核酸医薬開発の現状と今後の展望

国立医薬品食品衛生研究所*

井上貴雄*・佐々木澄美*・吉田徳幸*

Current status of development of oligonucleotide therapeutics

Oligonucleotide therapeutics are single- or double-stranded DNA or RNA-based molecules consisting of short strand of nucleotides (generally 10-50 nucleotides). They are manufactured by chemical synthesis and act directly on RNA or protein. In recent years, oligonucleotide therapeutics, such as antisense oligonucleotides (ASOs), siRNAs, miRNAs, aptamers or CpG-motif oligodeoxynucleotides (CpG ODN), are active areas of drug development designed to treat a variety of genetic and/or intractable diseases. So far, eight oligonucleotide therapeutics have achieved marketing authorization in USA or Europe, i.e. fomivirsen (Vitravene[®]), pegaptanib (Macugen[®]), mipomersen (Kynamro[®]), eteplirsen (Exondys 51[®]), nusinersen (Spinraza[®]), inotersen (Tegsedi[®]), patisiran (Onpattro[®]), and hepatitis B vaccine containing CpG ODN (CpG1018) as adjuvants (HEPLISAV-B[®]), and more than 150 oligonucleotide therapeutics are currently in clinical development. In this review, I outline classification, modifications and mechanism of actions of oligonucleotide therapeutics, and introduce the current status of development of RNA-targeted oligonucleotide therapeutics (ASOs, siRNAs and miRNAs).

アンチセンスや siRNA に代表される核酸医薬品は、これまで治療が難しかった遺伝性疾患や難治性疾患に対する新しいモダリティとして注目を集めている。従来の核酸医薬開発では生体内における安定性や有効性に課題があったが、修飾核酸技術や DDS 技術が進展したことで状況は一変しており、局所投与のみならず、全身投与でも高い効果を発揮する候補品が次々と開発されている。本稿では、核酸医薬品の分類、性質、構造、作用機序等の基礎知識を解説し、既承認核酸医薬品を例にあげながら、その開発状況や優位性について議論したい。

Takao Inoue*, Kiyomi Sasaki*, Tokuyuki Yoshida*

Keywords: oligonucleotide therapeutics, nucleic acid, RNA, antisense, siRNA

1. はじめに

本特集で取り上げる「核酸・遺伝子医薬」とは、核酸(DNA、RNA あるいはその化学修飾体)で構成される医薬品を包括的に表す用語である。核酸・遺伝子医薬の“核酸”が指すのは、端的には「タンパク質をコードしない核酸」と考えることができ、比較的短いオリゴ核酸で構成されるアンチセンスや siRNA がその代表例である。一方、核酸・遺伝子医薬の“遺伝子”は、「タンパク質をコードする核酸」

であり、プラスミドベクター、ウイルスベクターあるいは mRNA で構成されるものがこれに相当する。現在、製薬業界では新たな創薬標的の発掘が課題となっているが、核酸・遺伝子医薬はタンパク質を標的とする従来の医薬品とは異なり、その上流の DNA あるいは RNA のレベルで生体を制御できる点が大きな特色であり(図1)、原理的にはすべての分子が創薬対象となりうる。核酸・遺伝子医薬はこの数年で急速に実用化が進んでいることから注目を集めており、アンメットメディカルニーズの高い遺伝性疾患や難治性疾患を治療しうる次世代の創薬モダリティとして期待されている。

* National Institute of Health Sciences

図1 核酸医薬品の作用点

核酸・遺伝子医薬のDDS開発では、多くの場合、核酸・遺伝子医薬に共通の性質、例えば親水性の高いポリアニオンという特徴を踏まえたストラテジーで研究が進められている¹⁾。送達する核酸の種類(siRNA、プラスミドベクター等)に応じて最適化が行われるものの、“核酸”であっても“遺伝子”であっても性質がよく似た核酸関連物質という意味で同類であり、少なくとも基礎研究においては核酸・遺伝子医薬を1つのカテゴリーとして扱うことが多い。これを規制(品質評価あるいは安全性評価)の観点から見ると、同じ核酸・遺伝子医薬の範疇にあっても、どの核酸を送達するかでその考え方は大きく変わってくる。具体的には、①化学合成されるのか、細胞を用いて生物学的に製造されるのか、②オリゴ核酸がそのまま作用するのか、遺伝子発現を介して作用するのか、③修飾核酸を含むのか、含まないのか、などが品質・安全性評価を考える上でのポイントとなる。DDSについても、④脂質ナノ粒子や高分子ミセルを使うのか、ウイルスを用いるのか、あるいは、オリゴ核酸にリガンド等を直接結合するのか、などによって考慮事項が変わってくる。したがって、核酸・遺伝子医薬の実用化を念頭におく場合には、どのような構造/作用機序の核酸を医薬品にするかを、規制の観点を含めて分類・整理しておくことが望まれる。

上にあげた①、②、③の観点に基づいて核酸・遺伝子医薬を分類すると、“核酸”に相当する核酸医薬品と“遺伝子”に相当する遺伝子治療薬(遺伝子治療用製品)に大別することができる(表1)。すなわち、「(修飾)核酸が十～数十塩基程度連結したオリゴ核酸で構成され、遺伝子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」が核酸医薬品であり、これとは対照的に、「天然型核

表1 核酸医薬品と遺伝子治療用製品の比較

項 目	核酸医薬品	遺伝子治療用製品
本 体	オリゴ核酸	プラスミドベクター または ウイルスベクター (DNAまたはRNAゲノム をもつウイルス粒子)
塩基長	10～50塩基程度 (修飾核酸)	数千塩基以上 (天然型核酸)
製 造	化学合成	生物学的製造
作用機序	オリゴ核酸が直接作用	遺伝子発現を介して作用

酸が数千塩基以上連結した遺伝子で構成され、遺伝子発現を介して生体に作用するもので、生物学的に製造される製品」が遺伝子治療薬である(表1)。核酸医薬品の中でもアンチセンスや siRNA は、広義では遺伝子と捉えることのできる RNA に作用するため、ときに「核酸医薬品を用いた遺伝子治療」などと表現されるが、規制の観点では核酸医薬品と遺伝子治療薬は明確に区別され、核酸医薬品を用いた治療は遺伝子治療の範疇には含まれない。mRNA を用いた医療は遺伝子発現を介して作用するという点で遺伝子治療に近いが、一般には試験管内で酵素的に(すなわち非生物学的に)製造され、しばしば化学修飾されることから、核酸医薬的な要素も含まれる。mRNA はがん治療用ワクチンあるいは感染症予防ワクチンとしての開発も活発に行われているが、この場合はそれぞれのワクチンとしての規制の考え方を考慮する必要がある。

以上、核酸・遺伝子医薬を規制の観点から考察したが、本稿では「核酸医薬品」のサブグループに焦点をあて、その分類、性質ならびに開発動向を紹介したい。

2. 核酸医薬品の分類

核酸医薬品を構成するオリゴ核酸は、生体に備わった機構をうまく活用することで多彩な機能を生み出す²⁾。これにより、核酸医薬品には作用機序の異なる多様なモダリティが含まれることとなり、臨床開発が行われているものに限定しても、アンチセンス、siRNAs、miRNA、デコイ、アプタマー、CpG オリゴ(CpG oligodeoxynucleotides)の少なく

表2 核酸医薬品の分類

	アンチセンス	siRNA	miRNA	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構 造	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
塩基長	13~30	20程度	20程度	20程度	26~45	20程度
標 的	mRNA pre-mRNA miRNA	mRNA	mRNA	タンパク質 (転写因子)	タンパク質 (細胞外 or 細胞表層)	タンパク質 (TLR9)
作用部位	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞外	細胞外 (エンドソーム内)

表3 これまでに上市された核酸医薬品(2019年1月現在)

商品名	一般名	分 類	塩基長 (DDS等)	化学修飾	承認国/年	標 的	適 応	投 与
Vitravene [®]	fomivirsen	アンチセンス	21	S化	US 1998 EU 1999	CMV IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	硝子体内
Macugen [®]	pegaptanib	アプタマー	28 (PEG)	2'-F 2'-OMe	US 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF165 (タンパク質)	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro [®]	mipomersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2013	ApoB-100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51 [®]	eteplirsen	アンチセンス (SSO)	30	モルフォリノ 核酸	US 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza [®]	nusinersen	アンチセンス (SSO)	18	S化 2'-MOE	US 2016 EU 2017 JP 2017	SMN 2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
注HEPLISAV-B [®]	CpG1018	CpGオリゴ	22	S化	US 2017	TLR9 (タンパク質)	B型肝炎 (予防)	筋肉内
Tegsedi [®]	inotersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpatro [®]	patisiran	siRNA	21 (LNP)	2'-OMe	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	静脈内

注：HEPLISAV-B[®] はB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg protein)とアジュバントとして添加されたCpGオリゴ(CpG1018)の合剤であるが、オリゴ核酸で構成される「CpG1018」を核酸医薬品とみなして本表に組み込んだ。

表4 RNA を標的とする核酸医薬品の分類

分 類	アンチセンス			siRNA	miRNA
	RNA分解型 (Gapmer)	スプライシング制御型 (SSO)	miRNA 阻害型		
標 的	pre-mRNA mRNA (lncRNA)	pre-mRNA	miRNA	mRNA (lncRNA)	mRNA
作用部位	核内	核内	細胞質	細胞質	細胞質
原 理	RNase H	立体障害	立体障害	Argonaute (RISC)	Argonaute (RISC)
作用機構	RNA分解	pre-mRNAと スプライシング因子 の結合阻害	miRNAと mRNA の結合阻害	RNA分解	翻訳阻害

とも6種類が存在する(表2)。このうち、実用化されているものはアンチセンス、siRNAs、アプタマー、CpGオリゴの4種類である(表3)。オリゴ核酸の多彩な機能の根底にある基本原理は大きく分けて2つあり、1つはRNAとの相補的な結合、もう1つはタンパク質との結合である(図1、表2：標的)。

RNAと相補的に結合して機能する核酸医薬品としては、アンチセンス、siRNAs、miRNAの3種類がある(表4)。アンチセンス医薬品はpre-mRNA、mRNAあるいはmiRNAを標的とするものが臨床開発されており、その作用機序

はRNA分解、スプライシング制御、miRNA阻害に分類することができる。RNA分解型アンチセンスは核内に存在するRNase Hと協調的に機能するため、核内に存在するRNAを分解すると考えられ

ている。スプライシング制御型アンチセンスならびに miRNA 阻害型アンチセンスについては、RNA と RNA 結合分子の結合を立体的に阻害することで機能する。siRNA 医薬は RISC 複合体に含まれる Argonaute を介して標的 RNA を切断する(表4)。RISC 複合体は細胞質に存在するため、siRNA の標的は細胞質に存在する RNA に限定され、mRNA が主な標的である。miRNA は生体に内在的に存在する非コード RNA であるが、病態において低下した miRNA を化学合成した miRNA で補うというコンセプトで、miRNA 医薬の開発が行われている(表4)。以上に述べた RNA を標的とする核酸医薬品は、疾患の原因となるタンパク質を減少させることが可能であり、RNA 分解型アンチセンスならびに siRNA は特定の標的分子を減少させ、一方で、miRNA は複数の標的分子を同時に減少させることができる(7-2を参照)。また、スプライシング制御型アンチセンスならびに miRNA 阻害型アンチセンスについては、機能的なタンパク質を増加させることが可能である(6-2、6-3を参照)。このような機序を生かした医療は従来の低分子医薬品や抗体医薬品では難しかった治療戦略であり、アンメットメディカルニーズに対応しうるとされる所以である。

タンパク質に結合して機能する核酸医薬品としては、抗体医薬品と同様の機序で作用するアプタマーが知られており、細胞外あるいは細胞表層タンパク質と結合してその機能を阻害するものが臨床開発されている(表2)。デコイは転写因子が結合するプロモーター領域と同じ配列を有する2本鎖DNAであり、細胞内で転写因子と結合して転写を阻害する(表2)。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作用を有する(表2)。CpG オリゴはエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれた後、エンドソーム内で TLR9 に作用するが、細胞膜は通過しない。したがって、膜との配向性を考えると細胞の外で機能していると考えることができる。

3. 核酸医薬品の性質

核酸の分子量は310~330程度であるた

め、10~30塩基長の核酸医薬品の分子量は3,000~10,000程度となる。すでに上市されたアンチセンス医薬品(表3)を例にとると、fomivirsen(商品名 Vitravene[®]、21塩基長、 $C_{204}H_{243}N_{63}Na_{20}O_{114}P_{20}S_{20}$)、mipomersen(商品名 Kynamro[®]、20塩基長、 $C_{230}H_{305}N_{67}Na_{19}O_{122}P_{19}S_{19}$)、eteplirsen(商品名 Exondys 51[®]、30塩基長、 $C_{364}H_{569}N_{177}O_{122}P_{30}$)、nusinersen(商品名 Spinraza[®]、18塩基長、 $C_{234}H_{323}N_{61}Na_{17}O_{128}P_{17}S_{17}$)、inotersen(商品名 Tegsedi[®]、20塩基長、 $C_{230}H_{299}N_{69}Na_{19}O_{121}P_{19}S_{19}$)の分子量はそれぞれ、7,122、7,595、10,306、7,501、7,601である。siRNA は一般に20塩基程度の2本鎖であることから分子量も約2倍となり、13,000程度である。アプタマーは三次元的にタンパク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。既承認のアプタマー医薬品 pegaptanib(商品名 Macugen[®]、28塩基長)も PEG 化されており、分子量は50,000程度である。低分子医薬品は一般に分子量が500以下、抗体医薬品は15万であることから、核酸医薬品はタンパク質間相互作用を阻害する特殊ペプチド医薬等とともに「中分子医薬」とも称される。

以上のように、核酸医薬品は低分子医薬品よりはるかに大きい化合物であり、また、負電荷をも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ことから、疎水性の細胞膜を透過しにくいという特徴がある。上述の核酸医薬品の分類の中で、細胞の内側で機能するアンチセンス、siRNA、miRNA、デコイに関しては(表2)、オリゴ核酸が細胞膜を通過して細胞内に到達しなければならない。さらに、核内で機能するアンチセンス(表4：RNA 分解型、スプライシング制御型)は核膜を通過する必要がある。オリゴ核酸の細胞内移行に関わる分子機構については不明な点が多いが、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腔に移行した後、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

図2 修飾核酸の配置とアンチセンス医薬品の作用機序

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に移行する必要がある。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、エンドソーム膜を通過できるオリゴ核酸の割合は限定的と考えられている。この問題を克服するため、細胞内で機能する核酸医薬品については、①オリゴ核酸を構成する核酸の化学修飾、②オリゴ核酸の末端の修飾(脂質、糖などのコンジュゲート)、③送達キャリア(脂質ナノ粒子、ポリプレックス、高分子ミセル等)の活用など、膜あるいは膜タンパク質との親和性を高める工夫が施されている。①の例としては、リン酸部のO(酸素原子)をS(硫黄原子)に置換したホスホロチオエート修飾(S化)が知られている(図2 A矢印)。S化されたオリゴ核酸(Sオリゴと呼ばれる)はタンパク質との親和性が向上し、脂溶性も増すことから、細胞膜へのアンカリングならびに膜透過性が亢進すると考えられる。また、S化はヌクレアーゼ耐性の獲得に大きく寄与しており、これらの相乗効果により、Sオリゴはキャリアなしでも細胞内に到達する(ただし、送達効率は限定的である)。②および③

はDDS技術に相当するが、その具体例は本稿の「7. siRNA 医薬品および miRNA 医薬品の開発例」で紹介する。

S化をはじめとする修飾核酸技術の進展により、核酸医薬品の安定性ならびに有効性は飛躍的に向上しており、現在では皮下注や静注が可能な全身投与性の核酸医薬品が実用化されている(表3)。全身投与されたオリゴ核酸の体内分布については、各組織の毛細血管の内皮の状態に依存するとされる。すなわち、内皮に比較的大きな間隙のある肝臓、腎臓、脾臓、骨髄などの組織に移行しやすいことが知られている。オリゴ核酸の体内動態の詳細については、本特集を企画された西川元也先生の総説でわかりやすく解説されている³⁾。

4. 核酸医薬品に用いられる修飾核酸

核酸医薬品は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ことから、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、2008年までに承認され

リン酸部の修飾としては、上述のようにS化がよく知られている(図2A)。既承認のアンチセンス医

糖部の修飾としては、2'位の修飾と架橋型修飾があげられる(図2 A、図3 A)。2'位の修飾は核酸医薬開発の初期から試みられており、2'-F(図3 A)、2'-O-Methyl(2'-OMe)(図3 A)、2'-O-Methoxyethyl(2'-MOE)(図2 A)などが知られている。すでに上市された核酸医薬品(表3)を例にとると、pegaptanibではピリミジン塩基をもつ核酸(シトシン、ウラシル)の糖部が2'-F化されており、プリン塩基をもつ核酸(アデニン、グアニン)は2'-OMeが施されてい

る。mipomersen ならびに inotersen については、S 化に加えて、オリゴ核酸の両端に位置する核酸糖部に 2'-MOE が導入されている。また、nusinersen はすべての核酸が 2'-MOE 化された S オリゴである。架橋型修飾は、「揺らぎのある糖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ある。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、糖部 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ともに、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。糖部架橋型人工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(図2A)⁴⁾。架橋型核酸としては、他に ENA、AmNA、GuNA、scpBNA などが開発されている^{5,6)}。糖部修飾ではないが、糖部をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体(モルフォリノ核酸)も核酸医薬品の原料として用いられている。モルフォリノ核酸で構成されるモルフォリノアンチセンス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り、開発例としては eteplirsen があげられる(表3)。

5. 核酸医薬品の開発動向

2019年1月現在、米国あるいは欧州で上市された核酸医薬品はアンチセンス医薬5品目(fomivirsen、mipomersen、eteplirsen、nusinersen、inotersen)、siRNA 医薬1品目[patisiran(商品名 Onpattro[®])]、アプタマー医薬1品(pegaptanib)であり、CpG オリゴ(CpG1018)をアジュバントとして含有する B 型肝炎ワクチン(商品名 HEPLISAV-B[®])を含めると、合計8品目となる(表3)。これとは別に、豚の腸に由来するオリゴ核酸 defibrotide(商品名 Defitelio[®])が肝中心静脈閉塞症に対する医薬品として欧州ならびに米国で承認されているが⁷⁾、本稿における核酸医薬品の定義から外れる(生体から抽出されたもの

であり、化学合成品ではない)ため、ここでは除外する。2015年の特許庁等の調査によると、臨床試験段階にある核酸医薬品は2015年10月時点で140程度であり、その約半分がアンチセンス、約3分の1が siRNA に分類される^{8,9)}。対象疾患としては、遺伝性疾患あるいは難治性疾患が先行しており、アンメットメディカルニーズに対する核酸医薬品をまず実用化することにより、市場が拡大していくと考えられる。

筆者(井上)は本誌2016年1月号(第31巻1号)に「核酸医薬品開発の現状」と題した総説を寄稿しているが¹⁰⁾、当時の既承認の核酸医薬品は fomivirsen、pegaptanib、mipomersen の3つであり、2016年以降の3年間で新たに5つの核酸医薬品が承認されたことになる(表3)。この期間の特筆すべき点としては、①mipomersen に続き、全身投与性(皮下注、静注)の核酸医薬品の実用化が進んだこと(eteplirsen、inotersen、patisiran)、②特にアンチセンス医薬品の実用化が顕著であること(eteplirsen、nusinersen、inotersen)、③世界初の siRNA 医薬品が誕生し、送達キャリアを有する核酸医薬品としても初めての承認例となったこと(patisiran: 脂質ナノ粒子-siRNA)、④ワクチンのアジュバントとして、CpG オリゴが初めて実用化されたこと(CpG1018含有B型肝炎ワクチン)、⑤遺伝性疾患の中でも特に神経性疾患に対する核酸医薬品が複数上市されていること(nusinersen、inotersen、patisiran)、などがあげられる。日本で承認されている核酸医薬品は pegaptanib と nusinersen の2品目である(表3)。国内のトピックスとしては、⑥日本初のアンチセンス医薬品として nusinersen が承認され、劇的な治療効果が注目を集めていること、⑦国内での臨床開発数も大きく増加していること(表5)、⑧国内で開発された核酸医薬品が初めて承認申請されること(表5、viltolarsen 2018年度中に申請予定)などがあげられる。以降では、本誌DDSの読者の関心が高いと考えられる細胞内送達を要する核酸医薬品(アンチセンス、siRNA、miRNA)にフォーカスし、既承認医薬品を中心にその概要を解説したい。アプタマー医薬品ならびに CpG オリゴの最新の開発状況に関しては、

表5 国内における核酸医薬品の開発状況(臨床試験段階)

開発品名	分類(DDS等)	標 的	適 応	ステージ	開発企業
viltolarsen	アンチセンス	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	承認申請準備中	日本新薬
DS-5141b	アンチセンス	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Phase1/2	第一三共
ND-L02-s0201	siRNA (リポソーム)	HSP47 mRNA	肝硬変・NASH	Phase2	日東電工 ブリストル・マイヤーズ スクイブ
STMN-01	siRNA	CHST15 mRNA	潰瘍性大腸炎	Phase2	田辺三菱製薬 (ステリック)
RBM-007	アプタマー	FGF2	加齢黄斑変性症	Phase1/2a	リボミック
AMG0101	デコイ	NF- κ B	椎間板性腰痛症	Phase1/2	アンジェス
TDM-812	siRNA (A6K)	RibophorinII (RPN2) mRNA	乳がん	Phase1	国立がん研究センター スリー・ディー・マトリックス
BK-SE36	CpGオリゴ	TLR9	マラリア(予防)	Phase1	大阪大学 ノーベル
TRK-250 /BNC-1021	siRNA	TGF- β 1 mRNA	特発性肺線維症	Phase1	東レ ボナック
NJA-730	siRNA (SPG)	CD-40 mRNA	造血幹細胞移植治療後の急性GvHD	Phase1	NapaJen Pharma
WVE-120101	アンチセンス	mHTT mRNA SNP1	ハンチントン病	Phase1	WAVE 武田薬品工業
WVE-120102	アンチセンス	mHTT mRNA SNP2	ハンチントン病	Phase1	WAVE 武田薬品工業

文献11、12を参照していただきたい。

6. アンチセンス医薬品の開発例

アンチセンス医薬品は標的RNAと相補的に2本鎖を形成する1本鎖オリゴ核酸を薬効本体とする。上述のように、現在開発されているアンチセンス医薬品の多くはSオリゴであり、これをベースにさらに核酸の糖部にも修飾が施されている(図2)。糖部2'位を修飾した核酸(図2A：淡灰丸)をオリゴ核酸に導入すると相補鎖との結合力が強くなるが、これを架橋型核酸(図2A：濃灰丸)に置き換えるとその結合力が著しく向上する。RNA分解型、スプライシング制御型、miRNA阻害型(表4)といったアンチセンス医薬品の作用機序の違いは、これら修飾核酸のオリゴ核酸における配置と深く関連する。

6-1. RNA分解型アンチセンス

RNA分解型アンチセンスでは、オリゴ核酸の両端(Wing領域)にRNAとの結合力が強い糖部修飾核酸が配置され、中央のGap領域には糖部2'位が修飾されていないDNAが用いられる(図2B左)。こ

のアンチセンスが標的RNAと結合すると、「DNA/RNA二重鎖を認識してRNA鎖を切断するエンドヌクレアーゼ」であるRNase HがGap領域に生じたDNA/RNA二重鎖にリクルートされ、標的RNAを切断する。このようにRNA分解型アンチセンスはGap領域を有することから、一般に「Gapmer」と呼ばれる。アンチセンス創薬のリーディングカンパニーであるIONIS社が開発したmipomersenならびにinotersenは、Wing領域に2'-MOEが5塩基ずつ導入された5+10+5(=20塩基長)のGapmerである。Wing領域に2'-MOEより結合力の強い架橋型核酸を用いた場合、塩基長が短くてもアンチセンスと標的RNAの結合力は維持されと考えられる(図2B左の概念図：(1)と(2)の比較)。例えば、Isarna社が開発するアンチセンス医薬品(ISTH0036、14塩基長、Phase1)においては、Wing領域に2',4'-BNA/LNAが3塩基ずつ導入されており、3+8+3のGapmerでデザインされている。なお、RNase Hは生体内で普遍的に発現しているため、Gapmerの標的となる組織/細胞は制限されない。

6-2. スプライシング制御型アンチセンス

スプライシング制御型アンチセンスは、スプライシング因子の pre-mRNA への結合を阻害するアンチセンスである(図2 B 右)。代表例として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬が知られており、エクソンスキップの機序によって作用する(図4)。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では、79のエクソンから構成されるジストロフィン遺伝子がエクソン単位で欠失する症例が多く、この結果、筋細胞の維持に必須であるジストロフィンが生成しない。図4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、「C末側が欠失したジストロフィン」が生じ、速やかに分解される。この状況において、エクソン51と相補的に結合するアンチセンスを導入すると、スプライシングを促進するタンパク質と pre-mRNA の結合が阻害され、エクソン51がスプライスアウト(すなわち“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」は読み枠が合い、「エクソン50、51に

コードされるアミノ酸が欠失した短いジストロフィン」が生成する。ジストロフィンは N 末と C 末のモチーフが機能発現に必須であるが、繰り返しモチーフである中央部は多少抜けても機能が保持されるため、筋機能が回復する。スプライシング制御型アンチセンスとしては、図5に示した機序で機能する eteplirsen が米国で迅速承認(accelerated approval)されている(表3)。

以上のように、スプライシング制御型アンチセンスはスプライシングを変化させることにより、機能的なタンパク質を新たに発現させて病態を改善する。したがって、「pre-mRNA を切断することなく、pre-mRNA に結合する」ことが重要であり、構造としては Gap 領域が生じないように糖部修飾核酸が配置される(図2 B 右)。第一三共は上記と同じエクソンスキップの機序で作用するアンチセンス医薬品として、ジストロフィン遺伝子のエクソン45を標的とした DS-5141 b(18塩基長)を開発している。DS-5141 b は上述の架橋型核酸 ENA と糖部2位を修飾した 2'-OMe が“Mix”された Mixmer の構造を有しており(図2 B(4)の概念図)、国内におい

図4 スプライシング制御型アンチセンスの作用機序の例：エクソンスキップ療法

図5 スプライシング制御型アンチセンスの作用機序の例：エクソンインクルージョン療法

て Phase 1/2 試験が継続されている。国内においてはもう1つ、日本新薬がエクソン53を標的としたモルフォリノアンチセンス医薬品 viltolarsen を開発している。2018年6月に発表された臨床試験の結果は良好であり、2018年度内に日米での承認申請が計画されている(表5)。同社はエクソン53以外に、エクソン44、45、50、51などを対象としたアンチセンス医薬品の開発にも着手しており、エクソン44については2019年度の早期に臨床試験を開始する方針を発表している。

スプライシング因子にはスプライシングを促進する分子と抑制する分子が存在する。スプライシングを促進する分子をアンチセンスでブロックすると前述の「エクソンスkip」が起こるが、スプライシングを抑制する分子をブロックするとスプライスアウトされていたエクソンが mRNA に組み込まれる「エクソンインクルージョン」が起こる。脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy : SMA)の

治療薬として承認された nusinersen は、エクソンインクルージョンの機序で作用するスプライシング制御型アンチセンスである。nusinersen は前述の 2'-MOE Gapmer (mipomersen、inotersen) と同じく IONIS 社が開発した18塩基長のアンチセンスであり、nusinersen では Gap 領域が生じないようにすべての核酸に 2'-MOE が導入されている(図2 B(3)の概念図)。以下に nusinersen が適用される疾患とその作用機序について解説する。

SMN1(survival of motor neuron 1)は神経細胞の核に存在するアポトーシス抑制タンパク質と考えられており、SMN1をコードする SMN1 遺伝子のホモ欠損は重度の脊髄性筋萎縮症(運動ニューロン疾患)を引き起こす。ヒトには SMN1 遺伝子に隣接し、SMN1 遺伝子と配列がほとんど同一である SMN2 遺伝子のコピー (SMN2 遺伝子) が存在する(図5)。SMN1 遺伝子に由来する mRNA は「Exon1+2+3+4+5+6+7+8」のエクソン構造

を有しており、エクソン7がmRNAに含まれている。一方、*SMN2*遺伝子はエクソン7上の塩基配列の違い(C→T)からSMN1とはスプライシング様式が異なっており、通常はエクソン7が含まれないmRNA「Exon1+2+3+4+5+6+8」が優先的に生成する。この「エクソン7が含まれないmRNA」ではフレームシフトが起こるため、mRNAあるいはタンパク質のレベルで不安定であり、通常は機能しない(すなわち、*SMN2*遺伝子は通常は偽遺伝子と考えてよい)(図5上段)。*SMN1*遺伝子の機能欠失型変異をホモで有する患者では、*SMN2*遺伝子に加えて*SMN1*遺伝子も機能しないために、脊髄性筋萎縮症を発症する(図5中段)。nusinersenは*SMN1*ホモ欠損患者において、*SMN1*遺伝子ではなく、*SMN2*遺伝子の機能を回復させることを意図したアンチセンスである。nusinersenは*SMN2* pre-mRNAのエクソン7に近接するイントロンに相補結合するように設計されており、これにより「エクソン7のスプライシングインを抑制する因子」がpre-mRNAに結合するのを阻害する。この原理から、nusinersenの投与により*SMN2* mRNAにエクソン7を組み込むことが可能となり(=エクソンインクルージョン)、その結果、SMN1欠損を補完する機能的なSMN2タンパク質を発現させることができる(図5下段)。nusinersenについては、その高い有効性と脊髄性筋萎縮症の乳幼児がおかれた厳しい現実を念頭に比較的早い判断がなされ、2016年12月の米国を皮切りに、欧州、日本においても短期間のうちに承認がなされた(表3)。日本においてはアプタマー医薬品pegaptanibに続く2番目の核酸医薬品であり、アンチセンスとしては初の承認例となる。

6-3. miRNA阻害型アンチセンス

非コードRNAの1つであるmiRNAは20数塩基の1本鎖RNAで、標的mRNAの3'非翻訳領域に結合することでmRNAの翻訳を阻害する。miRNAの機能発現に関与する分子機構はsiRNAの分子機構と重複している。すなわち、ゲノムDNAから転写されたpri-miRNAが2段階の切断を受けて生成する2本鎖RNAは、人工的に合成・導入される

siRNAと相同であり、以降は共通の分子基盤を介して作用する。pri-miRNAから生じた2本鎖RNAはsiRNAと同様にRISC複合体に取り込まれた後、相補鎖であるパッセンジャー鎖が除かれて、1本鎖ガイド鎖(=miRNA)がRISC複合体に残る。この複合体がmiRNAと相補的なmRNAを認識し、主にmRNAの翻訳抑制を引き起こす(表4)。miRNAと標的mRNAの結合部位にはミスマッチなどの不適合性が許容されることが知られており、これにより1つのmiRNAが多くの標的mRNAの発現を調節できると考えられている。

miRNA阻害型アンチセンスは標的となるmiRNAと相補的に結合するように設計されており、miRNAとmRNAとの結合を立体障害により阻害する(表4)¹³⁾。miRNAは標的mRNAの翻訳を抑制するため、miRNA阻害型アンチセンスの導入により、miRNAの標的分子の発現を上昇させることができる。miRNA阻害型アンチセンスの中で臨床試験が進んでいるものは、miR-17標的(RGLS4326、Regulus社、常染色体優性多発性嚢胞腎、第1相)、miR-155標的(cobomarsen、miRagen社、皮膚T細胞リンパ腫、第1相)、miR-92a標的(MRG-110、miRagen社、慢性虚血性心疾患、第1相)などがある。

7. siRNA医薬品およびmiRNA医薬品の開発例

上述のように、siRNAおよびmiRNAはともにRISC複合体とともに標的mRNAと結合することで機能し、前者はmRNA分解、後者は主に翻訳阻害の機序で作用する(表4)。

7-1. siRNA医薬品

RNAiは1998年に線虫*C.elegans*を用いた研究から発見され¹⁴⁾、その後、合成した21塩基長の2本鎖RNA(すなわちsiRNA)がヒト細胞において発現抑制を引き起こすことが示されると¹⁵⁾、核酸医薬品としての早期実用化への期待が高まった。実際には、免疫反応やデリバリー等の問題から長らく苦難の道が続いたが、発見から20年の時を経た2018年8月に、世界初のsiRNA医薬品patisiranが誕生した

(表3、図3)。

2本鎖RNAで構成される siRNA は1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、膜透過性はさらに低下する。また、RISCに認識される必要があるため、アンチセンスに比べるとS化等の修飾核酸を導入しにくい。したがって、一般には細胞内導入あるいはヌクレアーゼ回避のために送達キャリアが必要と考えられている。実際、patisiran は脂質ナノ粒子(LNP: lipid nanoparticle)に包含された siRNA 医薬品であり(図3B: 脂質ナノ粒子)、静脈内投与により肝臓に到達した後、遺伝性異型トランスサイレチン(ATTR)アミロイドーシスの原因となる変異トランスサイレチン(TTR)の mRNA を切断する。TTR は主に肝臓で発現し、血中に分泌されて機能するタンパク質であるが、TTR 遺伝子に特定の変異を有する病態においては、変異 TTR タンパク質が繊維状に凝集したアミロイドを生じ、全身の臓器に沈着する。この結果、末梢神経障害、自律神経障害、心筋症等を発症する。日本においては、熊本県、長野県ならびに石川県に ATTR アミロイドーシスの集積地があり、国内でもアンメットメディカルニーズが高い。patisiran は2018年9月に日本でも承認申請がなされており、希少疾病用医薬品の枠で優先的に審査されるため、2019年6月末には概要が判明すると推定される。

上述のように、2本鎖の siRNA には基本的には送達キャリアが必須と考えられてきたが、patisiran を開発した siRNA 医薬開発のリーディングカンパニー Alnylam 社は、その後、送達キャリアを用いない「GalNAc-conjugated siRNA」と呼ばれる siRNA 医薬の開発に注力している(図3B: コンジュゲート)。GalNAc-conjugated siRNA では2本の RNA 鎖のうち、薬効に直接関与しないセンス鎖の3'末端に糖鎖の一種である GalNAc(N-アセチルガラクトサミン)が付加されている。送達キャリアを用いない核酸医薬品の場合、オリゴ核酸自体にヌクレアーゼ耐性を付与することが必須となるが、GalNAc-conjugated siRNA では RISC 形成に影響を与えない範囲で、可能な限り、

糖部修飾核酸が導入されており、また、オリゴ核酸の末端が部分的にS化されている(図3B: コンジュゲート)。GalNAc は肝実質細胞の細胞表面に特異的に発現するアシアロ糖タンパク質受容体と強く結合し、エンドサイトーシスされるが、この受容体はエンドサイトーシスとエキソサイトーシスのリサイクリングが活発に行われるため、siRNA が効率よく肝実質細胞に集積/機能する。GalNAc-conjugated siRNA はすでに5品目が臨床試験後期の段階にあるが、これらの候補品には givosiran(急性肝性ポルフィリン症治療薬)、fitusiran(血友病治療薬)、inclisiran(高コレステロール血症治療薬)、lumasiran(原発性高シュウ酸尿症1型治療薬)のほか、上記の TTR 遺伝子を標的とした vutrisiran も含まれる。LNP-siRNA の patisiran は静注(点滴)で投与する必要があるが、GalNAc-conjugated siRNA の vutrisiran は皮下投与(注射)が可能である。

なお、上述の RNA 分解型アンチセンス inotersen も同じ TTR 遺伝子を標的とする医薬品であり、皮下投与の注射剤である(表3)。siRNA と RNA 分解型アンチセンスの作用機序は異なるが、TTR RNA を分解するという意味で同じであり、これらの医薬品は互いに競合品に相当する。すでに上市されている patisiran(LNP-siRNA)と inotersen(アンチセンス)の第3相試験の比較を表6に示した。有効性の観点では patisiran(LNP-siRNA)の方が優れているが、臨床現場での利便性という意味では注射剤の inotersen(アンチセンス)が優位といわれている。Alnylam 社の GalNAc-conjugated siRNA への転換は、複雑な製剤である LNP-siRNA よりも品質管理

表6 inotersen と patisiran の臨床試験結果の比較

項目	inotersen	patisiran
分類	アンチセンス	siRNA
構造	1本鎖、20塩基長	2本鎖、21塩基長
DDS	なし	脂質ナノ粒子
投与ルート	皮下(注射)	静脈内(点滴)
投与量	284mg	0.3mg/kg (18mg/60kg)
投与頻度	1週間に1回	3週間に1回
評価の時期	66週目	18カ月目(約78週目)
mNIS+7(治療効果)	19.7ポイントの改善	34.0ポイントの改善
QOL-DN(治療効果)	11.7ポイントの改善	21.1ポイントの改善

参考文献: *N. Engl. J. Med.*, 379, 11-21 (2018)、*N. Engl. J. Med.*, 379, 22-31 (2018)

が容易であるという利点に加えて、点滴薬を注射剤に切り替えることができるというメリットがある。GalNAc-conjugated siRNA の成功例を念頭に、今後、siRNA 医薬の開発は従来の送達キャリア型に加え、コンジュゲート型の開発も進んでいくと予想される。

7-2. miRNA 医薬品

miRNA とは一般には標的 mRNA と結合する 1 本鎖 RNA を指すが、化学合成した miRNA 医薬品を生体に作用させるためには、まず miRNA が RISC 複合体に取り込まれる必要がある。このため、miRNA 医薬品は siRNA 医薬品と同様に RISC 複合体が認識する 20 塩基程度の 2 本鎖 RNA としてデザインされる(表2、表4)。miRNA 医薬品は病態において低下した miRNA を補充するというコンセプトで開発されており、内在性の miRNA と区別する意味で「miRNA mimic」などと呼ばれる。臨床開発が進んでいる miRNA mimic としては、miR-29 を補充する remlarsen(miRagen 社、皮膚線維症、第2相)や miR-15/107 を補充する TargomiR(EnGeneIC 社、中皮腫、第2相)などがある。TargomiR は miRNA の送達キャリアとして用いられる細菌由来の「EnGeneIC Dream Vector」に免疫賦活作用があり、miRNA の補充とがん免疫療法の相乗作用で有効性を発揮するとされている。

miRNA をコントロールする miRNA 阻害型アンチセンスならびに miRNA mimic については、1 つの分子を制御する分子標的薬が主流の現状において、1 つの医薬品で多くの mRNA を同時に制御(増加あるいは減少)できる点が特色であり、これまでにない治療効果を生み出すポテンシャルがある。現状では実用化例はないが、今後の展開に期待したい。

文献

- 1) 医学のあゆみ(特集：核酸医薬品の進歩と課題), 262(2) (2017)
- 2) 井上貴雄, 実験医学, 37, 2-7 (2019)
- 3) 西川元也, 実験医学, 37, 34-39 (2019)
- 4) Obika S., et al., *Tetrahedron Lett.*, 38, 8735-8738 (1997)
- 5) Ito K.R., et al., *Comprehensive Medicinal Chemistry*, 3, 216-232 (2017)
- 6) Morihiro K., et al., *Mol. Biosyst.*, 13, 235-245 (2017)
- 7) Stein C.A., et al., *Mol. Ther.*, 25, 1069-1075 (2017)

8. 最後に

以上、核酸医薬品のうち、アンチセンス、siRNA ならびに miRNA に焦点を絞り、その開発動向を紹介した。これらのモダリティの優位性の1つとして、開発スピードの観点があげられる。すなわち、核酸医薬品は核酸モノマーが連結したオリゴ核酸という共通の構造を有すること、有効性の高いリード化合物(核酸配列)を短期間で取得できること、得られたリード化合物がそのまま(あるいは短いステップで)臨床開発品になることなどから、一度開発スキームが完成すれば、創薬標的が変わっても迅速に開発を進めることが可能と考えられる。先に紹介した IONIS 社や Anylam 社のパイプラインを見ると、特定の構造/作用機序の核酸医薬品を設定し、その配列だけを変えることで、さまざまな疾患に対して短期間に候補品を生み出している様子が見える。国内においては、日本新薬がモルフォリノアンチセンスでエクソスキップ薬を順次開発する方針を発表しているが、このような例がさらに生まれると核酸医薬品の実用化が加速度的に進んでいくと考えられる。

核酸医薬品のもう1つの優位性としては、標的分子を RNA レベルで増減させるというユニークな作用機序であることから、創薬対象が拡大し、アンメットメディカルニーズにも対応できる点があげられる。しかし、この優位性は現状では限定的、あるいは、ポテンシャルの段階であり、十分に生かしているとは言いがたい。この壁を突破するには、やはりオリゴ核酸が到達する組織/細胞を拡大し、その効率を高めるための DDS 技術の進展が鍵と考える。日本における DDS 研究から、核酸医薬品の優位性を開花させる新たなブレイクスルーが生まれることを期待したい。

- 8) 特許庁, 平成27年度特許出願技術動向調査報告書 核酸医薬
- 9) シード・プランニング社, 2016年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望
- 10) 井上貴雄, *Drug Delivery System*, 31, 10-23 (2016)
- 11) 藤原将寿ら, 実験医学, 37, 21-25 (2019)
- 12) 小檜山康司ら, 実験医学, 37, 26-33 (2019)
- 13) Rupaimoole R., et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 16, 203-222 (2017)
- 14) Fire A., et al., *Nature*, 391, 806-811 (1998)
- 15) Elbashir S.M., et al., *Nature*, 411, 494-498 (2001)