

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。

#### 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機会が多い。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タンパク質粒子に取り込まれ、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タンパク質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。

#### 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イミン(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を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。

## 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は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。

## 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。

### 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の単回ボー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学、分布、毒性研究において AKI-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、AKI-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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。

## 10 今後の課題

### 10-1 抗血管新生治療薬

#### 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。

#### 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う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。

### 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った時間で作用する。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。

### 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。

### 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。

#### 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の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腫瘍奏功が示された。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p

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CAAP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、無増悪期間、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。

#### 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 Taxene 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思われる。

#### 10-1-8 抗血管新生療法としての分子標的薬剤の問題点と今後の課題

##### 10-1-8-1 各種 VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤

VEGF リガンド受容体ネットワークに対する理解が深まったことおよび各種 VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤で好ましい臨床結果が得られたことにより、この新しい治療アプローチが腫瘍学の領域における重要な治療モダリティとなる可能性が高まった。しかし、臨床および方法論において幾つかの解明すべき問題がある。それらは、①異なったチロシンキナーゼを単剤あるいは化学療法との組み合わせで治療した場合相反する臨床結果が得られている原因、②VEGFR チロシンキナーゼを長期間投与した場合における安全性、③今後の分子標的薬剤を用いる臨床試験において評価項目および方法論的なアプローチについて研究を開始する必要性である。これらの薬剤で抗腫瘍活性が異なっているのは、分子標的および活性が異なっていること、あるいは単に臨床試験において非有効投与量を選択したことにより説明できる。分子標的薬剤について最適な投与量およびスケジュールを設定することは重要な課題である。さらに、肺癌における EGFR で報告されているように、標的が高く発現していることと標的薬の反応性とは必ずしも相関しな

い。Bebacizumab を用いた抗 VEGF 治療と化学療法を組み合わせた場合、幾つかのフェーズ III 試験で全生存およびパイパー疲労自己報告スケールが優れており、腫瘍と内皮細胞の両方を標的とするとう有効性が高まる可能性が確認された。これらの結果と VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (Vatalanib, Semaxinib) で見られた結果が異なる理由については解明されていない。Semaxinib の場合、重篤な毒性を示すこと、この薬剤を静脈に長期間投与することは患者に不利益となることから、この薬剤の開発を中止することが強く勧告された。Vatalanib の場合は以下のように幾つかの理由が考えられる。①この薬剤の半減期は短いため、1日に1回の投与では不適切である。②未知の薬物間相互作用がある。③以下に述べるように、血管周囲の細胞における PDGFR-β を標的とすることにより、反対に有効性が低下する可能性がある。PDGFR-β をブロックすると、血管周囲の細胞の動員がブロックされることにより血管の正常化が阻害され、その結果組み合わせ治療による相乗的な効果が抑制される。一方、PDGFR-β をブロックすることにより周皮細胞による腫瘍内皮細胞の安定化が抑制される可能性もある。最近、単剤としての複数標的チロシンキナーゼ阻害剤と化学療法を組み合わせると、Bebacizumab+化学療法により誘導される相乗効果を再現できるという仮説が提唱された。この考えは、腎細胞癌および Imanitinib 抵抗性の胃腸間質腫瘍における Sunitinib 治療、腎細胞癌における Sorafenib 治療のように単剤として複数標的チロシンキナーゼ阻害剤を用いた臨床試験で最近報告されている肯定的な結果から支持される。この仮説は、進行性非小細胞肺癌において化学療法と他の複数標的薬剤である ZD6474 の組み合わせでみられた初期の肯定的な結果は大いに異なっているように思われる。しかし、化学療法による活性の増強は低投与量の ZD6474 (100

mg) では多くの場合みられているが高投与量 (300 mg) ではみられていない。興味深いことに、このキナーゼ阻害剤は EGFR よりも VEGFR に対する親和性が高い。従って、Bebacizumab と化学療法でみられているように、この薬剤は低投与量では VEGFR-2 のみを阻害し細胞傷害性薬剤の有効性を促進すると考えられる。一方、高投与量では、VEGFR と EGFR の両方を阻害するため Docetaxel との相乗効果はみられないということはある。この知見は EGFR 阻害剤と化学療法の組み合わせで報告されている否定的な結果と一致している。このような理由により、VEGF/VEGFR ファミリーの血管新生における役割および VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤の作用機構をさらに解明することが必要である。

これら薬剤を長期間投与した場合に起きる有害事象は、この点に関する知識が不足していることおよび病勢が進行しない患者では長期間治療を行うことを考慮すると問題となる。高血圧は VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤による治療における最も共通な有害事象の一つである。高血圧が発症する機構は不明であるが、血管が希薄になること、内皮が機能不全になること、亜酸化窒素の代謝が変化することに起因する可能性がある。しかし、高血圧は薬物療法で対処可能である。倦怠感も他の共通の有害事象であるが、処置時間はほとんど影響されない。他の有害事象はこれら薬剤により共通してみられ、Vatalanib では頭の軽さ/目まい、運動失調、Sunitinib では下痢、粘膜炎、皮膚毒性、Sorafenib では食欲不振、下痢、皮膚毒性、ZD6474 では補正 QT 間隔の持続であった。しかし、これら薬剤が長期間投与される患者の数が増大すれば、有害事象が今後増えることが予測される。

これら薬剤の臨床開発における最適な方法論のアプローチに関しては様々な未解決の問

題が存在する。フェーズ I 試験における主要な問題は、これら化合物が適切な生物学的活性を示す投与量の確認である。最小標的阻害投与量は最大忍容投与量とは異っており、その量は薬剤の開発の非臨床試験の段階で同定された生物学的なサロゲートバイオマーカーを用い妥当性が検証された測定系により決定すべきである。非臨床の有効性を臨床の設定にトランスレートする場合において困難な点は、適切で予測可能な非臨床モデルが不足していることである。試験する投与量およびスケジュールは準最適であり、血漿レベルが *in vitro* の研究から得られた阻害濃度以上で得られてもそれは適切な評価項目とはならない。フェーズ II 試験のデザインでは例えば無憎悪期間あるいは成長調節インデックスのような革新的な活性に関する評価項目を設定すべきである。転移性腎癌患者における Sorafenib の活性を示すために選択された無作為中断デザインは薬剤の病勢安定効果の評価が可能であり、感受性のある患者を同定可能な信頼できるアッセイがない場合には標的薬剤における初期の開発に特に適している。フェーズ III における試験デザインには、生物学的に活性を示す患者の選択基準および活性が予測可能な生物学的マーカーを含むべきである。患者は標的指向性を基に選択すべきであり、疾患指向性を基に選択すべきではない。興味のある問題は、最適な臨床試験を設定してこれらの化合物を評価することであり、非臨床の研究から示唆されているように可能ならば腫瘍の負担が軽い患者から構成したほうが望ましい。過去にさまざまな化学療法で治療されて従来の治療では抵抗性である腫瘍の負担が大きい患者では、既存の腫瘍を縮小させないで細胞増殖を抑制する標的薬剤による治療効果は低い。今後の大きな課題は VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤を細胞傷害性薬剤、ホルモン療法、放射線治療あるいは他の生物学的薬剤と組み合わせることにより、相乗的な抗腫

瘍効果を目指して治療することである。

#### 10-1-8-2 進行性非小細胞肺癌の治療における Sorafenib および Sunitinib

進行性非小細胞肺癌の Sorafenib および Sunitinib による治療は化学療法との組み合わせ、他の標的治療との組み合わせ、単剤治療で将来発展する可能性がある。Sorafenib+化学療法対化学療法単独の二つの独立した無作為フェーズIII試験が進行中であり、一つは化学療法レジメンとして Carboplatin+Paclitaxel もう一つは Cisplatin+Gemcitabine である。Sorafenib 単剤による米国東海岸癌臨床試験グループ試験が、過去に治療経験のある非小細胞肺癌の患者で進行中であり、これは大規模な無作為中止試験である。さらに、この薬剤による治療効果を最大限に引き出すことを目的として、進行性固形腫瘍において各種化学療法剤 (Irinotecan、Dacarbazine、Gemcitabine) あるいは分子標的薬剤 (Gefitinib) と Sorafenib を組み合わせた各種フェーズ I/II 試験が進行中である。特に、Sorafenib+Gefitinib のフェーズ I 試験では Sorafenib と Gefitinib はそれぞれ 1日に2回 400 mg および毎日 250 mg という治療効果が十分期待される量で組み合わせることが可能であることが示された。進行性の固形腫瘍の患者 17 人で行われた Sorafenib と Erlotinib のフェーズ I 試験から、フェーズ II の推奨投与量は Sorafenib で 1日 2回 400 mg、Erlotinib で 1日 150 mg と十分な推奨投与量であり、有害事象は許容できることが示された。進行性非小細胞肺癌の年長者患者 (>70 歳) あるいは一般状態が 2 の患者における Sorafenib+Gemcitabine そして Sorafenib+Erlotinib のフェーズ II 無作為試験が始まった。進行性非小細胞肺癌の治療において Bebacizumab で良好な結果が得られていることを考えると、化学療法および Erlotinib の

組み合わせ、Sorafenib あるいは Sunitinib と Bebacizumab の組み合わせは非常に興味深い。フェーズ I の進行性固形腫瘍の治療において Sorafenib は Bebacizumab との組み合わせで用量漸増試験が行われた。この試験では、Sorafenib および Bebacizumab の単剤投与でみられるよりも臨床効果が増大するが有害事象も増加させるように思われた。本研究から示唆された今後の研究における投与スケジュールは、1週間のうち 1-5 日、1日に 2回 200 mg の Sorafenib および 2週間 5 mg/kg の Bebacizumab であった。

Sorafenib は Bebacizumab 抵抗性の非小細胞肺癌の治療で将来発展する可能性がある。幾つかの興味あるデータが転移性腎細胞癌で最近報告されている。Bebacizumab のように VEGF と結合する薬剤に抵抗性の患者における Sunitinib の活性が Bebacizumab 難治性の転移性腎細胞癌で行われたフェーズ II 試験で評価されている。Bebacizumab に抵抗性の腫瘍では部分的に Sunitinib に感受性の経路を介して成長が促進されるという仮説が立てられた。登録された 60 人の患者のうち 32 人で反応が評価された。26 人の患者 (81%) である程度腫瘍が縮小し、その中には客観的な部分奏功を示した患者が 4 人いた (13%、95%信頼区間、4-29)。このように、Sunitinib は Bebacizumab 難治性の転移性腎細胞癌の患者において十分な抗腫瘍活性を示し、Sunitinib は Bebacizumab の抵抗性に関与するシグナル伝達経路を阻害することが示唆された。Bebacizumab に抵抗性の腫瘍における Sunitinib に対する反応の正確な作用機構を今後明らかにする必要がある。

最近提出された非常に興味深い非臨床モデルにおいて、非小細胞肺癌を含む固形腫瘍の治療に Sunitinib を臨床応用できる可能性が示唆された。他の難治性末期臓器癌に対する有効性を向上させるため、Imanitib と Sunitinib

が PDGFR- $\beta$  を介した周皮細胞による腫瘍内皮細胞の安定化を抑制することを期待して、最大忍容投与量あるいはメトロノーム化学療法そして VEGFR の阻害の組み合わせで用いられた。Imantinib は単独治療としては有効性が疑わしいが腫瘍血管に対する周皮細胞の被覆を減少させ、メトロノーム化学療法あるいは VEGFR 阻害剤との組み合わせで有効性を増強した。これら三つの全てを含むレジメンはさらに効果的であった。Cyclophosphamide を最大忍容投与量用いると一過性の退行が起きるがすぐに再成長する。一方、Imatinib+Cyclophosphamide のメトロノーム療法では安定した病勢が得られた。最大忍容量のレジメンでは腫瘍細胞のアポトーシスは引き起こされるが内皮細胞のアポトーシスは起きない。一方、他のレジメンでは有効性と一致して内皮細胞のアポトーシスを増加させる。連続した最大忍容投与量とメトロノーム化学療法を含む chemo-switch プロトコールでは、PDGFR- $\beta$  および VEGFR の複数を標的した阻害が重なり、完全寛解および前例のない延命効果が得られた。この研究の戦略は、標準治療化学療法の次に新規の維持レジメンで治療するというものである。すなわち、PDGFR- $\beta$  を標的として周皮細胞により腫瘍血管の安定化を阻害し、一方で化学療法そして VEGFR 阻害剤はこれら薬剤に感受性のある内皮細胞を標的とする。その結果、共同で既存の腫瘍血管を不安定化し進行している血管新生を阻害する。このように厳密に設定された非臨床モデルにおける結果は、このような戦略が臨床試験においても有効である可能性を示唆している。

#### 10・1・8・3 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤

Gefitinib および Erlotinib の開発により進行性非小細胞肺癌患者の治療により多くの選択肢が提供された。Gefitinib は最初に発見された EGFR に選択的な阻害剤であり、延命効

果ではなくフェーズ II の IDEAL 試験からの予備的な結果に基づいて FDA により迅速承認された。進行性非小細胞肺癌の患者に無作為に Gefitinib あるいはプラセボが振り分けられた ISEL 試験では Gefitinib 単独で延命効果は示されなかった。これはプラセボを上回って 2 箇月まで全生存を改善させた Erlotinib 試験 (BR.21) の結果と対照的である。Gefitinib と Erlotinib における結果の違いは多くの研究者の驚きであり、なぜ Gefitinib では延命効果における有効性が失敗したか疑問に思った。考えられる解釈は Gefitinib と Erlotinib の作用機構が必ずしも同じではない可能性である。最近報告された結果によると、EGFR チロシンキナーゼドメインにおける幾つかの変異は Gefitinib および Erlotinib に対する反応性と関連していることが示された。これらの変異は Gefitinib と Erlotinib で重複しているが、両薬剤がどの変異についても同等な活性を有するかどうかは不明である。Gefitinib は Erlotinib よりも特定の EGFR 変異に対する親和性が低いこともあり得る。別の考えられる解釈は、Gefitinib の試験では最大忍容投与量よりも低い投与量で行われたため有効性が示されなかった可能性である。Gefitinib および Erlotinib のフェーズ I 試験では推奨投与量として、Gefitinib では 250 mg Erlotinib では 150 mg の毎日の持続的な固定された量の経口投与が選択された。Gefitinib の場合、IDEAL 試験で示されるように、250 mg の投与量では毒性が少なく、500 mg の投与量と有効性は同じであった。従って、250 mg は最適な生物活性を示す投与量に近い。Erlotinib の場合、150 mg の投与量は過去に規定された最大忍容投与量に対応する。EGFR チロシンキナーゼおよび下流のシグナル伝達経路を最大に抑制するには、チロシンキナーゼ阻害剤は可能な限り最大限投与すべきである。150 mg の投与量では、Erlotinib の AUC は 38.42  $\mu\text{g}/\text{h}$  である。同様

な AUC (36.08  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) がほとんど最大忍容投与量である 700 mg/日の Gefitinib で得られている。Erlotinib について mg 投与量当たりの高い AUC と EGFR に対する高い親和性 (50% 阻害濃度、Gefitinib で 5 nM に比べ 2 nM) を組み合わせると、Gefitinib を上回る Erlotinib の顕著な有効性が得られる。経口投与薬剤の場合、多くの因子が活性薬剤の体内動態に影響を与える。特に、患者間の違いにより Gefitinib と Erlotinib の吸収および代謝が顕著に影響を受ける。最終的に EGFR に到達する実際の量は個々の患者で異なっている。これらの点についてはさらに検討する必要がある。

Gefitinib および Erlotinib は組み合わせ治療 (Gefitinib、INTACT-1 および 2; Erlotinib、TALENT および TRIBUTE) で単剤治療を上回る有効性が得られなかった。これらの研究の論理的根拠は、細胞傷害性薬剤と Gefitinib あるいは Erlotinib と組み合わせると EGFR を高発現するヒト異種移植で相乗的に作用するという *in vivo* の非臨床試験の結果に基づいている。組み合わせ治療が失敗した原因は、用いた組み合わせおよびスケジュールが非臨床試験とは大きく異なり、お互いに拮抗した可能性がある。非臨床試験では細胞傷害性薬剤を毎週投与するまでの週末の 48 時間は動物に Gefitinib あるいは Erlotinib は投与されなかった。その結果腫瘍細胞が G1 から S への移行の阻止から解放され細胞傷害性薬剤に感受性を有するようになったと考えられる。一方、臨床試験では、Gefitinib および Erlotinib は中断することなく持続的に投与された。

Gefitinib と Erlotinib 治療に関する最近の関心は将来の方向性である。Gefitinib と Erlotinib の開発により EGFR の変異が特に非小細胞肺癌の患者特に腺癌の非喫煙患者でかなり見られるという予期しない知見が得られた。これらの発見により非小細胞肺癌の治療に対するアプローチが多くの点で変更されるこ

とが期待される。

特に患者が Gefitinib、Erlotinib あるいは他の EGFR 阻害剤の治療により恩恵を受けるかどうか、EGFR の変異プロファイルを将来の臨床試験に組み込むことが重要である。最近の研究によると Gefitinib あるいは Erlotinib による耐性に関与する T790M 変異のある腫瘍において HKI-272 は非常に効果的であることが示された。EGFR の変異を検出するための試験が多くの専門の医療施設で確立されまもなく広く利用可能になる。例えば感度の高い PCR アッセイでエクソン 19 と 21 における共通の変異を検出できる。K-ras および akt のような他の遺伝子を共にプロファイリングする研究が最近盛んに行われている。ISEL 試験では Gefitinib 対プラセボで延命効果を示すことができなかったが、これは治療の前に変異のスクリーニングをしていないためバイアスがかかっている可能性がある。登録された患者のなかで EGFR 変異の患者が Erlotinib 試験 (BR.21) に比べて少なすぎたため、全体の延命効果が希釈された可能性がある。

さらに、世界の異なった地域で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の臨床試験を始めることが重要である。EGFR および他の可能性のある遺伝子の変異の出現頻度が地域により違うことにより試験結果が異なる可能性がある。特に西アジア対北米・ヨーロッパのようにある薬剤に対する奏効率がある地域では低かったり高かったりする可能性がある。

最近、Gefitinib と Erlotinib が少なくとも過去に 1 回 Pemetrexed による治療が失敗した進行性非小細胞肺癌の治療に使用されている。扁平上皮癌および腺癌に対して Erlotinib は効果的であることを考慮すると、Erlotinib の投与は Gemcitabine、Pemetrexed あるいは Docetaxel のような従来の化学療法よりもむしろ第二選択治療として考えるべきである。非小細胞肺癌以外に、上気道消化管、肺、結腸、

膵臓、胸部、卵巣、膀胱の腫瘍でも EGFR が過剰発現していることが示されている。これら腫瘍の変異のスクリーニングにより、単独治療あるいは組み合わせ治療として Gefitinib および Erlotinib をさらに開発するうえにおいて有用な情報が提供されることが期待される。有望な結果が Gefitinib を EOLFOX と組み合わせた場合の結腸直腸癌の治療、Celecoxib と組み合わせた場合の頭頸部扁平上皮癌の治療で得られている。Erlotinib は Capecitabine あるいは Oxaliplatin と組み合わせた場合において結腸直腸癌の患者の治療で、Bebacizumab との組み合わせで頭頸部扁平上皮癌の患者の治療で肯定的な結果も得られている。最近、Gefitinib および Erlotinib を放射線療法と組み合わせた場合に有望な結果が得られている。さらに、非小細胞肺癌の様々なサブグループの患者の最適に理論的枠組みを見つける研究が行われている。EGFR の阻害は病気が初期の患者および EGFR の変異に感受性がある患者の第 1 選択治療としてそして新補助あるいは補助治療として効果的である可能性があるが、これにはさらに検討が必要である。

結論として、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は将来有望な抗癌剤であるが、治療から最適に恩恵を受ける患者群を選択することは当然である。ISEL 試験により開発者は標的薬剤の開発プロセスを強化すべきであることが示された。薬剤を臨床開発する前に標的に対する薬物動態を十分理解することが重要である。これは患者のために最も成功しやすい開発戦略を選択する手助けとなる。

## 10-2 RNAi を用いた治療薬

### 10-2-1 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 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 のレベルに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ッ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。

### 10-2-2 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。

### 10-2-2-1 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。この考えに基づくとこれら 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 MDR 1 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 $\alpha$  の抑制に用いられた。なお、HIF-1 $\alpha$  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で 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 CC 5 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  $\gamma$  グロビン cDNA と共にヒト鎌状 B-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<sup>+</sup>細胞でこのベクターは B $\beta$  を特異的に低下させるが  $\gamma$ -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の概念が無効になる。

#### 10-2-2-2 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ョ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つの 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。

#### 10-2-2-3 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