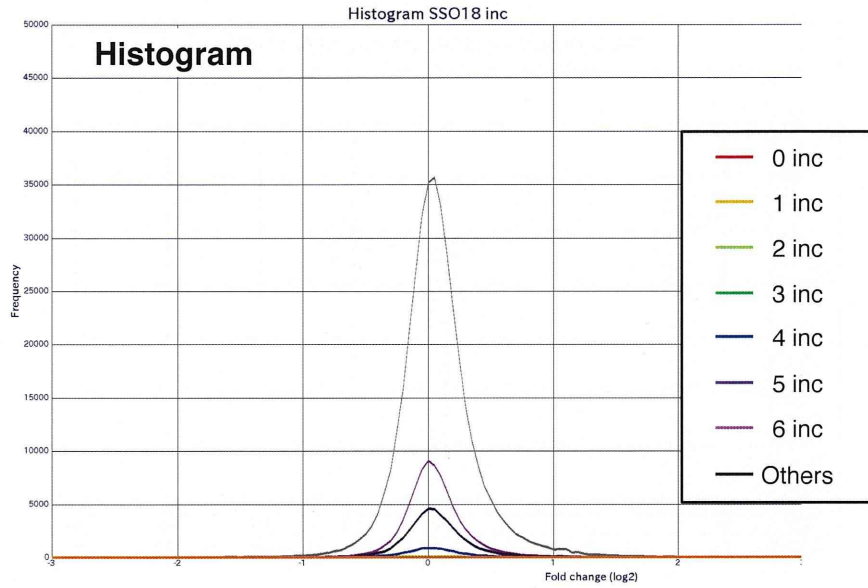


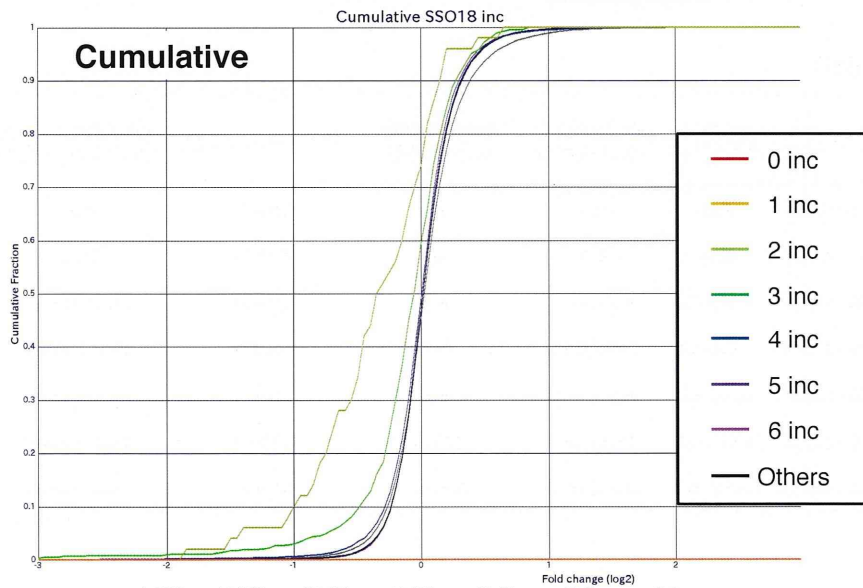
【図表45】 高密度エクソンアレイの解析結果

- SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

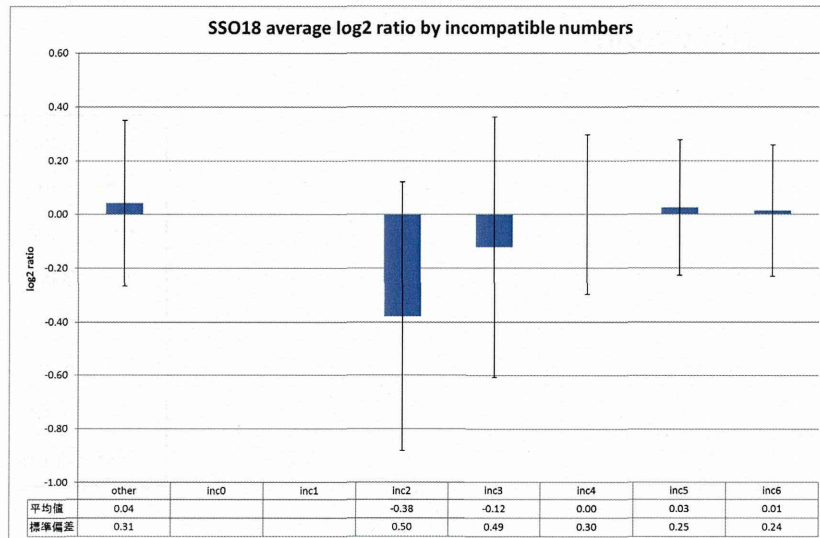


【図表46】 高密度エクソンアレイの解析結果

- SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



【図表47】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

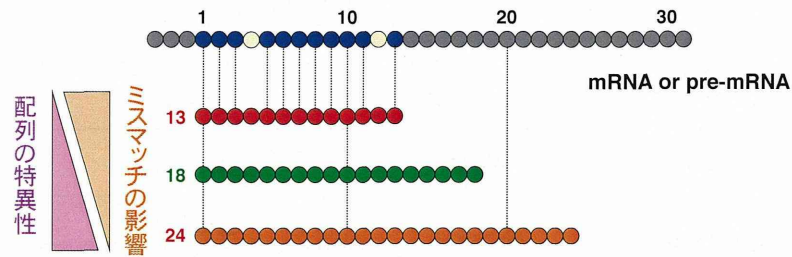


【図表48】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

U検定

比較対象群	p-value (指数表記)	有意差の有無 (有意水準5%)	Incompatibility のサンプル数	Otherのサンプル数	母集団の大小関係 (有意差がある場合)
inc0 - other	N.A.	N.A.	0	382171	N.A.
inc1 - other	N.A.	N.A.	0	382171	N.A.
inc2 - other	1.66E-10	Significant	50	382171	inc2 < other
inc3 - other	1.07E-21	Significant	654	382171	inc3 < other
inc4 - other	5.85E-24	Significant	8958	382171	inc4 < other
inc5 - other	2.68E-15	Significant	43349	382171	inc5 < other
inc6 - other	4.04E-112	Significant	80956	382171	inc6 < other

【図表49】 ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果とアンチセンス塩基長の関係(二面性)



- ・ 塩基長が短いほど、完全相補するRNA数は多くなる
→ オフターゲット候補遺伝子は増加する
- ・ 塩基長が長いほど、アンチセンス-RNA間の結合力は増大する
→ ミスマッチ等があってもRNAとの結合力が保持される
(ミスマッチ等があってもオフターゲット効果が起こりやすくなる)



様々な塩基長でオフターゲット効果が生じる配列条件を調べる必要がある

【図表50】

RNA鎖との結合力の高い修飾型核酸の開発が進化したことにより、アンチセンスの塩基長が短くなる傾向にある

名称	塩基長	開発段階	核酸の種類	作用機序
Fomivirsen	21	上市	DNA	立体障害 (翻訳阻害)
Mipomersen	20	上市	DNA/2'-MOE (Gapmer)	RNase H (mRNA分解)
Drisapersen	20	Phase 3	2'-OMe	立体障害 (スプライシング制御)
Eteplirsen	30	Phase 3	Morpholino 核酸	立体障害 (スプライシング制御)
Miravirsen	15	Phase 3	DNA/LNA (Mixmer)	立体障害 (miRNA阻害)

【図表51】

スプライシング制御型アンチセンスの オフターゲット効果の評価法

アンチセンス	Gapmer型	スプライシング 制御型
標的	mRNA	pre-mRNA
作用原理	RNase H	立体障害 (RNAとスプライス因子の結合阻害)
作用機構	mRNAの分解	スプライシングパターンの変化
オフターゲット効果 の評価	マイクロアレイ	高密度エクソンアレイ RNA-seq (次世代シーケンサー)

【図表52】

検索プログラムの比較

プログラム名	BLAST	GGRNA	GGGenome
検索対象	ゲノム	転写産物	ゲノム 転写産物
検索可能な 相補の不完全性	ミスマッチ/挿入/欠失	ミスマッチ	ミスマッチ/挿入/欠失
検索可能な 不適合数	配列の長さや ミスマッチの位置に依存	3塩基まで	検索配列の塩基長の 25%まで
特徴	<ul style="list-style-type: none"> 短い塩基配列は不向きで検索漏れが起こる 検索速度は遅い 	<ul style="list-style-type: none"> 十数塩基の短い配列でも高速検索が可能 漏れがない 	<ul style="list-style-type: none"> 十数塩基の短い配列でも高速検索が可能 漏れがない

【図表53】

既存の検索アルゴリズムの精度の検証
BLASTとGGRNAの比較

検索プログラム	BLAST			GGRNA		
	完全相補	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ	完全相補	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ
配列1	0	0	1	0	0	24
配列2	0	3	6	0	4	65
配列3	3	10	22	2	28	501

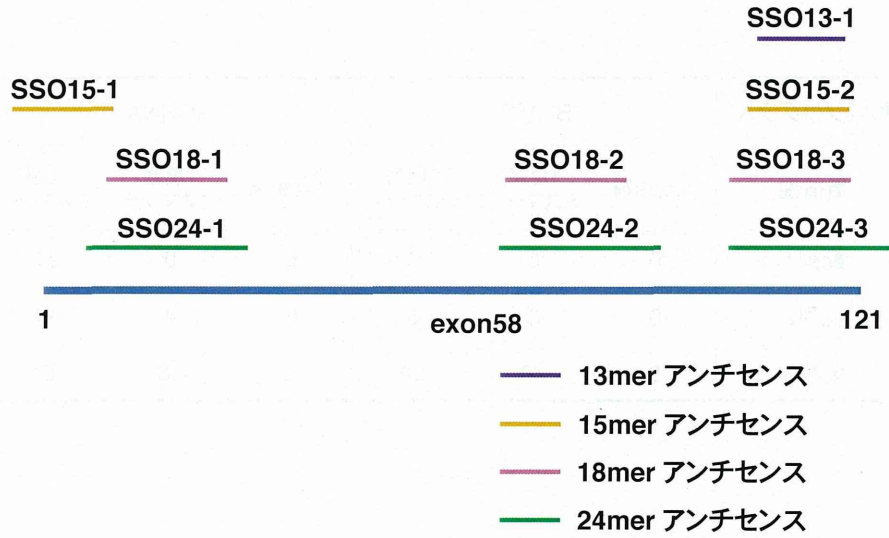
【図表54】

GGGenome/GGRNAによる相補結合部位の検索

	GGGenome(hg19を対象, mis/ins/delを解析)				GGGenome(Refseq60を対象, mis/ins/delを解析)				GGRNA(Refseq60を対象, misを解析)			
	0	≤ 1	≤ 2	≤ 3	0	≤ 1	≤ 2	≤ 3	0	≤ 1	≤ 2	≤ 3
No.1	1	24	807	19313	0	0	12	269	0	0	3	46
No.2	1	26	926	24046	0	1	8	248	0	0	2	45
No.3	1	24	571	13282	1	1	7	235	1	1	3	63
No.4	1	25	821	22380	1	2	12	315	1	1	6	76
No.5	1	43	1271	31818	1	2	14	302	1	1	5	62
No.6	2	25	1073	26349	1	1	10	250	1	1	3	69
No.7	1	23	1091	23974	1	1	12	254	1	1	4	83
No.8	1	56	2123	48508	1	1	28	486	1	1	11	126
No.9	2	62	3358	78145	1	2	40	707	1	2	14	178
No.10	1	73	3665	91069	1	1	20	511	1	1	6	122
No.11	1	35	1345	33498	1	1	17	380	1	1	6	87
No.12	2	44	1891	43619	1	1	20	400	1	1	8	84
No.13	2	30	1204	30384	1	2	23	347	1	2	6	78
No.14	1	28	1762	41825	1	1	20	363	1	1	6	80
No.15	1	21	1395	35097	1	1	17	309	1	1	6	79
No.16	1	1	192	8607	1	1	4	120	1	1	1	15
No.17	1	36	1386	32495	1	2	22	411	1	2	5	64
No.18	2	20	935	21580	1	1	26	368	1	1	5	58
No.19	3	39	1210	20564	1	2	33	451	1	2	10	77
No.20	1	27	1022	21298	1	1	26	475	1	1	9	104
No.21	1	14	788	36694	1	1	22	474	1	1	5	72
No.22	1	38	1638	38625	1	1	23	450	1	1	4	85
No.23	1	23	1210	31099	1	1	19	403	1	1	8	64
No.24	1	36	1248	29407	1	2	16	414	1	2	6	71
No.25	1	9	762	22444	1	1	19	347	1	1	2	54
No.26	1	30	1119	28657	0	2	49	853	0	2	16	125
No.27	1	20	733	21784	0	0	18	471	0	0	7	82
No.28	1	19	778	18070	0	0	19	408	0	0	11	88
No.29	1	31	940	20586	0	0	25	453	0	0	9	75
No.30	1	11	690	16236	0	0	12	281	0	0	6	50
No.31	1	11	583	13129	0	0	6	205	0	0	3	45
No.32	1	14	532	14857	0	1	12	213	0	0	3	50
No.33	1	17	795	20882	0	0	11	337	0	0	3	48
No.34	1	61	1527	26497	0	0	13	324	0	0	1	41

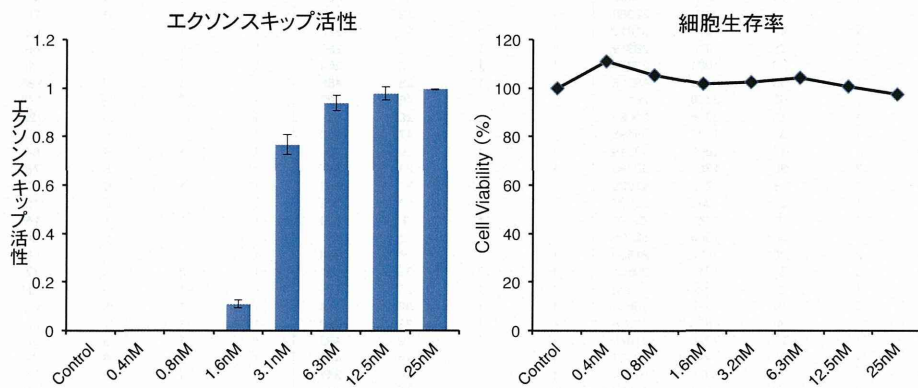
【図表55】

スプライシング制御型アンチセンスのターゲット部位



【図表56】

オンターゲット効果の解析(SSO18-2)



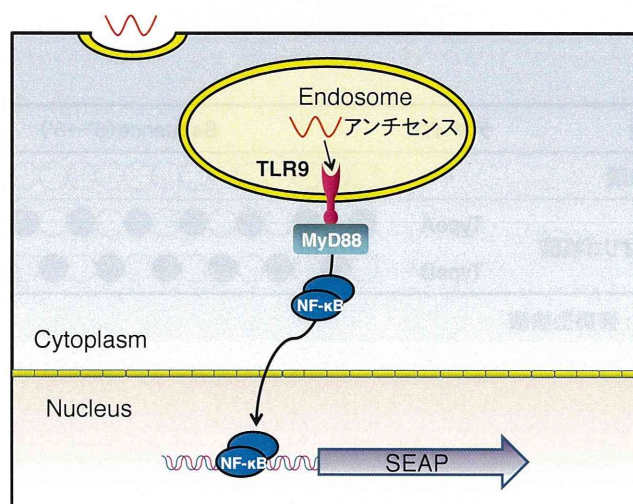
【図表57】

各アンチセンスのED₅₀値

Length	Antisense Name	ED ₅₀ (nM)
13mer	SSO13-1	5.02
15mer	SSO15-1	26.7
	SSO15-2	4.55
18mer	SSO18-1	1.93
	SSO18-2	2.76
	SSO18-3	24.8
24mer	SSO24-1	1.72
	SSO24-2	3.32
	SSO24-3	289

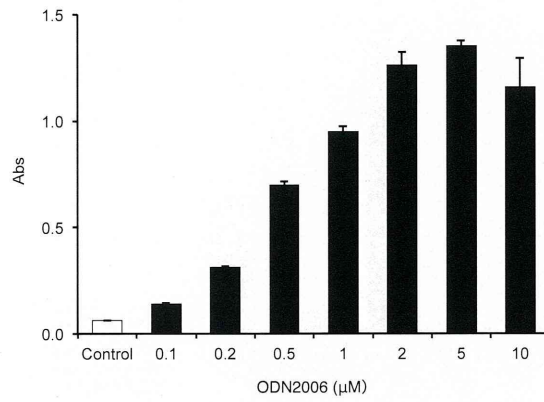
【図表58】

HEK-Blue hTLR9 細胞



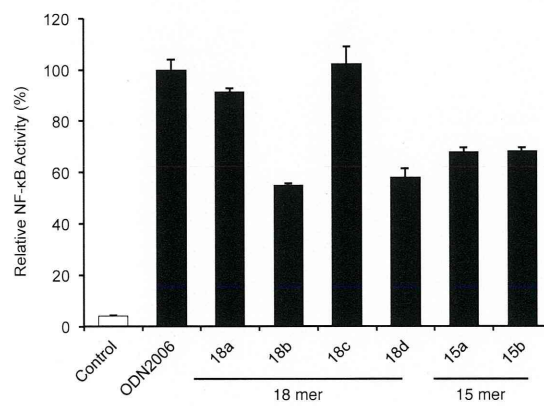
【図表61】

TLR9活性評価系の条件設定



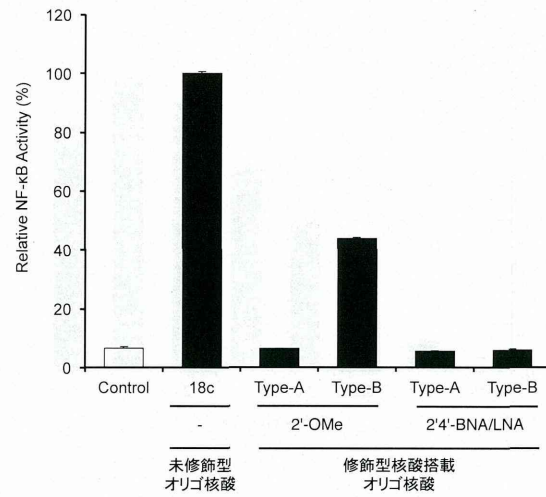
【図表62】

TLR9を活性化する塩基長の短いオリゴ配列の探索



【図表63】

修飾型核酸搭載オリゴ核酸のTLR9活性評価



学会等発表実績(3)

委託業務題目「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」

「核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発」

機関名 国立医薬品食品衛生研究所, 日本新薬株式会社, 第一三共株式会社, 扶桑薬品工業株式会社

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所	発表した時期	国内・外の別
		(学会等名)		
核酸医薬の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み(口頭発表)	井上貴雄	千葉 (日本化学会第95春期年会)	2015年 3月	国内
アンチセンス医薬品のオフターゲット効果の安全性評価に関する研究(ポスター発表)	吉田徳幸, 内藤雄樹, 佐々木澄美, 内田恵理子, 小比賀聡, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄	兵庫 (日本薬学会第135年会)	2015年 3月	国内
核酸医薬品の細胞内取り込み機構に関する解析(ポスター発表)	佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄	兵庫 (日本薬学会第135年会)	2015年 3月	国内
修飾型オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究(ポスター発表)	萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄	兵庫 (日本薬学会第135年会)	2015年 3月	国内
核酸医薬品開発のポイント-開発の現状・市場動向・課題・レギュラトリーサイエンス-(口頭発表)	井上貴雄	東京 (R&D支援センターセミナー)	2015年 3月	国内
核酸医薬開発とレギュラトリーサイエンス研究(口頭発表)	井上貴雄	大阪 (第18回バイオメディカル研究会)	2015年 3月	国内
核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発(口頭発表)	井上貴雄	東京 (創薬基盤推進研究事業研究成果発表会)	2015年 2月	国内
日本発核酸医薬の創出に向けて(口頭発表)	井上貴雄	東京 (抗体医薬・核酸医薬開発コンソーシアムシンポジウム)	2015年 1月	国内
核酸医薬品の開発動向とレギュラトリーサイエンス研究への取り組み(口頭発表)	井上貴雄	大阪 (第19回分子複合医薬研究会)	2014年 11月	国内
Evaluation of Off-target Effects of Antisense Oligonucleotides(ポスター発表)	Yoshida, T., Sasaki, K., Obika, S., Sato, Y., Inoue, T.	San Diego (10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society)	2014年 10月	国外
核酸医薬品開発の動向と課題(口頭発表)	井上貴雄	大阪 (第27回大阪大学医工情報連携シンポジウム)	2014年 9月	国内
核酸医薬品の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み(口頭発表)	井上貴雄	東京 (アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014)	2014年 9月	国内
オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究(ポスター発表)	萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄	東京 (アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014)	2014年 9月	国内
siRNAの細胞内取り込み機構の解析(ポスター発表)	佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 佐藤陽治, 井上貴雄	広島 (第6回日本RNAi研究会)	2014年 8月	国内

核酸医薬開発の動向と課題 (口頭発表)	井上貴雄	東京 (次世代医薬「核酸医薬」創 出に向けたStrategy2014)	2014年 7月	国内
核酸医薬品の規制 (口頭発表)	井上貴雄	兵庫 (第41回日本毒性学会学術 年会)	2014年 6月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所	発表した 時期	国内・外 の別
		(学会誌・雑誌等名)		
Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides <i>in vitro</i> .	Shimo, T., Tachibana, K., Saito, K., Yoshida, T., Tomita, E., Waki, R., Yamamoto, T., Doi, T., Inoue, T., Kawakami, J., Obika, S.	Nucleic Acids Research	2014年 6月	国外
核酸医薬品開発の動向	井上貴雄	医薬品医療機器レギュラ リーサイエンス	2014年 4月	国内
核酸医薬品開発の現状	井上貴雄	PHARMSTAGE	2014年 6月	国内
核酸医薬品の実用化促進に向けた取 り組み	井上貴雄, 吉田徳幸	国立医薬品食品衛生研究 所報告	2015年 1月	国内

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」のセントラルドグ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。

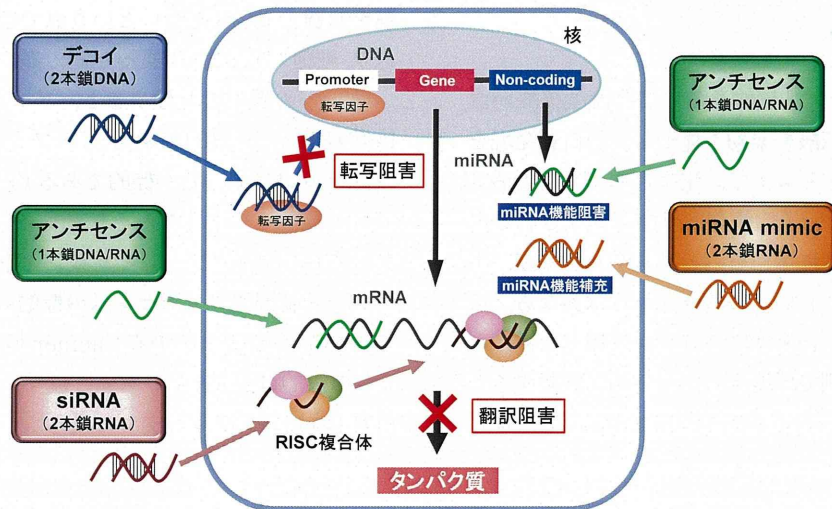
3. 核酸医薬品の特徴

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

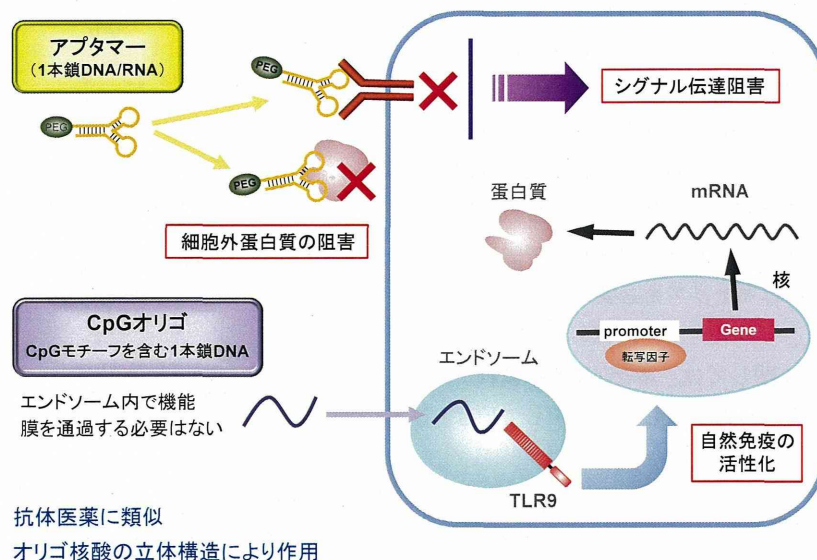


Fig.2 細胞の外側で機能する核酸医薬品

7,122, 7,595である。siRNA は一般に 20 数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、健常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

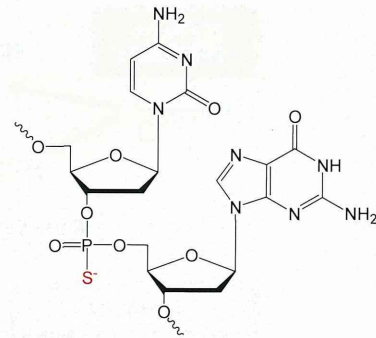


Fig. 3 ホスホロチオアート化

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

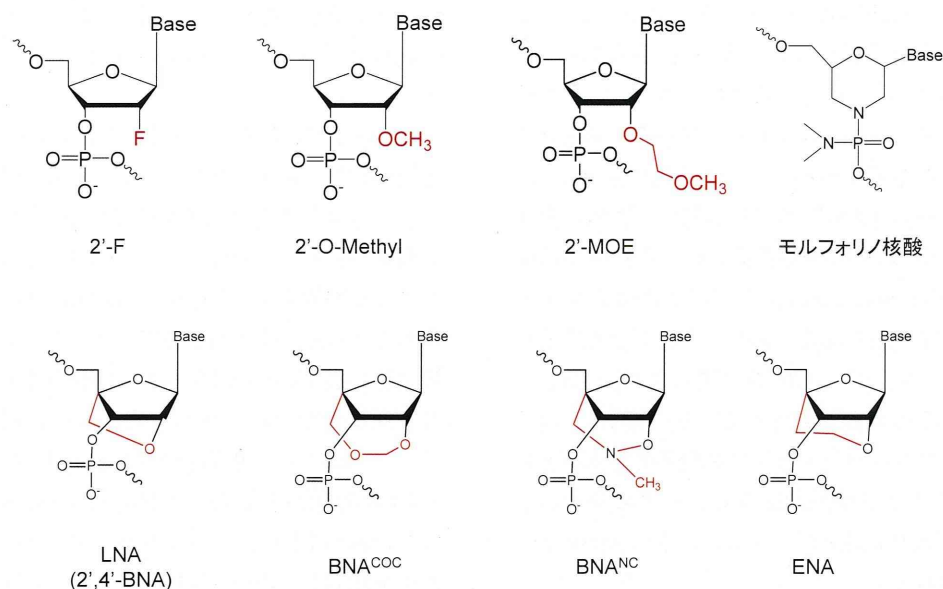


Fig. 4 核酸の糖部を改変した修飾型核酸

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。

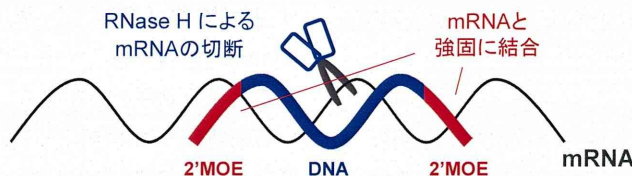
Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解することにより機能する。Fig. 5 に Gapmer 型アンチセンスの模式図を示した。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には mRNA との結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる。このアンチセンスが標的 mRNA と結合すると、“DNA と RNA の相補鎖を認識して RNA 鎖を切断するヌクレアーゼ”である RNase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

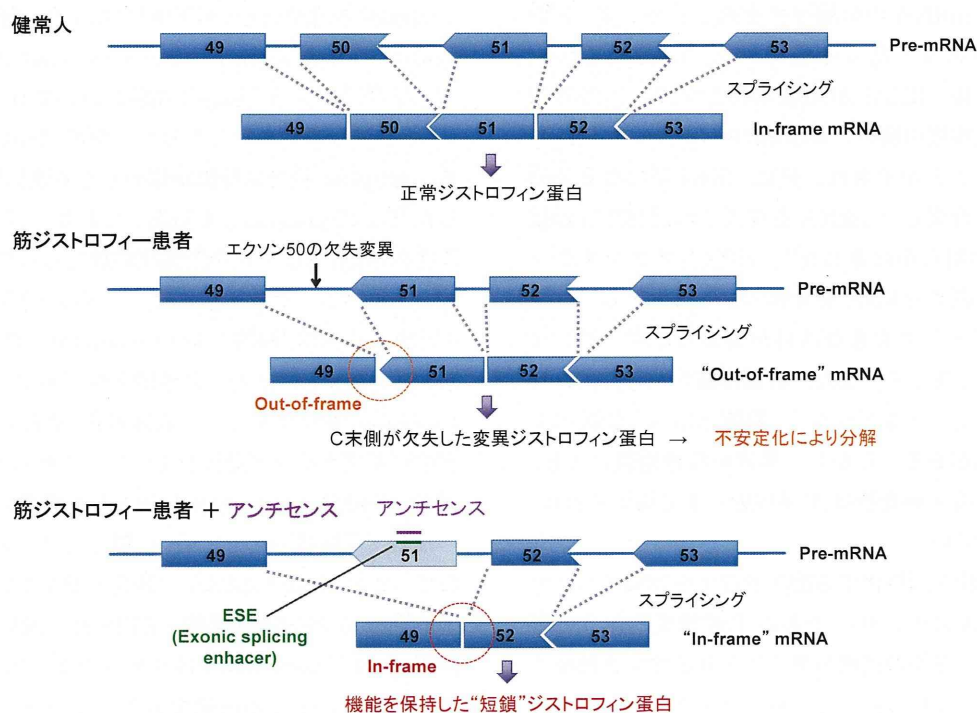


Fig. 6 エクソンスキッピング療法に用いられるアンチセンスの作用機構

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が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