

値でも規格・試験法を設定しておく必要がある。マイコプラズマ、無菌、ウイルス否定試験などは必須項目と考えられる。不純物に関しては、同一の宿主細胞や類似の精製工程により製造される製品の開発を既に行っている場合、有用な参考情報とすることができる場合がある。一方、規格試験法の分析法のバリデーション、目的物質関連物質

と目的物質由来不純物の単離および特性解析、貯法および有効期間の設定などは試験開始時までには明らかにしておくことは必ずしも求められないであろう。

試験薬に関する海外のガイドラインをTable 2に示す。FDAは、1995年にフェーズI試験に用いられる試験薬に関するガイダンスを公表している。

Table 1 Process evaluation and product characterization of biotechnological products used in early clinical studies (DRAFT)

	製法関連	製品関連
試験開始までに実施すべき試験	<ul style="list-style-type: none"> ◆セルバンク <ul style="list-style-type: none"> ・導入遺伝子を含むプラスミド全長の塩基配列 ・純度…内在性及び外来性ウイルスに関する試験 マイコプラズマ否定試験 他の細胞株の混入に関する試験 (MCB, WCB, CALについて検討) ・遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組込み部位の数 ・プラスミドの保持率 (染色体外発現の場合) ・特性解析 (アイソザイム解析等による由来する種の確認等) ◆未加工/未精製バルク：外来性ウイルス試験 ◆精製工程：ウイルスクリアランス工程評価試験 (バリデーションは含まず) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆試験薬の特性解析 <ul style="list-style-type: none"> ・構造 ・物理的・化学的性質 ・生物学的性質 ・免疫化学的性質 (抗体が目的物質の場合は抗原等との結合特性) ・純度 ・製造工程由来不純物 ・目的物質由来不純物 ・混入汚染物質 ・物質量等 ◆規格・試験法を設定 (暫定値でも可)
試験開始までに必須とされない試験	<ul style="list-style-type: none"> ◇細胞バンクの評価としての目的タンパク質発現の安定性試験や核型分析 ◇未加工/未精製バルクの3ロットの外来性ウイルス試験 ◇プロセスコントロール：重要工程の選定、工程内管理試験の設定等 	<ul style="list-style-type: none"> ◇規格試験法としての分析法のバリデーション ◇目的物質関連物質と目的物質由来不純物の単離および特性解析 ◇安定性：貯法および有効期間の設定

Table 2 Guidelines on quality and safety of biotechnological products used in clinical studies

	公表年	ガイドライン
FDA	1995年	フェーズI臨床試験に用いられる試験薬の申請に関するガイダンス Guidance for Industry Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase I Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products
	2006年	早期探索的臨床試験に関するガイダンス Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers Exploratory IND Studies
	2008年	フェーズI試験薬のcGMPに関するガイダンス Guidance for Industry cGMP for Phase I Investigational Drugs
EMA	2007年	ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減のための方策に関するガイドライン Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-in-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products EMA/CHMP/SWP/28367/07
	2008年	バイオ試験薬の品質に関するコンセプトペーパー Concept Paper on a Guideline on the Chemical and Pharmaceutical Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials EMA/CHMP/BWP/466097/2007
	2008年	バイオ試験薬のウイルス安全性に関するガイドライン Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products EMA/CHMP/BWP/398498/2005

また臨床試験の早期実施に関する最近の動向を反映して、2006年には早期探索的臨床試験に関するガイダンスを公表している。これらのガイダンスでは適用範囲にバイオ医薬品が含まれているが、具体的な要件については述べられていない。また、2008年には治験薬製造のためのcGMPガイダンスも公表しているが、その中では、バイオ医薬品については特性解析のみによってバイオ医薬品の品質を規定することが困難であり、品質の担保においては製法の恒常性、頑健性が重要であることが述べられている。さらに最も重要な要件として、治験薬のウイルス安全性等の感染因子の伝播を防止する対策があげられている。

EMAでは英国で起こったTGN1412の事故を受け、ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減のための方策に関するガイドラインを2007年に公表した。また、2008年に治験段階でのバイオ医薬品の品質全般に関するコンセプトペーパーを公表した。治験薬に求められるウイルス安全性に関してはガイドラインの検討が先行して行われ、2006年にはガイドライン案が公表され、2008年にはその最終版が公表された。EMAのウイルス安全性に関するガイドラインは、臨床開発段階の製品についてウイルス安全性確保の要件を明らかにしようとしたものであり、開発ステージの進行とそれに伴うウイルス安全性のデータの取り扱いや、核酸増幅検査 (NAT) などの新たなウイルス安全性試験の活用などについて述べられており、治験開始時まで必要とされるウイルス安全性試験データについて参考となる。

以上のように、欧米の規制当局においても、治験早期におけるバイオ医薬品の要件としては、ウイルス等の安全性確保が最も重要とされている。

3. バイオ医薬品の早期探索的臨床試験に関する一考察

化学薬品では早期探索的臨床試験の実施による臨床開発の迅速化を目指した動きが活発化しており、マイクロドーズ臨床試験に関してはガイダ

スも出されている。しかし、このような早期探索的臨床試験がバイオ医薬品に適用可能かも含めて、今後の検討が必要と考えられる。ここでは、バイオ医薬品の早期探索的臨床試験の適用により得られると考えられる情報と限界について考察すると共に、TGN1412事故の教訓も含め安全性確保について考察してみたい。

本稿の最初に述べたように、バイオ医薬品は生体成分をできる限り忠実に人工的にコピーした製品と抗体や改変タンパク質の様な非天然型の製品に分類できる (抗体医薬も自己成分に対する抗体は自己抗体産生細胞を除去する免疫制御機構により排除されることから非天然型と考えることが可能である)。天然型タンパク質製品に関しては、生体での存在量 (血中濃度) や作用機構が十分に明らかにされている場合には、安全域の推定や初期投与量の設定は比較的容易であろう。

これに対して、非天然型タンパク質製品に関しては生体での作用を予測することが困難である場合が多い。特にアゴニスト作用がある場合には、ヒトでの作用予測において慎重を期すべきである。TGN1412のみならず、OKT3等でも免疫系細胞が活性化され、サイトカイン放出反応が起こる例が知られている²⁹⁾。非天然型製品については、天然型製品に比べ製品の生体での作用の十分な予測が難しく、臨床試験で有害作用が生じるリスクが高いといえる (Fig. 7)。当然、こういった非天然型製品の開発において非臨床試験として動物を用いた毒性試験や薬理試験が実施されるであろうが、タンパク質医薬品では種差もあり、動物での毒性や薬理作用をヒトに外挿できない場合も少なくない。霊長類を用いた試験でもヒトとの作用に差異があることがTGN1412でも報告されている³⁰⁾。

また、化学薬品に比べバイオ医薬品は巨大で複雑な構造を持つことから、体内動態の解析においては、試験の設定や試験によって得られた情報の解釈を慎重に行うべきである。すなわち、バイオ医薬品の体内動態を解析する場合に、そのデータの解釈に際してはタンパク質という複雑な分子を解析するという限界に注意を払う必要がある。例

例えば、タンパク質の体内動態解析にELISAを用いる場合に、検出したシグナルが必ずしもインタクトなタンパク質分子の存在を表しているとは限らない (Fig. 8)。さらに、タンパク質を標識する場合は、標識前後での品質特性の変化に注意が必要である。また、タンパク質医薬品は不均一な分子の集合体と考えることもでき、特に糖タンパク質医薬品などでは、特定の糖鎖を持つ分子のみが

クリアランスが速いこともあるばかりでなく、強い生物活性を持つ場合がある。従って、特定臓器への集積シグナルが見られた場合にも、そのシグナルが活性を持った分子の存在を示しているのかどうかには注意が必要である。

早期探索的臨床試験の中でも体内動態解析を目的に低投与量で実施されるマイクロドーズ臨床試験は、非天然型タンパク質製品の臨床開発初期の

Fig. 7 Factors related to risks in early clinical studies of biotechnological products

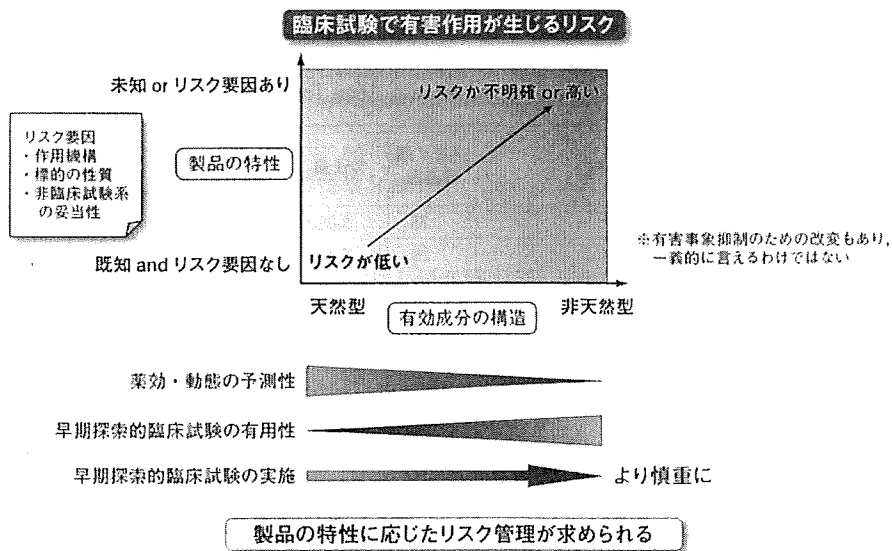
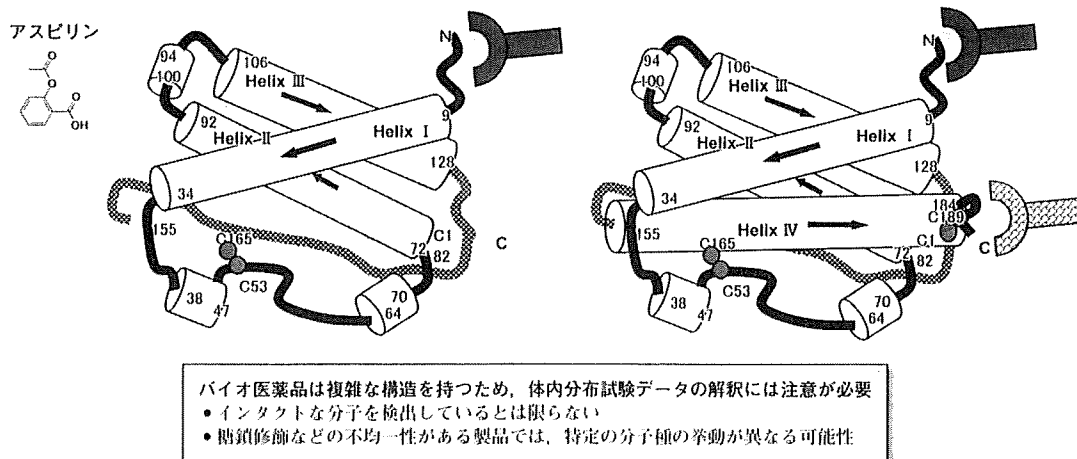


Fig. 8 Immunological detection of biotechnological proteins in *in vivo* distribution analysis



試験として生体内の分布を明らかにするために有用かもしれない。特定の臓器に集積することを予め明らかにすることができれば、臨床試験における用量漸増計画や検査項目の設定にも有用な情報となるであろう。また、抗体医薬品では複数の候補品から最適な薬効をもち安全性の高い製品を開発することがよく行われており、このような候補品からの選択においてもマイクロドーズ臨床試験の結果が役に立つ可能性がある。したがって、上述したような点に留意した評価を行うことより、バイオ医薬品でもマイクロドーズ試験が有用な情

報をもたらす可能性が考えられる。

マイクロドーズ試験における投与量の設定に関しては、FDAから2006年に出された早期探索的臨床試験に関するガイダンスGuidance for Industry, Investigators, and Reviewers-Exploratory IND Studiesにおいて「タンパク質医薬品では薬効発現推定用量の1/100未満で、30 nmolを上限とする。」とされている。しかしこの設定では、試験が安全に実施できるとは必ずしも言えないと考えられる。Table 3にあげるように、これまで承認されているタンパク質医薬品の投与量と比較

Table 3 Molecular weight and clinical dose of biotechnological products
— Validity of 30 nmol as the maximum dose for microdose study —

分類	名称	アミノ酸残基数	分子量	30 nmolの質量	添付文書上の用量から換算した臨床投与量*	添付文書上の用量
ナトリウム利尿ペプチド	カルベリチド	28	3,080	92 μ g	7 μ g/kg/分	0.1 μ g/kg/分
グルカゴン	グルカゴン	29	3,482	104 μ g		0.5mg/human
インスリン	インスリン	51	5,807	174 μ g		2単位/human
ソマトメジンC	メカセルミン	70	7,648	229 μ g	3.5mg	0.05mg/kg
IL-2	セルモロイキン	133	15,415	462 μ g		40万IU/human
インターフェロン	インターフェロンガンマ-1a	146	17,145	514 μ g		200万IU/m ²
G-CSF	フィルグラスチム	175	18,798	563 μ g		50 μ g/m ²
インターフェロン	インターフェロンアルファ-2b	165	19,269	578 μ g		300万IU/human
インターフェロン	インターフェロンベータ-1b	165	19,877	596 μ g		800万IU/human
G-CSF	レノグラスチム	174	20,000	600 μ g	> 140 μ g	2 μ g/kg
成長ホルモン	ソマトロピン	191	22,125	663 μ g	1.47mg	0.021mg/kg
エリスロポエチン	エポエチンアルファ	165	30,000	900 μ g		3000IU/human
エリスロポエチン改変体	ダルベポエチンアルファ	165	36,000	1.1mg	> 15 μ g	15 μ g
PEG化インターフェロン	ベグインターフェロンアルファ-2b	165	32,000	960 μ g	> 105 μ g	1.5 μ g/kg
インターフェロン	インターフェロンベータ-1a	166	25,300	759 μ g	> 30 μ g	30 μ g
卵巣刺激ホルモン	ホリトロピンアルファ	203	31,000	930 μ g		150IU/human
第VII因子	エプタコグアルファ	406	45,513	1.4mg	4.2mg	60 μ g/kg
グルコセレブロシダーゼ	イミグルセラゼ	497	60,000	1.8mg		60U/kg
トロンボモジュリン	トロンボモジュリンアルファ	498	64,000	1.9mg		380U/kg
t-PA	アルテプラゼ	527	64,000	1.9mg	35mg	0.5mg/kg
GalNAcスルファターゼ	ガルスルファゼ	495	66,000	1.9mg	70mg	1mg/kg
抗体(キメラ型IgG1)	バシリキシマブ	1,316	147,000	4.4mg	40mg	40mg/human
抗体(ヒト化IgG1)	トラスツズマブ	1,326	148,000	4.4mg	140mg	2mg/kg
抗体(キメラ型IgG1)	リツキシマブ	1,328	144,510	4.3mg		375mg/m ²
抗体(キメラ型IgG1)	インフリキシマブ	1,328	149,000	4.5mg	210mg	3mg/kg
抗体(ヒト化IgG4)	TGN1412		(150,000)	4.5mg	7mg	0.1mg/kg
第VIII因子	オクトコグアルファ	2,332	300,000	9.0mg		10IU/kg

TGN1412: 0.1mg/kgは初回臨床試験での投与量。(70kgのヒトでは7mg=46 nmol)

*ヒトの体重を70kgとして計算

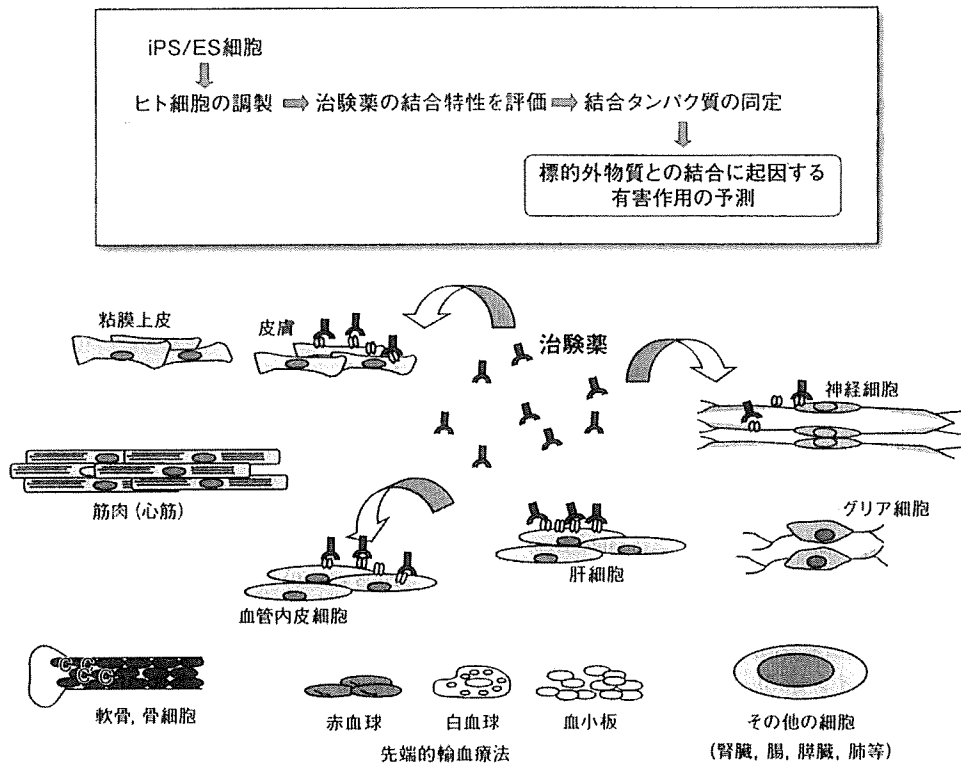
すると、30 nmolでは添付文書上の投与量を超えてしまう製品が複数ある。すなわち、医薬品候補分子の種類によっては、30 nmolが薬効用量以上になってしまう。また、TGN1412の臨床試験で投与された量は約46 nmolであり、30 nmolに近い値である。従って、30 nmolという量を投与量上限として設定することは試験の安全性確保の点から適切でなく、バイオ医薬品では投与量上限を一律に設定することは妥当ではないと考えられる。

マイクロドーズ試験を含め初期の臨床試験においては、アゴニスト作用を持つ製品であれば、標的分子との結合親和性、予想される血中濃度、*in vitro*における標的分子（受容体）占有率と細胞応答の定量的評価結果などをもとに求められた最小予測生物学的影響量（MABEL：Minimally anticipated biological effect level）や、既知の情報など

も考慮し、製品ごとに適切な投与量を設定していくことが必要となるであろう。

ヒトでの生体分布や作用を予測するその他のアプローチとして、開発をしようとするバイオ医薬品の特定組織への分布や結合性などの評価にヒトパネルを用いることも有用と考えられる。市販のヒト細胞パネルも利用できるようになっており、また、再生医療の進展に伴い様々な細胞を*in vitro*で誘導可能になってきている（Fig. 9）。さらに、正常細胞ばかりでなく、特定疾患患者からのiPS細胞樹立により様々な体細胞が誘導できれば、*in vitro*病態モデルでの結合性や作用を解明できる可能性があり、今後のバイオ医薬品の安全性評価に有用なツールとなるであろう。医薬品開発の効率化のため、最新の科学技術を活用した評価法の開発が望まれる。

Fig. 9 Analysis of binding specificity of biotechnological products using human cell panels



4. まとめ

本稿では、バイオ医薬品の臨床開発初期における品質・安全性確保の要点を議論してきたが、化学薬品で示されるような一律の基準を示すことは困難と考えられる。しかし、バイオ医薬品は天然型タンパク質製品と非天然型タンパク質製品に分類することが可能であり、前者については品質・安全性確保へのアプローチがより容易であると考えられる。すなわち、ウイルス等の感染因子に対する安全性確保を中心として、生体内分子の特性に関する情報を参考に合理的に治験薬そのものの品質・安全性を担保することができると考えられる。また、臨床初期においては、特性解析や非臨床試験のデータに加えて、ヒトでの生理作用や生体での血中濃度などの情報に基づき投与計画をデザインしていくことが可能であろう。一方、非天然型タンパク質製品の場合は、天然型製品で考慮すべき点に加え、未知の薬理作用を有する可能性があること、またアゴニスト作用のある製品では時として重篤な有害作用があることを念頭に、治験薬の品質・安全性を担保していく必要がある。

文 献

- 1) 「医薬品の臨床試験及び販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン(案)」ICHガイドラインM3 (R2). Available from : [http://www.pmda.go.jp/ich/m/Step3_m3\(r2\)_08_07_14.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/m/Step3_m3(r2)_08_07_14.pdf)
- 2) 医薬審第3号「組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について」(ICHガイドラインQ5B). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5b_98_1_6.pdf
- 3) 医薬審第6号「生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験について」(ICHガイドラインQ5C). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5c_98_1_6.pdf
- 4) 医薬審第329号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について(ICHガイドラインQ5A). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5a_00_2_22.pdf
- 5) 医薬審第873号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について(ICHガイドラインQ5D). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf
- 6) 医薬審第571号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」(ICHガイドラインQ6B). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf
- 7) 薬食審査発第0426001号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価について」(ICHガイドラインQ5E). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5e_05_4_26.pdf
- 8) 医薬審第326号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について(ICHガイドラインS6). Available from : http://www.pmda.go.jp/ich/s/s6_00_2_22.pdf
- 9) 薬審1第10号「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」. Available from : <http://www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/yakusin.pdf>
- 10) 薬審第243号「組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」. Available from : <http://www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/243.htm?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=2831>
- 11) Schellekens H, Casadevall N. Immunogenicity of recombinant human proteins : causes and consequences. *J Neurol.* 2004 ; 251 Suppl 2 : II4-9.
- 12) Schneider CK, Kalinke U. Toward biosimilar monoclonal antibodies. *Nature biotechnology.* 2008 ; 26 (9) : 985-90.
- 13) Sharma B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 3 : impact of manufacturing changes. *Biotechnol Adv.* 2007 ; 25 (3) : 325-31.
- 14) Porter S. Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci.* 2001 ; 90 (1) : 1-11.
- 15) Boven K, Stryker S, Knight J, Thomas A, van

- Regenmortel M, Kemeny DM, Power D, Rossert J, Casadevall N. The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* 2005 ; 67(6) : 2346-53.
- 16) Rosenberg AS. Effects of protein aggregates : an immunologic perspective. *Apys J.* 2006 ; 8(3) : E501-7.
- 17) Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgard U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A : the CANAL cohort study. *Blood.* 2007 ; 109(11) : 4693-7.
- 18) Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins.
- 19) Chung CH, Mirakhor B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *The New England journal of medicine.* 2008 ; 358(11) : 1109-17.
- 20) Weinberg PD, Hounshell J, Sherman LA, Godwin J, Ali S, Tomori C, Bennett CL. Legal, financial, and public health consequences of HIV contamination of blood and blood products in the 1980s and 1990s. *Annals of internal medicine.* 2002 ; 136(4) : 312-9.
- 21) 第15改正日本薬局方. Available from : http://www.std.pmda.go.jp/jpPUB/Data/jpdata/jp15_jpn.pdf
- 22) Tuma RS. Phase I antibody risks, trial safety examined. *Journal of the National Cancer Institute.* 2006 ; 98(14) : 956-8.
- 23) Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, Mistry Y, Dilger P, Liefoghe E, Cludts I, Fox B, Tarrant G, Robinson J, Meager T, Dolman C, Thorpe SJ, Bristow A, Wadhwa M, Thorpe R, Poole S. "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412 : Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics. *J Immunol.* 2007 ; 179(5) : 3325-31.

* * *

RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞**, 日向 昌司*, 山口 照英*

医薬品研究 Vol.40, No.12 別刷 (2009年)

財団法人 日本公定書協会

RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞**, 日向 昌司*, 山口 照英*

State and Perspective of Drug Development Using RNA Interference

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA**, Masashi HYUGA* and Teruhide YAMAGUCHI*

はじめに

“RNA interference” (RNAi) の現象は、1998 年線虫 (*C. elegans*) において遺伝子のノックダウンの誘導に必要な二重鎖の “short interfering RNA” (siRNA) の構造及びデリバリーの発見が始まりとなった¹⁾。その後、哺乳細胞において RNAi を引き起こすのに必要な siRNA の構造が示され、その構造は個々の 3' 末端にオーバーハングを持つ 19 個と 21 個のヌクレオチドから構成されることが明らかとなった²⁾。これにより、研究目的あるいは治療目的で、既知の配列を有する事実上どの遺伝子でも、効果的に抑制することが可能となった。一番の特徴は簡単に遺伝子発現を抑制することができることである。理論的には以下に示すように、標的 mRNA に対して完全に相補的な短い “double-strand RNA” (dsRNA) を外から導入するか細胞内で発現させるだけで十分抑制できる。RNAi は siRNA を直接細胞に導入するか³⁾、あるいは DNA をベースとしたプラスミドから転写され細胞質で RNase III ファミリー酵素 Dicer により siRNA に転換される “short hairpin RNA” (shRNA) により開始される^{4,5)}。これら二本鎖の siRNA が “RNA-induced silencing complex” (RISC) と呼ばれる複数のタンパク質複合体に取り込まれ、guide 鎖でないほうの短い RNA 鎖が RISC から除かれる。guide 鎖を有する RISC が標的

mRNA に結合し、RISC の主要な成分である “Argonaute-2 protein” (Ago-2) が特定の位置で標的 mRNA を切断し、その後、細胞内 RNase により分解される。最終的に、これらの過程により特定の遺伝子発現が非常に配列特異的にノックダウンされる⁶⁻⁹⁾。一方、“micro RNA” (miRNA) は RNAi マシンの内在性の基質である。miRNA は長い一次転写産物 (pri-miRNA) として最初発現され、Drosha-DGCR8 を含むマイクロプロセッサー複合体により、核内で 60~70 塩基対のヘアピン (pre-miRNA) に加工される^{10,11)}。そのループは RNase III ファミリー酵素 Dicer による細胞質内での加工により除去され、二本鎖の siRNA が細胞質で RISC に積まれる。成熟 miRNA はターゲット mRNA の 3' “untranslated region” (UTR) の配列と部分的にのみ相補性を有する。miRNA は mRNA の分解によって、標的タンパク質の翻訳を阻害する¹²⁾。

このように、RNAi は哺乳細胞における特異的な遺伝子発現をサイレンシングする最適な方法であるので、疾患に関連した遺伝子の調節に、RNAi は将来の治療の魅力的な選択となる。すなわち、基本的には、一つあるいは少数の遺伝子の異常な発現亢進が原因で生じるすべてのヒト疾患は、RNAi を基にした治療の候補となる。そのような疾患には、がん、自己免疫疾患、優性遺伝子疾患、ウイルス感染などが含まれる¹³⁻¹⁶⁾。更に、miRNA は腫瘍の抑制因子及

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 日本大学総合科学研究所 東京都千代田区五番町 12-5 (〒102-8251)
University Research Center, NIHON UNIVERSITY, 12-5 Gobancho Chiyoda-ku, Tokyo 102-8251, Japan

びがん遺伝子として働くので、内在性の miRNA は治療標的にもなる可能性がある¹⁷⁾。

本稿では、RNAi を用いた治療薬の開発について、動物モデル及び臨床試験における現状及び今後克服すべき課題について概説する。なお、本稿は成書を参考にした^{8,13,14,18~29)}。

1. 動物モデルにおけるデリバリー

siRNA 治療の主な障害は、作用させたい細胞、組織、器官に対して効率よくデリバリーさせることである。siRNA は、その負の荷電及び大きさのため細胞膜を通過することは容易ではない。そのため、様々なデリバリーの方法が考案されている。本稿では動物モデルにおける各種デリバリーの方法について概説する。なお、各種臓器毎に分類したデリバリーの方法については内容が重複するため割愛するが、これに関しては成書を参考にされたい^{19,20)}。また、熱安定性、ヌクレアーゼによる分解に対する保護、生体分布の改善を目指して、siRNA に様々な化学修飾を行う試みも行われているが、これらについても成書を参考にされたい²⁹⁾。

1.1 裸の siRNA

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。本稿では、「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製剤化した siRNA (非修飾あるいは修飾) を意味する。組織に直接デリバリーする場合、裸の siRNA は剤形設計及び投与方法の設定が容易であり、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る。したがって、眼の血管新生及び癥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 を標的として最適化された 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ける病理的な網膜の血管新生に対して、頑健で特異的な障害が示された¹⁵⁾。生理食塩水で製剤化した 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% 以上阻害された。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と考えられた。

VEGF 受容体 1 をターゲティングする生理食塩水で製剤化した 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、脈絡膜で血管新生の起きている領域が 45~66% 低下した³⁰⁾。

これら動物モデルにおける研究から、VEGF の経路を標的とする裸の siRNA が、加齢性黄斑変性症 “age-related degeneration” (AMD) に対して有効である可能性が示された。

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以下に示すように明らかになった。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 1 匹当たり 100 µg 投与される。肺に対して siRNA を直接デリバリーして成功した例の多くは、生理食塩水、5% デキストロース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。なお、肺表面活性剤については、その主成分であるリン脂質が肺胞を拡大して siRNA の上皮細胞へのデリバリーを助けるだけでなく、後述するようにリポソームを形成し、一般的な siRNA のデリバリーに適したベヒクルの形成に寄与する可能性も否定できない。

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(生理食塩水で製剤化あるいは *TransIT*-TKO との複合体形成により製剤化)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 “Respiratory Syncytial Virus” (RSV) とパラインフルエンザウイルス “Parainfluenza Virus” (PIV) の肺におけるウイルス負荷が、特異的にそれぞれ 99.98% 及び 99% 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³¹⁾。また、呼吸困難、肺炎症、ロイコトリエンの誘導のような RSV により誘導される病徴も、局所的な siRNA の投与により軽減された。

同様なアプローチを用いて、5% デキストロースで製剤化した siRNA が、重症急性呼吸器症候群コロ

ナウイルス “Severe Acute Respiratory Syndrome” (SARS) 感染の非ヒトげっ歯類モデルで鼻腔内に投与された³²⁾。その結果、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が緩和された。更に、siRNA の投与により、呼吸気管におけるウイルス複製の阻害、間質の浸潤の顕著な低下、肺に対する病理的な変化が起きた。これらの研究から、呼吸器系におけるウイルス感染の治療に対して、RNAi 治療は有効である可能性が示された。

ウイルス遺伝子だけでなく特定の疾患において、内在性の遺伝子を siRNA によりサイレンシングできることが以下の様に示されている。

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た³³⁾。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 の抑制は肺に限定される。

更に最近、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 “Angiopoietin-2” (Ang-2) に対する siRNA を生理食塩水で製剤化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た³⁴⁾。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 では阻害されなかった。興味深いことに、同じ研究で解析された Ang-2 欠損マウスにおける表現型は、Ang-2 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、生理食塩水で製剤化した 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製剤化した 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 標的が抑制された³⁵⁻³⁸⁾。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、マウスの足蹠に 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た^{39,40)}。

1.2 リポソームとリポレックス

リポソームは、薬剤の薬力学的な性状の増加あるいは毒性プロファイルの低下を目的として、従来から用いられている製剤である。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。二重層は複数の成分から構成され、それには陽性あるいは膜融合脂質を含む場合が多い脂質の部分、コレステロール、ポリエチレングリコール-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 *TransIT*-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不安定であり、長期間溶液中に置くと凝集するので、通常は使用する直前に調製する。このような不安定さは、リポレックスを用いた製剤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際、最も重要な知見の一つは、siRNA を安定な核酸-脂質粒子 “Stable Nucleic Acid-Lipid Particle” (SNALP) で製剤化し全身にデリバリーすると、マウスと非ヒトげっ歯類で “Apo-lipoprotein B” (ApoB) を顕著に抑制できるという報告である⁴¹⁾。カニクイザルに SNALP で製剤化した siRNA を 1 回当たり 2.5 mg/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蛋白質はそれぞれ 65% 及び 85% 以上低下した。注目すべきことに、SNALP 製剤の siRNA を 2.5 mg/kg で単回静脈内投与すると、抑制が少なくとも 11 日持続することが示された。

SNALP で製剤化した 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た^{42,43}。他の陽性リポソーム系では、マームセットで“GB virus B” (GBV-B) の複製をうまく抑制することが示されている⁴⁴。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 GBV-B を用い、リポソームで製剤化した GBV-B に対する siRNA を 1 回 5 mg/kg 投与すると、ウイルスの複製が完全に阻害された。

TransIT-TKO で製剤化した VEGF siRNA を用いた研究では、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⁴⁵。

このように、脂質をベースにした siRNA 製剤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“Dioleoyl Phosphatidylcholine” (DOPC) をベースにしたデリバリー系を用いて、EphA2⁴⁶ 及び Focal adhesion kinase⁴⁷ 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こし、腫瘍の成長が阻害された。これらの研究で、製剤化された siRNA は、3 週間、週に 2 回、1 回当たり 150 μ g/kg で動物に投与された。また、DOPC リポソームで製剤化した 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た⁴⁸。中性脂質を基にした製剤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。

調製及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^{45,49}、肺³¹、神経系⁵⁰ 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。

リポレックス siRNA を腔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。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腔内にデリバリーすると、感染に対してマウスを防御できた⁵¹。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た⁵²。リポフェクタミンで製剤化した 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、流腸に伴う結腸の炎症が抑制された⁵²。これら脂質をベースにした siRNA の腔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“interferon” (IFN) 反応の活性化を示す知見は報告されていない^{51,52}。

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た 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 及び“Peroxisome Proliferator-Activated Receptor” (PPAR)- α 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、肝細胞で可能であった⁵³。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。その重要な特徴は、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、荷電をマスクするポリエチレングリコール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結合することである⁵³。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、肝臓に対する標的細胞を、肝細胞から類胸内皮及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ある。このナノ粒子で製剤化された 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た⁵⁰。また、このナノ粒子で製剤化した siRNA は、カニクイザルで十分耐容性であった⁵⁹。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魅力的である。

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ロコラーゲンとキトサンが、*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。PC-3 皮下異種移植モデルマウスに、VEGF に対するアテロコラーゲン-siRNA を全身投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が顕著に抑制された⁵⁰。前立腺がん異種移植モデルマウスに、前立腺がんの腫瘍化に関与する EZH2 及び p100 α に対するアテロコラーゲン-siRNA を全身投与すると、骨転移が顕著に阻害された⁵⁹。

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。キトサンで製剤化した "Enhanced Green Fluorescent Protein" (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⁵⁹。同様に、キトサンで製剤化した 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⁵⁹。

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に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、標的のための分子はセンス鎖の 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本鎖は、RNAi による抑制活性を保持している。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、コレステロールをコンジュゲートした ApoB に対する siRNA 二重鎖の、マウス静脈投与による特異的な ApoB のサイレンシングが初めて示された⁶⁰。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 分解産物の 5' RACE による増幅とシーケンスから証明された。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、更に、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⁶¹。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 の二本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た⁶¹。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とあらかじめ結合することで、マウスにおける抑制の効率が顕著に改善され、低密度リポタンパク質 "Low-density lipoprotein" (LDL) に結合した粒子は主に肝臓に運搬されるが、高密度リポタンパク質 "High-density lipoprotein" (HDL) に結合した粒子は広い組織分布パターンを示した。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 receptor BI" (SR-BI) がないマウスでは低下した。また、コレステロールコンジュゲート siRNA の *in vitro* 取り込み及び標的 mRNA の分解には、*C. elegans* の Sid1 受容体の哺乳類相同等体が必要であった。コレステロールでみられた *in vivo* の有効性は、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た⁶⁰。

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、ハンチントンに対するコレステロールとのコンジュゲート siRNA を線条体内に単回投与すると、標的 mRNA の抑制、ニューロンの病状の軽減及び異常行動の発生遅延が認められた⁶²⁾。

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“Prostate-specific Membrane Antigen” (PSMA) 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。PSMA アプタマーは、直接 siRNA に連結するか⁶³⁾ 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⁶⁴⁾、*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 のサイレンシングが促進された。

PSMA 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 を介した標的 mRNA のサイレンシング及び細胞死が起きた⁶⁵⁾。活性型の siRNA と連結した変異非結合型の PSMA アプタマーは抑制を示さず、機能を有する PSMA 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。したがって、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。PSMA 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 二本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“Polyethylenimine” (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、様々な細胞及び組織に非特異的に取り込ませることができる。又は、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 とコンプレックスを形成後、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。エンドソームからの 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させ、エンドソームの不安定化及び浸透圧により、コンプレックスの細胞質への遊離を促進する⁶⁶⁾。PEI ポリマー・siRNA コンプレックスは *in vivo* において多く使用されている。しかし、PEI を治療デリバリーベヒクルとして用いる場合の懸念は、高い投与量で非常に強い毒性が見られることである。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、低投与量で siRNA の *in vivo* におけるデリバリーを可能にする試みが数多くなされている。その他の非特異的に様々な細胞及び組織に取り込ませるアプローチとして、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⁶⁷⁾。このアプローチは、広範囲の細胞種に対する siRNA の *in vitro* におけるデリバリーには効果的であるが、*in vivo* でのサイレンシング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基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“Rabies Virus Glycoprotein” (RVG) 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“Nonamer Arginine Residues” (9R) 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⁶⁷⁾。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が起こった。更に、日本脳炎に対する siRNA を RVG-9R とコンプレックス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た⁶⁷⁾。

組換え抗体とプロタミンの融合タンパク質を用いて、荷電の相互作用により、特定の細胞をターゲティングする抗体と siRNA のコンプレックスを形成させる戦略もある。その一つの例では、ヒト免疫不全ウイルス “Human Immunodeficiency Virus” (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-プロタミン・抗体融合タンパク質コンプレックスを特異的にデリバリーできた⁶⁸⁾。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受容体特異的な結合に用いられた。更に、gp160-B16 細胞異種移植モデルで、siRNA-抗体-プロタミンコンプレックス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し、遺伝子を特異的にサイレンシングできた。更に 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、活性化したリンパ球でのみ siRNA による遺伝子のサイレンシングが起きた⁶⁹⁾。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 short hairpin RNA 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動物モデルでは有効性を示しているが、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、更に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。したがって、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 miRNA 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、使用可能な主なベクターは、これまでに臨床第 1 相安全性試験で評価されており、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、今後のベクターを基にした RNAi のデザインを評価する際大きな助けになる。2 番目に、任意の標的に対して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。3 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と shRNA プロモーターを用いることにより、shRNA 導入標的細胞と shRNA 発現細胞の組み合わせ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は、それぞれのベクターが本来有する性状により選択される。RNAi のキャリアとして最近開発中のウイルスベクター⁷⁰⁾の中で最も有力な候補の一つは、最新世代の偽型 (pseudotype) 二重鎖アデノ随伴ウイルス “Adeno-Associated Virus” (AAV) である⁷¹⁾。AAV は約 4.7 kb 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⁷²⁾。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。また、AAV は染色体へインテグレーションされるが、その挿入部位は決まっている^{73,74)}。したがって、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⁷⁵⁾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⁷⁶⁾。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^{77,78)}。これは例えば、アデノウイルス“Adenovirus”(AV) ベクターで観察されたかなり重篤な有害作用の知見⁷⁹⁾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と考えられる。

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、shRNA 発現 AAV ベクターを細胞に複数のコピー導入でき、細胞内で多量の shRNA を発現できる。

RNAi デリバリーのために AAV が有用である可能性は、この領域における次に述べる二つの進歩により更に顕著に増加した。一つは、ベクターゲノムが天然の 1 本鎖とは異なり 2 本鎖としてパッケージングされるように設計されたことであり、粒子を介して最大限に迅速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⁸⁰⁻⁸²⁾。更に、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⁷⁹⁾。このように、二本鎖の偽型 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“Hepatitis B Virus”(HBV) 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 2 本鎖 AAV ベクターが設計された⁸⁰⁾。このベクターは以下に示す特徴を持つ。二本鎖 AAV-2 ベクターは導入効率が高い。AAV 血清 8 型ベクターは肝臓において優れた

有効性を示す。この 2 本鎖ベクターは両者の長所を組みあわせ、AAV-8 カプシドで偽型にした二本鎖 AAV-2 ゲノムを含む最適化されたベクターであり、更に AAV-2 パッケージングシグナル DNA の一つを AAV-4 のものと置き換えて安定化させている。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 ベクターを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 箇月持続的に抑制された。本結果は、他の AAV 血清 8 型を基にしたベクターを用いた同様なマウスモデルでも確認された⁸¹⁾。血清型がそれぞれ異なる AAV ベクターは組織における有効性が異なる。したがって、AAV ベクターを RNAi 発現に用いると、AAV 血清 8 型ベクターの場合のように、適切な血清型の AAV カプシドと二本鎖 AAV-2 ゲノムを組み合わせることでベクターを作成することにより、標的とする組織及び細胞に対し優れた導入効率と有効性を示せることが利点である。例えば、偽型のベクターを二本鎖 AAV-2 ゲノムに導入して作成し、組織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、網膜で非常に有効である AAV 血清型 5 カプシドの 2 本鎖ゲノムから、眼特異的なプロモーターで shRNA を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⁸²⁾。その他の注目すべき知見として、脊髄小脳失調症のモデルにおいて、マウスの脳で shRNA の発現に組換え AAV ベクターを用いた例⁸³⁾、抗 HIV shRNA の発現に AAV-2 を基にしたベクターを用いた例⁸⁴⁾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 を遺伝的に改変したレンチウイルスベクターであり、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がある^{85,87)}。

最近開発されているウイルス RNAi ベクターの 3 番目の例は AV である。AV 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 36 Kb と大きなサイズであること、少なくとも第一世代の AV 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⁸⁸⁾、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、AV

ベクターは、RNAiによる特異的な治療、特に各種がんの治療で期待される候補となっている⁸⁹⁻⁹¹。特に興味深いのは、腫瘍細胞の中で選択的に複製し腫瘍細胞を溶解させるように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AV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⁹²。

2. 臨床試験

RNAiは、研究レベルから臨床試験まで急速に進歩し、数種類のsiRNAが今後近いうちに臨床試験に入る予定である。最初の臨床試験では、siRNAの直接的な局所デリバリー、湿式型のAMDの治療のVEGF経路そしてRSV感染症の治療の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、すべて硝子体の空洞へ直接投与される。なお、硝子体へのsiRNA投与は、内在性ヌクレアーゼ活性が低いこと、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。以下に現在臨床試験が実施されているかあるいは今後予定されているRNAiを用いた医薬品の非臨床試験及び臨床試験の結果について示すが、文献として公表されているものはごくわずかであり、そのほとんどはインターネットのプレスリリースによる。

2.1 Bevasiranib

Bevasiranibは、すべてのVEGF-Aスプライシングアイソフォームをターゲティングする未修飾siRNAである⁴⁹。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、安全で十分耐容性であるように思われた。Bevasiranibの臨床第3相試験が湿式型AMDで実施され、Bevasiranibの8から12週間毎の投与と、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Ranibizumabの4週間毎の投与の比較で、有効性が比較された⁵⁰。その結果、2009年3月6日のプレスリリースによると、BevasiranibはRanibizumabとの併用で活性を示したが、主要評価項目を満たさなかったため、この臨床第3相試験は中止された。なお全身的及び局所眼球における安全性は問題なかつ

た⁵⁰。

2.2 AGN-745

AGN-745はVEGF-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相試験が終了した⁹⁵。単回投与8週後に視力の安定が起こり窩の厚さが低下することから、生物学的活性が示され耐容性であった。AGN-745の臨床第2相試験が湿式型AMDで実施されている。今後の問題は、AGN-745の薬効が同じ効能を有するAvastin及びRanibizumabと比較して上回る事ができるかどうかである。

2.3 PF-4523655

PF-4523655(旧名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である。以下に動物モデルにおけるPF-4523655の結果を示す⁹⁶。レーザーにより誘導される脈絡膜の血管新生の前臨床動物モデルにおいて、PF-4523655は、硝子体内投与により、RTP801の発現抑制、抗血管新生及び抗神経因子の発現誘導、脈絡膜の血管新生の容量、血管漏出、炎症性細胞の脈絡膜浸潤の低下を起こした。PF-4523655はVEGFをベースにした薬剤と協調的あるいは相乗的に作用した。PF-4523655は糖尿病マウスにおいて網膜の血管の漏出を減少させた。PF-4523655の臨床試験に関し、2008年の7月に公表されたプレスリリースを以下に示す⁹⁷。湿式型AMDの治療の臨床1/2相試験が行われ、最近承認された治療に反応性のない湿式型AMDの患者において、安全で十分耐容性であった。現在、臨床第2相の前向き無作為多施設投与量決定試験(prospective, randomized, dose-ranging study)で、世界中の複数施設で糖尿病性黄斑浮腫の患者160人を用いて、レーザー治療に対するPF-4523655の有効性及び安全性が評価されている。

2.4 ALN-RSV01

最初のsiRNAを用いた肺炎患の治療に関する研究が、新生児及び免疫不全症において重篤な呼吸器感染症を引き起こすRSVに対して行われた。ALN-RSV01はウイルスのヌcleoカプシド(N)遺伝子をターゲティングするsiRNAである。2007年12月のプレスリリースによると、臨床第1相試験で安全性と薬理の評価のため、ALN-RSV01は健康な成人ボランティアの鼻腔内に投与され、安全で十分耐容性であった⁹⁸。同プレスリリースによると、109人の

患者が登録され、そのうちの71人にALN-RSV01、38人にプラセボが投与された。臨床第1相試験のフォローアップの結果が公表された。ALN-RSV01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3 mg/kg、複数回の投与治療群では3日間1日に1回0.01から0.6 mg/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の血漿レベルにより測定したデリバリー効率は、非臨床試験モデルよりもヒトのほうが顕著に高かった。有害事象は、ALN-RAV01とプラセボの両方で観察されたが、大部分は軽度であった。重度あるいは重篤な有害事象はなかった。単一投与治療群の中の高用量投与群で、軽度から中程度のインフルエンザ様の有害事象がみられたが一過性であり、臨床試験での高いデリバリー効率に関連している可能性があった。複数回の投与治療群では、3日間毎日最大0.6 mg/kgまで安全で十分耐容性であった。

2008年2月のプレスリリースによると、臨床第2相二重盲検無作為プラセボコントロール試験の結果が公表された。この試験では、健康な成人を野生型RSV株に感染させ、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、ALN-RSV01が鼻腔内に投与された。その結果、ALN-RSV01投与群では、プラセボと比較してRSV感染率が約40%低下した。また、感染フリーの被験者が95%増加した。このように、ALN-RSV01は統計的に有意な抗ウイルスの有効性を示すと共に安全で十分耐容性であった。

2008年4月のプレスリリースによると、ALN-RSV01は、RSVに自然感染した成人肺移植患者の臨床第2相二重盲検無作為プラセボコントロール試験で、更に現在評価されている⁹⁹⁾。この試験の1番目の目的は、プラセボに対するALN-RSV01の安全性と耐容性の評価であり、2番目の目的は、RSVが下気道に自然に感染した患者における、ALN-RSV01の抗ウイルス活性の評価である。

2.5 QPI-1002

以下に、QPI-1002(旧名Aklis-5)に関するプレスリリースを示す⁹⁹⁾。最初の全身投与siRNAとして、p53腫瘍抑制遺伝子をターゲティングするQPI-1002が開発されている。p53遺伝子は、腎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。QPI-1002は、化学修飾siRNAであり、急性腎損傷においてp53の一時的な抑制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、急性腎損傷の治療にも用いられる予定である。虚血再かん流により誘導される急性腎損傷において、損傷を受ける主な細胞は近位尿細管の上皮である。QPI-1002を静脈投与すると、主に腎臓特に近位尿細管に速やかに蓄積し、標的細胞を防御する可能性がある。

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。QPI-1002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、急性腎不全の進行が効果的に阻害された。QPI-1002は、Cisplatinにより誘導される腎損傷の抑制に効果的であった。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、QPI-1002は好ましい安全性プロファイルを示し、腎臓における貯留時間は短く薬動力学的な効果を示した。

現在進行中の二つの臨床第1/2a相用量漸増試験で、QPI-1002は大規模な心臓手術を受けた患者に単回静脈投与されており、安全性と薬動力学が評価されている。そのうちの一つは、中程度から高いリスクの患者で、もう一つは非常に高いリスクの患者である。これら試験は多施設、二重盲検プラセボコントロール試験であり、米国、スイス、イスラエルの複数の箇所で患者が募集されている。

2009年1月、QPI-1002の新たな臨床第1/2試験の実施がプレスリリースされた。この試験は、死亡したドナーの腎臓の移植を受ける患者の移植後腎機能障害“delayed graft function”(DGF)を防止するために、全身に投与したQPI-1002を評価する試験である。

患者のDGFは腎移植の手術直後の間で最もよく起こる合併症であり、米国では死亡したドナーの腎臓移植のうち25~40%が影響を受ける。DGFでは、移植前には虚血状態にある移植腎において、移植手術後に急速に血流が回復することによって、腎障害を引き起こすような一連の反応が惹起される。腎臓移植後のDGFは、長期間の病院の入院及び高い比率の移植拒絶を伴い、その結果、移植した腎臓の生着率が低下する。

DGFについては、最大204人の成人腎移植レシピエントによる、複数施設での臨床第1/2試験が準備されている。この前半は、DGFを発現するリスクの高い腎臓移植患者にQPI-1002を単回静脈投与し、安全性と耐受性を評価する用量漸増試験である。後半は、同じ患者群で選択した投与量のQPI-1002の安全性と臨床効果を評価する試験である。患者は米国の臨床施設に登録される予定である。

2.6 NUCB-1000

NUCB-1000は、異なった配列のHBVゲノムをターゲットにする四つの別々の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製剤化されている¹⁰⁰。2008年1月のプレスリリースによると、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る予定であった¹⁰⁰。その試験は、軽度から中程度にHBVに感染しており肝硬変の兆候のない15人の患者で行われる予定であった。患者は、グループ当たり3人で、五つの用量漸増グループに構成された。主要評価項目は、安全に関連したものであり、副次的評価項目は、血中のHBVウイルスレベル及び血液循環中のHBV表面抗原を含む有効性の生物学的マーカーである。しかし、2008年の6月のプレスリリースによると、この試験はスポンサーである企業の財政事情悪化のために中止された¹⁰¹。

2.7 OZ1

RNAiとは原理が異なるが、同様にRNAを分解するリボザイムを用いた結果について示す。OZ1は、HIV-1 *vpr* 及び *tat* の読み取り配列をオーバーラップする領域をターゲットにするリボザイムをコードする遺伝子を含む、Moloney マウス肉腫ウイルスを基にした、複製能力のないガンマレトロウイルスベクターである^{102,103}。OZ1は、研究室及び臨床において分離されたHIV-1の複製を *in vitro* で阻害し、OZ1によりターゲットされるHIV-1の領域の抵抗性変異は、長期間の細胞培養で観察されなかった¹⁰²⁻¹⁰⁵。二つの臨床第1相試験では、CD4⁺Tリンパ球¹⁰⁰あるいはCD34⁺造血幹細胞¹⁰⁶を用いて、*ex vivo* の導入及びOZ1導入細胞の再注入の妥当性と安全性が評価された。研究の期間中及びその後の長期間におけるフォローアップの間、遺伝子導入過程あるいは遺伝子導入生成物に関連した重篤な有害事

象はなかった。自家CD34⁺造血幹細胞のデリバリーを用いた、OZ1の臨床第2相無作為二重盲検プラセボコントロール試験が、74人のHIV-1感染成人で行われた¹⁰⁷。OZ1に関連した有害事象はなかった。40~48週及び40~100週における、ウイルス濃度曲線の時間加重面積は、OZ1グループのほうが有意に低かった。100週にわたって、CD4⁺リンパ球の数はOZ1グループのほうが高かった。この研究から、細胞を用いた遺伝子導入は、HIVの患者において安全で生物学的に活性を有することが示された。

2.8 TD-101

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¹⁰⁸。先天性爪肥厚症は、ケラチン6a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¹⁰⁸。ケラチン6a N171K変異は単一塩基置換変異であり、シトシンがアデニンに置換し、アミノ酸がアスパラギンからリジンに変化する。この変異の結果、野生型では、繊維状を呈するケラチンフィラメントの凝集が起きる。TD-101は、野生型の遺伝子には影響を与えないで、このケラチン6a N171K変異遺伝子のみをターゲットにする。2005年9月のプレスリリースによると、ケラチン6a N171K変異遺伝子を導入した細胞に、ケラチン6a変異に特異的なsiRNA (TD101)を加えると、*in vitro* でケラチンフィラメント凝集の表現型がレスキューされた。2008年1月のプレスリリースによると、臨床第1相試験で、TD101は、ケラチン6a N171K変異を持つ米国の成人の足の裏の特定の皮内領域に、14週の間週に2回投与される予定である。この臨床第1相試験では、安全性と共に若干有効性についても評価される予定である。

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反応の誘導が報告された^{109,110}。更に、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いわゆる off-target 効果が報告された¹¹¹。その後、大規模な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 ス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 miRNA を介した機構により起きると考えられた¹¹²⁻¹¹⁷。また、siRNA-脂質複合体により、“Toll-like Receptor” (TLR) 特に TLR7 の誘導が、形質細胞様樹状細胞において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 danger motif (5'-GUCCUCAA-3') によることも明らかになった¹¹⁸。その後、siRNA を最適化すること及びこれら細胞を標的としない製剤を用いることにより、この効果は回避できることが示唆された^{119,120}。同様に、多くの報告から、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^{121,122}。したがって、このような有害事象は、将来の臨床プロトコールでは完全に除去できる可能性が高いと考えられる。更に、動物とヒトにおいて先天性免疫反応は複雑で異なっているため、今後 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、更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、マウスの肝臓で 49 種類の異なった shRNA を発現する非常に効率の良い、先に示した二本鎖 AAV-8 ベクターが用いられた⁸¹。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、高いレベルの shRNA 発現による内在性 miRNA 経路のステップの飽和によるものであり、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¹²³。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な有効投与ベクター量の選択により、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、HBV トランスジェニックマウスで、血清におけるウイルス DNA の発現が、2 週間後 32 倍以上低下し、4 箇月後で約 150 倍低下し、安定化した⁸¹。また、HBV mRNA は、2 週間後 90% 以上低下し、8 週後ではぎりぎり検出される程度まで低下した。

同様な siRNA の多重投与により、マウスとハム

スターにおいて、内在性 miRNA のレベルに影響を及ぼさずに、ターゲティングする肝臓遺伝子の発現が顕著に抑制された。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と、miRNA よりも下流の過程で siRNA が 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* でお互い競合しそれぞれの有効性が阻害されるという初期の報告³⁰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、それぞれの RNAi トリガーの有効性が低下した^{123,124}。また、これらに関連して、高濃度の siRNA で細胞内 RNAi マシニングが飽和される可能性を強く示す結果が得られている¹²⁵。そのデータによると、細胞内の RISC による外から導入した siRNA の集合能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⁸¹。まだ証明はされていないが、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¹²⁶。この結果によると、Ago-2 タンパク質は、これまで *in vivo* で siRNA 及び shRNA の競合が示唆されていた肝臓と肺で、特に低いことが示された。一方、*in vivo* で siRNA により miRNA の活性及びレベルに影響を及ぼすことなく、肝臓の各種遺伝子をサイレンシングできるという報告もある¹²⁷。しかし、RNAi 系の飽和と細胞毒性は、明らかに siRNA の投与量に依存した結果である⁸¹。した