりCA4Pの抗血管新生活性が確認できた。PETはエンドスタチンのフェーズI試験において腫瘍の血流および腫瘍の代謝の変化を調べるためにも用いられた。エンドスタチンは腫瘍血流を低下させたが、代謝における結果は複雑で、低投与治療では増加したが最大投与量では減少した。しかし、2つの他のグループによる臨床研究では、エンドスタチンの投与量と腫瘍血流あるいは代謝との相関を示すことはできなかった。

症状の安定、無憎悪期間、最終的には患者の生存のような根拠のある結果とバイオマーカーの比較によりこれら予備的な知見を確認し、バイオマーカーの候補の妥当性を綿密に評価する努力が今後もさらに必要である。

C. 1. 10. 1. 7 従来の化学療法薬を血管新生の阻害剤として使用する際に考慮すべき基準

血管新生を阻害する新しい戦略の探究に多くの関心がよせられたことにより、化学療法で従来から使用されている多くの細胞傷害性化合物の抗血管新生活性が評価されるようになった。多くの化学療法剤は抗血管新生活性を示すことが報告されているが、これらと臨床的ににおける結果との関連は不明である。

抗血管新生治療を対象としたこれら化学療法剤は以下のように分類できる。

- ① 腫瘍細胞を殺傷するよりも低い投与量で血管新生内皮細胞に毒性を示す化合物
- ② 細胞死を起こさないで活性化された内皮細胞の機能を抑制する化合物
- ③ 血管新生の過程のどこかを特異的に抑制する化合物
- ④ *in vivo*のアッセイにおいて血管新生を抑制する化合物

抗血管新生治療で評価されている多くの抗腫瘍活性を示す化合物のなかで、Taxaneが突出した効果を示している。2種類のTaxaneが最近臨床で評価されており、Paclitaxel (Taxel) および Docetaxel (Taxotere)は強力な放射線感作剤として作用することにより、各種の固形腫瘍において抗腫瘍活性を示す。これらの化合物に対する内皮細胞の感受性は腫瘍細胞に比べて10-100倍高いことが最近報告されている。さらに、これらの化合物は主に内皮細胞の増殖および分化を阻害し、アポトーシスを誘導する。これらの効果は、DocetaxelのほうがPaclitaxelよりも10倍以上活性が高い。これら全てのデータは血管新生阻害剤としてTaxaneの臨床試験を計画するうえで考慮すべきである。したがって、従来の化学療法では通常最大限忍容な投与量で投与後長期間休止するが、抗血管新生としての化学療法ではこれら薬剤を低濃度で長期間使用する必要があると