

アンチセンス医薬品は、標的 RNA と配列依存的に二重鎖を形成するオリゴ核酸を有効成分とし、標的 RNA の機能を制御することで有効性を発揮する。アンチセンス医薬品の開発の歴史は古く、1980-1990 年代から開発が行われてきたが、体内で分解されやすく、また、有効性も乏しいことなどから、ほとんどの開発は中止された。しかし、その後も基盤研究が粛々と進められ、修飾型核酸の開発並びに RNase H 研究の進展により、近年、再び注目を集めることとなった。Kynamro®に代表される「Gapmer 型アンチセンス」の登場である。Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解することにより機能する。Fig. 5 に Gapmer 型アンチセンスの模式図を示した。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には mRNA との結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる。このアンチセンスが標的 mRNA と結合すると、“DNA と RNA の相補鎖を認識して RNA 鎖を切断するヌクレアーゼ”である RNase H がオリゴの中央部で DNA/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖を切断する。RNase H は普遍的に発現する酵素で、主に核内に存在することから、Gapmer 型アンチセンスは核内で機能していると考えられている。Kynamro®では、結合力を高める修飾型核酸として糖部を修飾した 2' MOE が使用されているが (Fig. 4, 5)、現在開発段階にあるアンチセンスでは、更に結合力の強い架橋型核酸も用いられている。Gapmer 型アンチセンスの開発を牽引しているのはアンチセンス開発の老舗 ISIS 社であり、Genzyme 社と提携して Kynamro®を上市している。世界初の核酸医薬品である Vitravene®を開発したのも ISIS 社である。この他、Santaris 社が架橋型核酸 LNA (2', 4' -BNA) を用いた Gapmer 型アンチセンスを開発している。

### 5.1.2 スプライシング制御型アンチセンス

現在開発されているアンチセンス医薬品の主流は mRNA を分解する Gapmer 型であるが、立体障害によって蛋白質のアクセスを阻害するタイプのアンチセンスも開発されており、その代表例として「スプライシング制御型アンチセンス」が挙げられる (Table 3)。現在、臨床開発段階にあるスプライシング制御型アンチセンスは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬であり、エクソンスキッピングの機序によって作用する<sup>11)</sup> (Fig. 6)。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では、ジストロフィン遺伝子 (79 個のエクソンで構成される) がエクソン単位で欠失する変異が多く観察されており、この結果、筋細胞の維持に必須であるジストロフィン蛋白が生成しない。Fig. 6 に示した例では、エクソン 50 の欠失により、「エクソン 49 と 51 が連結した mRNA」が生じ、エクソン 51 以降で読み枠がずれることにより (Out of frame)、早期にストップコドンが生じる。この結果生じた「C 末側が欠失した変異ジストロフィン蛋白」は不安定なため、分解される。この状況において、エクソン 51 の ESE 領域 (Exonic splicing enhancer : スプライシングを促進するシス配列) と相補的に結合するアンチセンスを導入すると、スプライシングが変化し、エクソン 51 が

“スキップ”される。これにより生じる「エクソン 49 とエクソン 52 が連結した mRNA」は読み枠が合うことから、C 末端まで翻訳されることとなり、「エクソン 50、51 にコードされるアミノ酸だけが欠失した少し短いジストロフィン蛋白」が生成する。重要な点は、ジストロフィン蛋白は N 末側のモチーフと C 末側のモチーフが機能発現に必須であるが、中央部の配列は多少抜けても機能が保持される点である。エクソンスキッピング法はこのジストロフィン蛋白の性質を生かした治療法といえる。本手法で用いるアンチセンスのターゲットは pre-mRNA であり、pre-mRNA とスプライシングに関与する蛋白質群との結合を阻害することに機能を発現する。Fig. 6 の作用機構を見てもわかるように、エクソンスキッピング法ではアンチセンス医薬品は RNA 鎖に結合すればよく、Gapmer 型のように RNA 鎖を切断する必要はない（むしろ、切断してはいけない）。したがって、アンチセンスの結合力を高めつつ、RNase H が作用しないように修飾型核酸が配置される。また、RNase が作用しないモルフォリノオリゴも用いられる。

エクソンスキッピング療法に用いるアンチセンスとして開発が進んでいるものは、GlaxoSmithKline 社と Prosensa 社が開発している Drisapersen、並びに Sarepta 社が開発している Eteplirsen がある。いずれも Fig. 6 に示したエクソン 51 を標的とするもので、前者は 2' -OMe 化アンチセンス、後者はモルフォリノオリゴが用いられている。Drisapersen は日本を含めた複数の国で大規模な国際共同治験（Phase 3）が進行していたが、主要評価項目（6 分間歩行距離）が有意に改善しなかったことを 2013 年 9 月に発表している（その後、GlaxoSmithKline 社は Prosensa 社に Drisapersen の開発権を返還している）。Eteplirsen は Phase 2b で良好な結果が得られており、2014 年に Phase 3 が開始される予定である。国内においても第一三共と日本新薬で開発が進められており、それぞれエクソン 45 とエクソン 53 を標的したアンチセンスの開発が発表されている。エクソン 45、エクソン 53 のスキッピングは、エクソン 51 のスキッピングに次いで対象患者数が多いとされている。第一三共は独自に開発した架橋型核酸 ENA を用いており、日本新薬はモルフォリノオリゴを使用している。現在開発が進んでいるスプライシング制御型アンチセンスはエクソンスキッピングの機序によるものであるが、今後病態の解明が進むにつれ、エクソンインクルージョン<sup>12, 13)</sup>など新しいスプライシング制御型アンチセンスが開発されるものと期待される。

## 5.2 siRNA

RNAi という現象はもともとアンチセンスを用いた研究が契機で発見された。すなわち、「アンチセンスのネガコンとしてセンス鎖 RNA を線虫に注入したところ、予想外にもセンス鎖でも遺伝子機能が阻害された表現型が得られた」という短い一文が 1995 年の Cell 誌に記載され<sup>14)</sup>、この原因を Fire らが追及したところ、「センス鎖 RNA に微量に混入した二重鎖 RNA が mRNA の分解を引き起こしている」という事実が明らかになったのである<sup>15)</sup>。この線虫における RNAi の発見の後、RNAi が誘導されるためには二重鎖 RNA が 20 塩基程度の短い二本鎖 RNA (siRNA) に切断される必要があることが示され、更に、2001 年にはヒト細

胞においても、合成した siRNA を導入すれば RNAi が誘導されることが明らかにされた<sup>16)</sup>。siRNA はアンチセンスに比べて低濃度で mRNA を分解できることから、核酸医薬品のシーズとして大きな注目が集まったが、デリバリーが予想以上に難しく、また、自然免疫系を活性化される例が報告されたことなどから<sup>17)</sup>、臨床応用への期待が下火になった経緯がある。しかし、最近の技術進展により、siRNA 医薬品の臨床開発数は 20 品目近くまで増えており、再び注目を集めている。

まず、自然免疫を活性化する副次的作用の問題については、二重鎖 RNA のセンサーである Toll 様受容体 3 の研究が進んだこと、修飾型核酸の導入により活性化を低減できることが明らかになったことから、リスクをあらかじめ回避できるようになった。デリバリーに関しては、全身投与が可能な siRNA として、末端にコレステロールを付加した siRNA が報告されたが<sup>18)</sup>、個体レベルの作用としては不十分であった。その後、Tekmira 社がリポソームの脂質成分を徹底的にスクリーニングすることで、SNALP (stable nucleic acid lipid particles) と呼ばれるリポソーム製剤を開発し、全身投与された siRNA が肝臓において効率よく機能する技術が確立された<sup>19)</sup>。現在では、リポソームの改良が更に進み、0.02~0.1 mg/kg (ED50) という低用量で発現抑制を実現している。Alnylam 社はこの技術を用いて、アミロイドーシスの原因となるトランスサイレチン (TTR) を抑制する siRNA 医薬品 Patisiran (ALN-TTR02) の開発を行っている。TTR は主に肝臓で発現し、血中で機能する蛋白質であるが、TTR 遺伝子に特定の変異が導入されると変異 TTR 蛋白からなるアミロイド(水に溶けない繊維状の蛋白)を生じ、全身の臓器に沈着する。静脈内投与された Patisiran は肝臓で機能し、血中の変異 TTR を減少される効果がある。これまで siRNA 医薬品は「Phase 2 止まり」といわれてきたが、Patisiran は Phase 2 でも良好な結果が得られており、現在 Phase 3 に入っている。

ここまで、「二本鎖 siRNA を全身投与するためにはリポソーム等のキャリアが必要」と述べてきたが、最近になって糖鎖を siRNA の末端に付加した「GalNAc-conjugated siRNA」と呼ばれる技術が新たに開発された。Alnylam 社が開発したこの技術は肝実質細胞の細胞表面に発現するアジアロ糖タンパク質受容体と GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) の結合を利用したもので、キャリアを用いない Naked な全身投与(皮下投与)により、肝臓で機能する。上述の TTR を標的とした siRNA に GalNAc を付加した「ALN-TTRsc」は Phase 1 試験において 0.5~0.2 mg/kg (ED50) で有効性を示しており、現在 Phase 2 の段階にある。Alnylam 社では肝臓が標的となる遺伝性疾患に特化した「5 x 15 program」を推進しており、五つの siRNA 医薬品を 2015 年までに後期臨床試験にもっていくことを目標としている。対象としては、上述の TTR アミドーシスに加え、血友病(標的: Antithrombin)、高コレステロール血症(標的: PCSK9)、急性間欠性ポルフィリン症(標的: ALAS1)、β サラセミア/鉄過剰症(標的: TMPRSS6)などのパイプラインが進行している。これらの計画はほとんどが GalNAc-conjugated siRNA を採用している。

なお、局所投与の siRNA に関しては、末端修飾がなされていない Naked siRNA の開発も進んでいる。Quark 社の開発する PF-655 (標的: RTP801、適応: 糖尿病性黄斑浮腫) は Naked で硝子体注射される siRNA 医薬品であり、現在 Phase 2 の段階である。その他、siRNA 医薬品の具体的な開発品については、文献 9, 10 を参照して頂きたい。国内企業の話題としては、日東電工/Quark 社が開発する ND-L02-s0201 (標的: HSP47、適応: 肝硬変) が挙げられ、海外で Phase 1 試験が開始されている。siRNA 医薬品の臨床試験は、国内企業としては初めての例である。ND-L02-s0201 では、肝臓における活性化星細胞に取りこませることを目的として、ビタミン A が結合したリポソーム製剤を用いている。siRNA 医薬品の開発状況に関しては文献 20, 21 も合わせて参照されたい。

### 5.3 miRNA に関連する核酸医薬品

非コード RNA の一つである miRNA は 20 数塩基の短い一本鎖 RNA で、主に mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することで、mRNA の機能を阻害する。miRNA も 1993 年に線虫を用いた研究から発見され<sup>22,23)</sup>、2001 年になってヒトも含めた多くの生物種で miRNA が存在することが示された<sup>24)</sup>。miRNA の生成機構/作用機構は siRNA のパスウェイと類似している。すなわち、ゲノム DNA から転写されてヘアピン構造をとった pri-miRNA は、二段階の切断を受けて siRNA と同じ二本鎖 RNA となる。その後、siRNA と同様に RISC 複合体に取りこまれた後、相補鎖であるパッセンジャー鎖が除かれて、一本鎖ガイド鎖 (= miRNA) が RISC 複合体に残る。この複合体がガイド鎖に相補的な mRNA を認識し、mRNA の翻訳抑制あるいは分解を引き起こす。siRNA との違いや詳細な分子機構はここでは割愛し、miRNA が標的 mRNA の機能を抑制することを強調しておく。

miRNA に関連する核酸医薬品は「miRNA の発現異常によって引き起こされる病態を、miRNA の量を正常化することによって治療する」というコンセプトで創製される。まず、miRNA の発現が減少した病態については、miRNA を補充する試みが行われる。miRNA とは上述の生成経路の最後に生じる一本鎖 RNA を指すが、miRNA が機能を獲得するためには相補結合した二本鎖の状態での RISC 複合体に取りこまれた後、一本鎖 RNA (= miRNA) になる必要がある。したがって、miRNA を補充する療法では二本鎖 RNA の状態で細胞内に導入することとなる。このように miRNA を補充する目的で使われる二本鎖 RNA は“miRNA mimic”とも呼ばれ、二本鎖 RNA であるため体内への導入にはキャリアが必要である。一般に癌においては miRNA の発現が減少していることから、miRNA mimic は癌への適応が特に期待されている。現時点では非臨床試験の段階であり、開発している企業としては Mirna 社が挙げられる。

miRNA の発現が亢進した病態では、miRNA の量を減少させる方法論が必要である。miRNA は短い RNA であることから、ほぼ同じ長さの siRNA によって miRNA を認識し、分解することは事実上不可能である。そこで、miRNA の機能を抑制する手法として、miRNA と相補的に結合するアンチセンスが用いられる。miRNA 阻害型アンチセンスは、miRNA と標的 mRNA の結合をブロックするものであり、アンチセンス医薬品の分類としては「立体障害」となる

(Table 3)。miRNA 阻害型アンチセンスの開発を行っているのは、アンチセンス医薬品開発の代表格 ISIS 社と siRNA 医薬品開発の代表格 Alnylam 社が合同で設立した Regulus 社、並びに Santaris 社、Miragen 社がある。現在、miRNA 阻害型アンチセンスで臨床試験段階にあるのは、Santaris 社が開発している Miravirsen である。Miravirsen は架橋型核酸 LNA を含むアンチセンスであり、皮下注射に投与された後、肝臓で機能する。Miravirsen の標的である miR-122 は肝臓特異的に発現する miRNA で、miR-122 が C 型肝炎ウイルスの RNA に結合することがウイルス増殖に必須である。皮下投与された Miravirsen は肝細胞内で miR-122 をトラップするため、C 型肝炎ウイルスの増殖が抑制される。Miravirsen は Phase 2 で良好な結果が得られており、Phase 3 に入るところである。miRNA に関連する核酸医薬品の関しては文献 25, 26, 27 も合わせて参照して頂きたい。

#### 5.4 デコイ

デコイ核酸医薬品は転写因子が結合する DNA 領域の塩基配列を人工的に合成した二本鎖の DNA である。デコイを細胞内に導入すると、標的の転写因子に「おとり (=デコイ)」として結合し、この結果、本来のプロモーターDNA 領域と転写因子の結合が阻害される。したがって、デコイはアプタマーと同様に蛋白質の標的とする核酸医薬品である。一般に転写因子はある特定の現象に関わる遺伝子群を同時に発現制御することから、転写因子を標的とした医薬品は効果的に有効性を発揮する可能性を秘めている。デコイ核酸医薬品の開発はアンジェス MG において進められており、炎症に関連する遺伝子群を制御する転写因子 NF $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) を標的としたデコイの臨床研究が進められている。NF $\kappa$ B が関与する病態は、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、血管再狭窄、関節症など多岐に渡っており、NF $\kappa$ B デコイの応用範囲は広いと期待される。本開発については、文献 28, 29 に詳しいので、そちらを参照して頂きたい。

デコイ核酸医薬品としては、もう一つ Adynxx 社が開発する AXX1 がある。AXX1 は early growth response protein 1 (EGR1) と呼ばれる転写因子と結合し、その機能を阻害する。EGR1 は神経可塑性に関与することが知られており、EGR1 の阻害により痛みの伝達が遮断される。現在、手術時に単回投与し、手術後の痛みを低減するという目的で臨床試験が行われている。2013 年の時点で Phase 2 が終了し、良好な結果が得られている。

#### 5.5 アプタマー

アプタマーは一本鎖 RNA 又は DNA で構成され、その立体構造により標的蛋白質と結合して機能を阻害する核酸医薬品である。試験管内人工進化法 (SELEX 法) によって取得される。アプタマーの利点としては、標的蛋白質への結合性/特異性が高い、免疫原性が低い、化学合成可能で製造、保存が容易であることなどが挙げられる。アプタマーは細胞外で蛋白質と結合して機能を発揮するため、原理的に抗体医薬品と競合する。先に述べたアプタマーの優位性はあるものの、爆発的に開発の進む抗体医薬品が圧倒的に先行しているのが現状

である。現在、アプタマーの臨床開発品数は 10 程度であり、Phase 3 の段階にあるものが 2 品目ある。アプタマーの具体的な開発品目に関しては、文献 30, 31 に詳細に記載されているのでここでは割愛し、抗体医薬品ではまねのできないアプタマーの開発例として REG1 を紹介する。

REG1 は二つのオリゴ核酸 Pegnivacogin と Anivamersen で構成されるアプタマー医薬品で、Regado 社で開発が進められている。Pegnivacogin は血液凝固因子の一つである第 IXa 因子を標的とする RNA アプタマーであり、第 IXa 因子を阻害することにより血液凝固を抑制する。一方、Anivamersen は Pegnivacogin と相補的に結合する RNA 鎖であり、Pegnivacogin の立体構造を変化させることができる。興味深いことに、Pegnivacogin は血中半減期が 24 時間以上 (PEG 化)、Anivamersen は 5 分未満 (PEG 化なし) に設計されている。すなわち、通常は Pegnivacogin を投与することで血液凝固を抑制し、効果が強すぎた場合に半減期の短い Anivamersen を投与することで“解毒”することが可能となっている。このようなオリゴ核酸ならではの発想は、抗体医薬品との差別化という意味で重要であり、今後も新しいアイデアが生まれてくることを期待したい。なお、REG1 は Phase 2 で良好な結果が得られ、現在、Phase 3 に入っている。

#### 5.5 CpG オリゴ

CpG オリゴはここまで述べてきた核酸医薬品において“副作用”と懸念される点を、主作用とする医薬品である。すなわち、オリゴ核酸が Toll 様受容体に代表されるパターン認識受容体を介して引き起こす自然免疫系の活性化を、免疫賦活化作用という有効性として捉えた医薬品である。CpG オリゴはワクチンを投与する際の核酸アジュバントとして利用されるケースが多く、一本鎖 DNA を認識する Toll 様受容体 9 を介して作用する。具体的な開発品目に関しては、文献 32~34 を参照して頂きたい。

---

## 6. 最後に

以上、核酸医薬品の基本的性質と開発動向について述べたが、今後の課題としては、デリバリー技術のさらなる進展（肝臓以外の臓器への送達、細胞内取り込み効率の向上、投与量の低減）、並びに合成コストの低減が挙げられる。これらの課題に取り組むことが重要であるが、一方で、現在の技術でも核酸医薬品の上市は十分に可能なレベルに達しており、まずは、治療が可能な疾患を対象にして成功例を出していくことが重要である。核酸医薬品の規制面については、現状ではケーススタディが少なく、世界的に整備されていない状況であるが、国内においても核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスを議論する動きが生まれている。今後、医薬品開発とレギュラトリーサイエンス研究の両輪で前進し、日本発の核酸医薬品が早期に誕生することを期待したい。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、当研究室の吉田徳幸博士、佐々木澄美博士には調査研究や Figure 作成等で御協力頂きました。また、核酸医薬品開発に関わる多くの方から御助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 鈴木和博. 「核酸医薬」 バイオ医薬品. 西島正弘、川崎ナナ編. 化学同人. 2013、p.226-234.
- 2) 山口照英、内田恵理子. 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保, 世界への薬事申請書の書き方成功へのバイブル. 佐藤章弘 企画編集. 技術情報協会. 2012.
- 3) Aoki, Y.; Nagata, T.; Yokota, T.; Nakamura, A.; Wood, M.J.; Partridge, T.; Takeda, S. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- $\alpha$ 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013,22(24), p.4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
- 4) 西川元也. 核酸医薬開発の鍵を握る薬物送達システム(DDS). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2012. 43(9) , p.778-785.
- 5) 和田猛. 核酸医薬品に求められるもの. 医薬ジャーナル. 48(1), p.61-63.
- 6) 小比賀聡. 糖部架橋型核酸の医薬への応用. 医薬ジャーナル. 2012, 48(1), p. 65-69.
- 7) Obika, S., *et al.* Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar pucker. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, p.8735-8738.
- 8) 平尾一郎. 新規機能性核酸の創製へのチャレンジ. 医学の歩み. 2011, 238 ( 5 ) , p.566-572.
- 9) シード・プランニング社. 2012年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望.
- 10) HS財団規制動向調査ワーキンググループ. HS財団平成25年度規制動向調査報告書「核酸医薬品の開発と規制の動向」. 2014年3月.
- 11) 李知子, 松尾雅文. Duchenne型筋ジストロフィーに対するエクソンスキッピング誘導治療. 医学のあゆみ. 2011, 238(5), p. 536-541.
- 12) Sivanesan, S.; Howell, M.D.; Didonato, C.J.; Singh, R.N. Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci.* 2013, 4(1), p.00-00. doi: 10.2478/s13380-013-0109-2. 【井上先生へ頁数のご記入をお願いいたします】
- 13) Osman, E.Y.; Yen, P.F.; Lorson, C.L. Bifunctional RNAs targeting the intronic splicing silencer N1 increase SMN levels and reduce disease severity in an animal model of spinal muscular atrophy. *Mol Ther.* 2012, 20(1), p.119-26. doi: 10.1038/mt.2011.232.
- 14) Guo, S.; Kempfues, K.J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 1995,81(4), p.611-20. PMID: 7758115.
- 15) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific

- genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 391(6669), p.806-11. PMID: 9486653.
- 16) Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411(6836), p.494-8. PMID: 11373684.
  - 17) Kleinman, M.E.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, J.Z.; Albuquerque, R.J.; Yamasaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Karikó, K.; Ambati, B.K.; Wilgus, T.A.; DiPietro, L.A.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, J.R.; Taylor, E.W.; Ambati, J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 2008, 452(7187), p.591-7. doi: 10.1038/nature06765.
  - 18) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R.K.; Racie, T.; Rajeev, K.G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliensky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004, 432(7014), p.173-8.
  - 19) Zimmermann, T.S.; Lee, A.C.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Bumcrot, D.; Fedoruk, M.N.; Harborth, J.; Heyes, J.A.; Jeffs, L.B.; John, M.; Judge, A.D.; Lam, K.; McClintock, K.; Nechev, L.V.; Palmer, L.R.; Racie, T.; Röhl, I.; Seiffert, S.; Shanmugam, S.; Sood, V.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Wheat, A.J.; Yaworski, E.; Zedalis, W.; Koteliensky, V.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P.; MacLachlan, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006, 441(7089), p.111-114. Epub 2006 Mar 26.
  - 20) 福永淳一, 神津知子. RNAi創薬と国内外の開発状況. バイオインダストリー. 2012, 29(7), p.10-14.
  - 21) 宮岸真. 核酸医薬 種類とDDS. Pharma Tech Japan. 2013, 29(6), p.115-123.
  - 22) Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, 75(5), p.843-854.
  - 23) **Wightman, B.**; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993, 75(5), p.855-862.
  - 24) Lagos-Quintana, M.I.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001, 294(5543), p.853-858.
  - 25) 鹿島理沙、羽田明子. miRNA研究最前線. ファルマシア, 2013, 49 (6), p.524-528.
  - 26) 山田陽史、吉田哲郎. miRNA医薬開発の現状と展望. 遺伝医学MOOK. 2012, 23, p.208-213.
  - 27) 尾崎充彦、落谷孝広. micro医薬によるがん治療への展開. 医学のあゆみ. 2011, 238(5), p.524-528.
  - 28) 三宅 隆, 森下竜一. デコイ核酸医薬を用いる血管疾患治療薬の開発. 医薬ジャーナル.

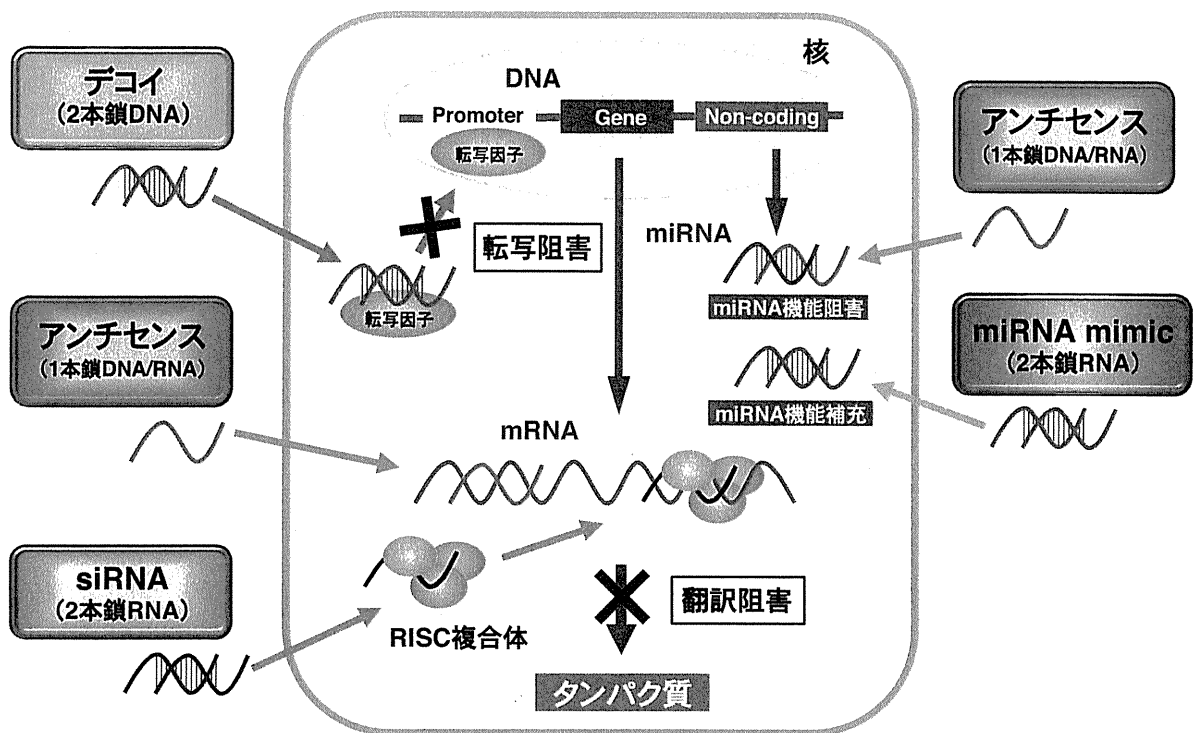


2012, 48(1). p.119-123.

- 29) 玉井克人. NFκBデコイDNA軟膏によるアトピー性皮膚炎の治療. 医薬ジャーナル. 2012, 48(1), p.125-128.
- 30) 石黒亮. アプタマー創薬と国内外の開発状況. バイオインダストリー. 2012, 29(7), p.4-9.
- 31) 藤原将寿. アプタマー医薬. 医学のあゆみ. 2011, 238(5) p. 507-513.
- 32) Hancock, R.E.; Nijnik, A.; Philpott, D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012,10(4),p.243-254.
- 33) Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Eggermont, A.; Fridman, WH.; Galon, J.; Sautès-Fridman, C.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2012, 1(5), p.699-716.
- 34) Bode, C.; Zhao, G.; Steinhagen, F.; Kinjo, T.; Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines.* 2011, 10(4), p.499-511.

Fig.1

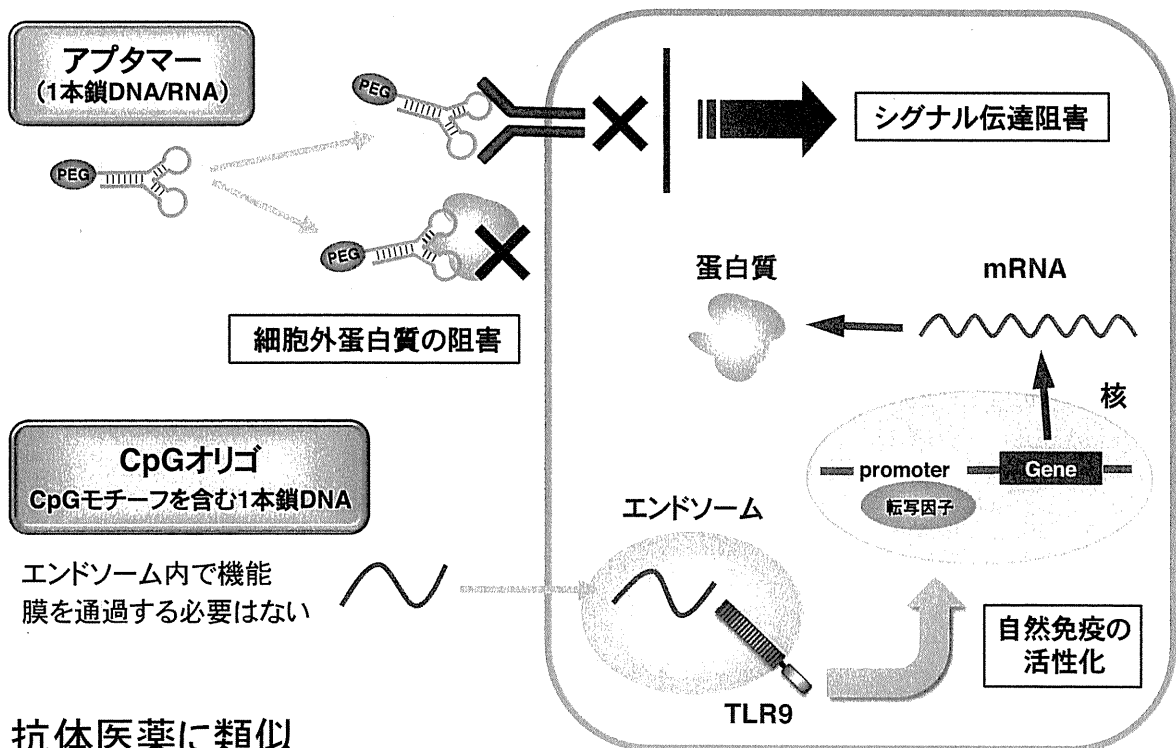
### 細胞の内側で機能する核酸医薬品



細胞膜を通過し、細胞内で配列特異的な結合により作用

Fig.2

### 細胞の外側で機能する核酸医薬品



抗体医薬に類似  
オリゴ核酸の立体構造により作用

Fig.3

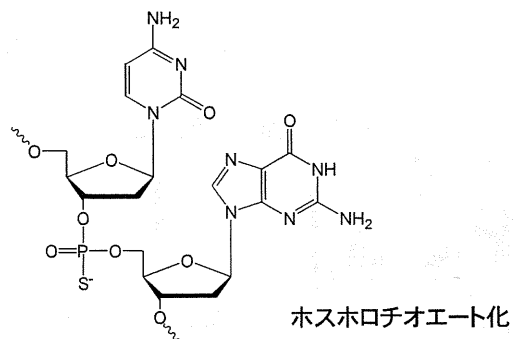


Fig.4

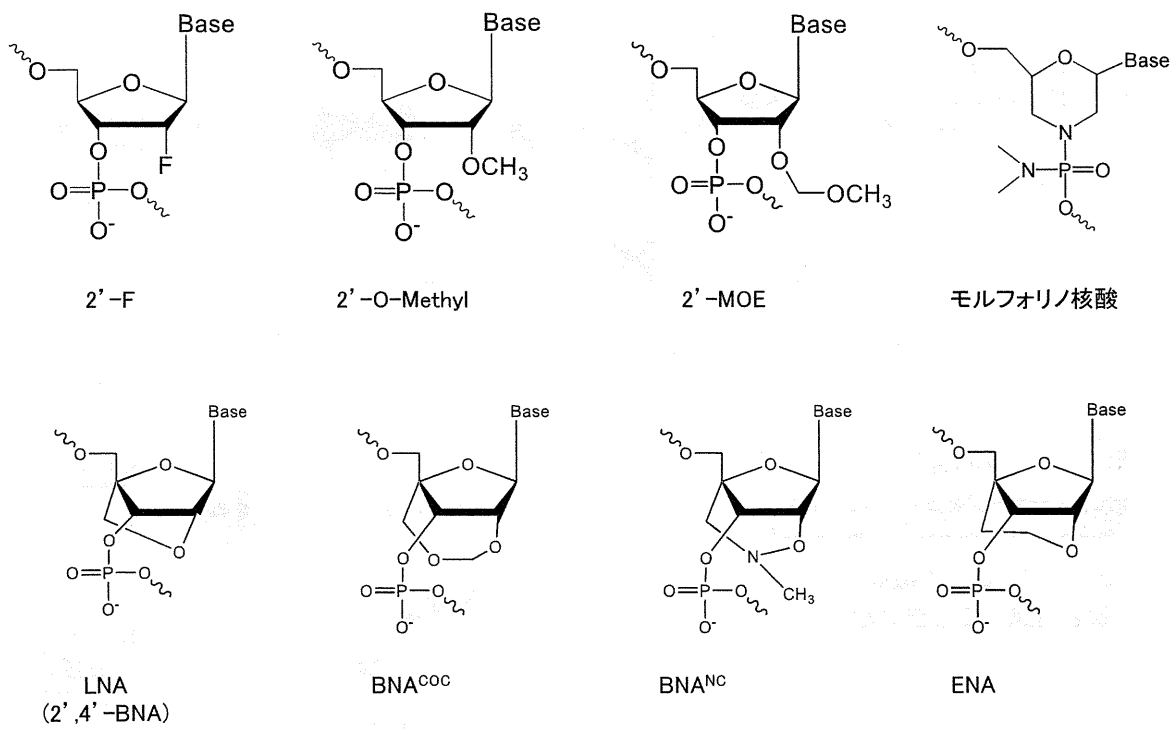
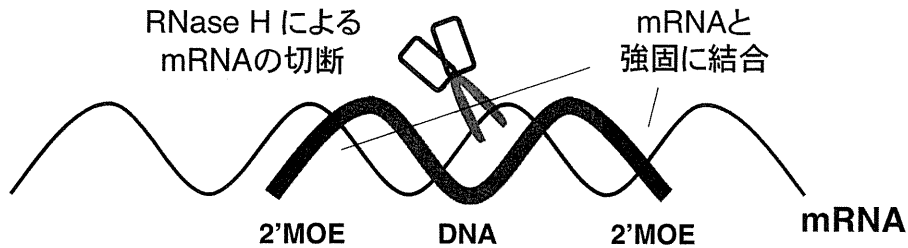


Fig.5

## Gapmer型アンチセンスの構造

RNase H: DNA/RNA二本鎖を認識し、RNAを切断するエンドヌクレアーゼ



- オリゴ核酸の両端にmRNAとの結合力が強い「糖部を修飾した修飾型核酸 (2'-MOE、LNA、ENA等)」を導入する。
- オリゴ核酸の中央“Gap”部分はRNase Hが基質として認識できるよう、DNA骨格にする(すなわち、糖部の2'位を修飾しない)。
- 一般に、Gapmer型アンチセンスはリン酸部がS化されている。

Fig.6

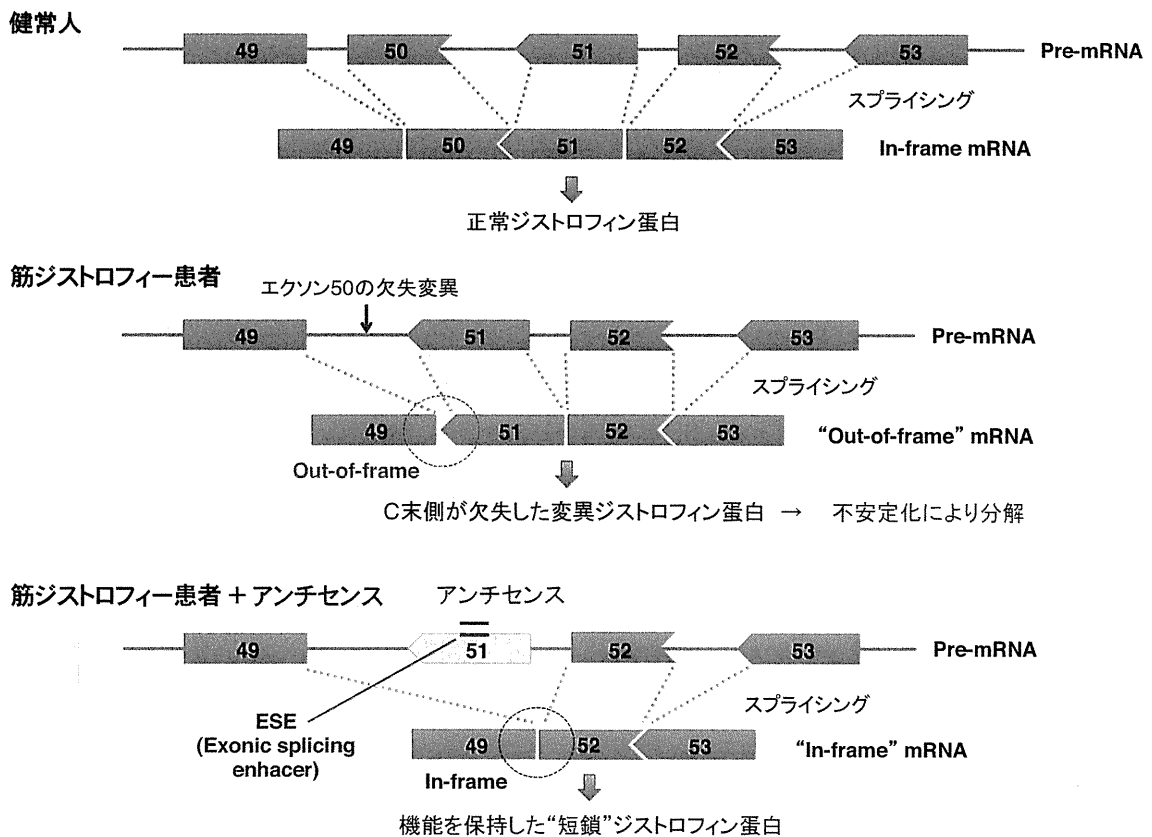


表1

## 多様な核酸医薬品

	アンチセンス	miRNA アンチセンス	siRNA	miRNA mimic	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖RNA, ヘアピン型1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
塩基長	12-21 20-30	12-16	20-25	20-25 > 49	20程度	26-45	20程度
標的	mRNA Pre-mRNA	miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞"外" (エンドソーム 内)
作用機序	mRNA分解 スプライシング 阻害	miRNA阻害	mRNA分解	miRNAの補充	転写阻害	機能阻害	自然免疫の 活性化
開発段階	承認 2品目 Phase 3	Phase 2→3	Phase 3	Phase 1	Phase 2	承認 1品目 Phase 3	Phase 2
主な 開発企業	Isis, Santaris, Prosenza, Sarepta	Santaris, Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

Table.2

## 上市された核酸医薬品

商品名	一般名	分類	承認国 承認年	標的	適応	投与 ルート
Vitravene	Fomivirsen	アンチセンス	米 1998 EU 1999	サイトメガロウイルス(CMV) 遺伝子IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	硝子体 内局注
Macugen	Pegaptanib	アプタマー	米 2004 EU 2006 日 2008	Vascular endothelial growth factor (VEGF)165 蛋白質	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体 内局注
Kynamro	Mipomersen	アンチセンス	米 2013	ApoB100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下注

Table.3

## アンチセンス医薬品の分類

分類	標的	原理	作用機構
Gapmer型	mRNA	RNase H	mRNAの分解
スプライシング制御型	pre-mRNA	立体障害	pre-mRNAとスプライソソームの結合阻害
miRNA阻害型	miRNA	立体障害	miRNAとmRNAの結合阻害

国立医薬品食品衛生研究所発信 | その 1 |

# 医薬品の発がん性不純物の 評価と管理に関するガイダンス

阿曾 幸男

あそ ゆきお 国立医薬品食品衛生研究所 連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

## はじめに

化学的に合成された医薬品にはその合成に用いられる出発物質や試薬、反応中間体、反応副生成物、出発物質や試薬に含まれる不純物、保存中に生成する分解物などが不純物として混在しうる。化学合成医薬品の不純物に関するガイダンスとして、日・米・EUの三極で国際調和された日米EU医薬品規制調和国際会議(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH) Q3A/Q3B/Q3C<sup>1-3)</sup>がある。

ほとんどの不純物の安全性確認および管理については、ICH Q3A(R2)：「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」、およびQ3B(R2)：「新有効成分含有医薬品のうち、製剤の不純物に関するガイドライン」によって指針が与えられている。また、原薬または医薬品添加物の製造工程あるいは製剤の製造工程で使用されるか生成する揮発性有機化学物質に関してはICH Q3C：「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に安全性データに基づきその許容量が勧告されている。

一方、医薬品の有機不純物の中にはDNAと反応してDNAにダメージを与え、発がんリスクを高める可能性のある不純物がある。これらの不純物には発がん性のデータがないものが少なくなく、その発がん性を評価するためには時間を要する。また、DNAと反応してがんを引き起こす不純物の毒性発現には閾値がないと考えられていることから、不純物のレベルをどこまで下げるべきかについての明確な指針が必要となる。そこで、不純物の構造をもとにDNA反応性(変異原性)の評価を行い、変異原性があるとわかった不純物に対して発がん性不純物として管理するという戦略のもと、現在、発がんリスクを有する可能性のあるDNA反応性(変異原性)不純物の評価と管理に関するガイダンス(ICH M7 ガイドライン)の制定に向けた作業が進められている。

本稿においては、ICH M7 step2 文書<sup>4)</sup>に基づきガイドラインの要となる、毒性学的懸念の閾値(Thresholds of Toxicological Concern; TTC)に基づく安全とみなしうるレベルの設定、不純物の変異原性を有するかの評価、不純物の管理を中心に概説する。なお、本稿で述べた内容は今後のガイドライン制定作業において変更される可能性のあることを申し添える。

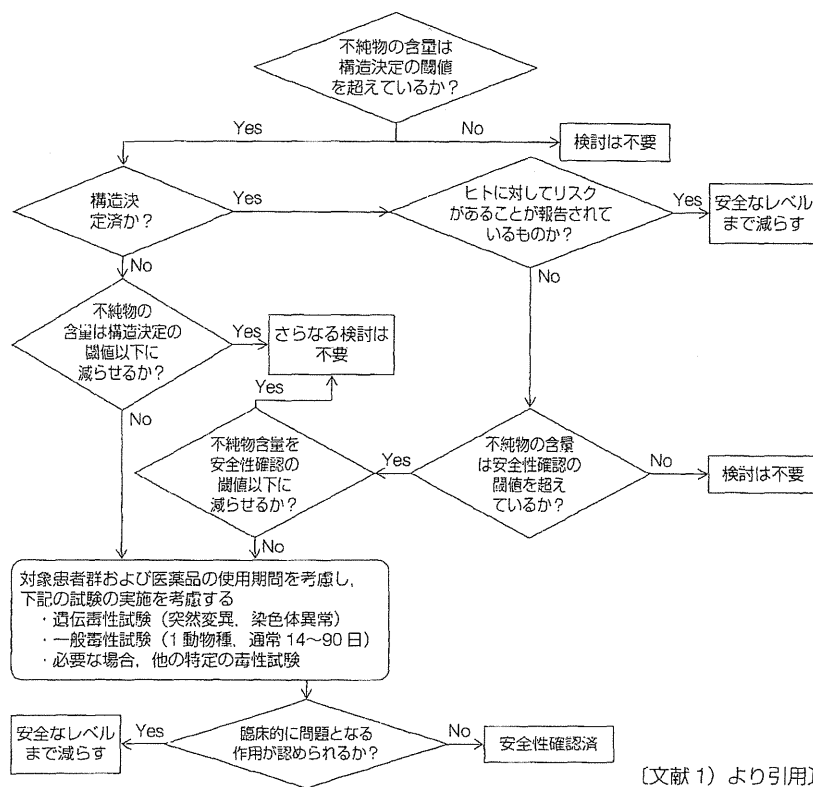


図1 構造決定、安全性の確認のためのフローチャート〔ICH Q3A(R)〕

表1 原薬中の有機不純物に関する報告、構造決定、安全性確認の閾値(Q3A(R))

最大1日投与量	報告の閾値	構造決定の閾値	安全性確認の閾値
≤2 g	0.05%	0.10%と1.0 mg/dayの低いほうの値	0.15%と1.0 mg/dayの低いほうの値
>2 g	0.03%	0.05%	0.05%

〔文献1〕より引用

### DNA 反応性(変異原性)不純物に対する安全とみなしうるレベル

ICH Q3A/Q3Bにおいては1日最大投与量に応じ、報告の必要な閾値、構造決定(identification)の必要な閾値、安全性の確認(qualification)の必要な閾値について具体的な数値が定められている(表1<sup>1)</sup>、原薬の例)。また、構造決定、安全性確認のためのフローチャートが定

められている(図1)<sup>1)</sup>。フローチャートに従えば、構造決定の閾値を超える不純物の構造決定を行い、既知の安全性データあるいは化学構造からみてヒトへの安全性が懸念される場合は安全なレベルまで不純物の量を減らす必要がある。ICH M7ガイドラインにおいては、不純物が毒性の発現に閾値がないと考えられるDNA反応性(変異原性)を有するとわかったとき、その不純物のげっ歯類に対する発がん性試験データがある場合は発がんデータ(例えば試験動物の50%にがんが発生する投与量など)に基づき安全とみなされるレベルを算出することが推奨される。

一方、発がん性データがない場合にはそのようなアプローチは使えないので、ICH M7ガイドラインにおいては、毒性学的懸念の閾値



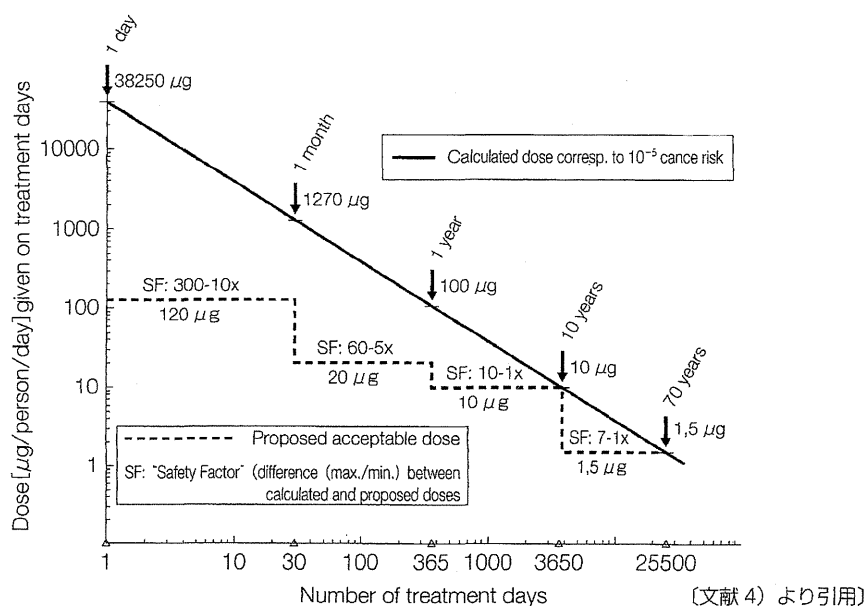


図2 投与期間の関数として表した理論上の10万分の1の発がんリスクに相当する量として算出された変異原性不純物の1日摂取量とM7ガイドラインで推奨する許容摂取量の比較

(TTC)<sup>5,6)</sup>の概念を取り入れ、安全とみなしうるレベルとする。

TTCとは、すべての化学物質について、その値以下では明らかな健康被害がないとするヒトでの包括的な実質安全性閾値(virtual safety dose; VSD)であり、発がん性が最も感受性の高い毒性エンドポイントであるという仮定に基づいて、発がん性データベース(carcinogenic potency database; CPDB)<sup>7)</sup>に登録された発がん物質のTD<sub>50</sub>の値の分布解析から求められたものである。

10年を超えて長期間投与される医薬品中の不純物質に対するTTCは1.5μg/dayである。この値は医薬品を毎日生涯にわたり摂取したときの発がんリスクが10<sup>-5</sup>増加する(10万人に1人ががんが生ずる)のに相当する量である。食品などでは発がんリスクの増加が10<sup>-6</sup>となるようにTTC(0.15μg/day)が定められているが、医薬品では治療効果によるベネフィットが

あることを考慮し、10<sup>-5</sup>のリスクが用いられている。このリスクレベルは、あらゆる種類のがんを含めたとき、ヒトの一生涯において3人に1人を上回る割合で発がんすることに比べても、理論上のわずかなリスクの増加に相当すると思われる。

また、TTCの算出はConservativeな仮定に基づいていることから、TTCを上回ったとしても必ずしも発がんリスクの増加にはつながらず、がんの発生率の増加は、実際には10万人に1人を大幅に下回る可能性が高いと考えられる<sup>6)</sup>。投与期間が短い医薬品については投与期間に応じて高い閾値を設定することが可能である<sup>8)</sup>(図2)<sup>4)</sup>。これは、生涯累積用量が同じであれば高濃度の発がん性物質の短期間曝露と低濃度の発がん性物質の長期間曝露の発がんリスクは同等であるとの仮定に基づいている。

## DNA 反応性(変異原性)不純物の評価

ICH M7 ガイドラインでは医薬品中の不純物が DNA と反応し、発がんリスクを高める可能性があるかの評価は以下のように行うことが推奨されている。まず、細菌に対する変異原性の予測ができる(定量的)構造活性相関((Q)SAR)プログラムによる *in silico* 解析を行う。不純物の構造がわかれば、変異原性の評価が可能であるという利点をもつ。

(Q)SAR による解析の結果、警告構造がないと判定された場合、DNA 反応性はないと見なされ、DNA 反応性に関するさらなる検討は必要ないことになる。警告構造がある場合、その構造が原薬と共通の警告構造(例えば、不純物と原薬の同じ位置および環境に同一の警告構造)である場合はその原薬の Ames 試験の結果が陰性であれば、非変異原性不純物と判断される。

原薬の警告構造と関連しない場合は TTC レベル以下に不純物を減らすか、Ames 試験により DNA 反応性(変異原性)についてさらに検討を行うことになる。Ames 試験が陰性であれば、(Q)SAR の結果のいかんにかかわらず DNA 反応性はないと見なされ、DNA 反応性に関するさらなる検討は必要ない。Ames 試験が陽性であれば TTC レベル以下に不純物を減らすことになる。Ames 試験が陽性のとき、*in vivo* における適切な gene mutation assay を行い、陰性であれば、不純物が許容限度値を超えて設定することの裏づけとなりうる。

## DNA 反応性(変異原性)不純物の管理

医薬品中の不純物が DNA 反応性(変異原性)であることがわかったら、最終製品中の不純物レベルが安全とみなしうるレベル以下であるこ

とを保証する管理戦略の構築が必要となる。ICH M7 ガイドラインにおいては製品および製造工程の理解ならびにリスクマネジメントの原則に基づく管理戦略の構築を推奨している。発がん性データがない変異原性不純物の場合は TTC(1.5 µg/day)レベル以下であることを保証する必要がある。例えば 1 日投与量が 30 mg の医薬品原薬中に許容される不純物の濃度は  $1.5 \mu\text{g/day} \div 30,000 \mu\text{g/day} \times 100 = 0.005\%$  である。この値は ICH Q3A にある報告の必要な閾値より 1 オーダー低い値である。1 日投与量が増えれば、原薬中に許容される不純物濃度はさらに低くなる。最終製品について試験を行い不純物が許容限度以下であることを示すのは不純物の管理方法として最も単純、かつストレートな方法である。

しかし、高感度の分析をルーチン的に行うことになるため、このような方法での管理は困難な場合もある。リスクマネジメントに基づき、工程設計および管理と適切な分析試験を組み合わせることにより、最終製品に関して高感度な試験を行わなくとも、最終製品中の不純物レベルが安全とみなしうるレベル以下であることを保証することが可能になる場合もある。例えば次のような例が考えられる。

出発物質 Y は、5 つの合成工程の第 3 工程で導入され、標準的な分析法によって 0.1% 未満の不純物 B が日常的に検出される場合、出発物質中の 0.1%(不純物の)規格が許容できるか判断するため、10% までの異なる濃度で不純物 B を出発物質に添加したラボスケールでの除去試験を行う。最後の 3 工程を通して 500 倍を超えるパージファクターが確認された場合、このパージファクターを出発物質 Y 中の 0.1% の規格に適用すると、原薬中の不純物 B の量は 2 ppm 未満と予測される。

この結果は、TTC に基づいた原薬中の限度値 50 ppm より低く、出発物質 Y 中の不純物 B

を0.1%以下の規格で管理することにより最終製品中の不純物Bの量が許容基準以下であることを保証できることになる。具体的な管理戦略は医薬品によりケースバイケースであるが、ICH Q11:「原薬の開発と製造に関するガイドライン」<sup>9)</sup>などを参照して管理戦略を構築することになる。

## おわりに

医薬品中の不純物が変異原性を有し発がん性が疑われる不純物であるとわかったら、今まではその医薬品の開発は断念されることが多かったものと思われる。それは発がん性データに基づいて不純物の許容限度値を決めることが時間と労力がかかるためと考えられる。リスク評価に基づくTTCの概念を導入することにより、発がん性に関する試験データがなく許容摂取量が不明な不純物に対して、医薬品中の許容限度値を設定することが可能と考えられる。このような医薬品の安全性を確保するためには不純物が許容限度値以下であることを保証する管理戦略の構築が不可欠である。そのためには分析技

術の高感度化もさることながら、製品や製造工程を十分に理解し、製造工程の管理を適切に行うことが今までにも増して重要になると思われる。

## 参考文献

- 1) International Conference on Harmonisation (2006). Q3A (R2) : Impurities in New Drug Substances.
- 2) International Conference on Harmonisation (2006). Q3B (R2) : Impurities in New Drug Products.
- 3) International Conference on Harmonisation (2011). Q3C (R5) : Impurities : Guideline for Residual Solvents.
- 4) International Conference on Harmonization. M7 Draft Consensus Guideline (2013).  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7\\_Step\\_2.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_2.pdf)
- 5) Munro IC, et al: A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. Food Chem Toxicol 37 : 207-232, 1999
- 6) Kroes R, et al: Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment. Toxicol Lett 127 : 43-46, 2002
- 7) Carcinogenic Potency Database. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CPDB.htm>.
- 8) Felter SP, et al: A proposed framework for assessing risk from less-than-lifetime exposures to carcinogens. Crit Rev Toxicol 41 : 507-544, 2011
- 9) International Conference on Harmonisation (2012). Q11 : Development and Manufacture of Drug Substances (chemical entities and biotechnological/biological entities).

## MEDICAL BOOK INFORMATION

## 医学書院

# ソーリー・ワークス!

医療紛争をなくすための共感の表明・情報開示・謝罪プログラム

Sorry Works! 2.0

Disclosure, Apology, and Relationships Prevent Medical Malpractice Claims

著 Wojcieszak D. et al

監訳 前田正一

翻訳 児玉 聡・高島響子

●A5 頁208 2011年  
定価: 本体2,600円+税  
[ISBN978-4-260-01493-9]

米国で行われているSorry Works! 運動をわかりやすく紹介した実践書の全訳。医療事故が起きた際にまず共感を表明し、徹底した調査と情報開示を行い、必要な場合には謝罪と補償を行うという一連のプロセス、およびそれがもたらす利益について、とてもやさしくきめ細やかに、かつ現実的に書かれたマニュアルとなっている。自らの病院をよりよいものにし、患者さんとの関係を良好にしたいと考える、すべての医療関係者へ。

# 災害時のこころのケア

サイコロジカル・ファーストエイド 実施の手引き 原書第2版

Psychological First Aid; Field Operations Guide, 2/e

著 アメリカ国立子どもトラウマティックストレス・ネットワーク、

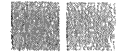
アメリカ国立PTSDセンター

訳 兵庫県こころのケアセンター

●A5変型 頁192 2011年  
定価: 本体1,200円+税  
[ISBN978-4-260-01437-3]

本書は、9.11同時多発テロなどを経験した米国が練り上げてきた「災害被害者のための心理的支援マニュアル」の決定版である。分野横断的なく包括性、会話例を多用した「具体性」において極めて評価が高く、  
「害を与えないこと」を第一義に、生活援助へと大きく軸足を移した点で画期的。「何をすべきで何をすべきでないのか」を明示し、繊細かつ大胆なアプローチ法を列挙する。専門家は一度は目を通していただきたい。

# 遺伝子治療薬



## Summary

遺伝子治療は遺伝子を患者の体内に導入し、体内での遺伝子発現により疾病を治療する次世代医療である。遺伝子異常が原因となる先天性疾患に対する根本的治療法として期待されるのみならず、がんやパーキンソン病などの難病においても画期的な治療法となる可能性を秘めている。遺伝子治療に用いられる遺伝子治療薬は、目的遺伝子と目的遺伝子を宿主細胞に導入するための運搬体(ベクター)から構成され、今日、さまざまな特徴をもつベクターが開発されている。現在、国内で医薬品として承認されている遺伝子治療薬はないが、最近では先天性疾患やがん遺伝子治療でもきわめて有望な成果が得られるようになり、本格的な実用化が待たれる。

## 25.1 遺伝子治療薬開発の歴史と現状

遺伝子治療は1990年にアメリカでアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症という酵素遺伝子の欠損が原因の先天性免疫不全症に対してはじめて臨床試験が実施されて以降、すでに20年以上の歴史があり、これまでに世界で1,800件以上の臨床試験が実施されている。当初の遺伝子治療はほとんど有効性が得られなかったが、最近ではベクターや遺伝子導入法、周辺技術の改良、遺伝子治療に関する知識の集積などにより、とくに先天性の単一遺伝子疾患で顕著な効果が得られている。

遺伝子治療薬開発の現状を図25.1に示す。開発段階は臨床開発初期のものが多いが、開発後期から承認申請に至ったものも複数ある。2012年現在、中国、フィリピン、ロシアに次いで、欧州でも遺伝子治療薬が承認されている(図25.1a, 表25.1)。一方、1999年にはアデノウイルスベクターの過剰投与が原因となる死亡事故、2002年にはレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療で白血病発症という重篤な副作用が明らかにな

り、遺伝子治療薬の開発は一時大きなブレーキがかけられた。遺伝子治療薬の安全性の確保が遺伝子治療薬開発の重要な課題であり、安全性や有効性を高めるためのベクターの改良や、新規ベクターの開発研究が進められている。

## 25.2 遺伝子治療薬の適用方法と対象疾患

バイオ医薬品は、目的遺伝子を導入した大腸菌や培養細胞で発現されたタンパク質を治療薬として用いるが、遺伝子治療薬は目的遺伝子そのものを治療薬として患者に導入し、体内での遺伝子発現により治療を行うものである。目的遺伝子の導入には、遺伝子治療薬を患者に直接投与方法(*in vivo* 遺伝子治療)と、体外で遺伝子導入した細胞を投与方法(*ex vivo* 遺伝子治療)の2種類の方法がある(図25.2)。どちらの方法を用いるかはベクターの種類と対象疾患による。

遺伝子治療の対象疾患として最も適しているのは、先天性の遺伝子欠損疾患と考えられている。