NF κ Bデコイオリゴの臨床開発

特集 オリゴ核酸医薬への DDS の展開

和田和洋^{*1)}, 森下竜一^{*2)}

Clinical development of NF κ B decoy oligodeoxynucleotides

In recent years, nucleic acid medicines, such as antisense, decoy, siRNA and aptamer have been regarded as the targeted therapy for next generation. On the basis of many research results that elucidate functional mechanism of the nucleic acid medicines, efficacies of the medicines on various diseases have been verified and their development as pharmaceuticals and/or medical devices have been more and more expected. Besides, it is expected that application of the adequate DDS technique would enable to deliver the nucleic acid medicines to the targeted organ/tissue, which makes the medicines act on the targeted cell/molecule, and thus such application of the DDS technique would broaden indication of treatment by the nucleic acid medicines. However, there are several points to be considered in the development of the nucleic acid medicines, which are different from that of biologics and/or chemical drugs that do not have such concern generally. So, it is necessary for development of nucleic acid medicines to overcome such a variety of challenges.

In this review, challenges in the development of nucleic acid medicines for pharmaceuticals and investigation of DDS application for medical devices are introduced, focusing on the clinical development of NF κ B decoy oligodeoxynucleotides.

近年、核酸医薬品が次世代の分子標的薬として注目され、様々な疾患の分子レベルでの機構解明を目的とした研究に基づき、その有効性が検証され臨床応用への期待が高まっている。DDSを適用し、目的とする臓器・組織へ送達、標的分子に作用させることにより、治療できる対象疾患が拡大されるが、核酸医薬品の開発には、安全性および品質の確保という観点で、低分子化学合成品にはない留意点があり克服しなければならない。

本稿では、NF κ B デコイオリゴヌクレオチドの開発を中心に、核酸医薬品の開発上の課題と DDS 技術適用の試みを紹介する。

Kazuyo Wada^{*1)}, Ryuichi Morishita^{*2)}

key words : nucleic acid medicine, NF κ B, decoy, atopic dermatitis, PTA-DCB

核酸医薬品開発の現状

アンチセンス、デコイ、siRNA、アプタマー等の核酸医薬品は、標的分子への結合によって作用を発揮するよう人工的に化学合成された核酸分子であり、遺伝子の転写・翻訳過程における制御・蛋白質の機能阻害による薬効を有する。その構造はアンチセンスのように1本鎖のもの、デコイやsiRNAのように2本鎖のものがあ、その機序・作用部位も異なっている(図1, 表1)。

アプタマーは、抗体医薬品同様、細胞外の蛋白質標的分子に直接結合してその作用を抑制するが、ア

図1 核酸医薬の作用機序

ンチセンス、デコイ、およびsiRNAは細胞内に取り込まれてから、細胞が元来備え持つメカニズムを利用して細胞質内の分子に直接作用する。これらの核酸医薬品は、ヌクレオチドを基本骨格としたオリ

^{*1)} AnGes MG, Inc. Saito Lab. アンジェス MG 株式会社社彩都研究所

^{*2)} Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

表 1 核酸医薬の分類

デコイ	転写因子結合領域と同じ配列を持つ短い2本鎖DNAであり、転写因子に結合し、標的遺伝子の発現を抑制する。
アンチセンス	標的遺伝子の配列に相同的な1本鎖RNA/DNAであり、mRNAに結合することでmRNAから蛋白質への翻訳過程を阻害する。
siRNA	RNA干渉(RNAi: RNA interference)作用を持つ2本鎖RNA(small interfering RNA: siRNA)であり、標的遺伝子のmRNAに結合し、RNAの分解を促進することにより遺伝子の発現を抑制する。
miRNA	短い1本鎖RNA(micro-RNA)であり、siRNAと同様にmRNAの翻訳を抑制するが、標的遺伝子のmRNAの3'-UTRに結合することで翻訳を抑制する。
リボザイム	核酸を切断する触媒活性を有する1本鎖RNAで、mRNAを切断することにより遺伝子発現を抑制する。
アプタマー	高度に特異的な三次元構造を有する短い1本鎖RNA/DNAであり、抗体医薬同様、標的分子に結合することにより薬効を示す。

表 2 現在までに承認された核酸医薬品

核酸医薬	分類(作用機序)	適応症	投与経路	承認
Vitravene (ホミビルセン)	アンチセンス CMVの増殖に必要なIE2 (immediate early antigen2) 遺伝子に結合し、転写を阻害	AIDS患者における サイトメガロウイルス性網 膜炎	硝子体内	ISIS/Novartis(Ciba Vision) 1998年8月FDA承認 同年11月に発売開始 ヨーロッパでは、1999年7月承認 2002年5月に安全性の問題ではなく 商業上の理由から販売は中止
Macugen (ベガプタニブ)	アプタマー 血管新生を促す血管内皮細胞 増殖因子(VEGF)に結合 して、新生血管の発育を阻 害	血管新生型(滲出型) 加齢性黄斑変性症	硝子体内	国内2008年7月承認(国内初) アメリカ:2004年12月承認 カナダ:2005年5月承認 ヨーロッパ:2006年1月承認 ブラジル、アルゼンチン、ペルー、パ キスタンおよびフィリピンでも承認

表 3 アンジェスのデコイプロジェクト状況

	対象疾患	開発段階
NF κ B デコイオリゴ	アトピー性皮膚炎 整形外科領域(関節リウマチ・変形性関節症) 呼吸器領域(慢性閉塞性肺疾患 COPD・喘息) 血管再狭窄予防	第Ⅲ相試験準備中 前臨床 前臨床 臨床準備中

ゴマーである点で、同じく核酸からなる遺伝子治療薬およびアミノ酸からなるペプチド・蛋白製剤を包含するバイオ医薬品とも従来の低分子化学合成医薬品とも異なる。このような分子構造上の違いや作用様式の差異から考えられる品質・安全性における懸念事項については熟慮が必要である。

現在、医薬品として承認されているものは、AIDS患者におけるサイトメガロウイルス(CMV)性網膜炎に対するアンチセンスDNA、Vitravene(fomivirsen)と血管新生型(滲出型)加齢性黄斑変性症(AMD)に対するアプタマー、Macugen(pegap-

tanib)である(表2)。Vitraveneは、CMVの増殖に必要なIE2(immediate early antigen2)遺伝子に結合する1本鎖DNA(phosphorothioate)であり、転写を阻害することでCMVの増殖を抑制し薬効を示す¹⁾。

Macugenは、本邦においても2008年7月に承認された国内初の核酸医薬品である。PEG(ポリエチレングリコール)化されたRNAアプタマーで、血管新生を促す血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に結合して新生血管の発育を阻害する²⁾。アプタマーは細胞外の標的分子に作用するものの、いずれも硝子体

図2 NFκB 活性化による遺伝子発現誘導

内への局所投与での適用であり、作用の発現は限局的である。全身適用可能な核酸医薬品の開発の成否には標的分子や疾患の特性に応じた DDS の開発が大きく影響することは間違いない。

siRNA, デコイにおいては、第Ⅱ相試験まで開発ステージが進んではいるものの、いまだ承認されたものはない。siRNA の開発については、本特集の他稿で詳しく紹介されるのでそちらを参照いただきたいが、筆者らも共同研究により siRNA 創薬に携わっているところである。また、デコイについては NFκB デコイオリゴヌクレオチド(以下、NFκB デコイオリゴ)を開発しており(表3)、アトピー性皮膚炎を対象に第Ⅱ相試験を終え、欧米も含めたグローバル開発の可能性も視野に入れ、第Ⅲ相試験の実施に向け準備段階である。また、その他の炎症性疾患に対しても NFκB が関与しており、整形外科領域および呼吸器の炎症性疾患においても NFκB デコイオリゴを治療薬として開発中であり、非臨床試験を進めているところである。さらに、NFκB デコイオリゴの血管再狭窄予防効果に着目し、狭窄性血管の拡張を目的とした医療機器の開発を進めており、臨床試験実施に必要な試験結果を累積中である。

本稿において、NFκB デコイオリゴの医薬品開発の現状について紹介する。

NFκB デコイオリゴの開発

1. NFκB

NFκB は、1986 年に David Baltimore らによって同定された転写因子である。NFκB ファミリーとして、p65/RelA, p50, c-Rel, RelB および p52 の五つのメンバーが報告されており、二量体形成、核内移行、DNA への結合、阻害蛋白質 IκB との結合等を担う rel homology domain を持つ。NFκB の活性化は、抑制因子である IκB によって制御されている。

IκB は、NFκB 二量体と結合することにより nuclear localization sequence を覆うことで、不活性化状態で細胞質内に留まらせる。種々の細胞外刺激により、IκB がリン酸化され、さらに分解を受けることで NFκB は開放され、核内に移行し、NF-κB 結合配列(5'-GGGRNYYYCC-3')に結合することで、特異的な遺伝子発現を誘導する³⁾(図2)。

NFκB は免疫・炎症性細胞を中心としたさまざまな細胞に存在し、免疫および炎症反応を制御する

種々のサイトカインや接着分子の転写を制御している。NF κ Bにより転写が活性化される炎症性サイトカインおよびケモカインとして、TNF- α , IL-1 β , IL-6 および IL-8 などが報告されている。また、免疫を制御している受容体である IL-2 受容体, MHC class I および MHC class II, 抗原提示に関与する共刺激分子である CD80 および CD86, 接着分子である ICAM-1 および VCAM-1, prostaglandin 合成酵素である COX-2, matrix metalloprotease である collagenase I などの発現を誘導している⁴⁾。これらの炎症性サイトカイン, 免疫反応に関与している受容体, 接着分子および酵素群は, アトピー性皮膚炎, 関節リウマチ, 血管再狭窄, 炎症性腸炎, がん, 動脈硬化, 糸球体腎炎および糖尿病など多くの疾患に関与していることから, NF κ B を制御する薬物の開発が注目されている⁵⁾。

2. NF κ B デコイオリゴの作用機序

さまざまな刺激により, 一連の遺伝子群が発現または抑制される初期の過程には特定の転写調節因子が関与している。デコイ療法はこの転写因子をブロックすることで, 活性化される遺伝子群の発現を調節する方法である。転写因子の結合部位を含むオリゴヌクレオチドを合成 2 本鎖核酸(デコイ)とし, ターゲット細胞に導入すると, デコイが転写因子と結合することで DNA 上への転写因子の結合を阻害してプロモーター活性が低下, 本来発現する遺伝子群がコントロールされる^{6,7)}。このデコイ療法は, 細胞周期や炎症などターゲットとなる現象に関与する複数の遺伝子を同時に制御することが可能であり, 一般にアンチセンス法より高い効果を得ることができると考えられている^{8,9)}。

炎症・疾患時に過剰に活性化される転写調節因子 NF κ B は, この機能を抑制することによって炎症性サイトカイン等の種々の疾患・炎症関連物質の発現抑制効果が得られるため, 免疫疾患治療および炎症治療の標的分子として注目されている(図 3)。NF κ B デコイオリゴは, NF κ B が制御している免疫および炎症反応を担うサイトカインや接着分子の転写発現を抑制することによりその作用を発揮し, 炎症性疾患の治療薬としての開発が進むことに期待が

寄せられている⁵⁾。

3. アトピー性皮膚炎

アトピー性皮膚炎は表皮, なかでも角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能異常という皮膚の生理学的異常を伴い, 多彩な非特異的刺激反応および特異的アレルギー反応が関与して生じる, 慢性に経過する炎症と痒疹をその病態とする湿疹・皮膚炎群の一疾患であり, 患者の多くはアトピー素因を持つ。アトピー素因とは, ① 家族歴・既往歴(気管支喘息, アレルギー性鼻炎・結膜炎, アトピー性皮膚炎のうちいずれか, あるいは複数の疾患)があること, または, ② IgE 抗体を産生しやすい素因をさす¹⁰⁾。

臨床症状は, 皮疹の症状(乾燥, 紅斑, 丘疹, 痒疹結節, 鱗屑, 痂皮, 水疱, 膿疱, びらん, 潰瘍, 掻破痕, 色素沈着, 色素脱失など)によって, 個々の皮疹の重症度が分類され, 重症, 中等症, 軽症および軽微に判定される¹¹⁾。

本邦のアトピー性皮膚炎の治療ガイドライン(以下, 本邦ガイドライン)においては, その炎症に対する第一選択としてステロイド外用剤を用いた薬物治療が推奨され, それに準ずる治療薬として, 免疫抑制作用を有するタクロリムス軟膏も推奨されている。その他, 生理学的機能異常に対しては保湿剤外用などのスキンケア, 痒疹に対しては抗ヒスタミン剤, 抗アレルギー剤を補助療法として併用する。一般にアトピー性皮膚炎患者の皮膚病変は, 健康な皮膚と比較して皮膚バリア機能が低下しており, 既存薬にみられる皮膚刺激性や血中移行に伴う副作用を完全に回避することは難しい。

これらのことより, アトピー性皮膚炎の治療現場では, より皮膚刺激性および局所的な副作用が少なく, 全身循環に移行しないか, 移行したとしても安全性の高い薬剤が, 新たな治療薬の選択肢として求められている。

4. NF κ B デコイオリゴのアトピー性皮膚炎治療薬としての開発

ステロイドの抗炎症作用は, I κ B の発現を増強し, NF κ B の活性化を抑制することが作用機序の一

図3 NF κ B デコイオリゴの転写活性抑制作用機序

つとされており、NF κ B デコイオリゴの作用点と重複していると考えられる。

ステロイドは、I κ B への作用以外にも多岐にわたる作用を有し、その多様な作用が副作用発現の一つの要因と考えられる。一方、NF κ B デコイオリゴは、NF κ B への特異的な抑制作用により、その抗炎症作用を発揮することが予測され、安全性においてステロイド外用剤に対する優位性が期待できる。免疫抑制作用を有するタクロリムス軟膏は刺激性があるとされており、また強い免疫抑制作用による有害事象など患者へのリスクを軽減するため、患部表面のみに作用するよう薄く塗布する、治療は短期間とし長期の連用は避けるなど、十分な配慮が必要である¹²⁾。

NF κ B デコイオリゴ軟膏は刺激性もなく、NF κ B の活性化時にのみ作用するという機序から、より安全なアトピー性皮膚炎治療薬として位置づけられる可能性がある。

NF κ B デコイオリゴの有効性

アトピー性皮膚炎を誘発するアレルギー反応としては、I 型(即時型)およびIV型(遅延型)が関与しており、T 細胞、肥満細胞および好酸球等の種々の炎症性細胞の関与するアレルギー反応が複雑に絡み合って発症原因になっていると考えられている¹³⁾。

NF κ B デコイオリゴは、培養細胞を用いた検討で、NF κ B に依存したレポーター遺伝子の転写活性化を抑制することが確認されている¹⁴⁾。動物実験においては、経皮投与により遅延型アレルギー反応を抑制し¹⁵⁾、その効果はストロングクラスのステロイド外用剤と同程度であった。また、遅延型アレルギー反応に伴う好酸球数の増加を抑制することも確認している¹⁶⁾。NF κ B デコイオリゴは、遅延型アレルギー反応の抑制およびそれに伴う好酸球数の抑制を示すことから、アトピー性皮膚炎病態に対する抗炎症作用を有すると考えられる。

過去に、NF κ B デコイオリゴの軟膏製剤を用いた探索的な臨床研究が、弘前大学医学部附属病院で実施されている¹⁷⁾。本臨床研究では、20 歳以上 65 歳未満の重症アトピー性皮膚炎患者 10 例を対象として、2% 軟膏を 1 日 1 回 1 週間連日塗布した後、2 週目は休薬(白色ワセリンのみ)し、3 週目は朝・夕 1 日 2 回連日塗布、4 週目を再び白色ワセリンのみとして臨床効果および安全性の観察が行われた。その結果、局所の刺激性や重篤な全身性の副作用は認められなかったことが報告されている。また、有効性については顔面への投与例 7 例のうち 6 例にて有効性が示されたが、体幹・四肢などの顔面以外の病変では、有効性は得られなかったことが報告されている。

筆者らは、NF κ B デコイオリゴのアトピー性皮膚

炎領域の臨床試験を進めているが、経皮投与による安全性の確認を目的とした第Ⅰ相臨床試験では、約40人の健康人を対象として、皮膚刺激性試験と連続投与試験を実施し、安全性上問題がないことが確認された。その後の第Ⅱ相臨床試験は、顔面に中等症以上の病変を有するアトピー性皮膚炎患者を対象とし、NF κ B デコイオリゴ軟膏の3用量群(低用量群、中用量群、高用量群)とプラセボ群を比較した二重盲検比較試験であった。治験薬は、1日2回、4週間(28日間)にわたり、被験者の顔面の皮疹部位に塗布され、有効性については162症例を、安全性については165症例を対象として評価した。解析の結果、有効性については、主要評価項目である“皮膚症状スコア”において、統計学的な有意差には至らなかったものの、NF κ B デコイオリゴ軟膏の中用量群は、プラセボ群と比較して改善の傾向が認められた。また、副次的評価項目である“皮膚症状スコア”(上記主要評価項目より、プロトコルからの重要な違反例を除いた解析)および、“全般改善度”において、NF κ B デコイオリゴ軟膏の中用量群は、プラセボ群との間に統計学的に有意な差をもって改善がみられた。

一方、安全性については、副作用の発生頻度でプラセボ群と差はみられず、また問題となるような副作用も認められなかった。これらの結果を踏まえ、第Ⅲ相臨床試験においてさらに有効性と安全性を検証すべく準備段階にある。

NF κ B デコイオリゴの安全性

核酸医薬品の安全性評価には、分子構造や作用様式を考慮した対応が必要であり、以下の毒性について留意しなければならない¹⁸⁾。

- ・核酸医薬品の配列に依存し、標的分子に作用することに起因する On-target 効果に基づく毒性
- ・配列に依存し、標的分子外に作用することに起因する Off-target 効果に基づく毒性
- ・配列に依存しない毒性(非特異的蛋白結合等)
- ・修飾型オリゴヌクレオチドの代謝分解物の毒性

米国で上市済み、もしくは開発中の phosphorothioate 型のアンチセンス医薬で報告されている主な副作用は、配列非依存的な毒性によるものである。それらは、phosphorothioate の非特異的蛋白結合、核酸受容体への結合に起因すると考えられており、主な副作用および毒性所見は以下の通りである。これらの現象は、いずれも血漿中濃度もしくは全身曝露量に依存的でかつ可逆性であり、適切な投与方法または投与経路の選択により、回避することが可能である。

(1) 凝固系の遅延

- ・ヒト、サルおよびラットへの静脈内投与時若しくは皮下投与時における、血漿中濃度依存的な凝固系の遅延(APTT 延長)^{19,20)}。

(2) 補体の活性化

- ・ヒトへの静脈内 1.0 mg/kg 以上の投与時(隔日4回投与)における、軽微な C3a の増加²⁰⁾。
- ・サルへの静脈内投与時の 40~50 μ g/mL を超える高い血漿中濃度における、C3a 等の増加¹⁹⁾。

(3) 腎臓肝臓への可逆性の毒性

- ・サルへの皮下 10 mg/kg の投与時(隔日4回投与)における、腎機能異常を伴わない腎近位尿細管の軽度な萎縮性および再生像(3 mg/kg 以下でもしばしば観察される)^{19,21)}。
- ・マウスへの 100 mg/kg 以上の投与時(2週間に3回投与)における、腎近位尿細管の変性(血中尿素窒素・クレアチニンの有意な上昇を伴わない)¹⁹⁾。
- ・サルへの静脈内 50 mg/kg 投与時(4週間隔日投与)における AST の軽度上昇¹⁹⁾。
- ・嚙歯類への 100~150 mg/kg の投与時における、多巣性の肝細胞変性(本現象は用量依存的であるが、20 mg/kg 以下では一般的に肝細胞の変化を伴わない)¹⁹⁾。

NF κ B デコイオリゴの毒性試験において、腎臓の近位尿細管の好塩基性顆粒蓄積・障害性変化、リンパ系臓器・組織でのリンパ球増生、赤血球数・ヘモグロビン値・ヘマトクリット値の減少および APTT の延長などが毒性として認められている。

これらの所見は phosphorothioate 型のアンチセンス医薬品で認められている毒性と同様のものであり¹⁹⁾, NF κ B 転写活性阻害作用に起因したものではないと考えられている。また, いずれも本剤の血中移行に伴う臓器蓄積や血中濃度上昇に起因する毒性と考えられ, ³⁵S 標識した NF κ B のラットへの経皮投与では, 血中移行は観察されていないことから, これらの毒性は NF κ B の外用では観察されないと予測している。

一方で, 配列依存的な, すなわち薬効に起因する毒性も考えられ, 目的分子および目的外分子の発現に対する作用も確認する必要がある。核酸医薬品の配列に依存した毒性評価の場合, 用いる動物種の標的分子にヒトの標的配列と相同な部分配列が存在するとき, On-target 効果に基づく毒性は評価できるが, Off-target 効果に基づく毒性を評価する場合, ヒトに外挿する妥当性に配慮しなければならない。用いる動物種の標的分子内にヒト標的配列と相同な部分配列が存在しない場合, 発現する毒性は Off-target 効果によるものと考えられ, On-target 効果による毒性変化をどのように評価するかが課題となる¹⁸⁾。

核酸医薬品の安全性試験においては, バイオ医薬品や低分子化学合成医薬品とは異なった配慮が必要であり, バイオ医薬品のために策定された ICH-S6 ガイドラインや低分子化学合成品に対するその他の ICH-Safety ガイドラインにおいて確立された試験方法や考え方を, それぞれの核酸医薬品の特徴に合わせて修正しつつ, 実施された安全性試験の結果を解釈していく必要がある。

開発中の NF κ B デコイオリゴ製剤(ワセリン軟膏製剤)の安全性については, これまでに実施した臨床試験において副作用の発生頻度でプラセボ群と差はみられず, また問題となるような副作用も認められていない。核酸医薬品において DDS 製剤を開発していく際には, 安全性における差異についても十分に配慮しなければならず, 多くの場合, DDS 単独の毒性評価も必要と思われる。

NF κ B デコイオリゴの品質

医薬品として製造し販売するためには, その原薬および製剤の品質は保証されなければならない。製造販売承認業者には, 医薬品の品質管理と安全管理の責務が課せられている。開発段階においても, 原薬や治験薬の品質確保は当然要求される。原薬や治験薬の物理化学的性質を分析評価し, 医薬品として求められる品質規格を設定する。設定した品質規格により, 開発期間中に製造される原薬および治験薬の品質管理を行い, 品質の同等性を確保する必要がある。そのために, 品質評価試験方法(分析方法)の確立が必須となる。このことは, どの医薬品にもいえることであるが, 低分子化合物と生物製剤においては, 品質確保についての考え方には違いがあり, 核酸医薬品の品質確保にはその両方の考え方が必要である。低分子化合物と同様に核酸医薬品の原材料は化学合成品であるが, 分子量は Mw5,000~数万と大きい。構成成分が核酸であるために, 物理化学的性質のみならず生物学的性質についても分析評価しなければならない。

また一方で, デコイオリゴの構成成分は核酸であるが, 酵素分解を防ぐために修飾が施されているので, 純粋に生体内物質とはいえず, その点も考慮しなければならない。たとえば, phosphorothioate 修飾の核酸は不斉体であり, それらにより構成されるデコイは単一化合物とはいえない。そのようなデコイオリゴの品質を確保するには, 低分子化合物と生物製剤の両方の課題がつきまとう。核酸医薬品に DDS 技術が施される場合には, その品質の考え方がより複雑になることも念頭に置かねばならない。

デコイオリゴの品質評価におけるガイドライン等の整備は十分な状況ではない。医薬品の品質を保証するために主要な役割を果たす規格および試験方法を対象としたガイドライン ICH-Q6A「新医薬品の規格および試験方法の設定」²²⁾では, オリゴヌクレオチドは対象外とされている。一方で, ICH-Q6B「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)の規格および試験方法の設定」²³⁾は, 『DNA を成分とする医薬品には適用されない』とあり, いまだ, オリゴヌクレオチドを対象とした明

表 4 NFκB デコイオリゴの規格及び試験法

規格項目		試験方法
性 状		目視
確認試験	分子量(1本鎖)	TOF-MS(飛行時間型質量分析法)
	2本鎖	AEX-HPLC(陰イオン交換 HPLC)
	硫 黄	JP/USP(日本薬局方/Pharmacopoeia of the United States of America)
	1本鎖の塩基配列	TOF-MS
純 度	2本鎖純度	AEX-HPLC
	1本鎖純度	AEX-HPLC
	1本鎖純度	CGE(キャピラリー電気泳動法)
ホスホロチオエート		³¹ P-NMR(核磁気共鳴分析法)
水分		JP
ナトリウム		USP/JP
重金属	鉛	ICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)
	鉄	ICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)
	ニッケル	ICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)
残留溶媒	トルエン	USP/JP
	ビリジン	USP/JP
	アセトニトリル	USP/JP
	酢 酸	USP/JP
エンドトキシン		LAL 法(リムルス試験)
生菌数		USP 25/Ph. Eur. 4

確な関連ガイドラインはない。核酸医薬品の発展には、それらのガイドラインの整備も望まれているところである。しかし、原薬および製剤の安全性や有効性を確保するうえで有用な特性に焦点を絞り、原薬および製剤の品質確保のために適切な規格を定めなければならない。

筆者らにより開発中の NFκB デコイオリゴは、20塩基の2本鎖 DNA であり、phosphorothioate 修飾により酵素による分解の影響を軽減させているものであるが、品質評価試験として確認試験、純度試験、不純物等を規定している(表 4)。これらの試験を行い、設定した判定基準を満たしたものを“規格に適合する”とし、各開発段階において品質を適切に評価し保証している。ただし、規格および試験方法は、開発から実際に製造されるまでの間に技術が進歩した場合、適宜、改良されて然るべきものである。

NFκB デコイオリゴの製剤開発および DDS

1. アトピー性皮膚炎を対象とした NFκB デコイオリゴ軟膏新製剤

非臨床薬効試験および臨床試験により、アトピー性皮膚炎症状に対する NFκB デコイオリゴ軟膏製剤の、顔面への有効性が示されたが、体幹・四肢などの顔面以外の病変に対する効果は、残念ながら顔面ほどではない。顔面は、他部位と比較して角質の生理的バリア機能が低いこと、毛包脂腺系がよく発達していること、さらに強い瘙痒に伴う掻爬性びらんのため角層バリアが破綻していたことなどにより、NFκB デコイオリゴの吸収が高まり、有効性が認められたと考えている¹⁷⁾。

皮膚はその発達した角質バリア機能のために、通常、分子量 1,000 以上の分子は容易に通過しないことが知られており、分子量約 14,000 の NFκB デコイオリゴがバリア機能の低下したアトピー性皮膚炎

患者の皮膚で、どの程度吸収されるかが有効性に影響すると考察される。そこで筆者らは、皮膚透過性を高めた製剤についても研究開発中であり、その有効性・安全性および安定性を検証しているところである。

2. 血管再狭窄予防を目的とした PTA バルーンカテーテルへの NF κ B デコイオリゴの応用

現在、血管狭窄に対しインターベンション治療法が広く普及してきており、その一つに PTA (percutaneous transluminal angioplasty: 経皮的血管形成術) バルーンカテーテルにより狭窄部位を拡張し血流を確保する治療法があるが、対象患者の多くが高脂血症や動脈硬化を合併しているため、血管拡張後に高い確率で再狭窄を起し、再度の PTA バルーンカテーテル治療、ステント留置もしくは外科的バイパス術を施行するなどの治療が必要となるケースが多い。

再狭窄の原因としては、動脈硬化の進行に加えて血管内治療による内皮障害やそれに伴う血管内皮細胞の活性化、マクロファージの浸潤など炎症反応が起因となり、中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖および細胞外器質の沈着による新生内膜増生により病態が形成されると考えられている。NF κ B デコイオリゴは、内膜肥厚の病態形成の初期から広範にわたって関与する炎症に関連する遺伝子群の発現を強く抑制するため、障害部位に NF κ B デコイオリゴを暴露することで血管再狭窄を軽減できることが期待されている。

NF κ B デコイオリゴの有用性は、ラット²⁴⁾、ウサギ^{25~27)}、ブタ²⁸⁾、イヌ²⁹⁾の血管障害病態モデルの薬効評価試験において、抗炎症作用に基づく狭窄抑制効果を実証されている。さらに、臨床研究においてステントを用いた冠動脈形成術後の再狭窄予防に NF κ B デコイオリゴを導入し、その抗炎症作用に基づく再狭窄予防の有用性が示されている^{30~32)}。

乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) は、生体適合性・生体内分解性を有し、DDS 製剤、医療機器、機能性化粧品の開発に応用されている。PLGA 自体は生体へ投与されると加水分解や酵素分解を受けて TCA 回路によって水と二酸化炭素へと分解され体

外へ排出される³³⁾。この PLGA をナノ化してそのなかに薬物を担持・封入させ、体内の必要な臓器 (患部) へ送達し、そこで PLGA 自体の加水分解に伴う持続的な薬物放出により治療効果を高めようとする DDS 技術の研究開発が進んでいる。核酸医薬品においては、生体吸収性のキトサン修飾型 PLGA ナノ粒子へ物理化学的な手法により核酸薬剤を封入し、複合体にして投与することで体内および細胞内の動態を制御して治療効果を高めることができると期待されている^{33,34)}。

筆者らは、NF κ B デコイオリゴを封入した PLGA ナノ粒子をカチオン性電着法でバルーン部表面に積層・固定化させた DDS 型医療機器 (NF κ B デコイオリゴ含有 PLGA ナノ粒子塗布型 PTA バルーンカテーテル) を開発することに成功した。バルーン部表面へ積層したカチオン性 PLGA ナノ粒子が、バルーン拡張時に剥がれ、内包された NF κ B デコイオリゴの急性期炎症反応抑制効果により、再狭窄の低減を目指したものである。患者の QOL 改善に加え、医療経済上のメリットも大きく、高い医療ニーズがあると考えており、早期の臨床試験実施に向け開発を進めているところである。

3. DDS による NF κ B デコイオリゴの抗炎症療法の進展

従来、naked デコイオリゴでは、その臨床応用が局所投与で有効な疾患に限られていた。全身投与を可能にするためには、血中安定性、標的臓器・細胞へのデリバリー、生体内安全性などの課題を克服しなければならない。多様な臓器・細胞を標的とする核酸 DDS 技術により全身投与が可能になれば、さまざまな炎症性疾患への適応拡大の可能性が高まる。

NF κ B デコイオリゴの標的細胞に、炎症および罹患時の NF κ B の過剰活性化によりサイトカインを産生するマクロファージや樹状細胞があることから、それらの免疫担当細胞へのターゲティングを利用した DDS が開発されている³⁵⁾。マクロファージや樹状細胞には、比較的厳密な基質認識性を有するマンノースレセプターが存在し、マンノース修飾カチオン性リポソームはその糖鎖認識機構を利用した

細胞選択的ターゲティングシステムである³⁶⁾。マンノース修飾カチオン性リポソームによる DDS を利用した NF κ B デコイオリゴの抗炎症療法は、エンドトキシン誘発性肝障害マウス病態モデルにおいてその効果が検証されている³⁷⁾。このような DDS 製剤開発が実用化されれば、NF κ B デコイオリゴの抗炎症療法が多くの病態に応用できることが期待される。

おわりに

以上、NF κ B デコイオリゴの臨床開発状況についてまとめてみた。本稿執筆以降もその開発は着々と進められている。核酸医薬品そのものであっても、医薬品としての開発には留意すべき点が多いことを本稿で述べたが、その DDS 製剤においては、さらに苦慮すべき点が多くなることも想像に難くない。しかし、DDS なしに核酸医薬品の限界を克服することができないのも事実であり、研究開発に携わる読者においては、多くの課題にも果敢にチャレンジし、それらを克服され、より有効でより安全な核酸医薬品のより早い開発につなげてほしいと願う。

筆者らにおいても、核酸医薬品の開発におけるスタンダードとなるべく、質のよい開発を目指し健闘しているところである。

文 献

- 1) Grillone LR, Lanz R : Fomivirsen. *Drugs Today* 37 : 245-255, 2001.
- 2) Rosina C, Bottoni F, Staurenghi G : Clinical experience with pegaptanib sodium *Clinical Ophthalmology* 2 : 485-488, 2008.
- 3) Chen LF, Greene WC : Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 : 392-401, 2004.
- 4) Pahl, H : Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18 : 6853-6866, 1999.
- 5) De Stefano D, De Rosa G, Carnuccio R : NFkappaB decoy oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 12 : 203-213, 2010.
- 6) Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, Nabel GJ : Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides *Science* 250 : 997-1000, 1990.
- 7) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L et al. : Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8474-8478, 1993.
- 8) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakama M et al. : A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle

- proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5855-5859, 1995.
- 9) Morishita R, Higaki J, Tomita N, Ogihara T : Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res* 82 : 1023-1028, 1998.
- 10) 古江増隆, 古川福実, 秀 道広, 竹原和彦 : 日本皮膚科学会 アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2008 改訂版. *日皮会誌* 118 : 325-342, 2008.
- 11) 古江増隆, 佐伯秀久, 古川福実, 秀 道広, 大槻マミ太郎・他 : 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2004 改訂版. *日皮会誌* 114 : 135-142, 2004.
- 12) 医薬品安全性情報 Vol.4 No.14 <http://www.nihs.go.jp/dig/sireport/weekly4/14060713.pdf> (accessed October 2010).
- 13) Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA : New insight into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113 : 651-657, 2004.
- 14) アンジェス MG 社内資料
- 15) Isomura I, Tsujimura K, Morita A : Antigen-specific peripheral tolerance induced by topical application of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide. *J Invest Dermatol* 126 : 97-104, 2006.
- 16) アンジェス MG 社内資料
- 17) 玉井克人, 森下竜一, 中邨広重, 金田安史, 花田勝美 : アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬導入による新しい治療法. *アレルギー・免疫* 10(3) : 89-96 2003.
- 18) 大谷章雄, 池田孝則, 石川 誠, 大信田系裕, 河合睦文・他 : 核酸医薬品の非臨床安全性評価の課題. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 41 : 158-163, 2010.
- 19) Levin AA : A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489 : 69-84, 1999.
- 20) Glover JM, Leeds JM, Mant TG, Amin D, Kisner DL et al. : Phase I safety and pharmacokinetic profile of an intracellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide (ISIS2302). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 : 1173-1180, 1997.
- 21) Henry SP, Monteith D, Levin AA : Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer : 2. Toxicological properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Anti-cancer Drug Design* 12 : 395-408, 1997.
- 22) Specifications : Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products : Chemical substances Q6A (Step 4 version dated 6 October 1999). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA430.pdf> (accessed October 2010) ; 新医薬品の規格及び試験方法の設定 http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6a_01_5_1.pdf (accessed October 2010).
- 23) Specifications : Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B (Current Step 4 version dated 10 March 1999) <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA432.pdf> (accessed October 2010) ; 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)の規格及び試験方法の設定 http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf (accessed October 2010)
- 24) Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H et al. : Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 21 : 1635-1642, 2001.
- 25) Takeuchi K, Itoh H, Yonemitsu Y, Matsumoto T, Kume M et al. : *In vivo* reduction of the nuclear factor-kappaB activity using synthetic cis-element decoy oligonucleotides suppresses intimal hyperplasia in the injured carotid arteries in rabbits. *Surg Today* 37 : 575-583, 2007.
- 26) Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K et

- al. : Stent-based local delivery of nuclear factor- κ B decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 114 : 2773-2779, 2006.
- 27) Miyake T, Aoki M, Shiraya S, Tanemoto K, Ogihara T et al. : Inhibitory effects of NF κ B decoy oligodeoxynucleotides on neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model. *J Mol Cell Cardiol* 41 : 431-40, 2006.
 - 28) Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, Aoki M, Hashiya N et al. : Inhibition of NF κ B activation using cis-element 'decoy' of NF κ B binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Ther* 10 : 356-364, 2003.
 - 29) Shimizu N, Azuma N, Nishikawa T, Hirata S, Morishita R, et al. Effect on vein graft intimal hyperplasia of nuclear factor- κ B decoy transfection using the second generation of HVJ vector. *J Cardiovasc Surg(Torino)*. 48 : 463-470, 2007.
 - 30) Egashira K, Suzuki J, Ito H, Aoki M, Isobe M et al. : Long-term follow up of initial clinical cases with NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide transfection at the site of coronary stenting. *J Gene Med.* 7 : 805-809, 2008.
 - 31) Suzuki J, Ito H, Gotoh R, Morishita R, Egashira K, et al. Initial clinical cases of the use of a NF- κ B decoy at the site of coronary stenting for the prevention of restenosis. *Circ J* 68 : 270-271, 2004.
 - 32) Suzuki J, Tezuka D, Morishita R, Isobe M. An initial case of suppressed restenosis with nuclear factor- κ B decoy transfection after percutaneous coronary intervention. *J Gene Med* 11 : 89-91, 2009.
 - 33) 辻本広行 : 粉砕 53 : 38-49, 2010.
 - 34) Tsujimoto H, Tsukada Y, Hara K, Kawashima Y : New Particle Design and Its Preparation of NF κ B Decoy Oligodeoxynucleotide (NDON) Loaded PLGA Nanospheres for Gene Delivery. *J. Soc. Powder Technol J apan* 44 : 453-458, 2007.
 - 35) Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M : Development of cell-selective targeting systems of NF κ B decoy for inflammation therapy. *Yakugaku Zasshi* 128 : 209-218, 2008.
 - 36) Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M : Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther* 7 : 292-299, 2000.
 - 37) Higuchi Y, Kawakami S, Oka M, Yabe Y, Yamashita F, et al. : Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/NF κ B decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model. *FEBS Lett* 580 : 3706-3714, 2006.