表1　神経疾患に対するshRNA発現ウイルスベクターの*in vivo*への応用例

	疾患名	標的遺伝子	投与方法	文献
遺伝性神経疾患	Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	ataxin-1	小脳投与	7
	Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)	ataxin-3	線条体投与	26
	ハンチントン病	huntingtin	線条体投与	10, 11, 12
	家族性アルツハイマー病	APP	海馬投与	13
	家族性ALS	SOD1	筋肉・脊髄投与	14, 15, 16
孤発性神経疾患	アルツハイマー病	BACE1	海馬投与	17
	パーキンソン病	α-synuclein	線条体投与	18
	脳梗塞	transeint receptor potential melastain 7 (TRPM7)	海馬投与	19
	プリオン病	PrP	海馬・線条体投与	20, 21

ベクターの*in vivo*での有用性を最初に証明した[7]．

その後，ハンチントン病のモデルマウスにおいてもhuntingtinに対するshRNA発現AAV1型ベクターの線条体内への直接投与で，huntingtin遺伝子の発現をmRNAおよび蛋白レベルで抑制し，運動障害が改善したと報告された[10]．さらに，変異huntingtin発現AAVまたはレンチウイルスベクターの線条体への局所投与により作製されたモデルラットに対し，shRNA発現AAVまたはレンチウイルスベクターを同時投与することで線条体の神経変性を防ぐことができ，shRNA発現ウイルスベクターでの変異huntingtinの発現抑制が神経保護的に働くことが示された[11,12]．

アルツハイマー病では，家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つであるアミロイド前駆蛋白(APP) のスウェーデン型変異に対し，変異アレル特異的なshRNAをデザインし，その変異APP特異的shRNA発現AAV5ベクターをスウェーデン型変異APPを過剰発現させたトランスジェニックマウスの海馬へ直接投与し，脳内の可溶性Aβ量を減少させ認知機能障害を改善させたとの報告がなされた[13]．

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対しては，主に家族性ALSの10～20％を占めるsuperoxide disumutase (SOD1)遺伝子変異に対するアプローチが試みられており，SOD1に対するshRNA発現レンチウイルス・AAVベクターをALSのモデルマウスであるG93A SOD1トランスジェニックマウスの骨格筋に注入もしくは直接脊髄内に注入してその発症時期を遅延させたとの報告がなされた[14-16]．骨格筋にベクターを投与した場合は，逆行性軸索輸送によって運動ニューロンにshRNAを導入することができる．

ほとんどのアルツハイマー病，パーキンソン病やALSは家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが，それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば，その発現を抑制することで治療が可能かもしれない．アルツハイマー病ではAβがその発症に中心的役割を果たすと考えられており，アミロイド前駆蛋白からAβを切り出す酵素であるβおよびγセクレターゼはRNAiの標的遺伝子の候補と成り得る．この中で，γセクレターゼはNotchなど他の重要な分子も基質としているため，その機能を抑制すると問題を生じるが，βセクレターゼの本体といわれるBACE1のノックアウトマウスは特別の異常を示さないため，有望な標的分子である．これまでにBACE1に対するshRNA発現レンチウイルスベクターをスウェーデン型変異APP過剰発現トランスジェニックマウスの海馬へ直接投与し，老人斑の沈着を減少させ行動異常も改善されたとの報告があ

る[17]．

パーキンソン病では神経細胞脱落のみられる部位にレビー小体が形成されるが，その主要構成成分としてα-synucleinが同定され，また優性遺伝性の家族性パーキンソン病でα-synuclein遺伝子に変異，重複が見出され，α-synucleinの凝集・蓄積と神経細胞死の関係が注目されている．そこで，α-synucleinを標的としたRNAi治療の可能性が検討されるわけであるが，α-synucleinはさらにBACE1と同様にノックアウトしても明瞭な異常を呈さないため，RNAiの標的遺伝子の候補としては望ましい特徴を有している．これまでにα-synucleinに対するshRNA発現レンチウイルスベクターのラット線状体への局注でα-synucleinを抑制できることが示された[18]．パーキンソン病モデル動物への投与で症状が改善されるのか，今後の進展が待たれる．その他にも，脳梗塞やプリオン病といった疾患に対してshRNA発現ウイルスベクターの投与で症状が改善したとの報告がある[19-21]．

3. 生体内における問題点

shRNA発現ウイルスベクターの*in vivo*への投与にあたり主に3つの異なる機序の副作用が予想されている．第1はshRNAのデリバリーに用いるウイルスベクター自体の免疫原性の問題であり，第2はsiRNA/shRNAにより標的遺伝子以外の遺伝子の発現も抑制してしまうoff-target効果と，優性遺伝性疾患に対する治療の中で変異アレルのみでなく正常アレルの発現も損なわれてしまう変異遺伝子非特異的な発現抑制の問題，第3は発現させたshRNA自身による副作用で，これには過剰なshRNAによる細胞毒性の問題がある．ここではsiRNA/shRNA固有の問題点であるoff-target効果と変異遺伝子特異的な発現抑制，shRNA毒性に関して紹介する．

a. off-target効果

siRNAは確かに標的遺伝子に対する配列特異性は高いが，用いるsiRNAが21塩基と短いため部分的に相同性のある別の遺伝子の発現まで抑制されてしまう可能性がある．この現象はoff-target効果と呼ばれており，siRNAを臨床応用する際に大きな問題となる．

Jackson[22]らの検討では，通常19塩基中15塩基以上で，最低では11塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告され，さらに，センス鎖の直接効果によっても非標的遺伝子の抑制が生じることが示された．また，バイオインフォマティクス解析によりoff-target効果を受ける遺伝子群は3'側の非翻訳領域（UTR）に相同性を多く認める傾向があることが明らかとなった[23]．これは標的遺伝子の3'側のUTRに結合しその発現を抑制するmiRNAの作用機序に類似しており，siRNAのアンチセンス鎖の5'から2塩基目～7（8）塩基目の6（7）塩基（miRNAのシード領域に相当）（図3）が3'側のUTRに相同性をもつ遺伝子に影響を及ぼすことによる．

off-target効果を回避するには，ホモロジー検索で3'側UTRにこのシード領域の塩基配列に相同性をもつ遺伝子が存在しないsiRNA配列を選択することが望ましい．しかし，siRNAのような短い配列のBLASTによる相同性検索では見落としが多いという重大な欠点がある．最近，off-target効果を最小とするために短い配列の相同性検索を高速かつ確実に実行できるプログラムが開発されウエブサイトが公開されている[24]．

b. 変異遺伝子特異的な発現抑制

優性遺伝性疾患をsiRNAで治療しようとした場合，対立する2つのアレルを両方とも抑制してしまえば正常アレルのもつ野生型蛋白の機能喪失から新たな症状を引き起こす可能性があるため，疾患の発症に対して優性に働く変異アレルのみを選択的に発現抑制し，正常アレルには作用しない

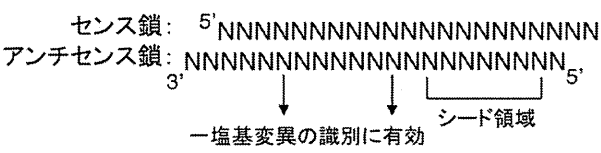

図3　siRNA配列上の重要なヌクレオチドの位置

ことが望ましい．

siRNAと基質RNAとの特異性について，変異が1塩基のみの違いである点変異の場合には正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できるsiRNAの作製は可能である．現在のところ，1塩基対のミスマッチを識別させるにはミスマッチがシード領域中に位置していない場合に比較的良好な識別効果が得られ，アンチセンス鎖の5'から10および16塩基目の位置で，特にプリン：プリンのミスマッチが最も効果的であると報告された[25]（図3）．さらにポリグルタミン病のように，繰り返し配列の長さがかわることが変異でも，繰り返し配列数に関連するpolymorophrism (SNP) やRNAの2次構造の違いを用いて変異アリル特異的な抑制が可能な場合があり，SCA3とハチントン病でその効果が示された[26-28]．

しかし，すべてのポリグルタミン病で関連するSNPが明らかになっているわけではなく，加えてpresenilin 1 (PS1) 遺伝子変異による家族性アルツハイマー病やsuperoxide disumutase 1 (SOD1) 遺伝子変異による家族性筋萎縮性側索硬化症などではその点変異が100種類以上知られており，そのすべての変異に対し特異的でかつ効率の良いsiRNAをデザインすることは困難である．これに対し，野生型および変異型，両者のアレルの発現を効率の良いsiRNAで抑制すると同時にそのsiRNAで切断されないようにエンジニアした野生型遺伝子で野生型蛋白を補おうという，いかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効なRNAi法が考案され，最近その*in vivo*における有効性が証明された[29]．

c. shRNA毒性

shRNA発現AAVベクターを経静脈的にマウスに全身性投与する実験系において致死的な肝障害が認められたという報告が2006年になされた[30]．この肝障害には配列依存性はなく，導入したshRNAの発現量との間に相関が認められ，障害を受けた肝臓では複数のmiRNAの発現が低下していた．この組織障害の機序として，ほ乳動物においてはmiRNAの前駆体 (pre-miRNA) とshRNAはexportin-5という共通の担体を通じて核から細胞質へ移行するため，核内に過剰に発現したshRNAがexportin-5によるpre-miRNAの細胞質への移行を競合的に阻害する結果miRNAへのプロセスが障害され，肝毒性に関与したことが示唆されている[30]（図2）．また，最近shRNA発現AAVベクターをマウス脳実質内に局所注入した場合でも細胞障害を生じることが報告されshRNA発現AAVベクターのマウス脳実質内への局所投与で注入部位の神経細胞脱落とミクログリアの活性化などの神経毒性が認められた[9,31]．

過剰なshRNAの発現は細胞毒性を誘導する可能性があるため，ベクター投与量を下げることで細胞毒性なく有効な至適投与量を見出すことができる場合がある[32]．また，あえてshRNA発現効率の悪いPol-II系プロモーターやmiRNAタイプのshRNA発現ベクターを用い，抑制効率の優れたshRNAをデザインして有効なRNAi効果を発揮することで，shRNA毒性を回避できる可能性が最近示された[9,33]．

B. 非ウイルスベクターを用いたRNAi遺伝子治療

非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法は，ウイルスベクターと比較して一般的にデリバ

リー担体自体の毒性がない点で安全と言えるが，その有効性や持続性が劣ることが多い．したがってウイルスベクターと同等の効果を得るためには複数回の投与を要することもあり，経済性の面での問題もある．特に神経疾患を標的としたデリバリーの場合，血液脳関門をどのように通過させるか，という点が最大の障害となっている．神経細胞および神経細胞よりもアプローチしやすい脳血管内皮細胞への非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法について概説する．

1．直接投与する方法

実際の*in vivo*におけるsiRNAの有用性を確かめる目的で，直接脳内にsiRNAを注入する報告がなされている．最近の報告ではsiRNAにコレステロールを結合させたものを投与する[34]ことや，カチオニックリポゾームにトランスフェリンを結合させたものをベクターとして用いる[35]ことでオリゴデンドロサイトにおける標的遺伝子発現抑制効果を上昇させている．臨床上これらの方法は実用性に欠けるが，実際にsiRNAをデリバリーすることができれば，標的遺伝子の発現抑制効果が*in vivo*でも認められることを示しており，重要である．神経細胞に対しては，サルの中脳黒質に化学修飾したsiRNAを投与することで，標的遺伝子であるα-synucleinの発現を抑制するという研究が最近報告されている[36]．

血液脳関門で守られている神経細胞やオリゴデンドロサイトとは異なり，脳血管内皮細胞は全身投与でアクセスが比較的容易であるという利点がある．また脳血管内皮細胞は多発性硬化症などの免疫性神経疾患，脳血管障害を中心とした神経疾患における病態形成の場として，重要な役割を果たしていることが知られている．脳血管内皮細胞へのsiRNAデリバリーが可能になればこれらの疾患の治療法として応用が期待され，臨床上有用である．今までに報告されたのはハイドロダイナミクス法と呼ばれる大量の溶媒とともに高い圧力で細胞内にsiRNAを導入させる方法のみであり[37-39]，臨床における実用性は少ない．今後各種非ウイルスベクターを用いた新規デリバリー方法の開発が望まれる．

2．脳室内に投与する方法

全身投与して血液脳関門を通過するよりも，脳室内に投与して脳脊髄液関門を通過するほうが，脳室が閉鎖空間であるため薬物濃度を高い状態で維持できるなど様々な点で利点がある．そこでsiRNAの脳室内投与についても研究が進められている．

化学修飾した合成siRNAを直接の脳室内に1～2週間持続注入することによって脳室の表層に近い海馬や大脳基底核においての標的遺伝子の発現を50%程度抑制した報告があり[40]，注目されている．siRNAをカチオニックリポソームに導入して同様に長期脳室内持続注入して，脊髄や後根神経節，視床下部等において有効に導入に成功したという報告もある[41,42]．また，最近，HDLをベクターとして脳室内投与で有効に神経細胞にsiRNAを導入した報告がなされた．SOD1に対するアンチセンス核酸を脳室に持続投与して変異SOD1トランスジェニックラットを治療したとの報告もあるが[43]，アンチセンス核酸の脳室投与による有効性については議論がある．

3．抗体やペプチドを利用して全身投与する方法

現在のところ，非ウイルスベクターを用いたsiRNAのデリバリー方法の中で，静脈注射により血液脳関門を越えて中枢神経系に到達したという報告はほとんどない．血液脳関門を通過するためにトランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体を，神経細胞に導入するためにインスリンに対するモノクローナル抗体を結合させたペグ

化免疫リポソームを作成して，全身投与することにより神経細胞へ導入させようとする試みも始まっている[44]．

神経細胞へ導入のため細胞導入シグナルペプチドの利用も研究されてきたが[45]，最近重要な報告がされた．狂犬病ウイルスの糖蛋白からデザインした29アミノ酸からなるペプチドに9つのアルギニンを結合させ (RVG-9R)，これとSOD1に対するsiRNAとで複合体を作製させた．この複合体を静脈投与することで血液脳関門を越えて，脳内のSOD1の発現を50%程度抑制した[46]．狂犬病ウイルスは脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体のα7サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトーシスによって脳内に運ばれ神経細胞にデリバリーしたと考えている．その明確な輸送経路や脳内局在が明らかになり，副作用の評価ができれば有効な投与量がsiRNA量で1～2mg/kgと比較的低容量であることから，今後の臨床応用へ将来性が期待される．

むすび

siRNAの有効性は高く神経疾患への応用を目的とした研究が急速に展開されている．ウイルスベクターを用いた方法は実際に*in vivo*での有効性を示した報告も多いが，同時に副作用を含めたいくつかの問題点も挙げられている．非ウイルスベクターを用いた方法の標的遺伝子発現抑制率は50%程度にとどまっており，ウイルスベクターと比較した際にその有効性は大きく劣るのが現状である．今後，これらの課題が克服され，siRNAが近い将来，難治性疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される．

文献

1) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. J Biol Chem. 2005; 280: 42826-30.
2) Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. Nat Biotechnol. 2009; 27: 59-65.
3) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 2002; 296: 550-3.
4) Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nat Biotechnol. 2002; 20: 500-5.
5) Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, et al. Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. J Gene Med. 2004; 6: 715-23.
6) Boudreau RL, Monteys AM, Davidson BL. Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. RNA. 2008; 14: 1834-44.
7) Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. Nat Biotechnol. 2002; 20: 1006-10.
8) Ely A, Naidoo T, Mufamadi S, et al. Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit viral replication efficiently *in vitro* and *in vivo*. Mol Ther. 2008; 16: 1105-12.
9) McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 5868-73.
10) Harper SQ, Staber PD, He X, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 5820-5.
11) Drouet V, Perrin V, Hassig R, et al. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. Ann Neurol. 2009; 65: 276-85.
12) Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, et al. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. Mol Ther.

2008; 16: 947-56.
13) Rodriguez-Lebron E, Gouvion CM, Moore SA, et al. Allele-specific RNAi mitigates phenotypic progression in a transgenic model of Alzheimer's disease. Mol Ther. 2009; 17: 1563-73.
14) Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 2005; 57: 773-6.
15) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. Nat Med. 2005; 11: 429-33.
16) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. Nat Med. 2005; 11: 423-8.
17) Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. Nat Neurosci. 2005; 8: 1343-9.
18) Sapru MK, Yates JW, Hogan S, et al. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. Exp Neurol. 2006; 198: 382-90.
19) Sun HS, Jackson MF, Martin LJ, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. Nat Neurosci. 2009; 12: 1300-7.
20) Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, et al. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. J Clin Invest. 2006; 116: 3204-10.
21) White MD, Farmer M, Mirabile I, et al. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 10238-43.
22) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol. 2003; 21: 635-7.
23) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nat Methods. 2006; 3: 199-204.
24) Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, et al. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. BMC Bioinformatics. 2009; 10: 392.
25) Schwarz DS, Ding H, Kennington L, et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. PLoS Genet. 2006; 2: e140.
26) Alves S, Nascimento-Ferreira I, Auregan G, et al. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. PLoS One. 2008; 3: e3341.
27) Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, et al. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. Curr Biol. 2009; 19: 774-8.
28) Li Y, Yokota T, Matsumura R, et al. Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. Ann Neurol. 2004; 56: 124-9.
29) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, et al. *In Vivo* Application of an RNAi Strategy for the Selective Suppression of a Mutant Allele. Hum Gene Ther. 2010 Jul 22. [Epub ahead of print]
30) Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature. 2006; 441: 537-41.
31) Ehlert EM, Eggers R, Niclou SP, et al. Cellular toxicity following application of adeno-associated viral vector-mediated RNA interference in the nervous system. BMC Neurosci. 2010; 11: 20.
32) Ulusoy A, Sahin G, Bjorklund T, et al. Dose optimization for long-term rAAV-mediated RNA interference in the nigrostriatal projection neurons. Mol Ther. 2009; 17: 1574-84.
33) Giering JC, Grimm D, Storm TA, et al. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. Mol Ther. 2008; 16: 1630-6.
34) Chen Q, Butler D, Querbes W, et al. Lipophilic siRNAs mediate efficient gene silencing in oligodendrocytes with direct CNS delivery. J Control Release. 2010; 144: 227-32.
35) Querbes W, Ge P, Zhang W, et al. Direct CNS delivery of siRNA mediates robust silencing in

oligodendrocytes. Oligonucleotides. 2009; 19: 23-9.

36) McCormack AL, Mak SK, Henderson JM, et al. α-synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra. PLoS One. 2010; 5: e12122.

37) Hino T, Yokota T, Ito S, et al. In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 340: 263-7.

38) Campbell M, Kiang AS, Kenna PF, et al. RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. J Gene Med. 2008; 10: 930-47.

39) Fuest C, Bankstahl M, Winter P, et al. *In vivo* down-regulation of mouse brain capillary P-glycoprotein: a preliminary investigation. Neurosci Lett. 2009; 464: 47-51.

40) Thakker DR, Natt F, Husken D, et al. Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain using nonviral RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 17270-5.

41) Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z, et al. *In vivo* siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. Neurosci Lett. 2006; 406: 240-3.

42) Luo MC, Zhang DQ, Ma SW, et al. An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. Mol Pain. 2005; 1: 1-8.

43) Yoshitaka Uno, Wenying Piao, Kazutaka Nishina,et al. HDL Facilitates *In Vivo* Delivery of a-Tocopherol-Conjugated siRNA to the Brain. Hum Gene Ther. 2010; in press.

44) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, et al. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. Clin Cancer Res. 2004; 10: 3667-77.

45) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA, et al. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. J Neurosci. 2004; 24: 10040-6.

46) Kumar P, Wu H, McBride JL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature. 2007; 448: 39-43.

特集　創薬シーズとして期待される核酸医薬品 ～その展望と課題～

1．序
～核酸医薬品に求められるもの～

和田　猛*

近年，医学，分子生物学の目覚ましい発展により，遺伝子治療や再生医療の実用化にも道が開かれつつある。医薬品の開発に目を向けると，低分子医薬や抗体医薬に続く次世代の医薬として，核酸医薬に大きな期待が寄せられている。しかし，これまでに上市された核酸医薬はわずか２品目にすぎず，核酸医薬の開発は大きなブレイクスルーが必要な段階に直面している。

本稿では核酸医薬の問題点を概説し，今後の課題と展望を述べる。

1．核酸医薬の種類

核酸医薬には，転写を阻害するアンチジーン核酸，デコイ核酸，翻訳を阻害するアンチセンス核酸，**siRNA** (small interfering RNA)，**miRNA** (microRNA)，リボザイム，タンパク質に結合してその働きを阻害するアプタマーなどがある。(図1)。

核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬と異なり，塩基配列や構造が既知の核酸やタンパク質を標的とするため，作用機序が明確であり副作用も少ない。医薬品の主流である低分子医薬や近年開発が盛んな抗体医薬は，疾患の原因となる標的分子の約２割程度しかカバーしておらず，残りの約８割の標的分子に対する創薬が今後の課題であるとされている。この８割にものぼる創薬困難な標的分子に対しては，従来とは異なる作用機序を有する医薬品の開発が必要であり，核酸医薬がその有力候補の一つとして期待されている。

核酸医薬の開発に最も重要なのは，核酸医薬の本体であるオリゴヌクレオチドの性能とその**DDS** (drug delivery system) 技術である。以下に，この二点に絞って問題点を概観する。

2．核酸医薬の化学修飾

核酸医薬の本体であるオリゴヌクレオチドは，適切な化学修飾を行わないと，生体内の核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)により速やかに分解されるため，薬として有効に働かない。また，水溶性の核酸分子は脂質親和性が乏しく，標的細胞への取り込み効率が低いといった欠点を有し，その実用化の大きな妨げとなっている。これらの欠点を克服するために，さまざまな化学修飾核酸が考案されてきた。核酸の化学修飾には，塩基部修飾，糖部修飾とリン酸部修飾があるが，実用化されているすべての核酸医薬は糖部修飾とリン酸部修飾の両方が施されている。核酸糖部を適切に修飾すると，標的核酸との親和性が向上するが，一般に，過度な修飾や修飾ヌクレオシドの導入箇所に依存して，核酸医薬としての活性を失う場合がある。また，糖部修飾により，分解酵素耐性は向上することが多いが，完全な酵素耐性を獲得することは

*東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻システム医療科学講座医用機能分子工学分野・准教授
(わだ・たけし)

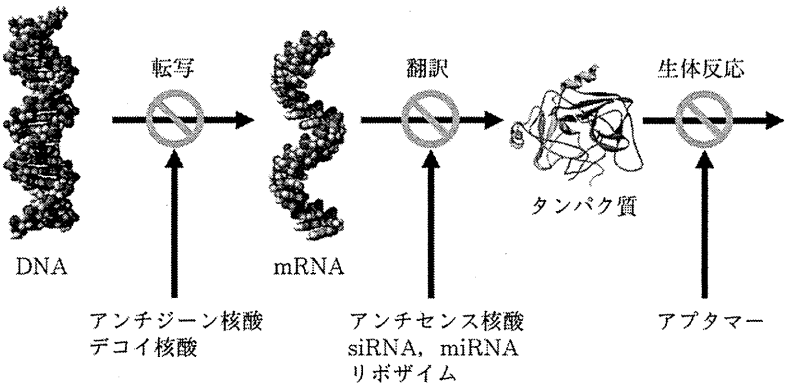

図1　核酸医薬の種類

核酸医薬による遺伝子の発現制御と生体反応の制御を示す．アンチジーン核酸，アンチセンス核酸，siRNA，miRNA，リボザイムは核酸分子を標的とし，デコイ核酸，アプタマーはタンパク質を標的とする．
mRNA：messenger RNA，siRNA：small interfering RNA
miRNA：microRNA

（筆者作成）

困難である。さらに，合成化学的には，糖部修飾は原料となるヌクレオシドの調製に多段階の反応工程を要し，生産コストの面で不利である。一方，リン酸部を修飾すると，確実に分解酵素耐性を獲得できる反面，リン原子上に不斉点が発生し，合成されるオリゴマーは立体異性体の混合物となる。

現在，実用化された核酸医薬を含め，研究開発段階にある多くの核酸医薬は，リン原子の立体が制御されていないホスホロチオエート修飾体が用いられている。だが，リン原子修飾核酸類縁体は，リン原子の絶対立体配置によって物理化学的性質（二本鎖形成能など）や生化学的性質（ヌクレアーゼ耐性など）が大きく異なるため，それらを立体選択的に合成することが今後の重要な課題である。

3．核酸医薬のDDS

核酸医薬の生体内における安定性を高め，効率的に標的細胞への導入を可能とするDDS技術の開発が，核酸医薬の実用化には極めて重要である。核酸医薬のデリバリーは，核酸分子を分解することなく標的臓器に送達し，細胞内に輸送する機能が要求される。核酸医薬のDDSではカチオン性リポソームや高分子ミセルなどのキャリアが用いられるが，カチオン性キャリアは細胞膜透過性が高い反面，細網内皮系（RES）に捕捉されやすい欠点を有する。この欠点を回避するためには，キャリアをポリエチレングリコール（PEG）などの水溶性高分子で修飾することが有効である。例えば，PEG修飾により，RESからの回避や血中安定性の向上が実現するが，細胞内への取り込み効率が大きく減少することが知られている。これらの相反する課題をどう解決するかが核酸医薬のDDSにおける大きな課題である。一般に，一本鎖のアンセンス核酸は，特段にDDSの工夫をすること無く，容易に標的細胞に導入される場合が多いが，二本鎖のsiRNAにはDDSが必須である。特にsiRNA医薬の全身投与では，核酸誘導体の血中滞留性や安定性を高め，患部へ効果的に送達可能な新規DDSの開発が極めて重要である。

4．核酸医薬の製造と品質管理

現在，核酸医薬品開発に特化したガイドラインは世界的にまだ確立されておらず，その中で核酸医薬の安全性と有効性を確保することが緊急の課

siRNA：small interfering RNA，**miRNA**：microRNA，**DDS**：drug delivery system
RES：細網内皮系，**PEG**：ポリエチレングリコール

題である。核酸医薬の本体であるオリゴヌクレオチドを高純度で合成する技術水準は近年飛躍的に向上しているが，DDS を含めた核酸医薬の製剤を考えた場合，製品が多様な分子集合体となる可能性は否定できず，その品質管理は一般に困難である。また，現在，上市あるいは臨床段階にある核酸医薬のすべてがリン原子の立体が制御されていないホスホロチオエート型修飾を含むが，リン原子の絶対立体配置の違いが核酸医薬の生理活性に及ぼす効果は全く調査されていない。不斉中心を有する低分子医薬では，立体化学と薬理活性の相関の解明が必須であるように，核酸医薬の分野でもこれらの立体選択的合成技術の確立と有効性の検証が今後の重要な課題である。

5．まとめ

現在，数年前と比較して核酸医薬に対するトレンドや企業の取り組み方が変化する中，いかにして直面する課題を克服するか，新しいコンセプトや革新的な技術の創出が求められている。わが国における核酸医薬の開発は，今がまさに正念場であると言える。

3．リン原子修飾核酸の合成と医薬への応用

和田　猛*

核酸医薬の実用化において解決すべき課題は，核酸誘導体の生体内における安定性の向上とデリバリー技術の確立である。これらの問題を克服するための手法の一つとして，核酸リン原子の化学修飾がある。核酸のリン酸部位を修飾すると，確実に分解酵素耐性を獲得できる反面，リン原子上に不斉点が発生し，合成されるオリゴマーは立体異性体の混合物となる。リン原子修飾核酸類縁体は，リン原子の絶対立体配置によって物理化学的性質や生化学的性質が大きく異なるため，それらを立体選択的に合成することは極めて重要である。しかし，これまでリン原子の絶対立体配置を制御可能な合成法が存在しなかったため，核酸類縁体の物理化学的性質，生化学的性質，ひいては医薬としての性質に対して，リン原子の絶対立体配置の違いがどのように影響するか，という極めて本質的な問題が全く解明されていない。

本稿では，筆者らがこれまでに開発したリン原子修飾核酸の立体選択的合成法を中心に概説する。

1．ホスホロチオエートDNAの立体選択的合成

ホスホロチオエートDNAは，これまでに最も広汎に研究されてきたリン原子修飾DNA類縁体であり，医薬品として実用化され，市販されているものもある。しかし，現在用いられているホスホロチオエートDNAは，すべて多くの立体異性体の混合物である。ホスホロチオエートDNAの生理活性，物理化学的性質は，リン原子の絶対立体配置によって大きく異なることが知られており，それらを立体選択的に合成する意義は大きい。これまでに報告されているホスホロチオエートDNAの立体選択的合成法の多くは，ジアステレオマー混合物として得られるモノマーをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離精製して用いている。

一般に，物理化学的性質が酷似したジアステレオマーのクロマトグラフィーによる分離は困難であり，モノマーユニットの合成収率も低いのが問題である。我々は，入手が比較的容易な光学活性アミノアルコールを不斉源とするヌクレオシド3'-環状ホスホロアミダイト（オキサザホスホリジン）誘導体の立体選択的合成に成功した。（図1）[1)~3)]。この方法の長所は，従来のリン原子修飾核酸類縁体の立体選択的合成法とは異なり，モノマーが立体選択的に合成できることである。立体化学的に純粋なモノマーとヌクレオシドを立体特異的に縮合することができれば，リン原子の立体が制御されたホスホロチオエートDNAの合成が

*東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻システム医療科学講座医用機能分子工学分野・准教授（わだ・たけし）

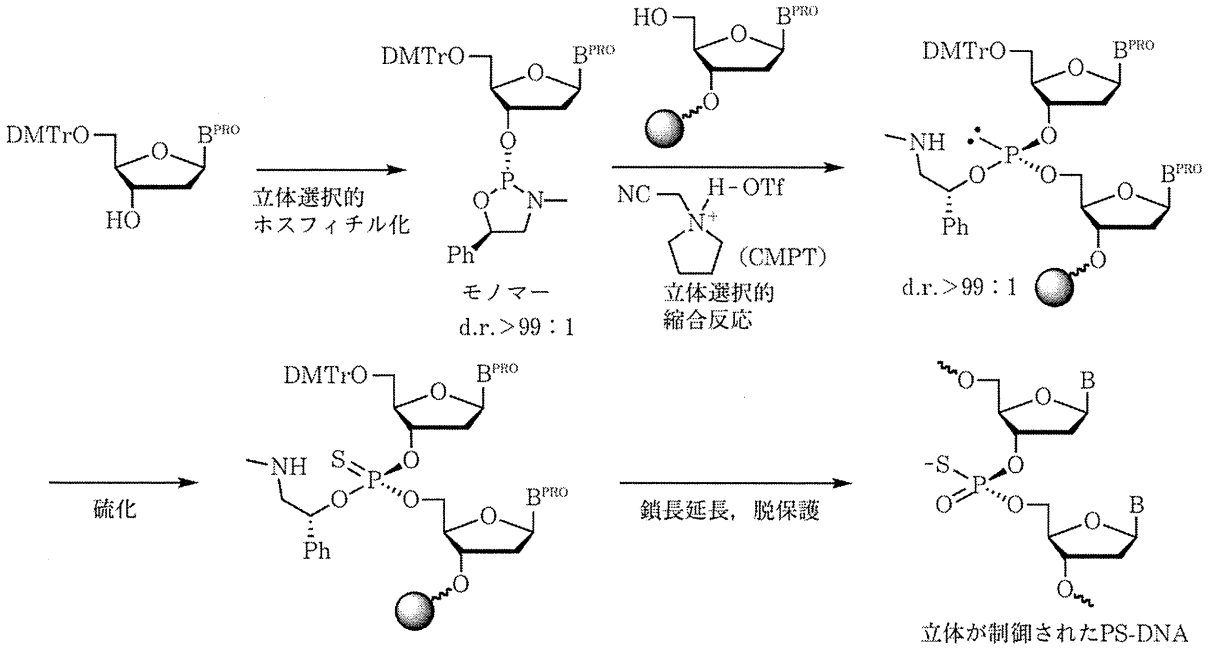

図1　オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA の立体選択的合成

オキサザホスホリジン法は，立体化学的に純粋なオキサザホスホリジンモノマーと求核性の低い酸性活性化剤を用いて，立体選択的な縮合反応を行う方法である．

PS-RNA：ホスホロチオエート RNA

（文献 1～3 より）

可能となる。

しかし，従来のホスホロアミダイト法による DNA の合成では，求核性の高いテトラゾールが活性化剤として用いられるために，縮合反応においてモノマーのエピマー化が進行する。これは，テトラゾールの共役塩基であるテトラゾリドアニオンがモノマーのリン原子を繰り返し求核攻撃するためである。

そこで，我々は，求核性の低い新しい活性化剤である，N-(シアノメチル) ピロリジニウムトリフラート (CMPT) を開発し，立体化学的に純粋なオキサザホスホリジンモノマーを用いて，立体選択的な縮合反応を行うことに成功した。(オキサザホスホリジン法)。縮合反応は 5 分以内に完結し，反応のジアステレオ選択性は 99：1 以上であった。この方法はさらに改良され，固相合成に適用され，自動合成機を用いて，リン原子の立体が制御された 10～20 量体程度のオリゴマーの合成を行うことができる[4]。

2．ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA の立体選択的合成に成功したので，次に，この方法をホスホロチオエート RNA の立体選択的合成に応用した。(**図2**)。まず，DNA 誘導体と同様の方法で，2'- 水酸基が t- ブチルジメチルシリル基 (**TBDMS 基**) で保護されたオキサザホスホリジンモノマーを立体選択的に合成した。次に，CMPT を活性化剤として用い，液相法で二量体の合成を試みたところ，DNA 誘導体の場合と比較して，反応速度と立体選択性の顕著な低下が観察された。RNA 誘導体の合成では，2'- 水酸基の保護基として，かさ高い TBDMS 基が導入されているため，その立体障害により，縮合反応速度が低下し，モノマーユニットがエピマー化することが原因であった。DNA 誘導体の場合もモノマーのエピマー化が進行するが，エピマー化の速度よりも縮合反応速度の方がはるかに大きいため，十

TBDMS 基：t- ブチルジメチルシリル基

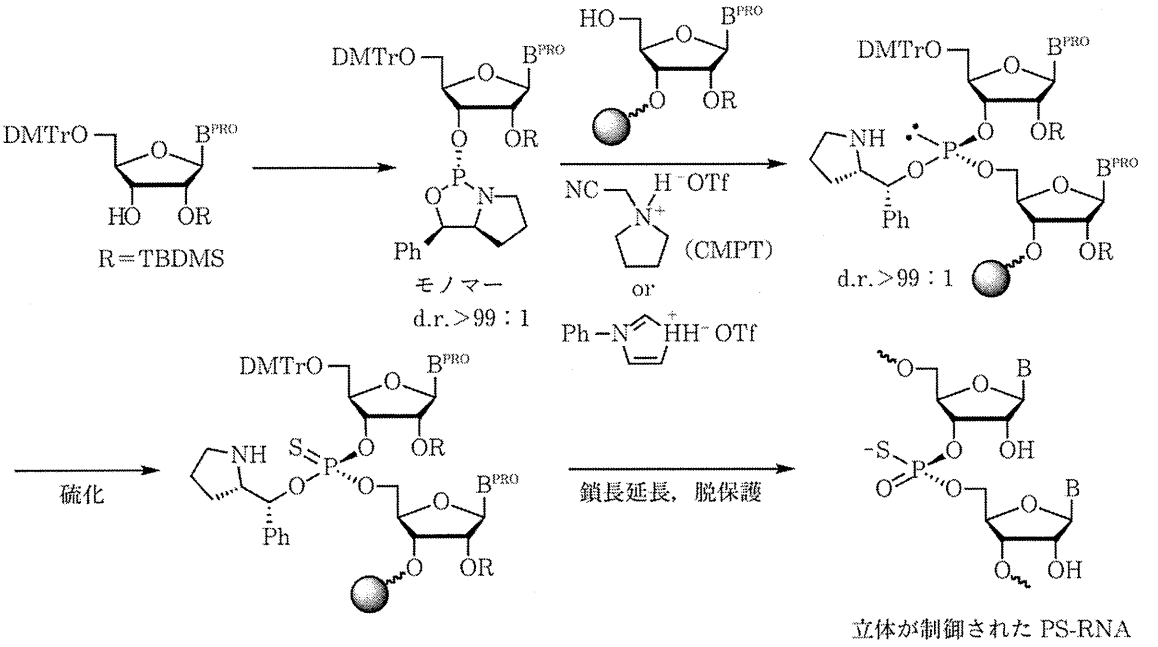

図2　オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成には，より熱力学的に安定なモノマーと強力な活性化剤が必要である．

（文献5より）

分な立体選択性が発現する。

そこで，これらの問題を克服するために，オキサザホスホリジン環の構造をさらに検討し，縮合反応条下でエピマー化し難い，熱力学的に安定なオキサザホスホリジン骨格構造の再検討を行った。検討の結果，プロリンから誘導される二環式構造を有するモノマーを用いると，エピマー化がほぼ完全に抑制できることが分かった。さらに，この二環式構造を有するモノマーは，求核性の活性化剤の存在下でもエピマー化しないため，通常長鎖 RNA 合成で用いられる強力な活性化剤を使用することも可能である。実際に，長鎖のホスホロチオエート RNA を固相合成する際には，求核性を有する N- フェニルイミダゾールトリフラートが活性化剤として有効であった。この手法を用いて，リン原子の立体が制御されたホスホロチオエート RNA10 量体の合成に成功し，相補的な塩基配列を有する天然型 RNA 鎖との二重鎖形成能を評価したところ，リン原子の絶対立体配置の違いにより，RNA 二重鎖の熱的安定性に顕著な差があることが分かった[5]。

今後，我々が開発した手法により合成されたリン原子の立体が厳密に制御されたホスホロチオエート RNA の核酸医薬へ応用されることが期待される。

3．H- ホスホネート DNA の立体選択的合成

上述したように，オキサザホスホリジン法は，5員環状リン化合物であるオキサザホスホリジン誘導体の立体電子効果を活用してリン原子の立体化学を制御する合成法である。オキサザホスホリジン骨格中の酸素原子に隣接する炭素原子に置換基を2つ導入すると，これが第三級炭素となる。縮合反応によって得られるホスファイト中間体を強酸性条件下処理すると，第三級カルボカチオンの生成を伴い，リン原子の立体化学純度を損なうこと無く，対応する H- ホスホネートジエステルへと変換可能であることを見出した。H- ホスホネート結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体は，さまざまなリン原子修飾核酸類縁体の有用な合成中間体として知られるが，これまで，オリゴマーレベルで立体を制御した合成例が無く，本合成法が開発されたことにより，ホスホロチオエート以外のさまざまな置換基を有する核酸類縁体の合成が可能となる。(**図3**)[6]。

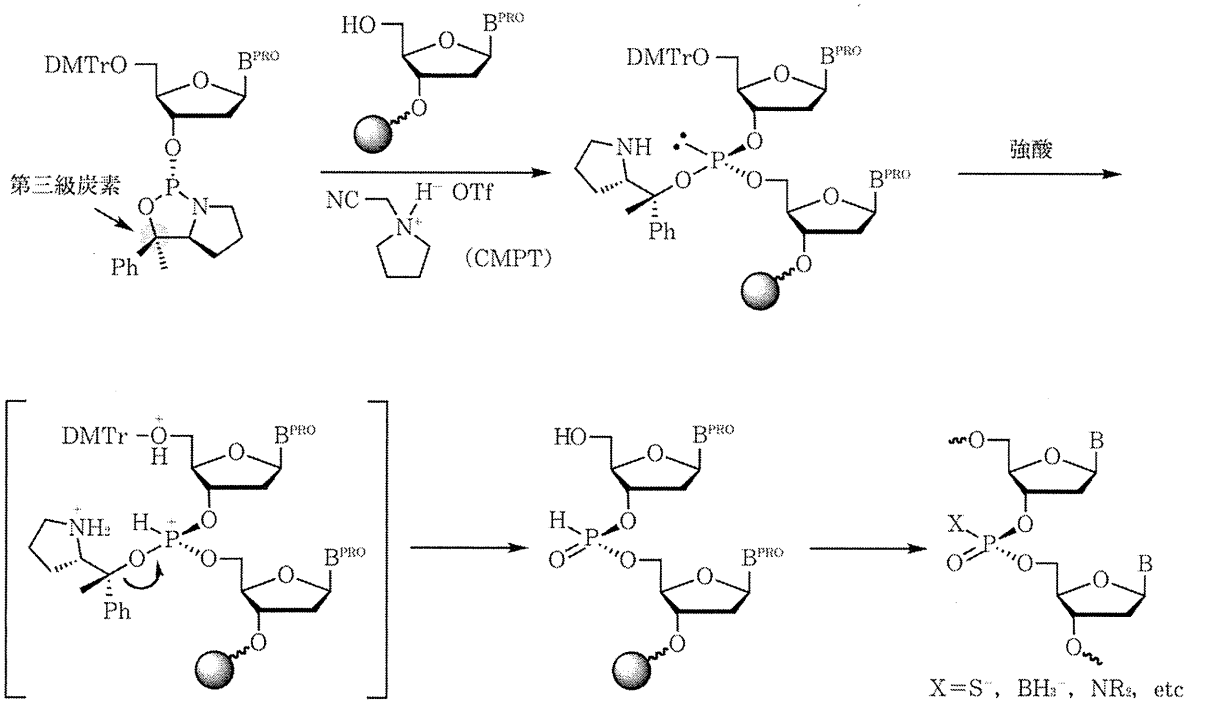

図3 H- ホスホネート DNA の立体選択的合成と変換反応

第三級炭素を有するオキサザホスホリジンモノマーを用いることにより，立体が制御された H- ホスホネート DNA が合成できる．この中間体は，さまざまなリン原子修飾核酸へと立体特異的に変換することができる．

（文献6より）

4．ボラノホスフェート DNA/RNA の合成

ホスホロチオエート DNA をアンチセンス医薬として用いる場合の問題点は，その細胞毒性の高さである。この細胞毒性は，細胞内のタンパク質と非特異的な相互作用によるもので，医薬の投与量が多い場合に起こる副作用の原因となる。近年，ホスホロチオエートに代わる新しいリン原子修飾核酸として，ボラノホスフェート DNA が注目されている。ボラノホスエートは，リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つをボラン（BH_3）で置換した構造を有し，天然型のホスホジエステルやホスホロチオエートと比較して脂溶性が高く，細胞膜透過性に優れる。また，ヌクレアーゼ耐性も高く，DNA 類縁体の場合，RNA と形成する二重鎖が RNase H の基質となるため，アンチセンス核酸として有効である。

一方，RNA 類縁体の場合，高い **RNAi**（RNA interference）活性を示すことから次世代の核酸医薬として注目されている。化学合成は，ホスホロアミダイト法や H- ホスホネート法により得られるホスファイト誘導体をボラノ化することにより達成されるが，ボラノ化の際に核酸塩基への副反応が問題となる。

我々は，この問題を克服した合成法である，ボラノホスホトリエステル法を開発した。（**図4**）[7)～9)]。この方法は，あらかじめボランが導入されたホスホリル化剤を合成し，これとヌクレオシドを反応させてモノマーを合成するため，ボラノ化剤による核酸塩基への副反応を本質的に回避することができる。この方法を用いて，ボラノホスフェート RNA 類縁体の合成も試みられている[9)]。

最近，我々は，ボラノホスフェートよりも酸化度の低い H- ボラノホスホネートをモノマーとして用いる新規合成法（H- ボラノホスホネート法）

RNAi：RNA interference

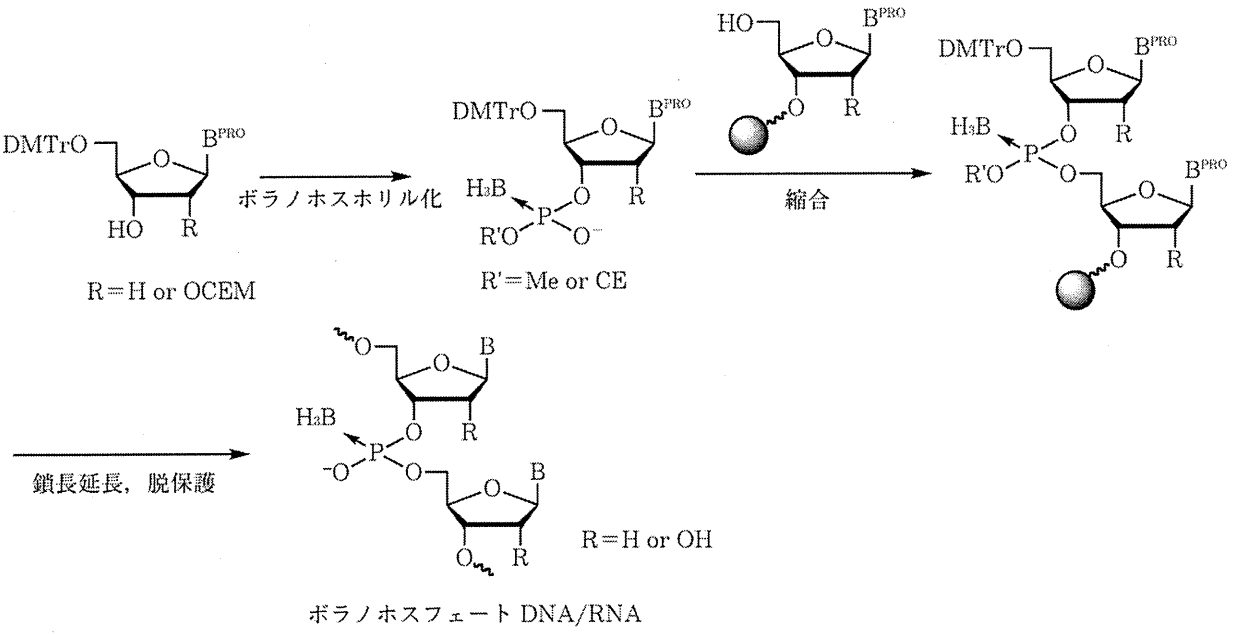

図4　ボラノホスホトリエステル法によるボラノホスフェート DNA/RNA の合成

ボラノホスホトリエステル法では，リン原子にボランが導入されたモノマーを用いることにより，4種類の核酸塩基を有するボラノホスフェート DNA/RNA を効率的に化学合成することができる．

（文献7～9より）

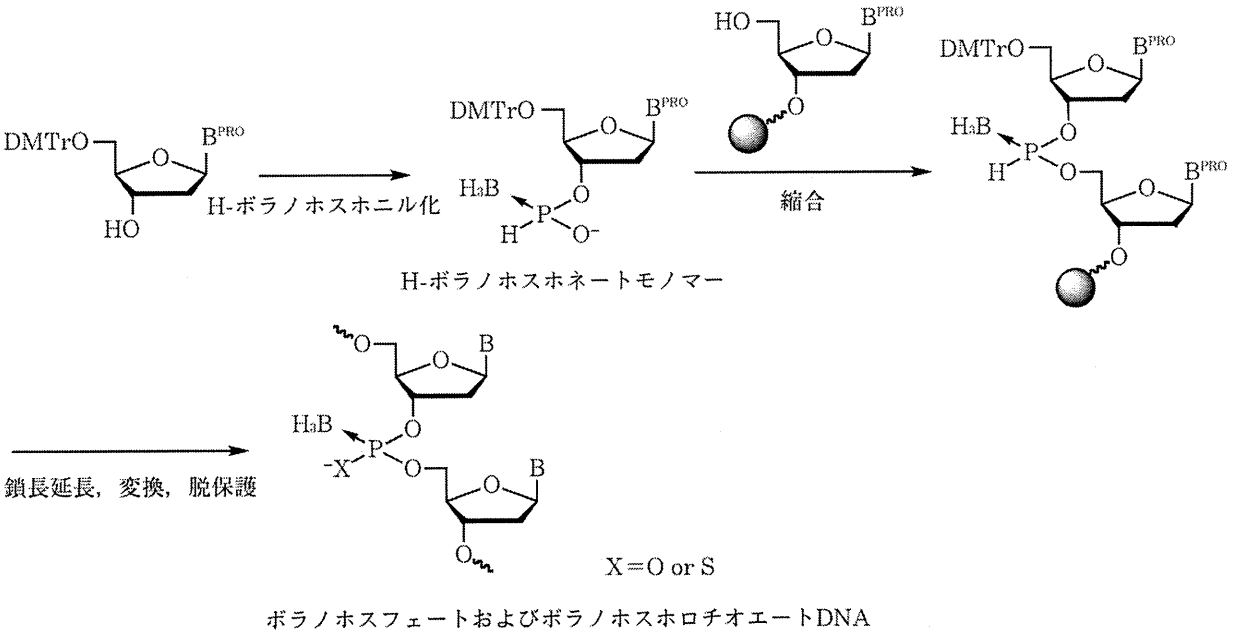

図5　H- ボラノホスホトリエステル法による含ホウ素 DNA 類縁体の合成

H- ボラノホスホネート法のモノマーは極めて反応性が高い．この方法により，核酸医薬として有用できまざまな含ホウ素核酸類縁体を合成することができる．

（文献 10 より）

を開発した。(図5)[10]。この方法は，従来のボラノホスホトリエステル法と比較して，モノマーの反応性が高く，より長鎖のオリゴマー合成に適している。さらに，P-H結合の水素原子を他の官能基に変換できるため，さまざまな含ホウ素核酸類延体の合成が可能である。

上記すべてのボラノホスフェート型核酸類縁体合成法では，リン原子の立体化学は制御することができないが，我々が開発したオキサザホスホリジン法を用いることにより，リン原子の立体が制御されたボラノホスフェート型核酸類縁体を合成することができる[6][11]。現在，核酸塩基部への副反応を抑制可能な新規合成反応を開発中であり，近い将来，その実用化が期待される。

5. まとめ

以上述べてきたように，オキサザホスホリジン法により，核酸医薬として有望なリン原子修飾核の立体選択的合成が可能となった。今後，それらの絶対立体配置と生理活性の関係が明らかになれば，より高性能な核酸医薬が創製されることが期待できる。核酸医薬の実用化に向けて，核酸類縁体合成時に生じる立体異性体の問題は，その機能発現や安定性向上のために解決すべき必須の課題であり，筆者らの方法がその解決のための強力な手段となることを期待する。

文　献

1) Oka N, Wada T : Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. Chem Soc Rev **40** : 5829-5843, 2011.
2) Oka N, Wada T, Saigo K : Diastereocontrolled Synthesis of Dinucleoside Phosphorothioates Using a Novel Activators, Dialkyl (cyanomethyl) ammonium Tetrafluoroborates. J Am Chem Soc **124** : 4962-4963, 2002.
3) Oka N, Wada T, Saigo K : An Oxazaphospholidine Approach for the Stereocontrolled Synthesis of Oligonucleoside Phosphorothioates. J Am Chem Soc **125** : 8307-8317, 2003.
4) Oka N, Yamamoto M, Sato T, et al : Solid-phase Synthesis of Stereoregular Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates Using Bicyclic Oxazaphospholidine Derivatives as Monomer Units. J Am Chem Soc **130** : 16031-16037, 2008.
5) Oka N, Kondo T, Fujiwara S, et al : Stereocontrolled Synthesis of Oligoribonucleoside Phosphorothioates by an Oxazaphospholidine Approach. Org Lett **11** : 967-970, 2009.
6) Iwamoto, N, Oka N, Sato T, et al : Stereocontrolled Solid-phase Synthesis of Oligonucleoside H-phosphonates by an Oxazaphospholidine Approach. Angew Chem Int Ed **48** : 496-499, 2009.
7) Shimizu M, Wada T, Oka N, et al : A Novel Method for the Synthesis of Dinucleoside Boranophosphates by a Boranophosohotriester Method. J Org Chem **69** : 5261-5268, 2004.
8) Shimizu M. Saigo K, Wada T : Solid-phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Boranophosphates by the Boranophosphotriester Method. J Org Chem **71** : 4262-4269, 2006.
9) Enya Y, Nagata S, Masutomi Y, et al : Chemical synthesis of diastereomeric diadenosine boranophosphates (ApbA) from 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) adenosine by the boranophosphotriester method. Bioorg Med Chem **16** : 9154-9160, 2008.
10) Higashida R, Oka N, Kawanaka T, et al : Nucleoside H-Boranophosphonates : a New Class of Boron-Containing Nucleotide Analogues. Chem Commun : 2466-2468, 2009.
11) Wada T, Maizuru Y, Oka N, et al : Stereoselective Synthesis of Dinucleoside Boranophosphates by an Oxazaphospholidine Method. Bioorg Med Chem Lett **16** : 3111-3114, 2006.