

試験の点から記載した。本リフレクションペーパーで適用範囲とするブロック共重合体ミセル製剤は、内包された又はブロック共重合体に結合した有効成分の *in vivo* での薬物動態、安定性及び体内分布を調節するように創製されている。したがって、ヒト初回投与試験を検討する際は、標的病変部位と主要臓器における分布を含む、動物を用いた非臨床薬物動態データを考慮することが重要である。

なお、既承認医薬品等と有効成分や投与経路が同一であっても、ブロック共重合体ミセル製剤化により「有効成分の体内分布や標的部位への移行性が大きく異なると想定される薬物」に該当すると考えられ、その際は治験計画の届け出が30日調査の対象となることにご留意頂きたい¹¹⁾。

3 ナノ医薬品の表面物性に関する評価

前節でブロック共重合体ミセル製剤の評価における留意点として記載したように、ナノ医薬品の表面物性はサイズと同様に重要な物理的・化学的性質である。なぜならば、ナノ医薬品の品質に影響を及ぼすナノ医薬品同士の相互作用（例えば凝集）、及び体内動態に影響を及ぼすナノ医薬品と生体内のタンパク質や細胞との相互作用は、多くの場合、ナノ医薬品の表面で起こるからである。重量当たりの表面積は粒子径が小さくなると急激に増大するため、バルク固体と比べ、その相互作用の頻度も増大すると考えられる。したがって、ナノ医薬品を設計する際は、安定性に優れ、生体内に投与後はより好ましい薬物動態特性、薬効、及び安全性を示すよう、ナノ医薬品の表面物性の制御が重要になる (Fig. 3)。具体的には、キャリア組成を工夫する、PEG など親水性ポリマーで表面を被覆す

る、等の製剤設計により

- ① ナノ医薬品同士の凝集抑制（又は分散性の改善）
 - ② 表面被覆による有効成分の安定性向上（例えば、鉄ナノ粒子の糖による被覆）
 - ③ 血漿タンパク質との非特異的相互作用の制御、細網内皮系による認識・クリアランスの回避
 - ④ 血液適合性（溶血性、凝固系、補体系等への影響）の向上、免疫原性の抑制
- 等の効果が期待される。

すでに臨床応用されているリポソーム製剤¹²⁾ や鉄ナノ粒子製剤¹³⁾ では、安全性に関わる課題として、インフュージョンリアクション（輸注反応）がしばしば問題となることがある。一般にインフュージョンリアクションとは、薬剤投与中又は投与開始後24時間以内に発現する紅潮、息切れ、顔のむくみ、頭痛、悪寒、血圧低下などの症状の総称である。24時間以降、または2回目の投与以降に発現することもある。インフュージョンリアクションが生じるメカニズムについてはまだ十分に分かっていないが、リポソーム製剤においては、補体成分の活性化が主要誘因であることが示唆されており¹²⁾、補体成分の活性化を誘起しやすいリポソーム製剤の物理的・化学的性質に関する研究が進んでいる。これまで報告されている要因を Table 2 にまとめた。EMA のリポソーム製剤に関するリフレクションペーパーでは、リポソーム製剤の補体活性化の測定について言及されている。具体的には、有害事象の可能性の程度を評価するために *in vitro* と *in vivo* の試験、例えば、補体（あるいはマクロファージや好塩基球）の活性化測定や、ブタなど感度の高い動物モデルを用い投与後の肺動脈圧の上昇をモニターする手法等を、必要に応じて考慮すべきである、との記載がある¹⁴⁾。

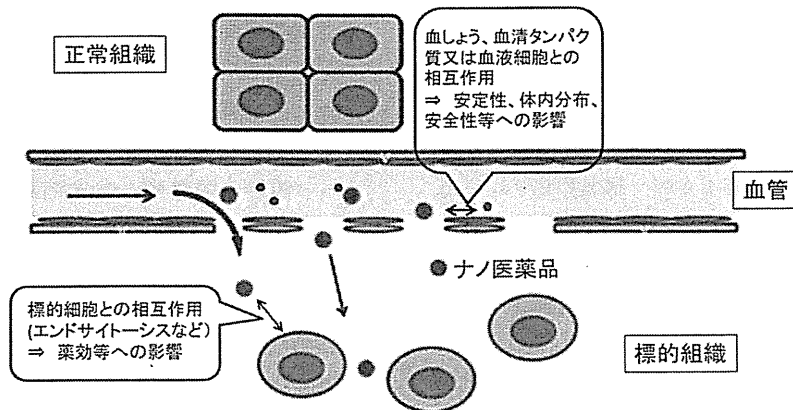


Fig. 3 ナノ医薬品とタンパク質・細胞との相互作用の模式図*
*本図は主として静脈注射製剤の事例です。

Table 2 リポソーム製剤の補体活性化のリスクを高めることが報告されている主な要因¹²⁾

- 正あるいは負の表面電荷
- サイズの増加
- 不均質性
- 凝集体の存在
- リポソーム外に有効成分が存在すること (特にドキソルピシンや類似薬)
- 高い割合 (>50%) で膜中にコレステロールが存在すること
- 不電荷のリン脂質にPEGが結合したリポソーム
- リポソーム表層のポリアミノ基修飾
- エンドトキシンの混入*

*エンドトキシンの混入はリポソーム自体の特性ではないが、製剤に起因する要因として記載した。

ナノ医薬品の *in vivo* 安定性は、リポタンパク質をはじめ血中タンパク質との相互作用により影響を受ける可能性がある。リポソーム製剤などのキャリア型ナノ医薬品から有効成分が早期放出された結果として投与量が予定以上に放出された場合、そのような相互作用は安全上の意味合いを有する。FDA のリポソームに関するドラフトガイドラインには、「リポソームと血清タンパク質及びリポタンパク質の相互作用は、リポソーム製剤に使用する脂質の種類に依存するため、原薬及びリポソーム製剤のタンパク結合率 (リポタンパク質を含む) の測定や主要結合タンパク質の同定を行うこと」との記載がある¹⁵⁾。このように、製剤設計の早期段階からナノ医薬品の細胞やタンパク質との相互作用に関する情報を得ておくことが重要ではないかと思われる。

2013年にEMAより、ナノ医薬品の表面被覆に関するリフレクションペーパーが発出された¹⁶⁾。本文書は、非経口投与型のナノ医薬品の開発にあたり、ナノ医薬品の表面被覆について留意すべき点に焦点をあてた文書である。製剤の体内分布、細胞内動態への影響から、

- ① ナノ医薬品表面へのPEG等による被覆の均一性や被覆の安定性
- ② 受容体のリガンドや抗体などナノ医薬品に標的性を付与するための表面修飾分子の配向性

が、有効性や安全性の観点から特に重要な特性であるとしている。具体的な製剤特性評価における留意点としては、上記①に関連して、組成を含む被覆素材の解析、被覆素材を結合するリンカー部分の化学の明確化、被覆の安定性 (保存時の安定性及び使用時の安定性) を指摘している。また、上記②に関連して、ナノ医薬品の表面に存在する表面修飾分子の配向性やコンフォーメーションに留意すべきことが記されている。本リフレクションペーパーは、表面被覆のみに焦点を当てた文書であり、ナノ医薬品の開発において表面物性の重要性が窺い知れる。

4 おわりに

本稿では、ブロック共重合体ミセル医薬品のリフレクションペーパー案の概要を記すとともに、欧米におけるナノ医薬品の開発に関連した規制動向を記した。後半では、ナノ医薬品の表面物性に着目したが、冒頭で述べたようにナノテクノロジーを医薬品に応用する目的は多様であるため、それぞれの製剤化の目的や投与経路等を考慮した品質特性のリスト化が重要であることは言うまでもない。

参考文献

- 1) Draft Guidance, Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, US Food and Drug Administration, 2011
- 2) 加藤くみ子, ナノ医薬品開発に関する動向, 薬学雑誌, 133, 43-51 (2013)
- 3) DRAFT COMMISSION RECOMMENDATION: the definition of the term "nanomaterial" European Commission, 2011
- 4) 1st International Workshop on Nanomedicines, Summary Report, European Medicines Agency 2010 available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2010/10/WC500098380.pdf
- 5) ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー (案) available at http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html
- 6) 松村保広, がん治療におけるミセル製剤の臨床開発, Drug Delivery System, 28, 215-220 (2013)
- 7) 加藤くみ子 他, ブロック共重合体ミセル医薬品の評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44 (12), 968-975 (2013)
- 8) 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とまなう同

- 等性／同質性評価について (ICHQ5E ガイドライン) 平成17年4月26日 薬食審査発第0426001号
- 9) 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスについて (ICH M3 (R2) ガイダンス) 平成22年2月19日薬食審査発0219第4号
- 10) 医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス, 平成24年4月2日薬食審査発0402第1号
- 11) 自ら治験を実施しようとする者による薬物に係る知見の計画の届出等に関する取扱いについて 薬食審査発0531第4号 平成25年5月31日
- 12) J.Szebeni, Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions, *Eur. J. Nanomed.* 1, 33-53, (2012)
- 13) New recommendations to manage risk of allergic reactions with intravenous iron-containing medicines, European Medicines Agency, 2013
- 14) Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product, European Medicines Agency, 2013
- 15) Draft Guidance for Industry, Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, US Food and Drug Administration, 2002
- 16) Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products, European Medicines Agency, 2013



ナノ医薬品の機能と 実用化に向けた課題

The expected functions of nanomedicines and the issues towards the introduction
of safe and efficacious nanomedicines

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

加藤くみ子

KUMIKO SAKAI-KATO

National Institute of Health Sciences, Division of Drugs

はじめに

昨今、ナノテクノロジー(超微細加工技術)を医薬品開発に応用する研究が発展している。リポソーム製剤や鉄ナノ粒子製剤など、ナノメートルサイズの構成要素を有する製剤は20世紀より国内外で開発・臨床応用されてきたが、「ナノ医薬品」あるいは「ナノメディシン」として注目されるようになったのは、21世紀に入ってからであろう。実際に、Thomson Reuters社の文献検索システムWeb of Scienceによる調査では、「nanomedicine」または「nanomedicines」を含む論文報告数は、1999年までは0件であったのに対し、2000年に2件、2006年には174件にまで増加する。さらに2012年の報告数は816件に上っている(図1)。

21世紀に入ってからこの大きな変化には、2000年より米国で開始された国家ナノテクノロジー・イニシアティブ(NNI)プログラムの影響があると考えられる。これは、国家としてナノテクノロジーの責任ある開発を支援することを目的としたプロジェクトである。わが国においても、その翌年2001年から開始された第2期科学技術基本計画の中で、ナノテクノロジーの医療への応用を推進することが示され、これを受けて厚生労働省においては5カ年計画により厚生労働科学研究費補助金・萌芽的先端医療技術推進研究(ナノメディシン分野)(2002~2006年)が開始された。これらの政策により、ナノメディシンに関わる研究が急速に発展していったと考えられる。ここで「ナノメディシン」は、ナノテクノロジーを応用

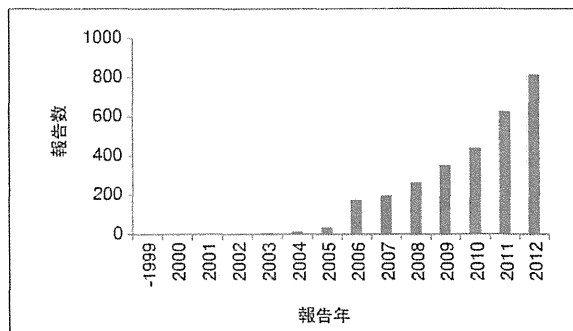


図1 「nanomedicine」または「nanomedicines」を含む論文報告数の推移
Web of Science(Thomson Reuters社)より

した医療行為や技術、概念そのものを示す言葉として用いられており、ナノテクノロジーを応用した医薬品「ナノ医薬品」を包含する。

本稿では、「ナノ医薬品」について、期待されている機能、および実用化促進のための課題について考察したい。

1. ナノ医薬品の機能

(1) ナノ医薬品に特徴的な主な機能

図2に、主として製剤側の特性を利用した機能と、主として生体側の特性を利用した機能により、便宜上、ナノ医薬品を分類してまとめた。ただし、これらはナノ医薬品に特徴的な機能の事例であること、また、多くのナノ医薬品では製剤側の因子と生体側の因子が相互に関連し機能している点にもご留意いただきたい。

機能の事例		医薬品の事例*
主として製剤側の特性を利用	磁性の変化	造影剤(超常磁性酸化鉄(SPIO))
	原薬結晶の溶解性・溶出性の向上	ナノ結晶製剤
主として生体側の特性を利用	体内分布の制御(EPR効果など)	抗がん剤内封ナノ医薬品
	生体内における有効成分の安定性向上	核酸医薬品やペプチド・タンパク質性医薬品を内封したナノ医薬品
	標的細胞への取り込み向上	

図2 ナノ医薬品に期待される主な機能の事例

*: 研究開発中の製剤も含む

ナノテクノロジーを用いて形成されるナノメートルサイズの物質(ナノマテリアル)は、バルク部分が減少し、界面が増すことで、個々の原子・分子・バルク物質が有する化学的・物理的特性とは区別し得る特異な性質を示す。このナノマテリアルに特有の優れた性質を医薬品に応用した事例として、例えば、酸化鉄をナノメートルサイズの粒子にすることで磁性が変化し常磁性が現れる性質を利用したSPIO (superparamagnetic iron oxide: 超常磁性酸化鉄)があり、MRI造影剤として臨床応用されている。また、ナノマテリアルは単位質量あたりの表面積が増大するため、難溶性薬物をナノ結晶化することで溶解性や溶出性が増大し、バイオアベイラビリティの増大が期待される事例も製剤側に起因する機能としてあげられるだろう。

一方、生体側の特性を利用するために製剤を適切なナノメートルサイズに設計した製剤もある。一例としては、生体における毛細血管の細胞間隙構造の特性をナノ医薬品の体内分布制御に利用するもので、EPR (Enhanced permeability and retention) 効果²⁾を利用した静脈注射用ナノ医薬品(抗がん剤を内包したりボソーム製剤など)があげられるだろう。また、有効成分をキャリアに内包することで血中タンパク質の非特異的結合や酵素による分解を回避し、有効成分の安定性の向上が期待される。事例としては、核酸医薬品やペプチド・タンパク質性医薬品など不安定な薬物を内包したナノ医薬品の研究開発があげられる。特にペプチド・タンパク質性医薬品では、患者の利便性やコンプライアンスの向上という点から経口投与が望まれるが、消化酵素やタンパク分解酵素による分解を受けやすく、また消化管粘膜透過性が低いことから、それらの課題を解決するための手法として、近年ナノメートルサイズのキャリアに内包した製剤の研究開発が盛んに行われている³⁾。その他、エンドサイトーシス等の機構によりナノ粒子の細胞内取り込みが促進され

る事象を利用した製剤の研究開発も進められており、核酸医薬品のような細胞内取り込みに工夫を要する医薬品の研究開発においては、今後重要な機能となるであろう。

(2) 製剤機能最適化のための物性制御

上述の機能を有する製剤の設計においては、添加物(キャリア成分など)の選択の他に、サイズ、表面物性等の制御により、製剤機能の最大化を図る。その際、表面積が増大することによる製剤表面でのタンパク質との非特異的相互作用の増加や製剤同士の凝集など、意図せぬ反応を最小化するための物性制御も重要になる。一般的にナノ粒子にはタンパク質、脂質をはじめとする生体内のさまざまな分子が結合しナノ粒子の表面を取り巻く。結合した生体高分子のナノ粒子からの解離速度は一般的に非常に遅く、ナノ粒子の生体内での挙動が結合分子により大きく左右されることを示唆している⁴⁾。したがって生体高分子の結合やナノ粒子同士の凝集など、生体環境中におけるナノ粒子の存在状態を評価することは*in vivo*における安定性、体内動態や安全性等を評価する上で有用な情報を与えるであろう。ナノ粒子の生体環境中における存在状態を*in vitro*で評価する際には、例えば、ナノ粒子を血漿等と一定条件下で混合後、動的光散乱法のほか、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡等の画像解析法で分析するなど、各分析手法の特徴を考慮し複数の原理の手法を用いて評価することが好ましいであろう(表1)⁵⁾。一方、昨今の共焦点レーザー顕微鏡システムの発展により、ナノ粒子の*in vivo*での動的変化をリアルタイムに可視化する技術開発も進められている⁶⁾。

表1 ナノマテリアルの主なサイズ測定法

手法	原理	測定されるサイズ
動的光散乱法	液体中の粒子がブラウン運動により拡散する速度(拡散係数)を計測することで粒子径を測定する	拡散係数相当径
レーザー回折法	光の回折現象とミー散乱現象を利用して粒子径を求める	球相当径
遠心沈降法	媒体中を沈降する粒子の大きさと沈降速度の関係から粒子径を測定する	ストークス径
電子顕微鏡法	電子顕微鏡観察対象に電子線をあて、それを透過してきた電子が作り出す干渉像を拡大して観察する	短軸径
原子間力顕微鏡(AFM)	試料と探針の原子間にはたらく力を検出して画像を得る	高さ情報
サイズ排除クロマトグラフィー	固定相である充填剤(ゲル)の細孔を利用した分画法	分子量分画法

2. ナノ医薬品の実用化に向けた課題—レギュラトリーサイエンスの視点から—

2010年9月に、欧州医薬品庁(European Medicines Agency; EMA)の主催による「ナノ医薬品に関する第1回国際ワークショップ」が開催された。本国際ワークショップには世界各国から産官学、さらに患者団体の代表等が出席し、

- ①現在までに実用化された、また開発中のナノ医薬品について
 - ②医薬品への実用化に向け取り組まれている先端技術について
 - ③ナノ医薬品の品質特性評価、非臨床評価、リスク管理(ヒトおよび環境へのリスク)等の評価について
- など、広範な内容が議論された⁷⁾。ワークショップでは、筆者を含め参加した規制当局者により、以下のような今後の課題が示された。

これまで「ナノ医薬品」の評価は、「ベネフィット・リスク」バランスの概念をベースとした現行の規制の枠組みの中で行われてきたが、それが妥当であったことが本ワークショップにおいて確認された。また、既存のガイドラインを補完する形で新たな評価手法も取り入れられてきている。ナノ医薬品は、新規素材による最先端の技術を利用して開発されており、また、従来の低分子医薬品とは体内での挙動や生体との相互作用などさまざまな点において異なる、などの特徴があげられる。したがって体内での動態などナノ医薬品の特性に配慮し、その開発や評価に関して考慮すべき点を明確にしていくことが必要であり、さらなる科学研究が不可欠である。さらに、ナノテクノロジーは急速に、またグローバルにさまざまな分野で発展しているため、規制に携わる科学者は、常に適切な評価手法について情報を得、対応する必要がある。

これらの課題提起を踏まえ、国立医薬品食品衛生研究所では、以下に示すナノ医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究、および国際的な活動に取り組んできた。

(1)レギュラトリーサイエンス研究

上述のとおり、本分野は革新的医薬品の開発など、今後もさらに発展することが予想され、新たな

な評価法の開発に資するさらなる科学研究が不可欠である。この活動を通して、開発に際して考慮が必要な要件をまとめ、さらに機能評価法を開発・標準化し、評価法ガイドライン案等を作成することが重要であり、ナノ医薬品の臨床応用を早期に実現する上で大きな推進力になると考えられる。

国立医薬品食品衛生研究所薬品部に新たな室が2008年に設立され、これらの課題に取り組んできた(図3)。一例としては、ブロック共重合体ミセル製剤やリポソーム製剤等のキャリア成分の動態を中心にナノ医薬品の細胞内動態評価法、および細胞内動態に関わる品質特性評価法の開発に関わる研究を推進してきた。その結果として、分子生物学的手法やキャリア成分の蛍光標識法を用いることにより、ブロック共重合体や脂質などキャリア成分の細胞内動態や、細胞内動態に関与する内因性タンパク質が明らかとなってきた。これらの成果は、細胞内へのナノ医薬品の取り込みや、細胞内における薬物放出の他、キャリア成分の細胞内蓄積回避等に関する重要な知見となり得るものと考えている⁸⁾。

現在は、上記に加えてナノ医薬品の物理的・化学的特性と体内動態や安全性(例えば、補体活性化への影響等の血液適合性)との関連性について研究を行っている^{9,10)}。さらにナノ医薬品の評価に関わるレギュラトリーサイエンス研究の詳細は、国立医薬品食品衛生研究所薬品部内ホームページにて情報提供している¹¹⁾。

なお、米国では、米国国立がん研究所(National Cancer Institute)のもとにナノテクノロジー評価研究所(Nanotechnology Characterization Laboratory; NCL)

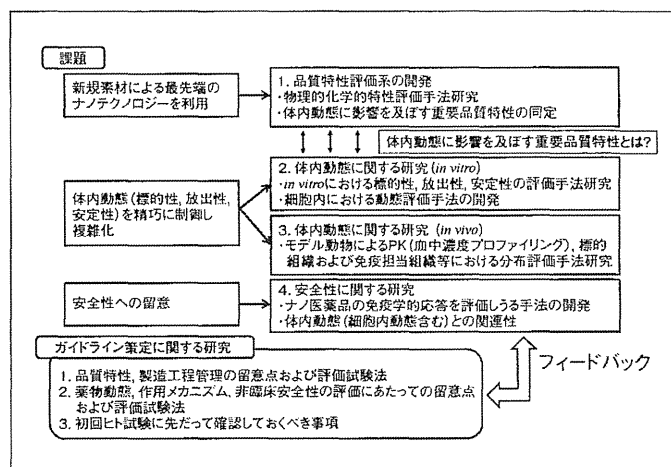


図3 ナノ医薬品*の評価に関するレギュラトリーサイエンス研究の事例
*：主として生体内安定性や生体内分布等の体内動態の制御を目的として開発されているナノ医薬品を想定

ナノ医薬品の機能と実用化に向けた課題

表2 ナノ医薬品関連の規制文書

年	機関	対象製剤	文書
2002	FDA	リポソーム	Guidance for Industry Liposome Drug Products, Draft
2006	EMA	ナノ医薬品一般	Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use
2010	FDA	リポソーム	Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride
2011	FDA	ナノ医薬品一般	Draft Guidance, Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology
2011	EMA	鉄ナノ粒子	Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications
2013	EMA	リポソーム	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product
2013	EMA	ナノ医薬品一般	Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products
2013	EMA	鉄ナノ粒子	Draft reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product
2014	MHLW/EMA	ブロック共重合体ミセル	Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products

が設置されている¹²⁾。NCLでは、アカデミア、産業界、政府機関の研究者により開発されたがん治療や診断を目的とするナノマテリアルの非臨床段階における評価、解析を行い、その結果を研究者に報告することで、これらの開発および臨床応用を推進することを活動目的としている。また、得られた情報や評価手法は知識基盤として蓄積されるとともに、一部は公表されており、NCLの活動から学ぶべきものは多い。

(2) 国際的な活動

ナノテクノロジーを応用した医薬品の評価については、欧米規制当局においても議論が進んでいる。2002年に米国より、リポソーム製剤のドラフトガイドラインが発出されて以来、この十数年の間に、個別製剤ごとの評価に関連した規制文書が複数発出されている(表2)。さらに、ナノ医薬品に関わる科学的な知見や規制科学についての情報を国際的に共有し、また議論するために、2009年よりEMAを中心とした規制側の専門家会議が開催されており筆者も参画している。このような国際的な活動の中で、厚生労働省はEMAとブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する共同リフレクションペーパーを作成し、本年1月10日にEMAと同日に公表した^{13, 14)}。

本リフレクションペーパーについては、稿を改めて紹介させていただく予定である。

おわりに

本稿では、ナノ医薬品に期待されている機能について概説するとともに、レギュラトリーサイエンスの視点からナノ医薬品の実用化を推進するための課題について述べた。本邦においてナノ医薬品の研究開発がいつそう推

進まれ、日本発の革新的医薬品の創出、実用化がもたらされるためにも、各方面の先生方からの御意見をいただければ幸いである。

最後に、共同研究者の皆様、支援いただいた厚生労働省に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) [National Nanotechnology Initiative], web site <http://www.nano.gov/nanotech-101/what>
- 2) Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387-6392, (1986).
- 3) Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, Langer R, Farokhzad OC. Trans epithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Sci Transl Med.* 5, 213ra167, (2013).
- 4) Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Nilsson H, Thulin E, Linse S, Dawson KA, Understanding the nanoparticle protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2050-2055, (2007).
- 5) Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB, McNeil SE. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine* 5 106-117(2009).
- 6) 野本貴大, 松本有, 藤加珠子, R. J. Christie, 宮田完二郎, 大庭誠, H. Cabral, 村上真美, 福島重人, 西山伸宏, 片岡一則, リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡を用いた drug delivery systems(DDS)の動態評価法. *薬学雑誌*, 132, 1347-1354, 2012.
- 7) 1st International Workshop on Nanomedicines 2010 Summary Report, European Medicines Agency. Available at http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html
- 8) Sakai-Kato K, Un K, Nanjo K, Nishiyama N, Kusuvara H, Kataoka K, Kawanishi T, Goda H, Okuda H. Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components. *Biomaterials* 35, 1347-1358(2014)
- 9) Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H. Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids. *Biochim Biophys Acta.* 1840, 1171-1180(2014)
- 10) 加藤くみ子, DDS製剤の開発・評価と実用化手法, 第12章 DDSの規制・薬事と対応の留意点 第1節 国内外のDDS製剤の開発に関する規制の動向, 技術情報協会, p531-535 (2013)
- 11) [ナノ医薬品(ナノメディシン)に関する参考情報], web site http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html
- 12) [National Characterization Laboratory], web site <http://ncl.cancer.gov/>
- 13) [ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーの公開等について]平成26年1月10日付 薬食審査第0110第1号
- 14) Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products, European Medicines Agency, 2014

核酸医薬品開発の動向

井上 貴雄*

Development Trends for Oligonucleotide Therapeutics

Takao INOUE*

1. はじめに

アンチセンス, siRNA, アプタマーに代表される核酸医薬品は, これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから, 抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている^{1,2)}. 核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で, 低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる. また, その物質的性質, 機能的性質から, 一つのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品が誕生すると考えられており, 開発期間の面からも注目される.

本稿では, 核酸医薬品の基本的性質と開発動向について概説する.

2. 核酸医薬品の分類

核酸医薬品とは一般に, 「核酸あるいは修飾型核酸が直鎖状に結合したオリゴ核酸を薬効本体とし, 蛋白質発現を介さず直接生体に作用するもので, 化学合成により製造される医薬品」を指す. 遺伝子治療薬も核酸で構成される医薬品であるが, 作用発現に蛋白質への翻訳を介する点, 生物学的に製造される点において核酸医薬品とは異なる. 核酸医薬品は構造や標的, 作用機序の違いから様々な種類が存在するが, 細胞の内側で機能するか, 外側で機能するかにより, 大きく二つに分類することができる (Table 1,

Fig. 1, 2).

細胞内で作用する核酸医薬品としては, mRNA (メッセンジャー RNA) を標的とする「アンチセンス」や「siRNA (small interfering RNA)」が挙げられ, また, 転写因子等の蛋白質と結合して転写段階を抑制する「デコイ」がある (Fig. 1).

一方, 細胞外で作用する核酸医薬品としては, 抗体医薬品と同様に細胞外蛋白質と結合して機能を阻害する「アプタマー」が広く知られている (Fig. 2). 更に, Toll 様受容体 9 (TLR9) に作用して自然免疫を活性化させる医薬品として「CpG オリゴ (CpG oligodeoxynucleotides: CpG ODN)」が開発されている (Fig. 2). CpG オリゴはエンドサイトーシスによって細胞に取りこまれた後, エンドソーム内で TLR9 に作用するが, 膜との配向性を考えると細胞質と膜を挟んで反対側 (つまり細胞の“外側”) で機能する. 細胞膜を通過する必要がないという点ではアプタマーと同様であり, 細胞“外”で作用すると捉えることができる (Fig. 2).

「標的」の観点で分類すると, アンチセンス, siRNA は核酸 (RNA) が標的であり, アプタマー, デコイ核酸, CpG オリゴは蛋白質が標的である (Table 1). 前者については, 標的となる RNA も核酸医薬品の種類によって異なっており, エクソンスキッピング療法に用いられるスプラッシング制御型アンチセンスの標的は pre-RNA, mRNA を分解する機能を有する Gapmer 型アンチセンスや siRNA の標的は mRNA である. 近年, 「DNA → RNA → 蛋白質」のセントラルドクマに乗らない非コード RNA の存

* 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第 5 室 (核酸医薬室) 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Cellular and Gene Therapy, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

在が明らかになっており、その代表格としてマイクロRNA (miRNA) の機能が注目されているが、miRNA を標的とした核酸医薬品も開発されている (miRNA アンチセンス)。

以上に述べた作用部位、標的、構造等の観点から核酸医薬品を分類し、一覧表として取りまとめた (Table 1)。簡略化のため、各項目には例外が含まれる場合があるのでご留意願いたい。

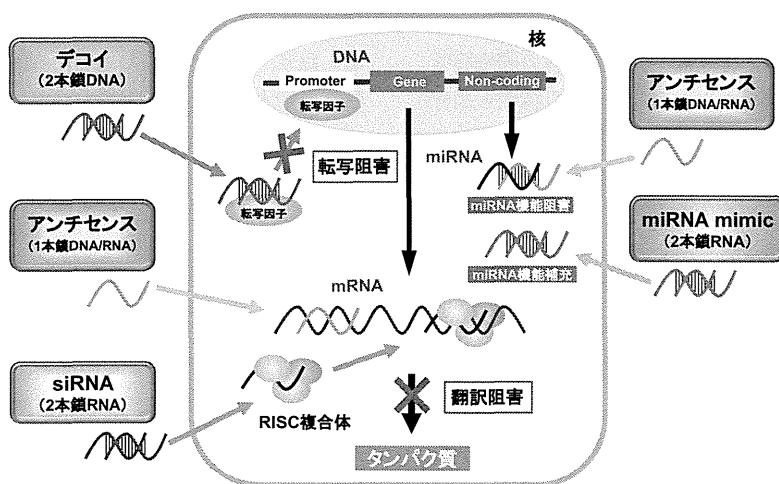
3. 核酸医薬品の特徴

3.1 核酸医薬品の大きさ

核酸医薬品の基本骨格であるヌクレオチドの分子量は 310-330 程度であり、近年開発が進む修飾型核酸でもその値は大きくは変わらない。したがって、10~30 塩基長の核酸医薬品を考えた場合、分子量は 3,000~10,000 程度となる。既に上市されたアンチセンス医薬品である Vitravene[®] (一般名: Fomivirsen, 21 塩基長, C₂₀₄H₂₄₃N₆₃Na₂₀O₁₁₄P₂₀S₂₀) 及び Kynamro[®] (一般名: Mipomersen, 20 塩基長, C₂₃₀H₃₀₅N₆₇Na₁₉O₁₂₂P₁₉S₁₉) は分子量がそれぞれ

Table 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, へアピン型 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, Prosensa, Sarepta	Santaris, Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax



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.1 細胞の内側で機能する核酸医薬品

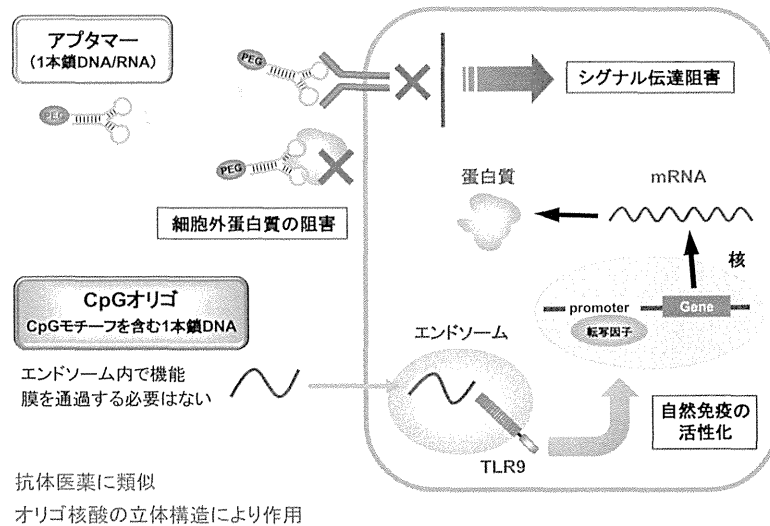


Fig.2 細胞の外側で機能する核酸医薬品

7,122, 7,595である。siRNAは一般に20塩基の長さであるが、2本鎖であることから分子量は13,000程度となる。アプタマー医薬品は三次元的に蛋白質を認識するという特徴から塩基鎖が長い傾向にあり、また、血中滞留性を向上させるためにPEG化されるケースも多い。日本で承認されているRNAアプタマーMacugen[®](一般名:Pegaptanib, 28塩基長, $C_{294}H_{342}F_{13}N_{107}Na_{28}O_{188}P_{28}[C_2H_4O]_{2n}$, $n \approx 900$)もPEG化されており、分子量は50,000程度である。

以上のように、核酸医薬品はいずれの種類も数千を超える分子量を持っており、同じ化学合成によって製造される低分子医薬品(一般に分子量1000未満)と比べ、遥かに大きい医薬品といえる。

3.2 核酸医薬品の体内分布

核酸医薬品は負電荷を持つホスホジエステル構造が連続したポリアニオン構造を有するため、疎水性の細胞膜を透過しにくいという特徴がある。この電荷的な特性と高分子量であるという特徴から、全身投与された核酸医薬品の体内分布は毛細血管の内皮細胞の構造に依存する。毛細血管は内皮細胞の構造により連続型毛細血管、有窓型毛細血管、洞様毛細血管に分類されるが、オリゴ核酸は内皮細胞が隙間なく敷きつめられた連続内皮を通過することができない。一方、内皮細胞が薄く、窓のような構造を持つとされる有窓型毛細血管や内皮細胞間に隙間のある洞様毛細血管では、内皮細胞シートを通過することが可能となる。実際、このように“緩い”内皮細胞シートを持つ肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、固形癌などにオリゴ核酸は集積しやすい。

上述の核酸医薬品の分類の中で、細胞の内側で機能する核酸医薬品に関しては、オリゴ核酸が毛細血管の内皮細胞

シートを通過した後、更に、組織を構成する細胞の細胞膜を通過して細胞内に到達しなければならない。オリゴ核酸の細胞内への移行に関しては詳細な分子機構はわかっていないが、エンドサイトーシスによって取り込まれたオリゴ核酸がエンドソーム内に移行した後、エンドソーム膜を通過して細胞質に入ると考えられている。エンドソームは「初期エンドソーム→後期エンドソーム→リソソーム」と成熟していくため、エンドソーム膜を通過できなかったオリゴ核酸はリソソーム内で分解される。このため、核酸医薬品が有効性を発揮するためには、エンドソームの段階で細胞質側に脱出する必要がある(エンドソームエスケープ)。上述のように、核酸医薬品は分子量数千以上のポリアニオンであることから、疎水性のエンドソーム膜を通過できるオリゴ核酸の割合は低いと考えられている。この問題を克服するため、核酸の分子内に疎水性を高める改変を加えたり、オリゴ核酸の末端に修飾を施すなど、膜との親和性を増大させる試みが行われている。

二本鎖のsiRNAは一本鎖のアンチセンスに比べて分子量、負電荷とも大きくなることから、膜透過性は更に低下する。この一本鎖と二本鎖の違いは培養細胞にオリゴ核酸を添加する実験を行うとイメージしやすい。すなわち、リポフェクトアミン等の遺伝子導入試薬を使用せず、“Naked”な状態でオリゴ核酸を添加した場合、一本鎖アンチセンスでは数100nMまで濃度を上げると細胞内に取り込まれるが、二本鎖siRNAは高濃度にしても取り込まれない。これは*in vivo*においても同様であり、一般に「一本鎖はキャリアがなくても取り込まれるが、二本鎖ではキャリアが必要」とされている。取り込み効率には、分子量、電荷、構造、物性といったオリゴ核酸側の要因のみならず、

生体側のシステムにも大きく依存すると考えられる。例えば、スカベンジャー受容体を多く発現する貪食細胞はポリアニオンを認識して、オリゴ核酸を効率よく取りこむ(その後、分解される)。また、筋細胞の破壊・再生が繰り返している筋ジストロフィーの疾患においては、健康人の筋細胞よりオリゴ核酸が取りこまれやすいとされる³⁾。投与経路にも依存しており、硝子体内注射や肺への吸入など局所的に投与する場合にはキャリアを必要としない場合がある。

核酸医薬品の体内分布に関しては、本誌43巻に優れた総説が発表されているので、詳細はこちらを参照して頂きたい⁴⁾。

4. 修飾型核酸の開発

上に述べたオリゴ核酸の体内分布は、ヌクレアーゼ耐性を獲得し、全身投与が可能となった“新しい核酸医薬品”を念頭においたものである。従来、核酸医薬品は体内でヌクレアーゼにより速やかに分解される易分解性が課題となってきた背景から、分解の影響を受けにくい局所投与型の核酸医薬品が先行して開発されてきた。実際、2012年までに承認された Vitravene[®] (アンチセンス) 及び Macugen[®] (アプタマー) は、いずれも硝子体内へ局注する医薬品であった。しかし、近年、修飾型核酸の開発が顕著に進展したことにより、オリゴ核酸のヌクレアーゼ耐性が向上し、体内での安定性は大きく改善した。また、化学修飾により標的配列との結合性が著しく向上し、細胞内への取り込み効率も従来に比べて改善している。更に、これら一連の流れにより、より低濃度で有効性を得ることが可能となり、問題とされてきた細胞毒性の問題も大きく低減した。Toll様受容体を介する自然免疫活性化も、化学修飾により回避できる可能性が指摘されている。以上のような利点から、現在開発されているほとんどの核酸医薬品は何かしらの化学修飾が施されている。

核酸の化学修飾は、リン酸部の修飾、糖部の修飾、塩基部の修飾に分類することができる。リン酸部の修飾としては、O(酸素原子)をS(硫黄原子)に置換したホスホロチオアート修飾(S化)がよく知られており(Fig. 3)、現在開発されている多くの核酸医薬品においてS化がベースとして導入されている(“Sオリゴ”と呼ばれる)。S化は核酸と核酸をつなぐリン酸ジエステル結合部の修飾であることから、ヌクレアーゼ耐性の獲得に大きく寄与し、また、疎水性が増すことから細胞内への取り込みも改善する。一方、S化するとリン原子上に不斉点が発生するため、Sオリゴは立体異性体が混在した化合物として合成される。この点は品質管理の観点から重要であり、核酸医薬品に特有の考

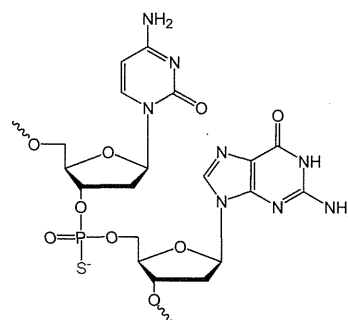


Fig. 3 ホスホロチオアート化

慮が必要となる⁵⁾。現時点では、リン原子の立体化学による異性体はいずれも有効成分であるという前提で開発が進められている。また、Sオリゴは天然型と比較し、非特異的な蛋白質結合が増加することが知られている。

糖部の修飾には、2'位の修飾と架橋型修飾がある(Fig. 4)。2'位の修飾は核酸医薬品開発の初期段階から試みられており、2'-F、2'-O-Methyl(2'-OMe)、2'-O-Methoxyethyl(2'-MOE)などが知られている。既に上市された核酸医薬品(Table 2)を例にとると、Vitravene[®]はS化のみで糖部は修飾されていないが、Macugen[®]ではピリミジン塩基の核酸(シトシン、ウラシル)が2'-F化されており、プリン塩基の核酸(アデニン、グアニン)は2'-OMeが施されている。Kynamro[®]については、S化に加えて、オリゴ核酸の両端に2'-MOEが導入されている(後述)。

架橋型修飾は、「揺らぎのある頭部の立体配座を架橋により固定化する」というコンセプトにより創製されたもので、近年特に注目を集めている。通常、核酸はRNA型(N型)とDNA型(S型)の両方のコンフォメーションをとることができるが、頭部2'位と4'位を化学的に架橋することにより、厳密にRNA型(N型)に固定することができる。これにより、相補鎖との結合力が顕著に向上すると共に、ヌクレアーゼに対する立体障害によりヌクレアーゼ耐性も付与される⁶⁾。架橋型核酸は日本が世界に先駆けて開発を進めており、1997年に大阪大学薬学部の今西、小比賀らによって2',4'-BNA[2',4'-Bridged Nucleic Acid, 別名LNA(Locked Nucleic Acid)]が開発されたのが最初の報告である⁷⁾。架橋型核酸としては、他にBNA^{CO}、BNA^{NC}、ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)、cEtBNAなどが開発されている。糖部の修飾ではないが、糖部分をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体も核酸医薬品の原料として用いられている。モルフォリノオリゴ核酸はヌクレアーゼで分解されず、また毒性が低いという利点がある。

オリゴ核酸の塩基部は相補鎖との結合に特に重要であ

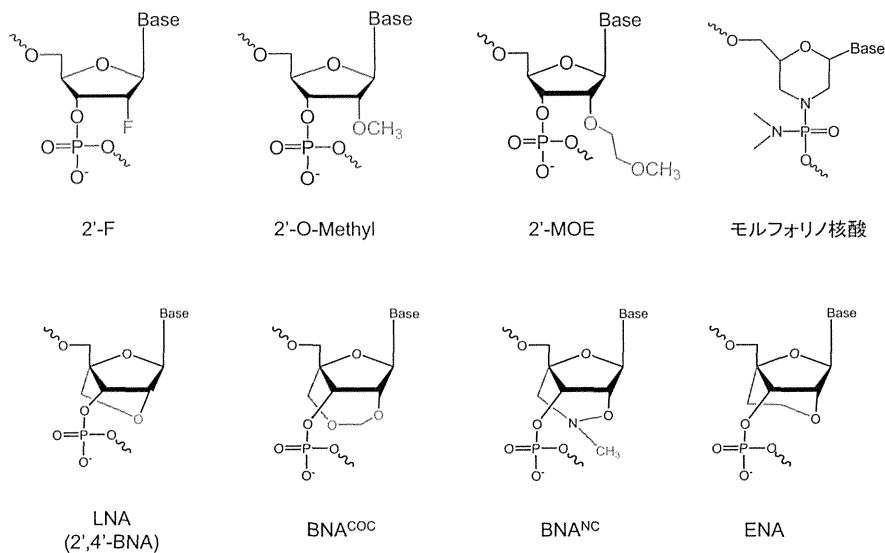


Fig.4 核酸の糖部を改変した修飾型核酸

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

ることから、相補鎖形成が前提である RNA を標的とする核酸医薬品において塩基部が修飾されることはほとんどない。一方で、三次元的な立体構造により蛋白質を認識するアプタマーでは、立体構造の多様性獲得あるいは蛋白質との親和性増強を狙って、塩基部が修飾されるケースがある。アプタマーの配列選択に用いられる試験管内人工進化法 (SELEX 法) では PCR のステップが含まれることから、アプタマー選別の際に用いられる核酸はポリメラーゼに認識される必要があり、また、相補鎖を形成するカウンター核酸が必要である。このことから、アプタマー開発においては、修飾型核酸を認識する改変ポリメラーゼの開発が行われており、また、A, T, G, C に続く第 5, 第 6 の核酸を生む人工塩基対の開発も試みられている⁸⁾。

5. 核酸医薬品の開発状況

これまで承認まで至った核酸医薬品はアンチセンス 2 品目 (Vitravene[®], Kynamro[®])、アプタマー 1 品目 (Macugen[®])

の 3 品目である。それぞれの承認国、承認年、標的、適応、投与ルートを Table 2 にまとめた。

特筆すべきは、2013 年に入り、アンチセンス医薬品 Kynamro[®] が全身投与の核酸医薬品として初めて上市された点である。Kynamro[®] は ApoB-100 の mRNA をターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬であり、キャリア無しで皮下投与される。上述のように、全身投与したオリゴ核酸は肝臓や腎臓等に集積する性質があるが、Kynamro[®] は肝臓に発現する ApoB-100 mRNA を分解することで有効性を発揮する。今後は、従来から開発されている局所投与型の核酸医薬品に加えて、静注 / 皮下注が可能な全身投与型の核酸医薬品が上市されると予想される。現状では、全身投与した際の標的はオリゴ核酸が集積しやすい肝臓、腎臓、癌などに限定されるため、まずはこれらの組織で核酸医薬品の有用性、優位性が示されていくと考えられる。

現在、非臨床 / 臨床の段階に入っている核酸医薬品の候補品数は、「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⁹⁾並びに「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¹⁰⁾」において詳しく調べられている。それによると、最も開発候補品が多いのはアンチセンスであり、非臨床 / 臨床を合わせて 100 近くの候補品がある。次いで、siRNA が 50 品目程度、アプタマーは 10 品目程度が非臨床 / 臨床の開発段階にある。miRNA 関連の核酸医薬品は、現段階で臨床段階にあるのは Miravirsen (PhaseII) の 1 品目のみであるが、非臨床段階の開発品が増えており、今後大きく進展すると予想されている。デコイ核酸に関しては、Anges-MG と Adynxx の 2 社が開発を行っている (2 品目)。CpG オリゴはワクチンアジュバントとしての使用や既存薬との併用が多く、CpG オリゴが主剤になるケースは少ないとされている。開発状況の集計データはないが、Phase 2 に進んでいるものがある。

核酸医薬品開発の全体像を俯瞰すると、RNA を標的とする核酸医薬品 (アンチセンス、siRNA) の開発が特に進展しており、抗体医薬品と競合するアプタマーは伸び悩んでいる印象を受ける。対象疾患としては、核酸医薬品でしか治療できないアンメット・メディカルニーズに対する開発が中心であり、まず遺伝性疾患や難治性疾患を対象とした核酸医薬品の実用化が先行すると思われる。以降、各々の核酸医薬品について、トピックを挙げる。

5.1 アンチセンス

5.1.1 Gapmer 型アンチセンス

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、

修飾型核酸の開発並びに RNase H 研究の進展により、「Gapmer 型アンチセンス」が登場し、再び注目を集めることとなった。

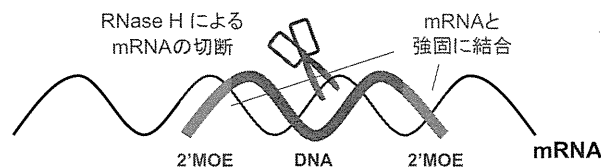
Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解することにより機能する。Fig. 5 に Gapmer 型アンチセンスの模式図を示した。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には mRNA との結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる。このアンチセンスが標的 mRNA と結合すると、“DNA と RNA の相補鎖を認識して RNA 鎖を切断するヌクレアーゼ”である RNase 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)。

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. 5 Gapmer 型アンチセンスの構造

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 とスプライシング因子の結合阻害
miRNA 阻害型	miRNA	立体障害	miRNA と mRNA の結合阻害

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¹¹⁾(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

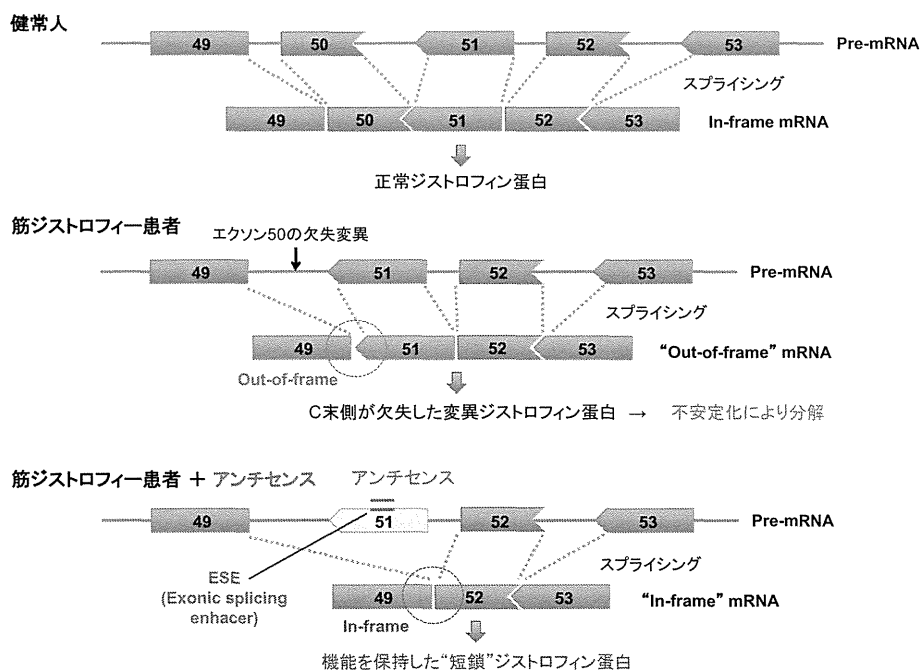


Fig. 6 エクソンスキッピング療法に用いられるアンチセンスの作用機構

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、主要評価項目である 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 を標的と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^{12,13)}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」という一文が 1995 年の Cell 誌に記載され¹⁴⁾、この原因を追及したところ、「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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。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¹⁷⁾、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¹⁸⁾、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¹⁹⁾。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 siRNA の末端に糖鎖を付加した「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シ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^{22,23)}、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²⁴⁾。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の状態での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Miravirsinである。Miravirsin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。Miravirsin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Miravirsin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。Miravirsin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 κ 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 κ 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 κ 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AYX1がある。AYX1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。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、ここではアプタマー開発のトピックとして、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PEG化により血中半減期が24時間以上になるように設計されており、一方で、Anivamersen はPEG化されておらず、半減期は5分未満となっている。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にしかできない発想は、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。

5.6 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、主作用として利用した医薬品である。すなわち、オリゴ核酸がToll様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。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可能なレベルに達しており、まずは、治療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

- 鈴木和博. 「核酸医薬」. バイオ医薬品. 西島正弘, 川崎ナヲ編. 化学同人. 2013, p.226-234.
- 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.
- 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- α 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Obika, S., et al. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar puckering. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, p.8735-8738.
- 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.
- 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). doi: 10.2478/s13380-013-0109-2
- 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.; Kempthues, 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.; Kotliansky, 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.; Kotliansky, 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. NF κ B 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, W.H.; 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.

核酸医薬品開発の現状

Developmental Status of Oligonucleotide Therapeutics

井上 貴雄 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第5室(核酸医薬室) 室長

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 Tel & Fax : 03-3700-9217

E-mail : takao@nihs.go.jp

1 はじめに

アンチセンス, siRNA, アプタマーに代表される核酸医薬品は、これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから、抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている¹⁾。核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で、低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる。また、標的分子が変わっても核酸医薬品の骨格(オリゴ核酸)は不変であり、有効性を持つ配列のスクリーニングも比較的単純であるため、ひとつのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品を創出できると考えられている。本稿では、新たな局面を迎えている核酸医薬品開発の現状について概説する。

2 これまでに承認されている核酸医薬品

「核酸医薬品」の明確な定義はないが、一般には「核酸が直鎖状に結合したオリゴ核酸を薬効本体とし、蛋白質発現を介さず直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品」の総称とされる。遺伝子治療薬も核酸で構成される医薬品であるが、作用発現に蛋白質への翻訳を介する点、生物学的に製造される点において核酸医薬品とは異なる。核酸医薬品はその作用機序の違いから様々な種類が存在するが、現在、医薬品として開発されているものは、アンチセンス, siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA), デコイ, ア

プタマー, CpG オリゴがある(表1)。アンチセンス, siRNA, miRNA はいずれも RNA を標的とする核酸医薬品であり, mRNA の分解, mRNA の翻訳阻害, RNA とタンパク因子の結合阻害などによって機能する。デコイは細胞内で転写因子(すなわち蛋白質)と結合して転写段階を抑制する核酸医薬品である。アプタマーは三次元的な立体構造で蛋白質を認識する医薬品であり, 抗体医薬品と同様に細胞外で蛋白質と結合し, その機能を阻害する。CpG オリゴは Toll 様受容体9 (TLR9) に作用して自然免疫を活性化させる医薬品である。

これまで承認に至った核酸医薬品はアンチセンス2品目 (Vitravene®, Kynamro®), アプタマー1品目 (Macugen®) の3品目である(表2)。それぞれの承認年, 標的, 適応, 投与ルートを表2にまとめたが, 特に注目すべき点は投与ルートである。従来, 核酸医薬品は体内でヌクレアーゼにより速やかに分解される易分解性が課題となってきた背景から, 分解の影響を受けにくい局所投与型の核酸医薬品が先行して開発されてきた。実際, 2012年までに承認された Vitravene および Macugen はいずれも硝子体内へ局注する医薬品であった。しかし, 近年, 修飾型核酸の開発が顕著に進展したことにより, オリゴ核酸のヌクレアーゼ耐性が向上し, 体内での安定性は大きく改善した。また, 化学修飾により標的配列との結合性が著しく向上し, 細胞内への取り込み効率も従来に比べて改善している。さらに, これら一連の流れにより, より低濃度で有効性を得ることが可能となり, 問題とされてきた細胞毒性の問題も大きく低減した。以上のような研究進展により, 現在では皮下投

表1 核酸医薬品の分類

	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 1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
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, Prosensa, Sarepta	Santaris Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

表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