



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 Science¹⁾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世紀に入ってからの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²⁾。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

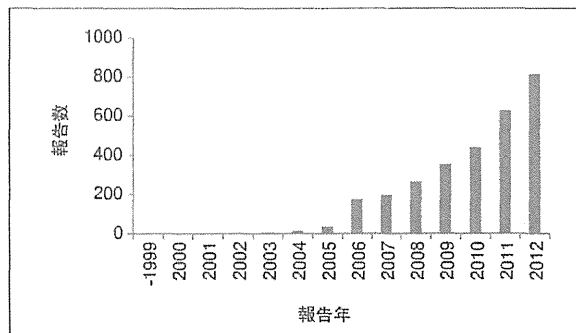


図1 「nanomedicine」または「nanomedicines」を含む論文報告数の推移
Web of Science(Thomson Reuters社)より

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ポソーム製剤など)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)

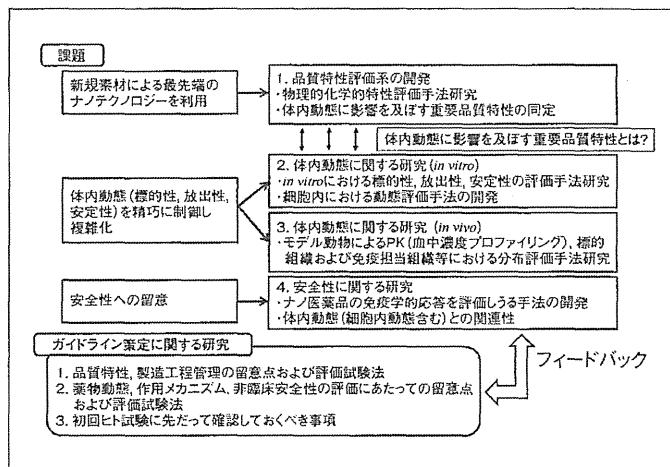


図3 ナノ医薬品*の評価に関するレギュラトリーサイエンス研究の事例
*：主として生体内安定性や生体内分布等の体内動態の制御を目的として開発されているナノ医薬品を想定

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

進され、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 tumorotropic 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. Transepithelial 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, Kusahara 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, p.531-535 (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 薬食審査発0110第1号
- 14) Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products, European Medicines Agency, 2014



抗体医薬品の分子設計

石 井 明 子* Akiko Ishii-Watabe
 鈴 木 琢 雄 Takuo Suzuki
 多 田 稔 Minoru Tada
 川 崎 ナ ナ Nana Kawasaki

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

1. はじめに

マウスモノクローナル抗体作製技術の開発を発端に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体と進化した抗体医薬品は、IgG サブクラス置換、アミノ酸置換、糖鎖改変、薬物修飾、低分子化、PEG 化等の分子設計技術の応用により、多様化している。抗体医薬品の分子設計では、目的とする適応疾患、剤形、投与経路等を念頭に、有効性・安全性を得るために必要な薬理作用、薬物動態、ならびに、製剤化を考え、構造の至適化が進められるが、その他に、有効性低下や有害反応発生につながる可能性のある免疫原性、さらには、製造工程についても考慮する必要がある。本稿では、IgG の構造と機能に基づき、抗体医薬品の薬理作用及び薬物動態に関して概説した上で、抗体医薬品の分子設計においてポイントと考えられる事項を述べ、生物薬剤学の観点で重要となる薬物動態の至適化を目的とした分子設計の例を紹介する。

2. 抗体医薬品とは

抗体医薬品は、免疫グロブリンを医薬品としたものである。古くからヒト血漿より精製した免疫グロブリン製剤が用いられていたが、近年、開発が盛んな抗体医薬品は、ハイブリドーマ法やファージディ

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室室長。京都大学大学院薬学研究科修士課程修了(衛生化学教室)、博士(薬学)。研究テーマ: バイオ医薬品の品質評価。連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 E-mail: watabe@nihs.go.jp

スプレイ法等を利用して作製されたモノクローナル抗体をリード抗体とし、必要に応じて、様々な分子設計に基づく改変を施したものである。

2.1 IgG の構造と機能

図 1 にヒト IgG1 の構造と機能を示す。IgG1 は、2 本の H 鎖及び 2 本の L 鎖からなる分子量約 150,000 の糖タンパク質で、CH2 ドメインの Asn297 に N-結合型糖鎖付加部位が存在する¹⁾。可変部の配列が各抗体により異なり、可変部に含まれる相補性決定部 (CDR) が抗原結合に関わる。定常部は、遺伝子多型による数個のアミノ酸残基の違いを除き、IgG サブクラスが同じ抗体に共通する配列である。可変部と定常部の間はヒンジ部と呼ばれ、H 鎖間のジスルフィド結合が位置する (図 1A)。

ヒンジ部の一部、CH2、及び CH3 ドメインからなる Fc ドメインは、Fc γ 受容体や補体との結合能を持ち、Fc γ 受容体の活性化による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性、及び、補体の活性化による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性に関与している (図 1B-i)。

また、Fc ドメインは、IgG の輸送担体である新生児型 Fc 受容体 FcRn との結合能を持ち、FcRn によるリサイクリングあるいはトランスサイトーシスに関与する²⁾ (図 1B-ii)。非特異的飲作用であるピノサイトーシス等により細胞に取り込まれた IgG は、エンドソーム内で FcRn に結合し、細胞外にリサイクルされる。この機構により、IgG がリソソームへの輸送と分解を免れるため、ヒト生体内 IgG の血中半減期は約 20 日と極めて長い。IgG は、FcRn により

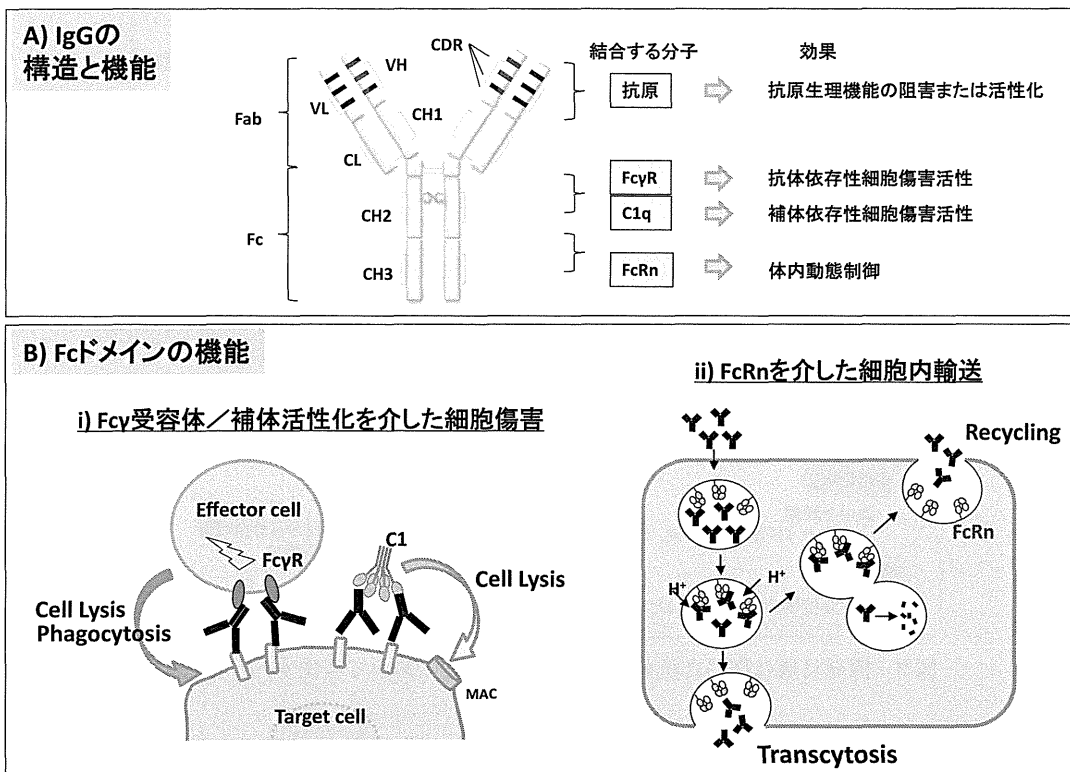


図1 IgGの構造と機能

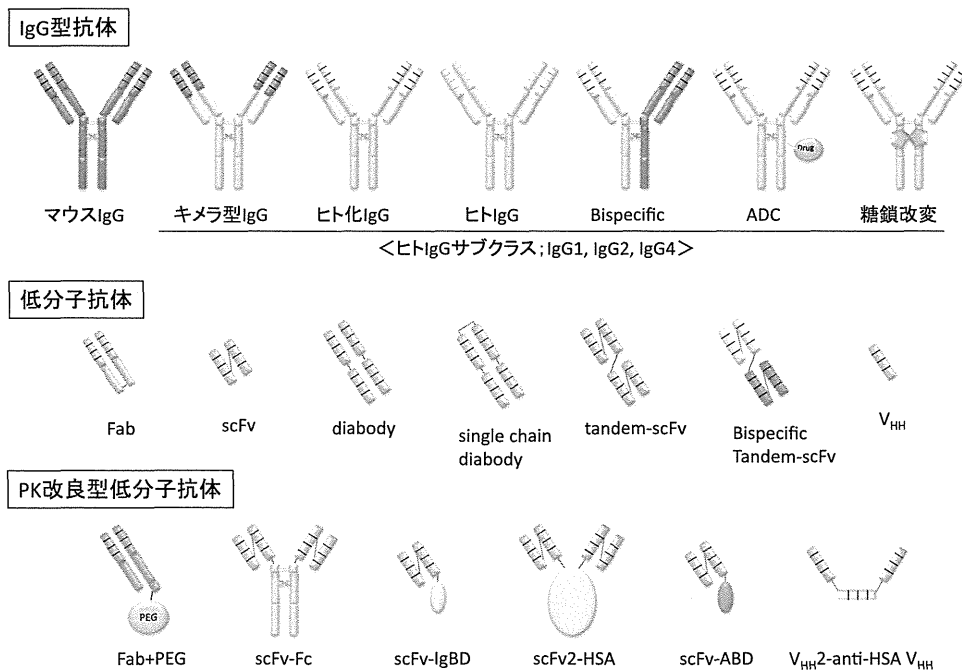


図2 抗体医薬品の骨格構造の例

トランスサイトシスされることも知られており、胎盤では、IgGがFcRnを介して母親から胎児に輸送される。

2.2 抗体医薬品の構造

図2に、IgG型抗体、低分子抗体、PK改良型低

分子抗体に分類して、抗体医薬品の骨格を图示した。IgG型抗体には、典型的なIgG型抗体としてマウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体があり、その他に、二重特異性抗体、抗体薬物複合体、糖鎖改変抗体、アミノ酸配列改変抗体等がある。キメラ

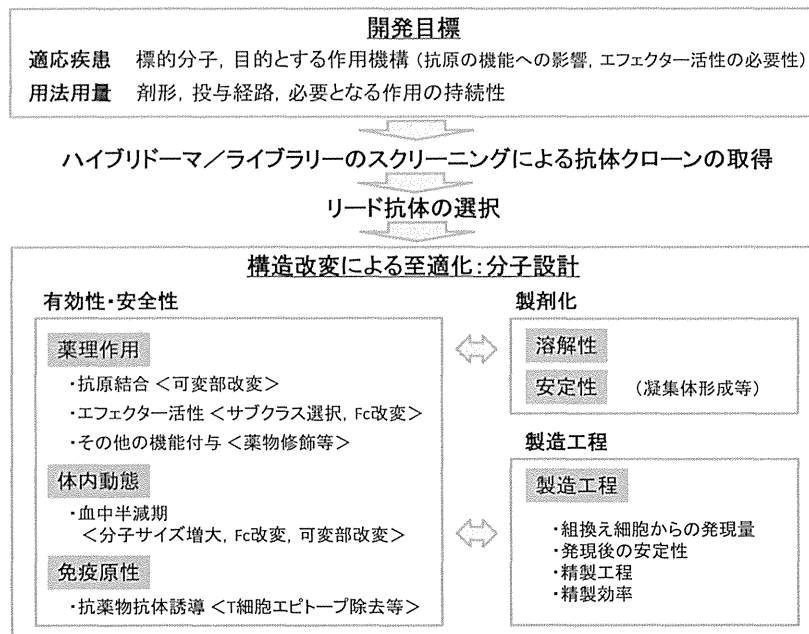


図3 開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において考慮すべき主な事項

抗体は、マウス抗体の定常部をヒト抗体に置換したもの、ヒト化抗体は、マウス抗体のCDR以外を全てヒト抗体に置換したものである。キメラ抗体やヒト化抗体は、マウスIgG配列をヒトIgG配列に置換することにより、免疫原性の低減とヒトFcRn結合能の付与を実現したもので、抗体医薬品の実用化に大きく貢献した分子設計である。

低分子抗体には、可変部と定常部CL及びCH1ドメインからなるFabの他、可変部のみからなるscFv、2つのscFvが会合したdiabody、2つのscFvをリンカーでつないだtandem-scFv、1本鎖で抗原結合能を持つラマ由来抗体可変部V_{HH}などがある。これら低分子抗体においても、キメラ化やヒト化等、免疫原性を低減する改変が行われている。また、低分子抗体では、PEG化やFcRn結合性の付与等、血中半減期延長に寄与する修飾が行われることがあり、図2では、これらをPK改良型低分子抗体として示している。現在のところ、日米欧で承認されている抗体医薬品の中で、低分子抗体は、Fabが2品目、PEG化Fab'が1品目であり、IgG型抗体と比較すると少ない。抗体医薬品をはじめ、バイオ医薬品の承認品目については、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部HPにて情報提供している (<http://www.nihs.go.jp/dbcb/mabs.html>)。

3. 抗体医薬品の分子設計において考慮すべきこと

開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において重要と考えられる主な事項を図3にまとめた。抗体医薬品の開発では、まず、目的とする適応疾患に応じて抗原が選択され、ハイブリドーマやファージディスプレイライブラリー等のスクリーニングにより、目的とする抗原への結合能を持つ抗体クローンが取得される¹⁾。得られた抗体クローンの中から、抗原との結合親和性や特異性、及び、抗原の生理機能への影響を評価して、開発候補となるリード抗体が選択される¹⁾。

選択されたリード抗体の至適化においては、(1)有効性・安全性に関連する薬理作用、薬物動態、免疫原性、(2)製剤化に関連する溶解性、安定性、さらに、(3)製造工程を考慮して、構造の至適化が行われる。

3.1 有効性・安全性

3.1.1 薬理作用

抗体医薬品の薬理作用は、抗原との結合、及び、エフェクター活性に寄与するFcγ受容体や補体との結合に依存するため、これらの結合能を至適化するための改変が行われる。また、目的とする薬理作用に応じ、二重特異性抗体への改変や、化学薬品による修飾等が行われることもある。

(1) 抗原結合の至適化

抗原結合には、可変部の構造が関与する。リード抗体の抗原結合親和性が不十分な場合や、ヒト化に伴い親和性が低下した場合、あるいは、特異性の向上が必要となる場合、CDR 及びその周辺のフレームワーク部のアミノ酸置換が行われる³⁾。

1つの抗体が2種類の抗原に結合することで薬理作用の発揮が期待できる場合、1つの抗体に2種類の可変部を持たせ、二重特異性抗体とすることがある⁴⁾。二重特異性抗体の例として、腫瘍細胞表面抗原とT細胞表面抗原に結合する抗体があり、腫瘍細胞近傍でT細胞を活性化することで、抗腫瘍効果を示す。

(2) エフェクター活性の至適化

ADCC 活性や CDC 活性等のエフェクター活性には、Fc ドメインのアミノ酸配列及び糖鎖構造が関与している。通例、細胞傷害活性を期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を増強、中和活性のみを期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を低減する方向で改変が行われる。

エフェクター活性を考慮した至適化において、まず、IgG サブクラスの選択が行われ、さらに、必要に応じて、Fcγ 受容体や補体結合に関与するアミノ酸残基の改変が行われる。ヒト IgG には、IgG1~4 のサブクラスがあり、これまでに承認されている抗体医薬品の多くでは、IgG1 サブクラスが用いられているが、IgG2, IgG4, あるいは、IgG2 と 4 のキメラ定常領域が用いられている例がある。IgG4 はエフェクター活性が弱く、特に補体活性化能が低い点が特徴で、中和のみを目的とする抗体に選択される。IgG3 はエフェクター活性が強いという特徴を持つが、ヒンジ領域が長く分子間ジスルフィド結合の数が多きことや、遺伝子多型が多いこと等が懸念され、これまでのところ、抗体医薬品に使われている例はない。

糖鎖構造改変の例として、Asn297 に結合する N 結合型糖鎖において、フコシル化された糖鎖の含量を低減することで FcγRIII への結合親和性を上げ、ADCC 活性を増強する技術が日本で開発されている。抗 CCR4 抗体モガムリズマブがこの例である(表 1)。

(3) 化学薬品による修飾

抗腫瘍効果を期待する抗体医薬品では、抗体と強

力な細胞傷害作用を持つ薬物を共有結合させた抗体薬物複合体 (ADC) として開発されることがある。細胞表面抗原に結合した ADC は、抗原の細胞内移行に伴いエンドソームに移行し、酸加水分解、酵素消化等により、薬物が放出される。薬物の放出性はリンカーの構造に依存するため、ADC の分子設計においてはリンカーの設計が重要である。

3.1.2 薬物動態

化学薬品では、薬物動態の制御における製剤設計の重要性が高いが、抗体医薬品では、有効成分の構造が薬物動態に関わるため、その分子設計において、薬物動態を考慮することになる。抗体医薬品は、それ自身が標的指向性を持っているため、薬物動態に関しては、血中滞留性や組織移行性が課題となる。本章第 4 節 (抗体医薬品の体内動態制御のための分子設計) で述べるように、IgG 抗体では、Fc ドメインの改変による FcRn 結合親和性向上や、可変部の改変による遊離型抗体のリサイクリング等を目的とした分子設計が行われている。低分子抗体では、主に、血中半減期延長のための分子設計が行われる。

3.1.3 免疫原性

免疫原性は、*in vivo* で免疫応答を生じさせる性質であり、抗体医薬品を含むバイオ医薬品の有効性・安全性確保に関する懸念事項の一つとなっている。投与された医薬品が免疫原性を示し、抗薬物抗体が産生されると、薬物の血中半減期への影響や、有効性の低下、免疫応答による有害作用発生につながる可能性がある。ヒトに対する免疫原性の程度は、臨床試験を実施しなければ分からないが、臨床試験段階で免疫原性の問題が生じると、開発の続行が危ぶまれるため、分子設計の段階で、免疫原性に寄与する構造についても考慮する。

免疫原性の回避について、今のところ定型化された手法はないが、分子設計に寄与する情報を得る方法として、抗原提示に関わる MHC クラス II 分子に結合するペプチド配列 (T 細胞エピトープ) を推定することや、リード抗体選択に際し、ヒト T 細胞の活性化を指標とした *in vitro* アッセイを利用すること等が考えられる。

3.2 製剤化

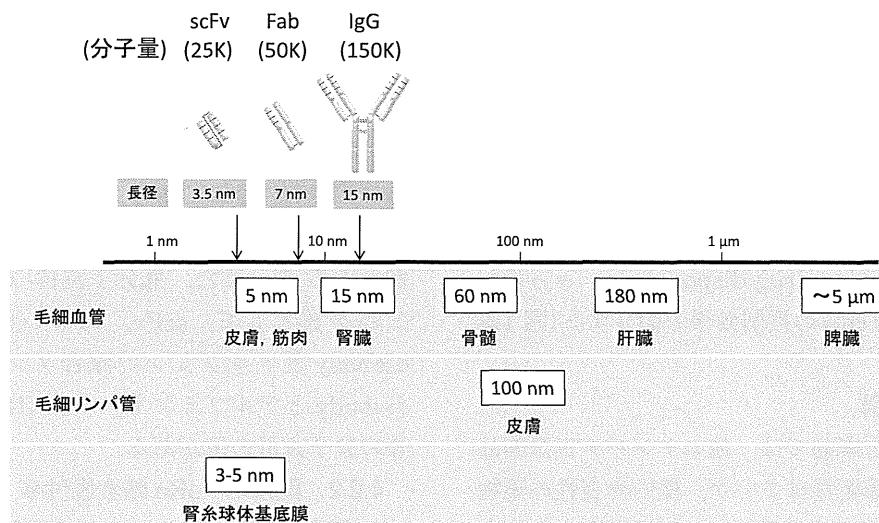
3.2.1 溶解性

これまでに承認されている抗体医薬品は、全て注射剤であり、投与経路は、抗腫瘍薬では点滴静注、

表1 日本で承認された抗体医薬品

構造	標的分子	一般名	販売名	剤形	投与経路	主な適応疾患
抗腫瘍薬						
マウス IgG1κ (MX-DTPA : ⁹⁰ Y 標識)	CD20	イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴァリン イットリウム	溶液	点滴静注	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1κ	CD20	リツキシマブ	リツキサン	溶液	点滴静注	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
キメラ IgG1κ	EGFR	セツキシマブ	アービタックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1κ	VEGF	ベバシズマブ	アバスチン	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
ヒト化 IgG1κ	HER2	ベルツズマブ	バージェタ	溶液	点滴静注	乳がん
ヒト化 IgG1κ	HER2	トラスツズマブ	ハーセプチン	凍結乾燥	点滴静注	転移性乳がん
ヒト化 IgG1κ (糖鎖改変)	CCR4	モガムリズマブ	ポテリジオ	溶液	点滴静注	成人 T 細胞白血病リンパ腫
ヒト化 IgG4κ (カリケアマイシン修飾)	CD33	ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターグ	凍結乾燥	点滴静注	急性骨髄性白血病
ヒト IgG1κ	CD20	オフアツムマブ	アーゼラ	溶液	点滴静注	慢性リンパ性白血病
ヒト IgG2κ	EGFR	パニツムマブ	ベクティビックス	溶液	点滴静注	結腸・直腸がん
免疫調節薬						
キメラ IgG1κ	TNFα	インフリキシマブ	レミケード	凍結乾燥	点滴静注	関節リウマチ
キメラ IgG1κ	CD25	バシリキシマブ	シムレクト	凍結乾燥	静脈内	腎移植後の急性拒絶反応抑制
ヒト化 IgG1κ	IL6R	トシリズマブ	アクテムラ	溶液	点滴静注, 皮下	関節リウマチ
ヒト化 IgG1κ	IgE	オマリズマブ	ゾレア	凍結乾燥	皮下	気管支喘息
ヒト化 IgG1κ	RS ウイルス	バリビズマブ	シナジス	凍結乾燥, 溶液	筋肉内	RS ウイルス感染
ヒト化 Fab' (PEG 化低分子抗体)	TNF 抗体	セルトリズマブ ベゴル	シムジア	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1κ	TNFα	アダリムマブ	ヒュミラ	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1κ	IL12/ IL23-p40	ウステキヌマブ	ステラーラ	溶液	皮下	尋常性乾癬
ヒト IgG1κ	TNFα	ゴリムマブ	シンボニー	溶液	皮下	関節リウマチ
ヒト IgG1κ	IL-1β	カナキヌマブ	イラリス	凍結乾燥	皮下	クリオピリン関連周期性症候群
ヒト IgG2/4κ	補体 C5	エクリズマブ	ソリリス	溶液	点滴静注	発作性夜間ヘモグロビン尿症
その他						
ヒト化 Fab (低分子抗体)	VEGF	ラニビズマブ	ルセンチイス	溶液	硝子体内	加齢黄斑変性症
ヒト IgG2	RANKL	デノスマブ	ランマーク, プラリア	溶液	皮下	骨病変, 骨粗鬆症

一般名の (遺伝子組換え) は省略して表記した。



(参考文献: Klein JS et al. JBC 106, 7385, 2009; Sarin H, J Angiogenesis Res 2, 13, 2010, Bagby TR et al. Pharmaceutics 4, 276, 2012, Moeller MJ and Tenten V Nat. Rev. Nephrol. 9, 266, 2013)

図4 抗体医薬品の分子量・分子サイズと、細胞間隙経路の大きさ

免疫調節薬では皮下投与が多い(表1)。免疫調節薬が用いられる慢性疾患では、自己注射が可能な皮下投与製剤が好まれる傾向が強くなっており、静脈内投与製剤が承認されて数年後に、皮下投与製剤が開発・承認される例も出てきている。言うまでもなく、皮下投与製剤では液量が限られ、高濃度の溶液が必要となる。抗体医薬品の投与量は高く、数十 mg/mL 程度の高濃度の溶液が必要になることもあり、製剤処方最適化のみでは目的とする濃度での溶液製剤の作製が困難な場合もあり得るため、分子設計の段階から、製剤化を考慮した分子の選択が必要になる。

3.2.2 安定性

抗体医薬品製剤は、溶液製剤または凍結乾燥製剤で、通例、4°Cで保存される。有効期間の設定には、実時間実保存条件での安定性試験が必要であり、最終的な評価には長時間を要する。安定性の評価項目は、有効性・安全性に影響する品質特性となるが、製剤の保存中にもその含量が増加し得る凝集体は、免疫原性等、安全性への影響が懸念される不純物であるので、製剤の安定性を考える上で、特に注意が必要とされる。また、脱アミドや酸化等の化学的修飾、高次構造変化等も有効性・安全性に影響する品質特性として、安定性の評価項目になる可能性が高い。安定性試験結果で問題が生じる事態を避けるため、分子設計の段階で、凝集体形成や化学修飾の懸念が少ないアミノ酸配列を選択することが望ましい。凝集体形成を起こしやすいアミノ酸配列を予測

する方法が検討されており⁵⁾、これらに一致する配列を回避する等の分子設計が考えられる。

3.3 製造工程

IgG 骨格を持つ典型的な抗体医薬品の製造工程としては、プラットフォーム化された技術があり、分子設計の際に考慮すべきことは多くない。しかし、その他では、個別に対応すべき問題を考慮して、分子設計を行う必要がある。代表的な例は二重特異性抗体である。抗原 A に結合する H 鎖、L 鎖、抗原 B に結合する H 鎖、L 鎖からは、10 通りの分子種が生じ得るため、目的とする抗体の収率は低い。これを回避するため、2 種類の H 鎖にそれぞれ鍵と鍵穴となるアミノ酸置換を施し、目的とする H 鎖の会合を促進する方法や、L 鎖の共通化等の分子設計が行われている。また、Fc ドメインを持たない低分子抗体の精製には、IgG 型抗体で汎用される Protein A カラムを用いることができないため、別のアフィニティーカラムに結合させるためのアミノ酸配列が導入される例もある。培養上清中の安定性が悪い等、大量生産に適さない抗体は、除外すべきである。

4. 抗体医薬品の体内動態制御のための分子設計

抗体医薬品の体内動態には、有効成分の分子サイズ、荷電、及び、FcRn 結合性⁶⁾等が関与する。図4に、抗体医薬品の分子サイズと、組織毛細血管、リンパ管、及び、腎糸球体基底膜の細胞間隙の大きさを示した。皮下投与の際、低分子抗体は、毛細血管

及びリンパ管から吸収される大きさで、IgG型抗体はリンパ管から吸収される大きさである。低分子抗体は、糸球体ろ過を受けるサイズであるため、消失には、糸球体ろ過の寄与が大きい。IgG型抗体は、糸球体ろ過されず、その消失には、細胞への非特異的取り込みに伴う分解、及び、標的介在性の薬物消失 (Target mediated drug disposition)、さらに、これらに対するFcRnの抑制効果が関与する(図1B-ii)。

4.1 IgG型抗体

IgG型の抗体医薬品では、他のタンパク質医薬品と比較して血中滞留性はよいが、標的介在性の薬物消失等により、血中半減期が2~5日程度のものである。また、一度、抗原に結合した抗体医薬品は、リサイクルされても、再度別の抗原に結合することはできず、生体内に存在しても機能を発揮できない。

これらの課題を踏まえ、血中半減期の延長や、抗原の結合していない遊離型抗体をリサイクルさせるための分子設計が行われている。血中半減期の延長には、Fcドメインのアミノ酸置換により、FcRn結合親和性を上昇させる分子設計が行われており、動物実験では、野生型の4倍程度までの血中半減期の延長がみられている⁷⁾。遊離型抗体のリサイクリングには、細胞内エンドソームの酸性条件下で荷電状態が変わるHis残基をCDRに導入する手法が開発されており、この手法を用いると、抗原抗体複合体が細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内で抗原が抗体から解離するため、遊離型抗体のみがFcRnによりリサイクルされる⁸⁾。これらの分子設計による体内動態改良は、投与量や投与頻度の低減につながり、皮下投与製剤の開発可能性も高めるものと考えられる。

4.2 低分子抗体

IgG型の抗体医薬品とは対照的に、Fcドメインを持たない低分子抗体医薬品は、FcRnによるリサイクリングを受けず、また、糸球体ろ過により消失するため、半減期が数時間程度と短い⁹⁾。血中半減期を延長し、有効血中濃度を維持するための分子設計として、Fcドメイン、あるいは、IgGに結合するペプチドと低分子抗体を融合することで、直接あるいは間接的にFcRn結合性を付与する試みがなされている⁷⁾。また、FcRnには、IgGのみならず、アルブミンも結合するため、Fcに代わり、アルブミンを

利用することも試みられている(図2)。

4.2.1 直接的FcRn結合性付与

低分子抗体-Fc融合タンパク質として、scFv、あるいは、二重特異性scFvとFcの融合タンパク質等の作製が報告されており、scFvでは3.5時間であった血中半減期が、scFv-Fcでは93時間に延長された例もある¹⁰⁾。また、低分子抗体-アルブミン融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabodyとアルブミンの融合タンパク質、また、diabodyとアルブミンドメインIII融合タンパク質等の分子設計の例がある。

4.2.2 間接的FcRn結合性付与

IgG結合配列として、IgG結合性を持つタンパク質であるProtein A、Protein G、あるいはProtein L由来のペプチド配列を低分子抗体に付与する方法が開発されており、低分子抗体-IgG結合性ペプチド融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabodyとIgG結合性ペプチドの融合タンパク質等が報告されている。IgG上のProtein A及びProtein G結合部位は、FcRn結合部位に近いので、IgGのFcRnへの結合を阻害しないペプチド配列を選択することが重要となる。ペプチドを利用する方法では、Fcドメインやアルブミンとの融合タンパク質とする場合と比べ、分子量が大きくならないため、組織浸透性を保てる可能性が高くなると考えられる。

4.2.3 その他

他のバイオ医薬品の血中半減期延長のために用いられているPEG化は、低分子抗体医薬品にも応用されており、PEG化されたFab構造を持つセルトリズマブペゴルがその例である(表1)。有効成分の構造を改変する手法の他、開発中の製品では、ポンプを用いて低分子抗体を持続注入する方法も用いられており、投与デバイスの工夫で有効血中濃度を維持する手法も含め、体内動態の制御には、様々な手法が考えられる。

5. おわりに

抗体医薬品の分子設計において考慮すべきポイントについて、薬理、薬物動態、免疫原性、溶解性、安定性、製造工程の観点から考察した。抗体医薬品の分子設計は、生産用細胞株の樹立、治験薬製造、非臨床試験、臨床試験等からなる一連の開発過程の入り口である。アミノ酸配列が一つでも異なれば別

の医薬品となるため、開発途中での構造改変は、その抗体医薬品の開発中止を意味する。実生産スケールでの製造や、ヒトでの有効性・安全性等、開発の後期にならないと分からないことも多い中、最適と思われる構造を選択していかなければならない。タンパク質工学を中心に、開発に関わる様々な分野の連携が重要と思われる。

引用文献

- 1) 西島正弘, 川崎ナナ編, “バイオ医薬品 開発の基礎から次世代医薬品まで”, 化学同人, 東京, 2013.
- 2) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英, 川崎ナナ, 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn, 日薬理誌, **136**, 280–284 (2010).
- 3) T. Igawa, H. Tsunoda, T. Kuramochi, Z. Sampei, S. Ishii, K. Hattori, Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies, *mAbs*, **3**, 243–252 (2011).
- 4) C. May, P. Sapra, H. Gerber, Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **84**, 1105–1112 (2012).
- 5) A. C. Tsolis, N. C. Papandreou, V. A. Iconomidou, S. J. Hamodrakas, A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in glob-

- ular proteins, *PLoS One*, **8**, e54175 (2013).
- 6) T. Suzuki, A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Kobayashi, T. Kanayasu-Toyoda, T. Kawanishi, Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcRn, *J. Immunol.*, **184**, 1968–1976 (2010).
- 7) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, FcRn 結合親和性を利用した次世代抗体医薬品の体内動態制御. 熊谷泉編. 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, シーエムシー出版, 東京, 2012, pp. 102–115.
- 8) T. Igawa, S. Ishii, T. Tachibana, A. Maeda, Y. Higuchi, S. Shimaoka, *et al.*, Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 1203–1207 (2010).
- 9) P. Holliger, P. J. Hudson, Engineered antibody fragments and the rise of single domains, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1126–1136 (2005).
- 10) D. B. Powers, P. Amersdorfer, M. Poul, U. B. Nielsen, M. R. Shalaby, G. P. Adams, L. M. Weiner, J. D. Marks, Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*, *J. Immunol. Methods*, **251**, 123–135 (2001).

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。

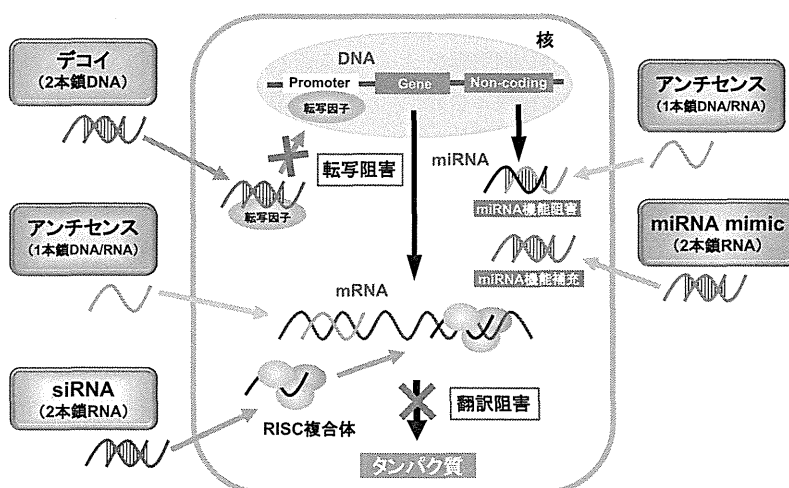
3. 核酸医薬品の特徴

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, 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, 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

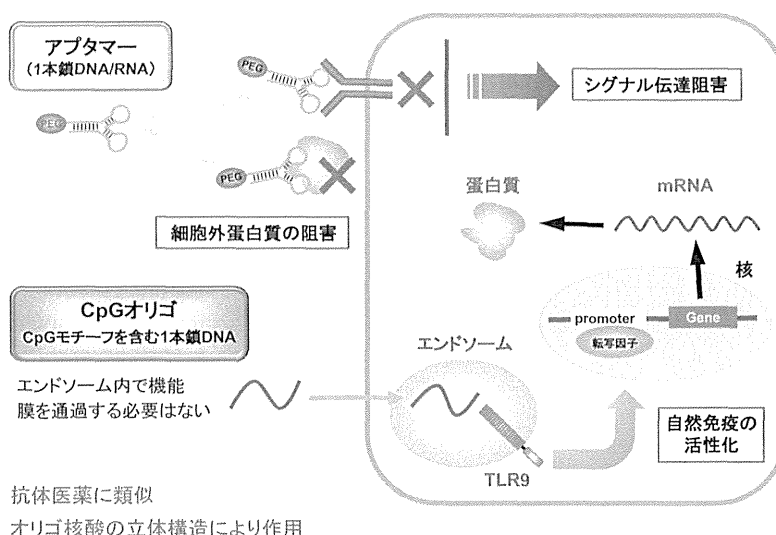


Fig. 2 細胞の外側で機能する核酸医薬品

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、遙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詰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・再生が繰り返し起こっ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

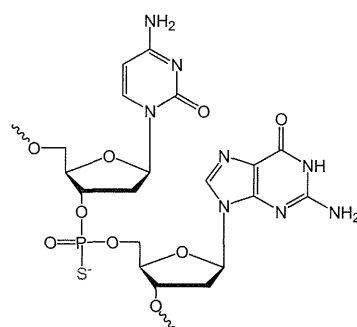


Fig.3 ホスホロチオアート化

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^{COC}、BNA^{NC}、ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)、cEt BNA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

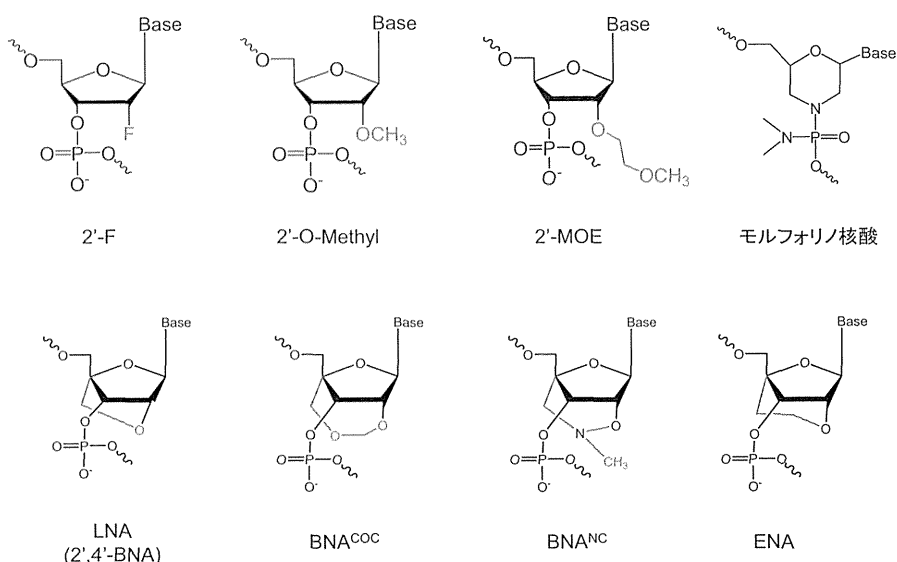


Fig. 4 核酸の糖部を改変した修飾型核酸

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てくると予想される。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 (Phase II) 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。

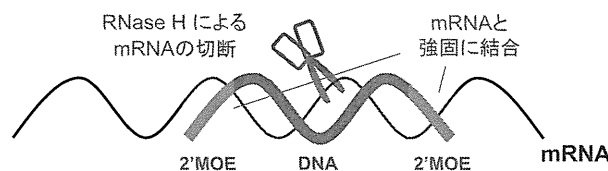
Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解する」ことにより機能する。Fig. 5 に Gapmer 型アンチセンスの模式図を示した。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には mRNA との結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる。このアンチセンスが標的 mRNA と結合すると、“DNA と RNA の相補鎖を認識して RNA 鎖を切断するヌクレアーゼ”である RNase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

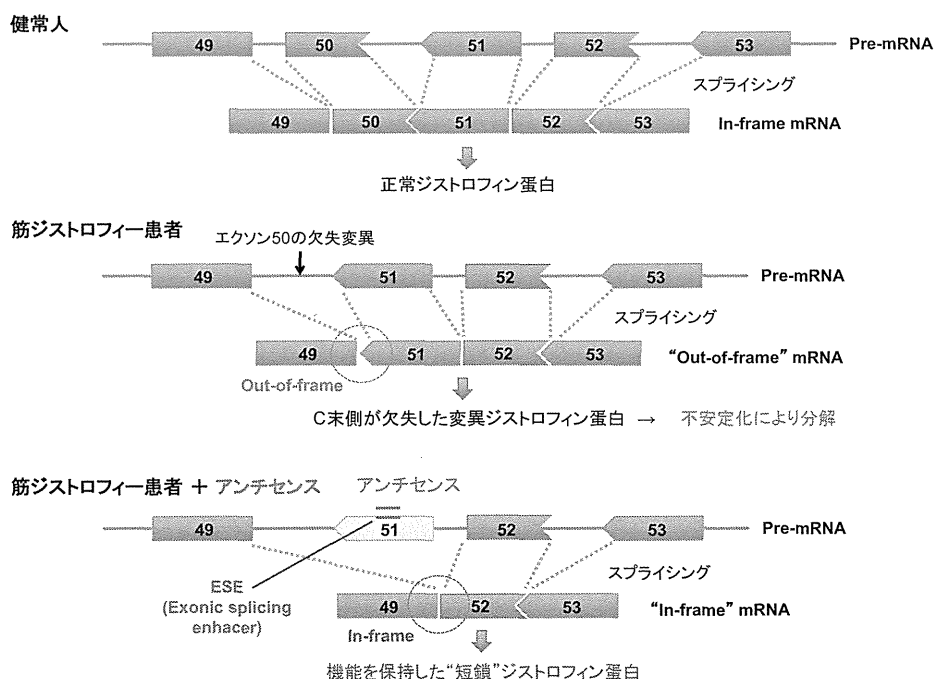


Fig. 6 エクソンスキッピング療法に用いられるアンチセンスの作用機構

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