

**siRNA 担持脂質ナノ製剤の評価  
に関する研究**

**Study on Assessment for siRNA-loaded Lipid  
Nanomedicines**

2017年7月

早稲田大学大学院先進理工学研究科

および

東京女子医科大学大学院医学研究科

共同先端生命医科学専攻

ナノ医療工学研究

久保田 恒平

Kohei KUBOTA



# 目次

第1章 研究背景・目的	1
1-1 核酸医薬品開発の進展	1
1-2 核酸医薬品の分類	3
1-3 核酸医薬品開発の抱える課題点	5
1-4 ナノ医薬品の定義	6
1-5 本研究の目的及び意義	7
1-6 本論文の構成	8
第2章 核酸医薬品開発の現状と動向に関する調査	10
2-1 緒言	10
2-2 核酸医薬品の開発状況	10
2-2-1 臨床開発中の薬剤のパイプライン	10
2-2-2 アンチセンス核酸の開発中薬剤の臨床プログラム	12
2-2-3 siRNA の開発中薬剤の臨床プログラム	16
2-2-4 アプタマーの開発中薬剤の臨床プログラム	19
2-2-5 miRNA の開発中薬剤の臨床プログラム	20
2-3 開発が進められている疾患領域及び投与経路に関する調査	21
2-3-1 対象疾患	21
2-3-2 投与経路	22
2-4 開発を進めている企業/国籍に関する調査	24
2-5 siRNA のデリバリー技術に関する調査	26
2-5-1 siRNA Delivery Technologies	26
2-5-2 Lipid Based Nanoparticles	27
2-5-2-1 Lipoplex Delivery Technology, Silence Therapeutics	27
2-5-2-2 Stable Nucleic Acid Lipid Particles (SNALP), Arbutus Biopharma	27
2-5-2-3 SMARTICLE, Marina Biotech Pharmaceuticals	28
2-5-3 Polymer Based Nanoparticles	29
2-5-3-1 RONDEL, Arrowhead Research	29
2-5-4 Conjugated Delivery Systems	29
2-5-4-1 Dynamic Polyconjugates (DPC), Arrowhead Research	29
2-5-4-2 GalNAc Conjugate Delivery System, Alnylam Pharmaceuticals	29
2-6 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の非臨床試験	30
2-7 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の臨床試験	31
2-8 DDS キャリアの違いによる siRNA 製剤の安全性の違い	33
2-9 従来の DDS 製剤と siRNA 担持脂質ナノ製剤との毒性比較	35
2-10 まとめ	37
第3章 核酸医薬品及びナノ医薬品開発に係る法規制に関する調査	38
3-1 緒言	38
3-2 核酸医薬品開発に係る政策及び法規制	38

3-2-1	ICH ガイドラインの規制に関する現状.....	38
3-2-2	米国における法規制動向 .....	39
3-2-3	欧州における法規制動向 .....	39
3-2-4	日本における法規制動向 .....	39
3-3	ナノ医薬品開発に係る法規制及び政策.....	40
3-3-1	リポソーム製剤に関する法規制 .....	42
3-3-1-1	米国における法規制 .....	42
3-3-1-2	欧州における法規制 .....	43
3-3-1-3	日本における法規制 .....	44
3-3-1-4	日米欧 3 極の記載内容の比較 .....	45
3-3-2	リポソーム製剤以外のナノ医薬品に関する法規制動向.....	46
3-3-2-1	米国における法規制動向 .....	46
3-3-2-2	欧州における法規制動向 .....	47
3-3-2-3	日本における法規制動向 .....	48
3-4	まとめ .....	50
<b>第 4 章 siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性が有効性・安全性に与える影響評価に関する検討.....</b>		
4-1	緒言 .....	51
4-2	siRNA 担持脂質ナノ製剤の CMC 研究 .....	51
4-2-1	Lipoplexes 及び LNP の調製及び製剤物性評価 .....	51
4-2-2	Cryo-TEM 測定.....	53
4-2-3	Small-angle X-ray scattering (SAXS) 測定 .....	54
4-2-4	製剤物性のまとめ .....	55
4-3	siRNA 担持脂質ナノ粒子の有効性評価.....	56
4-3-1	細胞内取込み評価 .....	56
4-3-2	siRNA 及び脂質キャリアとの細胞内共局在評価.....	61
4-3-3	RNase による siRNA 失活試験 .....	63
4-3-4	Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価.....	64
4-3-5	標的遺伝子のノックダウン活性評価 .....	67
4-3-6	siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性評価のまとめ.....	68
4-4	siRNA 担持脂質ナノ製剤に関する安全性評価 .....	69
4-4-1	細胞毒性評価 .....	69
4-4-2	サイトカイン産生評価 .....	70
4-4-3	補体活性化評価 .....	72
4-4-4	siRNA 担持脂質ナノ製剤に関する安全性評価のまとめ.....	72
4-5	考察 .....	73
4-5-1	siRNA 担持脂質ナノ製剤の CMC 研究.....	73
4-5-2	siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内取込み効率に関する評価.....	74
4-5-3	siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内取込み経路に関する評価.....	75
4-5-4	siRNA 担持脂質ナノ製剤のサイトカイン産生に関する評価.....	77
4-5-5	まとめ .....	78

4-6 実験の部.....	79
4-6-1 試薬.....	79
4-6-2 細胞株.....	79
4-6-3 Lipoplexes 及び LNPs の調製及び製剤物性評価.....	80
4-6-3-1 Lipoplexes の調製.....	80
4-6-3-2 LNPs の調製.....	80
4-6-3-3 平均粒子径及びゼータ電位測定.....	80
4-6-3-4 siRNA 及び脂質含量測定.....	81
4-6-4 Cryo-TEM 測定.....	82
4-6-5 Small-angle X-ray scattering (SAXS) 測定.....	82
4-6-6 細胞内取込み評価.....	83
4-6-6-1 共焦点レーザー顕微鏡を用いた評価.....	83
4-6-6-2 フローサイトメトリーを用いた評価.....	83
4-6-7 siRNA 及び脂質キャリアとの細胞内動態評価.....	83
4-6-8 RNase による siRNA 失活試験.....	83
4-6-9 Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価.....	84
4-6-10 標的遺伝子のノックダウン活性評価.....	84
4-6-11 細胞毒性評価.....	85
4-6-12 サイトカイン産生評価.....	85
4-6-13 補体活性化評価.....	85
4-6-13-1 C3a 測定.....	85
4-6-13-2 C5a 測定.....	85
4-6-14 統計解析.....	86
第5章 結論.....	87
5-1 本研究の成果と意義.....	87
5-2 今後の展望.....	92
引用文献.....	94
謝辞.....	103
研究業績.....	105

## 図題目次

- 図 1-1 核酸医薬品に関する論文数の年次推移
- 図 1-2 アンチセンス及び siRNA の作用機序
- 図 1-3 本論文の構成
- 図 2-1 核酸医薬品の開発状況
- 図 2-2 アンチセンス核酸及び siRNA の適用疾患
- 図 2-3 アンチセンス核酸及び siRNA の投与経路
- 図 2-4 核酸医薬品を開発している企業の国籍
- 図 2-5 臨床応用されている siRNA デリバリー技術
- 図 4-1 Cryo-TEM による lipoplexes 及び LNPs の形態観察
- 図 4-2 小角 X 線回折による lipoplexes 及び LNPs の構造解析
- 図 4-3 共焦点顕微鏡による lipoplexes 及び LNPs の細胞内取込み評価
- 図 4-4 フローサイトメトリーを用いた lipoplexes 及び LNPs の細胞内導入評価
- 図 4-5 N/P 比による細胞への取込み効率の違い
- 図 4-6 naked 核酸の細胞内導入効率評価
- 図 4-7 細胞内での siRNA 及び脂質の局在評価
- 図 4-8 RNase 添加による lipoplexes 及び LNPs 中の siRNA 失活評価
- 図 4-9 Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価
- 図 4-10 カベオラ介在エンドサイトーシスのマーカーを用いた共局在評価
- 図 4-11 標的遺伝子のノックダウン活性評価
- 図 4-12 WST-8 アッセイによる細胞毒性評価
- 図 4-13 炎症性サイトカイン産生評価
- 図 4-14 補体の活性化評価

## 表題目次

表 1-1	既承認の核酸医薬品一覧
表 1-2	核酸医薬品の分類
表 2-1	アンチセンス核酸の臨床開発プログラム
表 2-2	既承認アンチセンス核酸の第3相臨床試験デザイン
表 2-3	siRNA の臨床開発プログラム
表 2-4	アプタマーの臨床開発プログラム
表 2-5	miRNA の臨床開発プログラム
表 2-6	アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の非臨床毒性所見の違い
表 2-7	アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノの臨床試験での有害事象
表 2-8	種々DDS キャリアを用いた siRNA 製剤
表 2-9	siRNA 製剤の臨床試験での有害事象のまとめ
表 2-10	Doxil <sup>®</sup> の臨床試験での主な毒性所見
表 3-1	これまでに承認されたリポソーム製剤
表 3-2	これまでに発出されたナノ医薬品に関する法規制文書
表 3-3	リポソーム製剤に関する規制文書の日米欧の記載内容の比較
表 3-4	ナノテクノロジー研究所から発出されているナノ医薬品の <i>in vitro</i> 評価一覧
表 3-5	核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパーの記載内容
表 4-1	Lipoplexes 及び LNPs の平均粒子径及びゼータ電位
表 4-2	DiO を導入した lipoplexes 及び LNPs の平均粒子径及びゼータ電位

## 略号の説明

ADME	Adsorption, Distribution, Metabolism and Excretion
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ALT	Alanine aminotransferase
AMD	Age-related Macular Degeneration
ANDA	Abbreviated New Drug Application
APTT	Activated partial thromboplastin time
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
AST	Aspartate aminotransferase
ATP	Adenosine triphosphate
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CARPA	Complement Activation-Related PseudoAllergy
CBLB	Cbl Proto-Oncogene B
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CDM	Carboxylated dimethyl maleic acid
CHEMS	Cholesteryl hemisuccinate
CMC	Chemistry, Manufacturing and Control
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosine-phosphodiester-guanine
CQAs	Critical Quality Attributes
DDS	Drug Delivery System
DiOC16	3,3'-dihexadecyloxycarbocyanine perchlorate
DLinDMA	1,2-dilinoleyloxy- <i>N,N</i> -dimethyl-3aminopropane
DLT	Dose Limiting Toxicity
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DNA	Deoxyribonucleic acid
DODMA	1,2-dioleyloxy-3-dimethylaminopropane
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPC	Dynamic Polyconjugates
DPhyPE	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphanolamine
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELIZA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	the European Medicines Agency
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ESC	Enhanced Stabilization Chemistry
EU	European Union
FDA	Food and Drug Administration
FH	Familial hypercholesterolemia
GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HAGG	Heat Aggregated Gamma Globin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis B virus
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	High performance liquid chromatography
HPRT-1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1



ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IFT	Inverse Fourier Transform
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
ISO	International Organization for Standardization
KD	Knock Down
KIF	Keratinintermediate filament
KSP	Kinesin Spindle Protein
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
LNPs	Lipid Nanoparticles
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MLP	Melittin-like membranolytic peptide
MOCHOL	Cholesteryl-4-([2-(4-morpholinyl)ethyl]amino)-4-oxoburanoate
mRNA	messengerRNA
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
miRNA	microRNA
NCL	Nanotechnology Characterization Laboratory
NCI	National Cancer Institute
NIHS	National Institute of Health Science
NOAEL	No observable adverse effect level
ODN	Oligo-deoxynucleotide
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Pharmacodynamics
PDGF	Platelet Derived Growth Fator
PEG	Polyethylene glycol
PEG-DSPE	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamine- <i>N</i> -(polyethylene glycol-2000)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLA2	Phospholipase A2
PLK1	Polo-like kinase 1
PK	Pharmacoknetics
PKN3	Protein Kinase N3
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
RES	Reticuloendothelial system
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase H	Ribonuclease H
RPM2	M2 subunit of ribonucleotide reductase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute's medium
RPN2	Ribophorin II

qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SAXS	Small-angle X-ray scattering
siRNA	small interfering RNAs
SMA	Spinal Muscular Atrophy
SNALP	Stable Nucleic Acid Lipid Particle
shRNA	short hairpin RNA
ssDNA	single-stranded DNA
TBIL	Total bilirubin
TEA	Triethylamine
TEM	Transmission Electron Microscope
TLRs	Toll like receptors
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TR	Translational Research
TTR	Transthyretin
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 第1章 研究背景・目的

## 1-1 核酸医薬品開発の進展

核酸医薬品は、低分子医薬品及び抗体医薬品に次ぐ次世代の医薬品として開発が進められている。疾患に関連する mRNA や miRNA、或いは蛋白質などを標的とするため、作用機序が明確であり、これまでの低分子或いは抗体医薬品ではターゲットに成り得なかった疾患に対する新たな治療薬開発の可能性が示されている<sup>1,2</sup>。現在、癌、炎症性疾患或いは遺伝性疾患等様々な疾患を対象に開発が進められている<sup>3-7</sup>。現在の創薬の中心となりつつある抗体医薬品はターゲットとの特異性が高く、また副作用が少ないという利点があるものの、医薬品として開発可能な抗原には限りがあり、また大量生産が難しいため原価が非常に高いという課題がある。一方、核酸医薬品は固相合成による大量生産が可能であり<sup>8</sup>、解析技術の向上に伴い多くの疾患の原因遺伝子が詳しく解明されるに連れ、原理上これらの疾患が治療可能となると期待されている。

Eteplirsen (Duchenne 型筋ジストロフィー) や Nusinersen (脊髄性筋萎縮症) のアンチセンス核酸 2 品目が 2016 年に FDA から承認を受け、2016 年末までにアンチセンス核酸 4 品目、アプタマー 1 品目の計 5 品目の核酸医薬品が承認されている (表 1-1)。初期に承認された Fomivirsen や Pegaptanib は硝子体内への局所投与の薬剤であったが、核酸への修飾技術の向上に伴い核酸自体の免疫刺激性の低減、或いは血中での安定性の向上が達成され<sup>9,10</sup>、Mipomersen 或いは Eteplirsen のように、皮下投与による全身投与性の薬剤開発が可能となってきた<sup>11</sup>。

表 1-1 既承認の核酸医薬品一覧

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成、

検索日：2017 年 1 月 10 日)

名称	種類	承認年	開発	標的	適応
Fomivirsen (Vitravene®)	アンチセンス	米 1998 欧 1999	Ionis (旧 Isis) Novartis	サイトメガロウイルス (CMV) gene IE2 mRNA	CMV 性網膜炎 (AIDS 患者) 【局注 (硝子体内)】 →販売中止
Pegaptanib (Macugen®)	アプタマー	米 2004 欧 2006 日 2008	Pfizer Archemix	Vascular endothelial growth factor (VEGF) 165 タンパク質	加齢黄斑変性症 【局注 (硝子体内)】
Mipomersen (Kynamro®)	アンチセンス	米 2013	Ionis (旧 Isis) Genzyme	ApoB 100 mRNA	ホモ接合型家族性高コレステロール血症 【皮下投与】
Eteplirsen (Exondys51®)	アンチセンス	米 2016	Serapta	Exon 51	デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 【皮下投与】
Nusinersen (Spinraza®)	アンチセンス	米 2016	Biogen Ionis (旧 Isis)	SMA1 gene	脊髄性筋萎縮症 (SMA) 【髄腔内投与】

PubMedにより各種核酸医薬品に関する論文数を検索したところ(検索日:2016年12月1日)、アンチセンス核酸は2001年以降論文数が減少傾向にあるのに対し、siRNA 或いは miRNA の論文数は近年飛躍的に増えていることが分かる(図 1-1)。アンチセンス核酸に種々化学修飾を行うことで、免疫刺激性の低減或いは血中での安定性向上を目指した研究は2000年までにほぼ完成を迎え、2000年以降は研究から実際に医薬品開発にシフトしていると言える。アンチセンス核酸の開発を手掛けるバイオベンチャーは2000年以前に設立されているものが多い<sup>12</sup>。

一方 siRNA に関して、1998年に米国の生物学者である Fire と Mello は、2本鎖 RNA を線虫に導入すると、2本鎖 RNA の配列特異的に mRNA の発現が抑制される RNA 干渉 (RNAi; RNA interference) を見出した<sup>13</sup>。その後 2001年に哺乳類でも同様の現象が報告されてから、医薬品としての開発に大きな注目を浴びることとなり、Alnylam 社など siRNA 創薬に特化したバイオベンチャーも2000年代初頭に設立されている。Fire と Mello は2006年にノーベル生理学・医学賞を受賞し、その後も医薬品としての siRNA に関する研究は非常に注目されているが、効率的に薬物を送達させる必要があり、その技術開発の困難さから近年論文数も頭打ちになっていると考えられる。

miRNA は1993年に線虫から発見されてから、現在までに哺乳類をはじめ様々な生物種から1000種類以上が見出されている<sup>14</sup>。2001年に米国 Harvard 大の Ruvkun ら様々な研究者が細胞の発生、分化、増殖、癌化など様々な疾患に miRNA が関与することを報告してから<sup>15</sup>、非常に注目を集める研究フィールドとなった。また、2008年頃から exosome 内の miRNA が細胞間の情報伝達に利用されていることが報告され、現在は医薬品開発としてだけでなく、様々な疾患のバイオマーカーとしての応用も期待されている<sup>16-18</sup>。

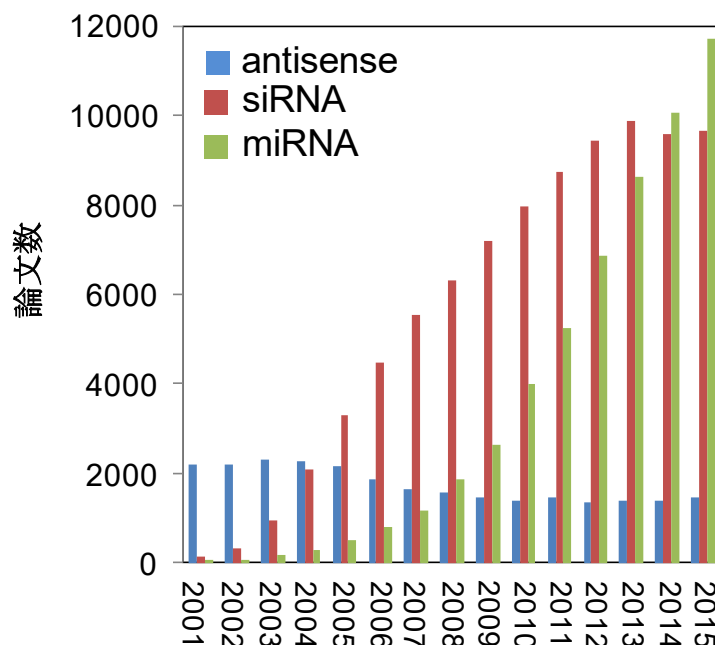


図 1-1 核酸医薬品に関する論文数の年次推移  
(PubMed の検索結果をもとに著者作成, 検索日:2016年12月1日)

## 1-2 核酸医薬品の分類

核酸医薬品の分類を表 1-2 に、作用機序を図 1-3 にまとめた。標的の mRNA に配列特異的に結合・分解するアンチセンス核酸或いは siRNA、特定の転写因子に作用することで転写を阻害するデコイ核酸、或いは抗体と同様に特定の蛋白質に結合しその機能を発揮するアプタマーなど幾つかの種類に分類される<sup>19</sup>。

表 1-2 核酸医薬品の分類 (平成 27 年度 特許出願技術動向調査報告書 (概要) 特許庁資料<sup>19</sup>をもとに著者作成)

種類	標的	作用部位	作用機序	概要
アンチセンス	mRNA, miRNA	細胞質内	mRNA, miRNA の分解、スプライシングの阻害	標的とする mRNA, miRNA 等に結合して分解を促進する、或いはスプライシングの際、エクソンをスキップさせる一本鎖 RNA/DNA
siRNA	mRNA	細胞質内	mRNA の分解	配列に相同な mRNA の分解を促進する二本鎖 RNA (siRNA) 又はヘアピン型一本鎖 RNA (shRNA) 等、RNAi の原理に基づき作用する
miRNA	miRNA	細胞質内	miRNA の補充	二本鎖 RNA 又はヘアピン型一本鎖 RNA の miRNA 或いはその mimic により、疾患で低下している miRNA の機能を補強する
アプタマー	細胞外蛋白質	細胞外	機能阻害	抗体と同じように標的蛋白質に結合する一本鎖 RNA/DNA
Decoy	転写因子	細胞質内	転写阻害	疾患遺伝子等の転写因子に結合し標的遺伝子の発現を抑制する、転写因子結合部と同一の配列を有する二本鎖 DNA
Ribozyme	RNA	細胞質内	RNA 分解	標的 RNA に結合して切断する酵素機能を有する一本鎖 RNA
CpG oligo	蛋白質 (TLRs)	細胞表層	免疫賦活	CpG モチーフを有するオリゴ核酸 (一本鎖 DNA)

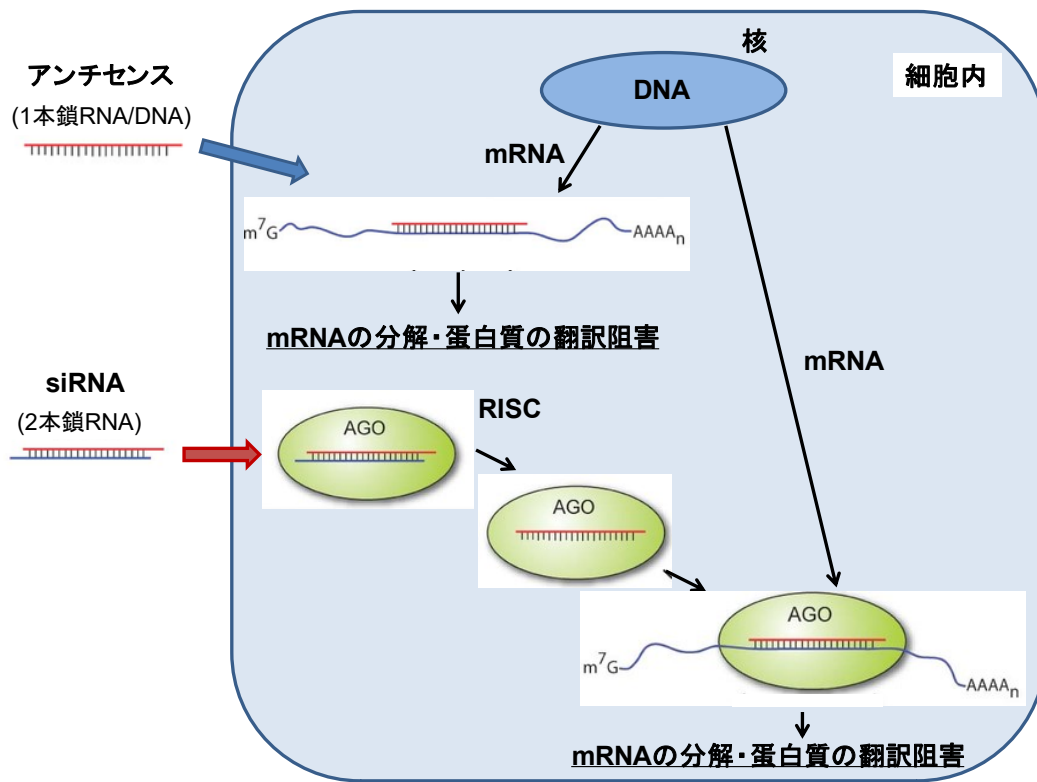


図 1-2 アンチセンス及び siRNA の作用機序 (文献情報<sup>20</sup>をもとに著者作成)

### 1-3 核酸医薬品開発の抱える課題点

核酸医薬品の薬効成分となるオリゴ核酸は、負の電荷を帯びた高分子電解質であるために細胞膜の透過性が極端に低いこと、生体内でヌクレアーゼによる分解を速やかに受け非常に不安定であること、生体内の Toll Like Receptors (TLRs) に関与し強い免疫刺激性を有すること、など種々開発上の課題点を抱えている<sup>21-24</sup>。1本鎖核酸であるアンチセンス核酸は、種々修飾技術の向上に伴い、上述した課題点が克服されつつある。代表的なものにホスホロチアート修飾(S化)が挙げられる。このことによって、ヌクレアーゼ耐性が向上し、mRNAを分解するためのRNase Hを誘導能が上がり、かつ血清タンパク質ともよく結合して腎臓からの排泄を遅らせている<sup>25</sup>。アンチセンス核酸は既に4品目が承認されているが(2016年12月現在)、高い投与量が必要であるため、高額となる薬剤費用或いは肝臓・腎臓への毒性コントロールが課題とされている。

19-23塩基対の2本鎖RNAであるsiRNAはアンチセンス核酸に比べ血中での安定性が低く、また単独では細胞膜の透過性が非常に低いため、標的細胞の細胞質まで効率的に送達するためには多くの場合、脂質或いはポリマーとの複合体であるナノ粒子を利用した薬物送達技術(Drug Delivery System, DDS)が必要となる。DDS技術に関する研究は種々進められているものの、薬効及び毒性のコントロールが非常に難しく、開発上の大きな障壁となっており、siRNAの開発が遅々として進まない最も大きな要因となっている。しかし、効率的に目的とする細胞内に薬剤を送達することができれば、アンチセンス核酸に比べて投与量の低減、或いは投与間隔を広げられる可能性があり、アンチセンス核酸で抱える課題を克服できると期待されている。

核酸医薬品の品質或いは安全性評価の指標となるガイドラインは日米欧で未だ整備されていないことに加えて、siRNAの開発にはナノ医薬品に係る法規制を含めて開発環境を整備する必要があり、レギュラトリーサイエンス研究の重要性が指摘されている。

#### 1-4 ナノ医薬品の定義

ナノ医薬品はナノメートルサイズの構成要素を有する医薬品を指し、Doxil®をはじめこれまでに数多くのナノ医薬品が承認されている(3-3項参照)。ナノ医薬品或いはナノテクノロジーに関して、EMA 或いはFDA では明確に定義されているのに対し、国内ではこれまでのところ定義はされていない。

EMA では 2006 年に発出した “Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use”<sup>26</sup> の中でナノテクノロジーを応用した医薬品に対する考えを示している。その中で、ナノテクノロジーを以下の範囲で定義している。“Nanotechnology is defined as the production and application of structures, devices and systems by controlling the shape and size of materials at nanometer scale. The nanometer scale ranges from the atomic level at around 0.2 nm up to around 100 nm.”

また、ナノ医薬品に関して “Nanomedicine is defined as the application of nanotechnology in view of making a medical diagnosis or treating or preventing diseases. It exploits the improved and often novel physical, chemical and biological properties of materials at nanometer scale.” と定義している。

ナノ医薬品はその作用機序が医療機器の規制の範疇に入る可能性もあるため、品質、安全性、及び有効性評価と共にリスク評価のための特別な経験が必要となることが考えられ、経験や知識の蓄積によりナノ医薬品に特化した新たなガイドラインの作成、或いは既存ガイドラインの改訂の必要性を議論する必要があると記載されている。

一方、FDA も 2011 年に発出された “Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology” (2014 年に改訂)<sup>27</sup> の中でナノテクノロジーを以下の範囲で定義している。“Whether a material or end product is engineered to have at least one external dimension, or an internal or surface structure, in the nanoscale range (approximately 1 nm to 100 nm)” “Whether a material or end product is engineered to exhibit properties or phenomena, including physical or chemical properties or biological effect, that are attributable to its dimension, even if these dimensions fall outside the nanoscale range, up to one micrometer” この中で properties or phenomena, including physical or chemical properties or biological effect, that are attributable to its dimension としているのは、ナノスケールによる材料特性が FDA の規制する製品の安全性、有効性、パフォーマンス、品質或いは公衆衛生へ影響する可能性があるためである。サイズ自体も重要であるが、それ以上にナノ化を医療に適用することで、治療や疾患に優れた特性がもたらされることが重要としている。

国内では特にナノ医薬品に関する明確な定義はされていないが、サブミクロン以下のナノメートルサイズの構成要素を含む医薬品と記されている<sup>28</sup>。

本研究で対象としている siRNA 担持脂質ナノ製剤は粒子径が 100 nm 程度に制御された粒子であり、ナノ医薬品に分類される。



## 1-5 本研究の目的及び意義

siRNA はアンチセンス核酸に比べ低濃度で目的の mRNA を分解でき、効率よく標的の組織に薬物を送達することができれば、これまでとは異なる新しい作用機序を有する次世代医薬品となると期待されている。しかしながら、siRNA を標的の組織に送達させるためには、多くの場合脂質などとの複合体を利用した薬物送達技術が必要となり、核酸医薬品特有の問題に加え、ナノ医薬品としての課題も加味して考える必要がある。Doxil®をはじめとするこれまでに承認されているナノ医薬品は、有効成分のみが標的とする細胞内に導入できれば良いのに対し、siRNA 担持脂質ナノ製剤は複合体として細胞内に導入され、さらに siRNA が脂質複合体から解離し、細胞質で標的遺伝子の mRNA と結合、分解を引起す必要があるため、これまでのナノ医薬品とは大きく異なり細胞内動態の制御が必要となる。そのため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には体内動態に加え、細胞内動態の制御方法及びその評価手法の開発が極めて重要となる。近年 siRNA の早期実用化に向けた取り組みが進められているものの、siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内動態評価、具体的には製剤の品質特性がどのように細胞内動態に関与し、またその有効性及び安全性がどのように影響を受けるかには不明な点が多く、またその評価手法も定まっていないことが siRNA の迅速な開発に繋がっていない大きな要因と考える。そのため製剤の品質特性がどのように細胞内動態に関与するか、その関連性を明らかにすることができれば、効率よく迅速な開発に繋がれることが期待できる。

本研究では、現状の核酸医薬品の開発動向を調査することで、開発が進んでいるアンチセンス核酸と siRNA の開発上の違い、具体的には対象疾患や薬剤の投与方法、或いは薬剤の有効性及び安全性の評価手法、有害事象の質的な差などを精査し、siRNA の実用化に向けた技術的な課題を抽出し、その解決策を考察した。また、核酸医薬品或いはナノ医薬品に関する開発上の法規制に関して、日米欧 3 極の動向を精査し、法規制の面から開発への課題を抽出し、今後の展望を考察した。これら製剤技術の成熟度 (有効性/安全性) と法規制の観点から siRNA の実用化促進に向けた課題を精査し、siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性及び安全性には細胞内動態の詳細な評価が不足していることが抽出された。そのため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内動態を体系的に評価することを目的とし、臨床開発中のモデル薬剤を調製し、製剤の品質特性がどのように細胞内動態に影響し、結果として有効性及び安全性にどのように影響するかを詳細に解析することとした。

siRNA 担持脂質ナノ製剤は既に幾つか臨床応用されているが、それぞれ各社独自の siRNA 或いはカチオン脂質を用いており、個別には *in vitro* 或いは *in vivo* より有効性、安全性に関する評価が行われているものの、siRNA 或いはカチオン脂質を含めて同一の構成成分及び組成から異なる調製手法で製剤を作り分け、粒子の構造情報も含めて製剤の品質特性解析を行い、その品質特性がどのように有効性及び安全性に影響を及ぼすかを評価した研究はこれまでに報告されていない。製剤の品質特性と有効性・安全性との関連性を明らかにし、非臨床試験を行う際に考慮すべき内容の提案を行うことが本研究の目的であり、これは siRNA の迅速な開発に直結することが予想され、また今後の法整備化に繋がる有益な研究と考える。

## 1-6 本論文の構成

本論文の構成を図 1-3 に示した。本論文は以下に示す 5 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景・目的・意義・構成を示した。

第 2 章では、核酸医薬品の開発状況を調査し、siRNA の実用化が進まない技術的な課題を分析した。具体的に、開発が比較的進んでいるアンチセンス核酸と、対象疾患、投与経路或いは剤型などを比較し、siRNA の現状の開発動向を精査した。特に siRNA の開発にはデリバリー技術が非常に重要となるため、臨床開発で用いられているデリバリー技術を調査し、現在までの到達点をまとめた。多くの場合脂質を用いた siRNA 担持脂質ナノ製剤として開発されるため、非臨床及び臨床試験において siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性・安全性がどのように評価されており、現在のデリバリー技術でどの程度それらがコントロールできているかを分析し、技術的な観点からの課題を抽出した。

第 3 章では、核酸医薬品及びナノ医薬品開発に係る法規制に関する調査を行った内容を記述した。核酸医薬品に特化したガイドラインはまだ存在していないが、ガイドライン策定に向けた日米欧 3 極の動向を調査した。また、siRNA の開発にはナノ医薬品としての性質も含むため、ナノ医薬品に係る 3 極の法規制文書の記載内容を精査し、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発にどの程度有用であるかを考察した。本章では、規制面から siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発への課題を抽出した。

第 2 章及び第 3 章から見出された技術面及び規制面からの課題に対し、第 4 章では siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性及び安全性を *in vitro* による評価研究により明らかとした内容を記述した。siRNA 担持脂質ナノ製剤は、従来のナノ医薬品に比べて目的の患部、細胞内の動態制御が極めて重要となるが、その評価手法は確立されておらず、十分に検証されていないことが大きな課題として抽出されたため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の製剤特性がどのように細胞内動態に影響し、結果として有効性・安全性に及ぼす影響を評価した。具体的には、臨床開発が進められている 2 種のタイプの異なる siRNA 担持脂質ナノ製剤をモデルに、異なる調製手法にて製剤を作り分け、粒子の構造解析を含めた製剤の物理化学的性質を評価するとともに、目的の細胞への取込み効率、取込み経路及び標的遺伝子のノックダウン効率(有効性)と炎症性サイトカインの産生量及び補体の活性化(安全性)に関して体系的な評価を行い、製剤特性と有効性・安全性との関連性評価に関する内容を記述した。

第 5 章では、本研究の成果とその意義、及び今後の展望を記述した。siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発に関する製剤化研究 (Chemistry, Manufacturing and Control, CMC) 或いは非臨床試験での *in vitro* 評価の重要性を記載すると共に、有効な開発戦略に係る提言を行った内容を記述した。

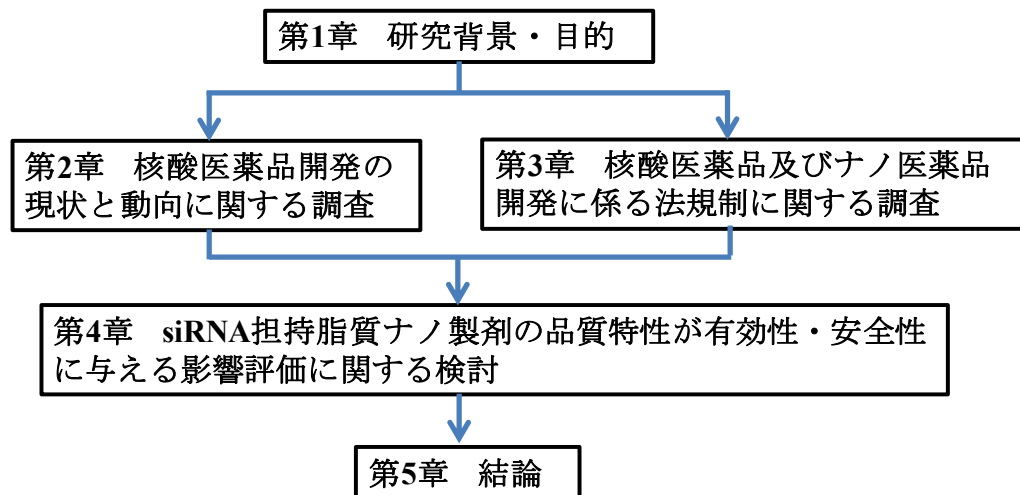


図 1-3 本論文の構成

## 第 2 章 核酸医薬品開発の現状と動向に関する調査

### 2-1 緒言

アンチセンス核酸、siRNA、アプタマー及び miRNA の計 4 種の臨床開発状況に関して、対象疾患、製剤の投与ルート及び剤型、各国企業の開発動向に関する調査を行い、現状の開発状況の分析を行うことを目的とした。また、siRNA の開発に関して、標的とする患部或いは組織に効率よく送達するデリバリー技術の開発が重要となることから、デリバリー技術の現在までの到達点及び抱える課題を解析した。

現在臨床開発が進められているアンチセンス核酸或いは siRNA 担持脂質ナノ製剤を調査し、naked 核酸及び脂質複合体の中で有効性と安全性はどのように異なるか、具体的には有効性を示す投与量の違い、標的臓器或いは組織の違い、毒性所見或いは強さの違いなどを評価し、両者の違いを分析した。その結果から、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発上の課題点を明らかにすると共に今後の有効な開発戦略への展望を考察した。

### 2-2 核酸医薬品の開発状況

#### 2-2-1 臨床開発中の薬剤のパイプライン

臨床開発中の薬剤の臨床プログラム数は、既承認薬も含めてアンチセンス核酸で 58 件、siRNA で 33 件、アプタマー及び miRNA でそれぞれ 10 件であった (検索ツール: ClinicalTrial.gov 及び Thomson Reuters Cortellis, 検索検索日: 2017 年 1 月 10 日, 図 2-1)。アンチセンス核酸では修飾技術が進歩し、これまでの課題が克服されつつあり、近年複数の製品が実用化している<sup>1)</sup>。一方、siRNA はアンチセンス核酸に比べ低濃度で目的の mRNA を分解できるため、開発が活発化しているが、2 本鎖 RNA を標的細胞内に効率的に送達する必要があるため、脂質或いはポリマーとの複合体であるナノ医薬品を利用した DDS 技術が開発上の大きな障壁となっており、アンチセンス核酸に比べて開発が進んでいないのが実情である。近年、siRNA の末端に糖鎖を結合した GalNAc 核酸が米国 Alnylam 社で開発され、DDS キャリアを必要とせず、皮下投与により肝臓に集積し機能を発揮することで非常に注目を集めており<sup>29)</sup>、現在 8 件のプログラムで臨床試験が進められている。

アプタマーは既に承認されている Pegaptanib と同様に、2 品目が加齢黄斑変性症を適用とする眼内注射製剤が第 3 相の臨床試験が進められている他、血液癌或いは糖尿病を対象疾患として開発が進められている。

miRNA は癌を中心に開発が進められているものの、まだ第 3 相の臨床試験まで進んだものはなく、発展途上であることが分かる。

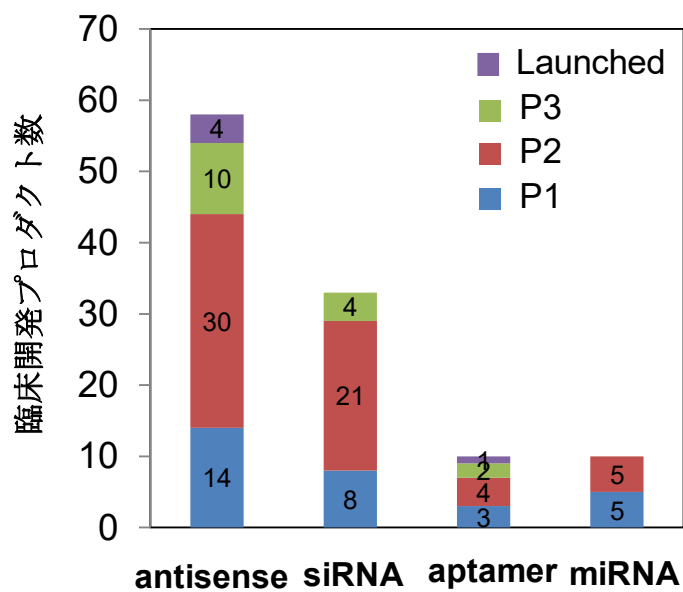


図 2-1 核酸医薬品の開発状況

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
 検索日：2017年1月10日)

核酸医薬品 4 種の臨床開発プログラムの詳細を ClinicalTrial.gov 及び Thomson Reuters Cortellis  
 を用いて調査を行った (検索日：2017年1月10日)。

## 2-2-2 アンチセンス核酸の開発中薬剤の臨床プログラム

アンチセンス核酸の臨床開発プログラムを表 2-1、既承認アンチセンス核酸の第 3 相臨床試験デザインを表 2-2 にまとめた。神経・筋変性疾患での開発が比較的多いのが特徴であり、2016 年に承認された Eteplirsen (Duchenne 型筋ジストロフィー) 及び Nusinersen (脊髄性筋萎縮症) も含まれる。Duchenne 型筋ジストロフィーは、日本でも国立精神・神経研究センターが日本新薬株式会社と (NCT00048321)、神戸大学が第一三共株式会社と国内開発で第 2 相の臨床試験を実施している (NCT02667483)。Duchenne 型筋ジストロフィーの疾患では、筋細胞の破壊と再生が繰り返されるため、初期発生段階の筋繊維が多く存在するため、効率良くアンチセンス核酸が送達可能であることが知られている<sup>30</sup>。

表 2-1 アンチセンス核酸の臨床開発プログラム

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
 検索日: 2017年1月10日)

製品名	開発企業	企業の国籍	開発 ステージ	投与方法	対象疾患	標的
Fomivirsen	Ionis Pharmaceuticals, Inc/Novartis	USA	Launch	Intraocular injection	Cytomegalo virus infection	IE2 of CMV/R NA
Mipomersen	Ionis Pharmaceuticals, Inc/Sanofi	USA	Launch	Subcutaneous administration	Hypercholes terolaemia	apoB- 100
Eteplirsen	Sarepta Therapeutics	USA	Launch	Intravenous injection	Duchenne Muscular Dystrophy	exon 51
Nusinersen	Biogen	USA	Launch	Intrathecal administration	Spinal Muscular Atrophy	altering the splicing of SMN2
Alicaforsen	Atlantic	USA	3	Transmucosal administration	Crohn's Disease	ICAM-1
Kappaproct	InDex Pharmaceuticals	Sweden	3	Transmucosal administration	Colitis, Ulcerative	p65
Volanesorsen (AKCEA- ApoC-III Rx)	Akcea	USA	3	Subcutaneous administration	Hypertriglyc eridemia	apoC-III
Inotersen (IONIS-TTR Rx)	GSK	UK	3	Subcutaneous administration	Amyloidosis	TTR
SRP-4053	Sarepta Therapeutics	USA	3	Intravenous injection	Duchenne Muscular Dystrophy	exon 53
SRP-4045	Sarepta Therapeutics	USA	3	Intravenous injection	Duchenne Muscular Dystrophy	exon 45
GED-0301	Celgene Corporation	USA	3	Oral administration	Crohn's Disease	Smad7
Aganirsen (GS-101)	Gene Signal	Switzerland	3	Intraocular injection (emulsion)	Corneal Graft Rejection	IRS-1
Lucanix	Activate Immunotherapy	USA	3	Intradermal injection	Non-small- cell lung cancer	TGF- beta

Imetelstat	Geron Corporation	USA	3	Intravenous injection	Myelodysplastic syndrome	Telomerase inhibitor
IONIS-HTTRx	Ionis Pharmaceuticals, Inc.	USA	2	Intrathecal administration	Huntington's disease	HTT
IONIS-STAT3Rx	Ionis Pharmaceuticals, Inc.	USA	2	Intravenous injection	Cancer	STAT3
IONIS-AR-2.5RX (AZD5312)	Ionis Pharmaceuticals, Inc.	USA	2	Intravenous injection	Prostate tumor	Androgen Receptor Pathway
IONIS-FXIRx	Bayer AG	Germany	2	Subcutaneous administration	Venous Thromboembolism	FXI
IONIS-SOD1Rx	Biogen	USA	2	Intrathecal administration	Amyotrophic Lateral Sclerosis	SOD1
Baliforsen (IONIS-DMPKRx)	Biogen	USA	2	Subcutaneous administration	Myotonic Dystrophy Type 1	dystrophin a myotonic protein kinase
Apatorsen (OGX-427)	OncoGenex	USA	2	Intravenous injection	Castration Resistant Prostate Cancer	HSP27
Aganirsen (GS-101)	Gene Signal	Switzerland	2	Intradermal injection	Psoriasis	IRS-1
ATL1103	Antisense Therapeutics Ltd.	Australia	2	Subcutaneous administration	Acromegaly	GHr
ATL1102	Antisense Therapeutics Ltd.	Australia	2	Subcutaneous administration	Multiple Sclerosis	CD49d
AKCEA-APO(a)-LRx	Akcea	USA	2	Subcutaneous administration	High Lp(a)	Apo(a)
AKCEA-ANGPTL3-LRx	Akcea	USA	2	Subcutaneous administration	Dyslipidemia	ANGPTL3
AKCEA-ApoCIII-LRx	Akcea/Novartis	USA/Switzerland	2	Subcutaneous administration	High TGs	apoC-III
IONIS-GCGRRx	Ionis Pharmaceuticals, Inc	USA	2	Intravenous injection	Type 2 Diabetes Mellitus	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
ISIS 2503	Ionis Pharmaceuticals, Inc	USA	2	Intravenous injection	Pancreatic Cancer	H-Ras
GTI-2040	Aptose Biosciences Inc	Canada	2	Intravenous injection	Carcinoma	R2 component of ribonucleotide reductase (RNR) mRNA
Archexin (RX-0201)	Rexahn Pharmaceuticals, Inc	USA	2	Intravenous injection	Metastatic Renal Cell Cancer	Akt-1

Miravirsen (SPC3649-207E)	Roche	Demmark	2	Subcutaneous administration	Hepatitis C	miR-122
RG-101	Regulus Therapeutics, Inc	USA	2	Subcutaneous administration	Hepatitis C	miR-122
RG-012	Regulus Therapeutics, Inc	USA	2	Subcutaneous administration	Alport syndrome	miR-21
SB010	Sterna Biologicals GmbH & Co. KG	Germany	2	Pulmonary injection	Asthma	Unknown
ASM8	Pharmaxis	Canada	2	Pulmonary injection	Asthma	ASM8
VRX496-Modified Autologous T cells	VIRxSYS Corporation	USA	2	Unknown	HIV Infection	HIV virus
Immunoregulatory Dendritic Cells	DiaVacs, Inc	USA	2	Unknown	Type 1 Diabetes	Unknown
SPC2996	Roche	Demmark	2	Intravenous injection	Cancer	Bcl-2
iCo-007	iCo Therapeutics Inc	Canada	2	Intravenous injection	Diffuse Diabetic Macular Edema	c-raf kinase
LErafAON	INSYS Therapeutics Inc	USA	2	Intravenous injection (Liposome)	Cancer	c-raf
Prexigeberse n (BP1001)	Bio-Path Holdings, Inc	USA	2	Intravenous injection (Liposome)	Cancer	L-Grb2 AS
DS-5141b	Daiichi Sankyo Co., Ltd.	Japan	2	Subcutaneous administration	Duchenne Muscular Dystrophy	exon 45
NS-065	Nippon Shinyaku Co Ltd	Japan	2	Subcutaneous administration	Duchenne Muscular Dystrophy	exon 53
Cenersen (EL625)	Eleos, Inc.	USA	1	Intravenous injection	Acute Myelogenous Leukemia	p53
IONIS-PKK Rx	Ionis Pharmaceuticals, Inc.	USA	1	Intravenous injection	Hereditary angioedema	PKK
IONIS-DGAT2 Rx	Ionis Pharmaceuticals, Inc.	USA	1	Intravenous injection	NASH	DGAT2
IONIS-GSK4-LRx	GSK	UK	1	Intraocular injection	Age related macular degeneration	Unknown
IONIS-HBV Rx	GSK	UK	1	Subcutaneous administration	HBV	HBV
QR-010	ProQR Therapeutics	Netherlands	1	Pulmonary injection	Cystic Fibrosis	$\Delta$ F508 mutation
TGF $\beta$ 2 Antisense-GMCSF Gene Modified Autologous	Mary Crowley Medical Research Center	USA	1	Unknown	Cancer	TGF $\beta$ 2



Tumor Cell (TAG) Vaccine						
TGF-β2 antisense ( ISTH0036)	Isarna Therapeutics GmbH	Germany	1	Intraocular injection	Primary Open Angle Glaucoma	TGF-β2
c-myb AS ODN (UPCC 04701)	University of Pennsylvania	USA	1	Intravenous injection	Cancer	c-myb
RG6061	Roche	Denmark	1	Intravenous injection	Cancer	HIF-1α
AST-005	Excicure	USA	1	Intradermal injection	Psoriasis	TNF-alpha
BB-401	Benitec Biopharma	USA	1	Intravenous injection	Cancer	EGFR
HIV-1 Anti-Sense TAR and Transdominant Rev Protein Genes	National Human Genome Research Institute (NHGRI)	USA	1	Unknown	HIV Infection	TAR
AVI-6002	Sarepta Therapeutics	USA	1	Intravenous injection	Ebola Hemorrhagic Fever	Ebola virus

表 2-2 既承認アンチセンス核酸の第 3 相臨床試験デザイン

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
 検索日 : 2017 年 6 月 30 日)

Mipomersen	試験名 : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Assess the Safety and Efficacy of Mipomersen as Added-on Therapy in Homozygous Familial Hypercholesterolemia Subjects (NCT00607373) 患者数 : 51 名 主要評価項目 : Percent Change From Baseline in Low-density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C) at Primary Efficacy Time Point 投与量 : 200 mg once a week subcutaneous injection for 26 weeks
Eteplirsen	試験名 : An Open-Label, Multi-Center, Study With a Concurrent Untreated Control Arm to Evaluate the Efficacy and Safety of Eteplirsen in Duchenne Muscular Dystrophy (NCT02255552) 患者数 : 160 名 主要評価項目 : Change in 6-Minute Walk Test (6MWT) distance from baseline 投与量 : 30 mg/kg of eteplirsen weekly for 96 weeks
Nusinersen	試験名 : A Phase 3, Randomized, Double-blind, Sham-Procedure Controlled Study to Assess the Clinical Efficacy and Safety of ISIS 396443 Administered Intrathecally in Patients With Infantile-onset Spinal Muscular Atrophy (NCT02193074) 患者数 : 122 名 主要評価項目 : Time to death or respiratory intervention 投与量 : 12 mg once every 4 months

### 2-2-3 siRNA の開発中薬剤の臨床プログラム

siRNA の臨床開発プログラムを表 2-3 にまとめた。Alnylam 社では Amyloidosis の原因となるトランスサイレチン (TTR) を抑制する Patisiran (ALN-TTR02) を第 3 相の臨床試験を実施している。これは Arbutus 社 (旧 Tekmira 社) が開発した SNALP (Stable Nucleic Acid Lipid Particles) と呼ばれる脂質を用いた DDS キャリアを利用しており、siRNA を効率良く肝臓へ送達することを可能とした<sup>31</sup>。この SNALP 技術はその他 5 件の臨床プログラムに利用されている。一方、Alnylam 社が開発した GalNAc 核酸は DDS キャリアなしの単独投与 (皮下投与) で肝臓へ集積し、機能を発現させることができ<sup>29</sup>、製造及び品質管理の面からも SNALP を用いた siRNA 開発から GalNAc 核酸プラットフォームを用いた開発に大きく舵を切っている<sup>32</sup>。

表 2-3 siRNA の臨床開発プログラム

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
検索日 : 2017 年 1 月 10 日)

製品名	開発企業	企業の国籍	開発ステージ	投与方法	対象疾患	標的
Patisiran (ALN-TTR02)	Alnylam Pharmaceuticals	USA	3	LNP (i.v.)	Amyloidosis	TTR
QPI-1007	Quark Pharmaceuticals	USA	3	Naked siRNA (intraocular)	Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy	CASP2
QPI-1002 (15NP)	Quark Pharmaceuticals	USA	3	Naked siRNA (i.v.)	Acute Kidney Injury	p53
STNM-01	Steric Institute & Co	Japan	3	Naked siRNA (transmucosal)	Crohns disease, pancreas tumor, Ulcerative colitis	CHST15 gene
TKM-Ebora-Guinea	Arbutus Biopharma Corporation	Canada	2	LNP (i.v.)	Ebola Virus Infection	Ebora polymerase
TKM-HBV	Arbutus Biopharma Corporation	Canada	2	LNP (i.v.)	HVB	HBV virus
TKM-PLK1	Arbutus Biopharma Corporation	Canada	2	LNP (i.v.)	Cancer	PLK1
Atu027	Silence Therapeutics GmbH	UK	2	LNP (i.v.)	Cancer	PKN3
ND-L02-s0201 Injection	Nitto Denko Corporation	Japan	2	LNP (i.v.)	liver fibrosis	HSP47
ALN-VSP02	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	LNP (i.v.)	Cancer	VEGF/KSP
ALN-GO1	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Primary Hyperoxaluria Type 1 (PH1)	Hyperoxaluria oxidase 1 modulator
ALN-PCSSC	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Familial Hypercholeste	PCSK9

					rolemia	
ALN-CC5	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Hemolytic uremic syndrome	C5
ALN-AS1	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Acute intermittent porphyria	5 aminolevulin ate synthase 1 inhibitor
ALN-AAT	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Liver disease	SERPINA1
ALN-AT3SC	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	Hemophilia A	Antithrombin
ALN-HBV	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	GalNAc (s.c.)	HBV	HBV virus
ALN-RSV01	Alnylam Pharmaceuticals	USA	2	Naked siRNA (pulmonary)	Respiratory Syncytial Virus Infections	RSV
siG12D LODER	Silenseed Ltd	Israel	2	polymer (biopsy needle)	Cancer	KRAS
SNS01-T	Senesco Technologies, Inc.	USA	2	PEI nanoparticle (i.v.)	Multiple Myeloma	eIF5A
RXI-109	RXi Pharmaceuticals, Corp.	USA	2	Self-delivering RNAi compound (intradermal)	Dermal scarring	CTGF
PF-04523655 (PF-655)	Quark Pharmaceuticals	USA	2	Naked siRNA (intraocular)	Diabetic Macular Edema,AMD	RTP801
SYL040012	Sylentis, S.A.	Spain	2	Naked siRNA (intraocular)	Ocular Hypertension	ADRB2
SYL1001	Sylentis, S.A.	Spain	2	Naked siRNA (intraocular)	Dry Eye Syndrome	TRPV1
STP-705	Sirnaomics	USA	2	polymeric particle (dermatological)	Wound healing	PTGS2
ALN-TTRsc-02	Alnylam Pharmaceuticals	USA	1	GalNAc (s.c.)	Amyloidosis	TTR
ALN-PCS02	Alnylam Pharmaceuticals	USA	1	LNP (i.v.)	Elevated LDL-Cholesterol (LDL-C)	PCSK9
siRNA-EphA2-DOPC	M.D. Anderson Cancer Center	USA	1	liposome (i.v.)	Cancer	EphA2
TD101	TransDerm Inc	USA	1	Naked siRNA (intradermal)	Pachyonychia Congenita	K6a
RRM1-specific siRNA	EnGeneIC	Australia	1	engineered bacteria nanoparticle (i.v.)	Cancer	RRM1
Nek2 siRNA therapy	Nagoya University	Japan	1	naked siRNA (intratumoral)	Cancer	Nek2
TDM-812	3D Matrix Ltd	Japan	1	naked siRNA	Cancer	Unknown

				(intratumoral)		
E3 ubiquitin protein ligase Cbl-b silencing siRNA	Apeiron Biologics GmbH	Austria	1	cell therapy (i.v.)	Cancer	CBLB gene

## 2-2-4 アプタマーの開発中薬剤の臨床プログラム

アプタマーの臨床開発プログラムを表 2-4 にまとめた。Pegaptanib は既に加齢黄斑変性症を適用として承認されているものの、抗 VEGF 抗体断片の Lucentis が承認されてからは売り上げが大幅に減っている。アプタマーは蛋白質の他、様々な標的分子と特異的に結合するため、診断用途のバイオセンサー或いは DDS の active targeting の ligand など様々な用途で研究が進められている<sup>33, 34</sup>。

表 2-4 アプタマーの臨床開発プログラム

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
検索日 : 2017 年 1 月 10 日)

製品名	開発企業	企業の国籍	開発ステージ	投与方法	適用疾患	標的
pegaptanib sodium (Macugen)	Eyetech Pharmaceuticals	USA	Launch	Intraocular injection	AMD	Anti-Vegf
Fovista™ (E10030)	Ophthotech Corporation	USA	3	Intraocular injection	AMD	Anti-PDGF
Zimura®	Ophthotech Corporation	USA	3	Intraocular injection	AMD	Anti-C5
NOX-A12	NOXXON Pharma AG	Germany	2	Intravenous injection	Chronic Lymphocytic Leukemia	SDF-1
NOX-E36	NOXXON Pharma AG	Germany	2	Intravenous injection	Type 2 Diabetes Mellitus	MCP-1
NOX-H94	NOXXON Pharma AG	Germany	2	Intravenous injection	Anemia	Hepcidin
AS1411	Advanced Cancer Therapeutics	USA	2	Intravenous injection	Acute myelogenous leukemia	BCL-2
NU-172	Archemix Corp.	USA	1	Intravenous injection	Thrombosis	Factor IIa
ARC19499	Archemix Corp.	USA	1	Subcutaneous administration	Factor VIII deficiency	Unknown
sc depot pegnivacogin + iv bolus anivamersen (DVT), Tobira	NovaMedica	Russia	1	Subcutaneous administration	Deep vein thrombosis	Unknown

### 2-2-5 miRNA の開発中薬剤の臨床プログラム

miRNA の臨床開発プログラムを表 2-5 にまとめた。miRNA を標的とした疾患治療においては、疾患の原因となる miRNA が高発現している場合は相補的な核酸を投与することで分解を促進し、また逆に発現量が低下している場合にはその miRNA を補充する治療戦略が取られる<sup>35</sup>。現在、複数の企業で癌或いは肝疾患を中心に開発が進められている。また、miRNA は様々な疾患のバイオマーカーとしての応用が期待されている<sup>16-18</sup>。

表 2-5 miRNA の臨床開発プログラム

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
検索日：2017年1月10日)

製品名	開発企業	企業の国籍	開発 ステージ	投与方法	適用疾患
miR-15/16	EnGeneIC	Australia	2	Intravenous injection	Mesothelioma
RG-101 (miR-122)	Regulus Therapeutics, Inc	USA	2	Subcutaneous administration	HCV infection
RG-012 (miR-21)	Regulus Therapeutics, Inc	USA	2	Subcutaneous administration	Alport syndrome
RG-125 (miR-103/107)	Regulus Therapeutics, Inc	USA	2	Subcutaneous administration	Obesity
Miravirsin (miR-122)	Roche	Demmark	2	Subcutaneous administration	HCV infection
SPC4955 (miR-133)	Roche	Demmark	1	Subcutaneous administration	Hypercholeste rolaemia
MRG-201 (miR-29)	miRagen Therapeutics, Inc	USA	1	Subcutaneous administration	Fibrosis
MRG-106 (miR-155)	miRagen Therapeutics, Inc	USA	1	Subcutaneous administration	Cancer
mRNA based immunotherapies (TriMix, breast cancer), eTheRNA	eTheRNA immunotherapie s	Belgium	1	Intravenous injection	Breast cancer
HIV-TriMix- mRNA vaccine, IDIBAPS-led consortium		Spain	1	Intravenous injection	HCV infection

## 2-3 開発が進められている疾患領域及び投与経路に関する調査

### 2-3-1 対象疾患

臨床開発が進められているアンチセンス核酸及び siRNA の対象疾患を図 2-2 に示した。  
(調査ツール：ClinicalTrial.gov, Thomson Reuters Cortellis、検索日：2017年1月10日)

アンチセンス核酸及び siRNA の治療疾患は共に癌が最も多く、全体の 30%を占めた。更に、アンチセンス核酸では神経・筋変性疾患 (17%) 及び感染症 (10%) が比較的多い適用疾患であった。特にスプライシングを阻害するアンチセンス核酸では、エクソンスキップ療法による Duchenne 型筋ジストロフィーの治療薬が国内外で盛んに開発が進められている。一方、siRNA は癌の他、感染症 (15%) 或いは代謝・免疫疾患 (15%) での開発が多く見られた。アンチセンス核酸及び siRNA の対象疾患の多くは、難治性の疾患であることが分かる。これは低分子薬或いは抗体医薬品を含めた既存薬では十分な治療効果が見られていない疾患が中心であり、新たな作用機序の薬剤開発が望まれている領域と考えられる。核酸医薬品は完全に副作用を抑え込むのが難しいと考えられるため (2-7 項参照)、生活習慣病など長期間の服用が必要であり、かつ副作用が許容されない疾患には適さないと考えられる。

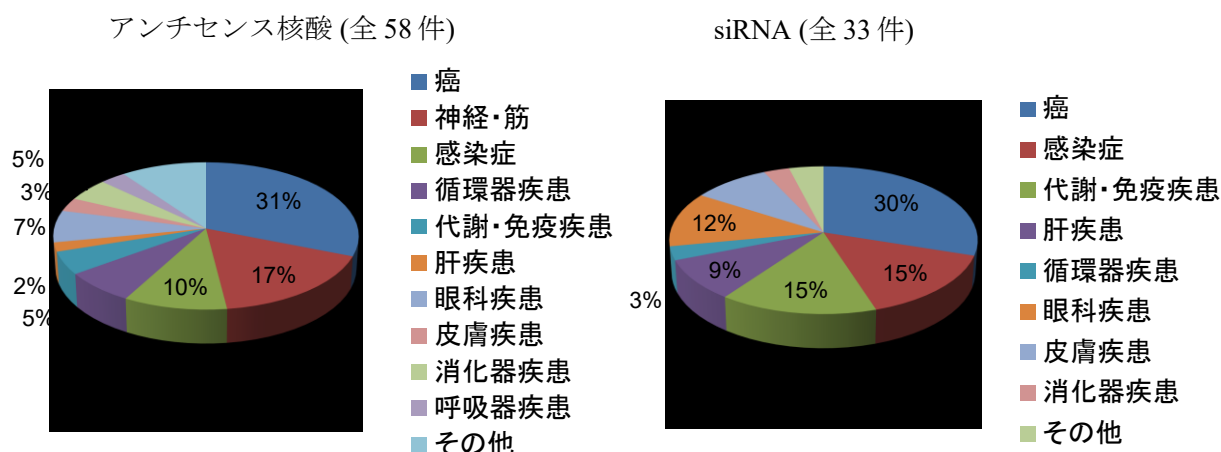


図 2-2 アンチセンス核酸及び siRNA の適用疾患

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成、  
検索日：2017年1月10日)

### 2-3-2 投与経路

アンチセンス核酸及び siRNA の投与経路を図 2-3 に示した。

(調査ツール：ClinicalTrial.gov, Thomson Reuters Cortellis、検索日：2017年1月10日)

アンチセンス核酸に関して、臨床プログラム全 58 件のうち静脈内投与が 22 件 (38%) と最も多く、そのうち 15 件は癌を対象としたもの、筋ジストロフィー或いは肝疾患を対象としたものがそれぞれ 3 件ずつであった。そのほとんどはアンチセンス核酸単独の投与であったが、癌を対象にしたもののうち、LErafAON (INSYS Therapeutics Inc., P2) 及び Prexigebersen (Bio-Path Holding Inc., P2) はリポソーム製剤を用いたプログラムであった。

皮下投与は 16 件 (28%) であり、循環器疾患 (4 件)、代謝・免疫疾患 (4 件)、感染症 (3 件) と肝臓を標的とした疾患が約 7 割を占め、その他筋ジストロフィー (4 件)、腎疾患 (1 件) を対象としたものであった。アンチセンス核酸は全体の約 7 割が静脈内投与或いは皮下投与と言った全身投与性の薬剤として開発が進められており、核酸の修飾技術の向上による薬効の増強及び毒性の低減による影響と考えられた。

脊髄性筋萎縮症或いはハンチントン病に対して髄腔内投与、喘息等の呼吸器疾患への経肺投与、皮膚疾患への皮内投与、又は眼科疾患への眼内投与など、局所投与が用いられるケースもあり、様々な疾患への適用が検討されていることが伺える。

全身投与性の薬剤のうち、血中薬液濃度の維持或いは自己注射可能である利便性のために皮下投与が選択されるが、癌を対象にしたもの及び筋ジストロフィーを対象にした薬剤はいずれも静脈内注射が選択されていた。癌は通常他剤と併用して投与計画に基づいて投与されることが多く、血中濃度をコントロールしやすいために、また筋ジストロフィーは自己注射が不可のために静脈内投与が選択されていると考えられる。

一方、siRNA に関しても、臨床プログラム全 33 件のうち静脈内投与が 13 件 (39%) と最も多く、そのうち 7 件が癌を対象としており、アンチセンス核酸と同様の傾向を示した。その他は肝臓を標的とした疾患であった。静脈内投与 13 件のうち、9 件は脂質複合体を用いたプログラムであり、ポリマーとの複合体を利用したもの、遺伝子改変した細菌をキャリアに用いたもの、siRNA 単独での投与がそれぞれ 1 件ずつであった。アンチセンス核酸と異なり、静脈内投与のほとんどは DDS キャリアを利用していることが分かった。

皮下投与のプログラム全 8 件は Alnylam 社で開発された GalNAc 核酸であり、全て肝臓を標的としたものであった。全体の約 6 割が静脈内投与或いは皮下投与を用いた全身投与性の薬剤が利用されていた。

GalNAc 核酸は全てが肝臓を標的とした薬剤であり、上記の通り血中濃度の維持及び自己注射可能である利便性から皮下投与が選択されていると考えられる。一方、siRNA 担持脂質ナノ製剤は全てが癌を対象とした疾患である訳ではないが、全て静脈内投与が選択されていた。これは皮下投与を可能にする程薬液を濃縮し、投与量を低減することができないため、静脈内投与を取らざるを得ないことが理由と考えられる。

GalNAc 核酸は DDS キャリアが不要であるため、siRNA 担持脂質ナノ製剤に比べ製造上の利点は大きい、対象が現状肝疾患に限られること、投与量が高くなることが課題として挙げられる。



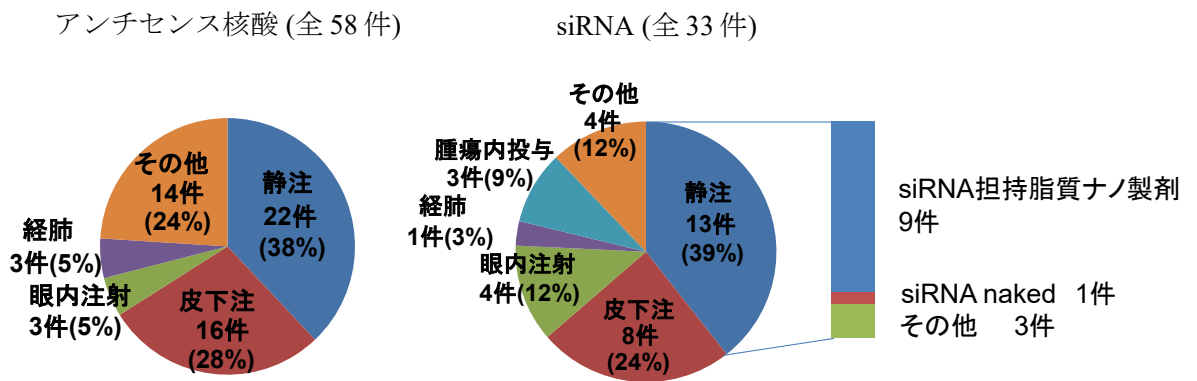


図 2-3 アンチセンス核酸及び siRNA の投与経路

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
検索日 : 2017 年 1 月 10 日)

## 2-4 開発を進めている企業/国籍に関する調査

核酸医薬品の開発企業の国籍を図 2-4 に示した。

(調査ツール：ClinicalTrial.gov, Thomson Reuters Cortellis、検索日：2017年1月10日)

アンチセンス核酸に関して、米国及びカナダの企業の開発件数が 41 件であり、全体の約 70% を占有した。Ionis 社や Sarepta 社など、既に承認実績のある米国企業は現在も複数の開発後期品目を有しており、順調に開発が進められていた。一方で、国内企業は日本新薬株式会社と第一三共株式会社が Duchenne 型筋ジストロフィーで開発を進めている 2 件のプログラムのみであった。

siRNA もアンチセンス核酸同様に、米国及びカナダの企業の開発が全体の約 70% (23 件) であった。SNALP 或いは GalNAc 核酸と言ったデリバリー技術を有する Alnylam 社及び Arbutus 社の他、眼科疾患を中心に開発を進めている Quark Pharmaceuticals など米国及びカナダの企業が順調に開発を進める他、日東電工株式会社は肝臓の肝星細胞への集積性向上のためにビタミン A を表面に担持した LNPs (Lipid-nanoparticles) 製剤で順調に開発を進めており、肝硬変を適用に現在 P2 試験が実施されている (NCT02227459)。その他、名古屋大学或いは国立がんセンターでは共に腫瘍内投与の薬剤を用いた医師主導治験が進められている (UMIN000016330)。

アプタマー及び miRNA では、国内企業の開発は見られず、米国或いは欧州の企業で開発が進められていた。

結果、4 種の核酸医薬品は全て米国及びカナダの企業が中心に開発が進められており、そのほとんどはバイオベンチャーであり、国内企業或いは海外のメガファーマの参入は僅かであった。平成 28 年に特許庁から核酸医薬品に関わる特許出願の動向に関する報告書が提出されており、その中で 1980 年から 2013 年の約 30 年間での特許出願件数は 28,655 件であり、その出願人の約 50%が米国籍、20%が欧州国籍、10%が日本国籍と解析している<sup>19</sup>。Ionis 社或いは Alnylam 社と言った米国企業が出願数の上位を占め、また核酸配列や修飾方法と言った主要特許を押さえている状況が報告されている<sup>19</sup>。そのため、国内企業或いはメガファーマの参入にはライセンス契約もしくは企業買収の必要があるため、参入が難しい状況であることが考えられた。また特に siRNA の開発に必要な DDS 技術に関して、カナダの Albutus 社の SNALP 技術や米国 Alnylam 社の GalNAc 核酸に代表される技術の多くは米国或いはカナダの企業が所有している点も開発件数の多さに繋がっている。

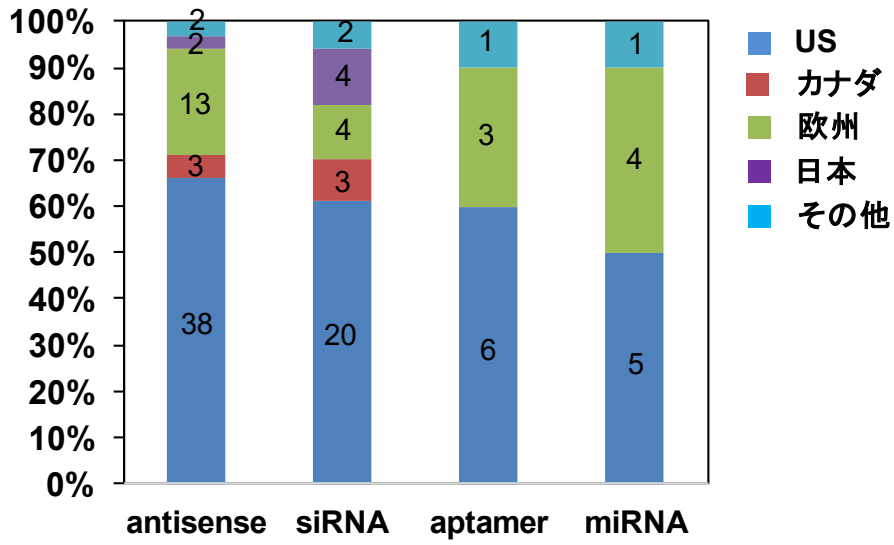


図 2-4 核酸医薬品を開発している企業の国籍

(Thomson Reuters Cortellis 及び ClinicalTrials.gov の検索結果をもとに著者作成,  
 検索日：2017年1月10日)

## 2-5 siRNA のデリバリー技術に関する調査

### 2-5-1 siRNA Delivery Technologies

siRNA を効率良く標的患部に送達し、機能を発揮させるためには、デリバリー技術の開発が鍵となる。種々研究は進められているものの、臨床応用されているものは、Lipid Based Nanoparticle、Polymer Based Nanoparticles、Conjugated Delivery Systems に大きく大別される (図 2-5)<sup>3, 36</sup>。

ナノ粒子を用いることで、血中で siRNA の分解を防ぐことの他に、Doxil®等でも知られる enhanced permeability and retention (EPR) 効果による治療戦略を目的としている<sup>37</sup>。しかしながら、標的細胞での取込み、或いはエンドソームから siRNA が細胞質に移行し RISC (RNA-induced silencing complex) に取込まれる効率が低い点が大きな課題となっている<sup>7, 21, 38</sup>。

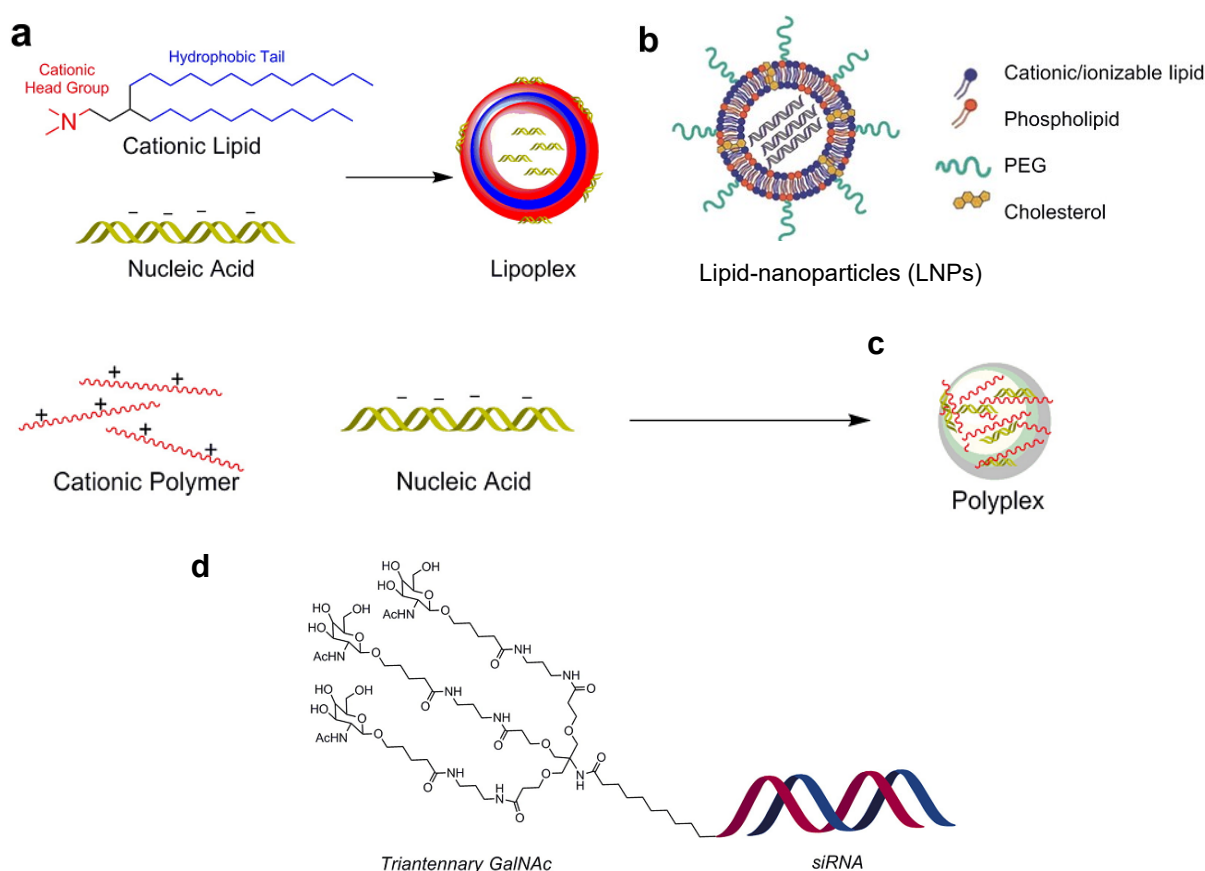


図 2-5 臨床応用されている siRNA デリバリー技術 (文献情報<sup>36</sup>をもとに著者作成)

Lipid Based Nanoparticles, a; Lipoplex, b; Lipid-nanoparticles (LNPs),  
Polymer Based Nanoparticles, c; Polyplex, Conjugated Delivery Systems, d; GalNAc-siRNA

## 2-5-2 Lipid Based Nanoparticles

### 2-5-2-1 Lipoplex Delivery Technology, Silence Therapeutics

Atugen AGを買収したSR Pharmaが、2007年に現在のSilence Therapeuticsに社名を変更して設立された。Atugen AGはprotein kinaseの発現を抑制する新規ターゲットを見出し、独自に開発したsiRNA配列であるAtu027がヒト前立腺癌株を移植したマウスで腫瘍の増殖を抑えることを見出した<sup>39, 40</sup>。Atu027は血管内皮に多く発現するProtein Kinase N3 (PKN3)を抑制し、種々細胞の癌化に関与するphosphoinositide 3-kinase (PI3K)の活性化の下流シグナルの伝達を遮断することが知られている<sup>41</sup>。また、Atu027は2'-OMe化修飾を行い、免疫刺激性の低下及び血中安定性の向上を行っている<sup>42</sup>。

一方、siRNA 或いは miRNA の送達技術として、脂質類を用いた AtuPLEX™ 技術を展開している。AtuPLEX™ は AtufECT01 ( $\beta$ -L-arginyl-2,3-L-diaminopropionic acid-*N*-palmityl-*N*-oleyl-amide trihydrochloride) と呼ばれる新規カチオン性脂質、中性脂質である DPhyPE (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphanolamine)、及び PEG-DSPE (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol amine-*N* [amino (polyethylene glycol)-2000])を含んでおり、これらから成るカチオン性リポソームに siRNA である Atu027 を混合し、粒子径約 100 nm の lipoplex を形成しており、血管内皮を標的に静脈内投与性の薬剤として開発が進められている<sup>43-45</sup>。AtufECT01/DPhyPE/PEG-DSPE の構成比率は 50/49/1 であることが知られている<sup>46</sup>。

2013年4月に gemcitabine との併用による膵臓癌を対象としたフェーズ 1b/2a 試験 (NCT01808638) が開始されたものの<sup>47</sup>、2017年3月に開発の中止が発表された。中止要因の詳細は報告されていない。

### 2-5-2-2 Stable Nucleic Acid Lipid Particles (SNALP), Arbutus Biopharma

2007年に Inex Pharmaceuticals からスピノフして Tekmira Pharmaceuticals が設立された。

Zimmermann らはアポリポ蛋白質 B (ApoB) を標的とした siRNA を新規の脂質複合体である SNALP に封入し、静脈内投与により効率的に肝臓で作用を示すことを見出し、ヒト以外の霊長類で初めて有用な薬剤となることを報告した<sup>31</sup>。SNALP は新規のカチオン脂質 DLinDMA (1,2-dilinoleyloxy-*N,N*-dimethyl-3-aminopropane)、DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、cholesterol、PEG 脂質から構成されており、約 80 nm の平均粒子径を持つ脂質粒子である。エタノールに溶解した脂質溶液と低 pH の buffer に溶解させた siRNA 水溶液を混合し、更に希釈によりエタノール濃度を低下することで安定な SNALP が形成される<sup>48</sup>。SNALP の粒子表面は、血中投与後中性であるのに対し、細胞に取込まれた後の酸性環境下ではカチオニックな性質を帯び、エンドソームとの膜融合を促進させることで siRNA が細胞質に放出されると考えられている<sup>49</sup>。

SNALP は静脈内投与後、肝臓に集積しやすいことが知られているが、血中で粒子表面にアポリポ蛋白質 E (ApoE) を結合し、肝実質細胞の low-density lipoprotein receptor (LDLR) を介したエンドサイトーシスによるものと報告されている<sup>49</sup>。現在 SNALP を用いた臨床試験は計 6 件実施されており、中でも肝実質細胞のトランスサイレチンの発現を阻害し、アミロイドーシスを対象とした patisiran (ALN-TTR02) は現在第 3 相の臨床試験が実施されており (NCT 01960348)、最も実用化に近い薬剤であることが知られている<sup>50</sup>。

### 2-5-2-3 SMARTICLE, Marina Biotech Pharmaceuticals

POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)、CHEMS (Cholesteryl hemisuccinate)、及び MOCHOL (Cholesteryl-4-([2-(4-morpholinyl)ethyl]amino)-4-oxoburanoate) を構成成分として含む脂質粒子であり、pH 応答性を有するのが特徴である (SMARTICLE 技術)<sup>51, 52</sup>。構成脂質のうち、DOPE は膜融合を促進することが知られている。MOCHOL の pKa は 6.5 であり、低 pH での製剤調製時にカチオン性を示し、核酸を効率良く粒子に封入することができる。粒子表面がアニオンである方が血中での免疫毒性等が低いことも知られており<sup>53, 54</sup>、SMARTICLE は血中投与後に MOCHOL 及び CHEMS の脱プロトン化により粒子表面はアニオン性を示し、細胞に取込まれた後に再度粒子表面がカチオン性を示すことで効率良いエンドソームエスケープが達成できることを見出している<sup>51</sup>。2007 年に ProNAi Therapeutics は single strand DNA 干渉技術を用いた PNT-100 を標的とする全ての適応症において、SMARTICLE の使用権利を獲得し、2008 年から PNT-2258 として臨床試験を開始した。PNT-100 は種々の癌細胞で発現が確認されている BCL-2 遺伝子の発現を抑える 24 塩基対の single-strand の DNA であり、それを含む SMARTICLE 製剤である PNT-2258 は非ホジキンリンパ腫及びびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫を適用として P2 試験が進められていたが (NCT01733238, NCT02226965)<sup>55</sup>、2016 年 6 月に十分な薬効を示さなかったことから開発の中止を発表している<sup>56</sup>。

また、Mirna Therapeutics 社は様々な癌プロモーターに関与する miRNA-34 の補充療法として SMARTICLE を用いた MRX34<sup>57</sup> を、固形癌を対象として P1 試験を行っていたが (NCT01829971)<sup>58</sup>、こちらも死亡例含めた毒性発現のために 2016 年 9 月に開発の中止を発表している<sup>59</sup>。

## 2-5-3 Polymer Based Nanoparticles

### 2-5-3-1 RONDEL, Arrowhead Research

Calando Pharmaceuticals はシクロデキストリンを用いたポリマー、トランスフェリンを標的とした ligand、adamantane 結合 PEG 脂質を構成成分とした RONDEL 技術が *in vivo* で効率的に siRNA を送達できることを見出した<sup>60,61</sup>。

M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) を標的とした siRNA を搭載した CALAA-01 として 2008 年から臨床試験を開始したが (NCT00689065)、2009 年に開発の中止を発表している。Calando Pharmaceuticals は 2008 年に Arrowhead Research に統合された。

## 2-5-4 Conjugated Delivery Systems

### 2-5-4-1 Dynamic Polyconjugates (DPC), Arrowhead Research

エンドソームエスケープの効率が DDS キャリアを用いた薬剤開発の鍵と考え、膜透過性 peptide 或いはエンドソームの低 pH 環境に応答するポリマーを用いた Dynamic Polyconjugates (DPC) 技術を展開している。siRNA をジスルフィド結合で導入したポリマー側鎖に pH 応答性の CDM (carboxylated dimethyl maleic acid) を介して ligand 或いは PEG を結合する。5-20 nm の粒子サイズであり、ligand による特異的な細胞取込み、低毒性、高いエンドソームエスケープ能を併せ持つことを報告している<sup>62</sup>。膜透過性 peptide (melittin-like membranolytic peptide, MLP) を用いた ARC-520<sup>63</sup> が HBV を適用として臨床開発が進められていたが (NCT02349126)、2016 年 11 月に中止が発表されている。中止理由の詳細は明らかにされていない。

### 2-5-4-2 GalNAc Conjugate Delivery System, Alnylam Pharmaceuticals

肝実質細胞に多く発現しているアジアロ糖蛋白受容体に強く結合する trivalent (triantennary) N-acetylgalactosamine (GalNAc) を核酸分子に結合することで、DDS キャリアを用いなくても効率的に肝臓で薬効を発現させることに成功した<sup>29</sup>。GalNAc を結合した siRNA は現在 8 件のプログラムが臨床開発を進められている他、アンチセンス核酸<sup>64</sup> 或いは miRNA<sup>65</sup> に結合させた薬剤の非臨床開発も進められている。DDS キャリアを用いないため、GalNAc 核酸は CMC 上のコントロールが比較的容易である利点を有している。しかしながら、肝臓の疾患しか狙えない点、及び比較的投与量が多くなる点に難点を抱える。肝実質細胞のトランスサイレチンの発現を阻害し、アミロイドーシスを対象としたとした薬剤として、SNALP 型である patisiran (ALN-TTR02) と GalNAc 核酸である revusiran (ALN-TTRsc) の両方で P3 試験を実施していたが、revusiran (ALN-TTRsc) に関してプラセボ群と比較し、薬剤投与群で有意な死亡者数例の増加が認められたため開発を中止している<sup>66</sup>。これは投与量の高さが要因として指摘されており、修飾パターンを変え安定化した GalNAc 製剤 (Enhanced Stabilization Chemistry, ESC) に切替えて開発を行っている。

## 2-6 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の非臨床試験

アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性及び安全性がどのように異なるか、具体的に有効性を示す投与量の違い、標的臓器或いは組織の違い、毒性所見などを調査し、両者の違いを分析した。

アンチセンス核酸として既承認薬である Mipomersen (高コレステロール血症) 及び Oblimersen (抗癌剤) の 2 製剤、及び siRNA 担持脂質ナノ製剤として ALN-TTR02 (トランスサイレチンアミロイドーシス) 及び ALN-VSP02 (抗癌剤) の 2 製剤のサルを用いた非臨床試験での毒性所見の違いを表 2-6 にまとめた<sup>67-70</sup>。

アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤は、共に免疫刺激性 (脾臓の肥大、炎症性細胞の浸潤など) が特徴であり、質的な毒性所見は共通していることが分かる。アンチセンス核酸は肝臓・腎臓、siRNA 担持脂質ナノ製剤は肝臓・脾臓の病理変化が認められた。一方で、脂質成分の中でも特に人工合成物であるカチオン脂質由来の強い毒性は見られなかった。一般的にカチオン性脂質を用いると強い肝毒性の発現が指摘されるものの、今回調査した ALN-TTR02 及び ALN-VSP02 は非臨床で徹底的にカチオン脂質のスクリーニングが行われており、低毒性のものが見出されているため、それに起因する強い毒性は見られなかったと考えられる。また、アンチセンス核酸に対して、siRNA 担持脂質ナノ製剤の投与量は 1/10 以下であり、投与量が低いことも低毒性の要因に繋がっていると考えられた。

表 2-6 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の非臨床毒性所見の違い<sup>67-70</sup>  
(文献情報をもとに著者作成)

薬剤名	種類	適用疾患	最大無毒性用量 (NOAEL)	毒性所見
Mipomersen (既承認)	アンチセンス	高コレステロール血症	10 mg/kg	30 mg/kg : 炎症性細胞浸潤を伴う血管壁の肥厚 ≥3 mg/kg : 免疫刺激性 (巨脾、リンパ節肥大、補体の活性化)、肝、腎の病理的な変化 ≥1 mg/kg : 多臓器への単核球浸潤
Oblimersen (P3 中止)	アンチセンス	癌 (メラノーマ)	30 mg/kg	免疫刺激性 (巨脾、リンパ節肥大、多臓器への単核球浸潤、補体の活性化)、肝、腎の病理的な変化、APTT 延長
ALN-TTR02 (P3 試験中)	siRNA 担持脂質ナノ製剤 (LNPs)	TTR Amyloidosis	-	免疫刺激性 (肝臓への炎症性細胞浸潤、炎症性サイトカイン産生)、肝の病理的な変化、トランスアミナーゼの上昇
ALN-VSP02 (P2 試験中)	siRNA 担持脂質ナノ製剤 (LNPs)	癌 (肝)	1 mg/kg	≥3 mg/kg : 免疫刺激性 (脾臓のリンパ節萎縮、赤脾の減少、組織球増殖症)



## 2-7 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の臨床試験

Mipomersen 及び Oblimersen のアンチセンス核酸 2 製剤、また ALN-TTR02 及び ALN-VSP02 の siRNA 担持脂質ナノ製剤 2 製剤のヒトでの臨床試験での毒性所見の違いを表 2-7 にまとめた<sup>3, 50, 67, 68, 70-74</sup>。

ヒトでの臨床試験においても、アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の有害事象は共通しており、主に infusion reaction、flu 様症状、サイトカイン産生或いは補体の活性化を含めた免疫刺激性であった。また、それらはヒトとサルで同程度の用量で認められており、種差は認められなかった。リポソーム製剤の投与でも頻繁に infusion reaction の発生が報告されており、補体の活性化との関連が指摘されている<sup>75</sup>。また、核酸自体にも補体を活性化することが知られている<sup>75</sup>。Flu 様症状は補体或いは炎症性サイトカインが関与する偽アレルギー反応と考えられるため、非臨床でのモニタリングが非常に重要と言える。

薬剤の投与量に関して、Mipomersen 或いは Oblimersen は皮下投与の製剤であり、数 mg/kg の用量を毎日投与する必要がある。有効性を示すには、DDS キャリアを用いる siRNA 担持脂質ナノ製剤に比べ、高い投与量が必要となり、薬剤費の観点からも大きな課題となっている。Mipomersen の臨床試験では、ALT 及び AST の上昇と共に脂肪肝の所見が認められている。Mipomersen は ApoB の発現を抑制することが作用メカニズムであり、その結果として脂肪が肝臓に蓄積されると考えられている<sup>67</sup>。このように強い肝毒性が指摘されており、Mipomersen は EMA では承認されていない。

表 2-7 アンチセンス核酸及び siRNA 担持脂質ナノ製剤の臨床試験での有害事象 3, 50, 67, 68, 70-74  
(文献情報をもとに著者作成)

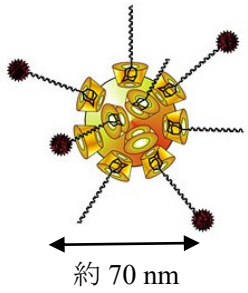
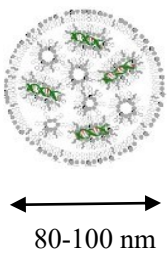
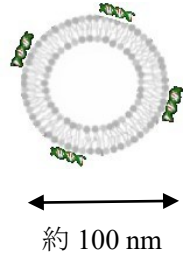
薬剤名	種類	適用疾患	ヒトへの投与量	有害事象
Mipomersen (既承認)	アンチセンス	高コレステロール血症	200 mg qw, (3 mg/kg)	Infusion site reaction (約 80%) Flu 様症状 (約 30%) ALT 上昇 (約 10%) 脂肪肝の増大 (On-target) 糸球体腎炎 (1/141 例)
Oblimersen (P3 中止)	アンチセンス	癌 (メラノーマ)	0.6-6.5 mg/kg Daily	6.5 mg/kg : DLT はなし Grade 3 貧血 Grade 2-3 リンパ球減少, 虚血性発作 Grade 2-3 APTT の延長 4.5-6.5 mpk : Grade 3 AST、ビリルビンの上昇 発熱、疲労感、咳、低血圧、悪心、 発汗
ALN-TTR02 (P3 試験中)	siRNA 担持 脂質ナノ製剤 (LNPs)	TTR Amyloidosis	0.01-0.5 mg/kg	0.5 mg/kg で infusion reaction
ALN-VSP02 (P2 試験中)	siRNA 担持 脂質ナノ製剤 (LNPs)	癌 (肝)	0.1-1.5 mg/kg q2w	≥ 1.25 mg/kg : DLT Grade 3 低カリウム血症 Grade 3 血小板減少 Grade 1-2 悪寒 ≤ 1 mg/mg : 炎症性反応 (IP-10, IL-1a, GCSF, IL-6, Bb の上昇) Infusion reaction (15%) 肝機能の低下 (ALT, AST, TBIL 上昇)

## 2-8 DDS キャリアの違いによる siRNA 製剤の安全性の違い

siRNA を用いた DDS 製剤として、臨床試験で利用されているものは大きく、ポリマーを用いたものと脂質を用いたものに分けられる (2-5 項参照)。脂質を用いたものは更に、Lipid-nanoparticles (LNPs) 型と lipoplexes 型に分けられる。そこで、ポリマーを用いたもの (CALAA-01)、脂質を用いた LNPs 型 (ALN-VSP02 及び TKM-PLK1) 或いは lipoplexes 型 (Atu027) の臨床試験での安全性の比較を行い、DDS キャリアの違いが安全性に与える違いを評価した。

各製剤の製剤学的特徴及び第 1 相臨床試験の試験デザインを表 2-8 にまとめた<sup>3, 43, 60, 61, 74, 76</sup>。いずれも平均粒子径 70-100 nm 程度の微粒子であり、カチオン性のポリマー或いは脂質を用いて、アニオン性である siRNA と静電相互作用を主な作用として微粒子を形成する。ALN-VSP02 或いは TKM-PLK1 で用いられる LNPs は siRNA を内封した脂質複合体であるのに対し、Atu027 で用いられている lipoplexes はカチオン性のリポソームに siRNA を添加する調製手法であり、siRNA が粒子表面に局在しやすいと言われているものの、詳細な構造情報は不明である<sup>76, 77</sup>。

表 2-8 種々 DDS キャリアを用いた siRNA 製剤<sup>3, 43, 60, 61, 74, 76</sup> (文献情報をもとに著者作成)

			
薬剤名	CALAA-01	ALN-VSP02, TKM-PLK1	Atu027
siRNA	RPM2	VEGFA/KSP, PLK1	PKN3
DDS キャリア	ポリマー	脂質 (LNPs)	脂質 (Lipoplexes)
企業	Arrowhead Research	Alnylam, Arbutus	Silence Therapeutics
対象疾患	固形癌	肝癌	肺癌/膵癌
開発ステージ	中止	P2	P2 (中止)
特徴	シクロデキストリンを用いた平均粒子径約 70 nm のポリマー微粒子	EtOH に溶解した脂質溶液と siRNA 水溶液を混合して形成する平均粒子径 80-100 nm の脂質微粒子	カチオン性リポソームに siRNA を添加し、静電相互作用により複合体を形成する平均粒子径約 100 nm の脂質微粒子
P1 の試験デザイン	患者数：24 名 投与量：0.1-1.0 mg/kg 15 min i.v. infusion 2 回/W (計 4 回投与)	患者数：41 名 投与量：0.1-1.5 mg/kg 15 min i.v. infusion 1 回/W (計 4 回投与)	患者数：34 名 投与量：0.001-0.336 mg/kg 4h i.v. infusion 2 回/W (計 8 回投与)

各製剤の臨床試験での有害事象を表 2-9 にまとめた<sup>3, 70, 74, 78</sup>。

DDS キャリアの違いに関わらず、有害事象の内容は同様であった。しかしながら、DLT (Dose Limiting Toxicity) は lipoplexes である Atu027 はポリマーを用いた CALAA-01 或いは LNPs (ALN-VSP02, TKM-PLK1) に比べ低い投与量から有害事象が認められている。これらは製剤に用いている材質 (siRNA、ポリマー或いはカチオン脂質) が異なり直接的な比較はできないが、lipoplexes は低用量から有害事象が発生しやすいのかもしれない。一方で、補体の活性化或いはサイトカイン産生と言った免疫刺激性の強さは DDS キャリアのタイプの違いに関わらず同様の傾向であった。

表 2-9 siRNA 製剤の臨床試験での有害事象のまとめ<sup>3, 70, 74, 78</sup> (文献情報をもとに著者作成)

薬剤名	DDS キャリア	ヒトへの 投与量	DLT (Dose Limiting Toxicity)	有害事象	補体活性或いはサイ トカイン産生
CALAA-01	ポリマー	0.1-1.0 mg/kg 30 min i.v. infusion 2回/W	1.0 mg/kg	疲労、悪寒、リンパ球 減少症、アレルギー反 応、低ナトリウム血 症、虚血性大腸炎、下 痢、発熱	補体の活性は無し IL-6, IL-10, TNF, IFN $\gamma$ の産生
ALN- VSP02	脂質 (LNPs)	0.1-1.5 mg/kg 15 min i.v. infusion 1回/W	1.25 mg/kg	疲労、無力症、嘔吐、 発熱、infusion reaction、脾臓増大血小 板減少、低カリウム血 症	補体の活性は無し IL-10, IL-1a, IL-6, GCSF, TNF の産生
TKM-PLK1	脂質 (LNPs)	0.15-0.90 mg/kg 30 min i.v. infusion 1回/W	0.9 mg/kg	発熱、疲労、頭痛、味 覚障害、infusion reaction、嘔吐、下痢、 サイトカイン産生、酸 素欠乏、呼吸困難、血 小板減少、	補体の活性は無し IL-6, MCP1, IL-8 の産 生
Atu027	脂質 (Lipoplexes)	0.336 mg/kg 4h i.v. infusion 2回/W	0.336 mg/kg	疲労、脱毛、発汗、腹 痛、下痢、リバーゼ上 昇	C3a, Bb, SC5b-9 の上 昇 サイトカイン産生は 無し

## 2-9 従来の DDS 製剤と siRNA 担持脂質ナノ製剤との毒性比較

従来の DDS 製剤として Doxil<sup>®</sup>を選定し、siRNA 担持脂質ナノ製剤と毒性情報を比較した。Doxil<sup>®</sup>は主薬であるドキソルビシン塩酸塩をリポソームに封入した注射用製剤であり、腫瘍における蓄積性を向上させることを目的に粒子の表面を PEG で修飾している。透過性が亢進した腫瘍内の毛細血管系より腫瘍組織の間質腔に蓄積し、リポソームから放出されたドキソルビシンが腫瘍細胞の増殖を抑制すると報告されている<sup>79</sup>。さらに、腫瘍組織及び炎症部位では正常組織に比べホスホリパーゼ A2 (PLA2) 活性が高まっていることが知られており、患部に蓄積した Doxil<sup>®</sup>は PLA2 により粒子構造が破壊され、ドキソルビシンが放出することで腫瘍細胞の増殖を抑制すると言われている<sup>79</sup>。

Doxil<sup>®</sup>の毒性所見を表 2-10 にまとめた<sup>80</sup>。ナノ医薬品に共通する有害事象として infusion reaction 或いは肝機能障害が認められている。また、リポソーム化したことで血中滞留性が向上し、末梢血管まで製剤が到達しそこでリポソームから漏出した主薬によって手足症候群が高頻度で発生している。その他心筋障害、骨髄抑制或いは口内炎などは主薬であるドキソルビシン塩酸塩による毒性と考えられている。

一方、主薬であるドキソルビシン塩酸塩を含まないプラセボリポソームをイヌに静脈内投与したところ、infusion reaction 及び一過性の血圧低下が見られた<sup>79</sup>。そのため infusion reaction は有効成分の有無に関わらずリポソーム製剤全般で発生することが分かる。抗ヒスタミン薬の前投与により infusion reaction の発生頻度を抑えることができることから、偽アレルギー反応が主体であることが示唆されている。

siRNA 担持脂質ナノ製剤でも infusion reaction 或いは肝臓・脾臓への毒性は発生するが、Doxil<sup>®</sup>に比べてより強い炎症性のサイトカイン産生といった免疫刺激が認められている点が大きく異なる。これはナノ医薬品としての毒性だけでなく、核酸に由来する毒性が見えているためと考えられる。TLRs など自然免疫に関与する受容体タンパク質を介する免疫刺激を如何に制御するかが大きな課題と言え、siRNA 担持脂質ナノ製剤は Doxil<sup>®</sup>に比べてより毒性コントロールの必要性があると考えられた。

表 2-10 Doxil®の臨床試験での主な毒性所見<sup>80</sup> (参考文献情報をもとに著者作成)

適応	主な毒性
<ul style="list-style-type: none"> <li>・がん化学療法後に増悪した卵巣癌</li> <li>・エイズ関連カポジ肉腫</li> </ul>	<p>&lt;再発卵巣癌：国内 P2 試験 (n = 74) &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・心筋障害 (頻度不明)*</li> <li>・骨髄抑制(白血球数減少 93.2%、好中球数減少 93.2%、血小板数減少 60.8%、ヘモグロビン減少 85.1%、赤血球数減少 75.7%)*</li> <li>・ Infusion reaction (18.9%)</li> <li>・手足症候群 (78.4%)</li> <li>・口内炎 (77.0%)*</li> <li>・肝機能障害 (頻度不明)</li> <li>・間質性肺疾患 (頻度不明)</li> <li>・肺塞栓症 (頻度不明)</li> <li>・深部静脈血栓症 (1.4%)</li> </ul> <p style="text-align: center;">*主薬 (ドキシソルピシン塩酸塩) による毒性</p>

## 2-10 まとめ

本章では、核酸医薬品の開発状況を調査し、siRNA の実用化が進まない技術的な課題を分析した。

siRNA に関する臨床プログラムの内訳を精査したところ、約 60%が癌や感染症を対象疾患とした全身投与性の薬剤として開発が進められていることが分かった。siRNA は血中での安定性等の問題から単独での全身投与が難しいため、多くの場合脂質或いはポリマーを用いた複合体としての開発戦略が取られている。しかしながら、その複合体を目的の細胞に効率よく送達させるだけでなく、細胞内への取込み、エンドソームから細胞質への薬物リリース、細胞質中で RISC へ取込まれて目的とする mRNA の切断など、多くの過程を制御する必要がある点、また用いる siRNA 或いはカチオン性脂質やポリマーによる毒性回避の必要があり、現状すべてを解決している薬剤はなく、薬物送達の技術的課題が siRNA の開発上の最も大きな要因であることが抽出された。siRNA の開発を先行している米国 Alnylam 社は、有用な他社の薬物送達技術 (Arbutus 社, SNALP 技術) を利用しており、迅速な開発スピードは薬物送達技術の完成度に直結していると言える。一方で、全身投与性の薬剤に関して薬物送達技術の開発の難易度が非常に高いことから、DDS キャリアが不要である GalNAc 核酸を用いた皮下投与プログラムへの切替えが近年進んでいる。GalNAc 核酸は CMC の観点である製造面での利点は大きいですが、対象疾患が現状肝疾患に限られること、投与量は siRNA 担持脂質ナノ製剤に比べ高いことなどが課題点として挙げられる。

siRNA の開発に重要となる薬物送達技術或いは GalNAc 核酸に関する技術的な課題に加え、これら特許或いは標的遺伝子に対する siRNA の配列特許も広く欧米のベンチャー企業に抑えられており、知財面からも日本企業を含めた企業の開発参入を困難にしている現在の開発状況が明らかとなった。

siRNA 担持脂質ナノ製剤の非臨床及び臨床試験における有効性及び安全性の評価に関する調査を行った結果、アンチセンス核酸に比べ siRNA 担持脂質ナノ粒子は低い投与量から薬効を示すものの、アンチセンス核酸と同様に infusion reaction、flu 様症状、サイトカイン産生或いは補体の活性化と言った共通の有害事象が見られており、現状そのコントロールが難しいことが分かった。また、それら有害事象は siRNA の開発に用いられる DDS キャリアのタイプに関わらず見られた。アンチセンス核酸は肝臓及び腎臓に病理変化が認められやすいのに対し、LNPs 及び lipoplexes は肝臓及び脾臓への病理変化が認められやすい傾向が見られたが、これはサイズの違いに起因すると考えられる。ナノ粒子での肝臓・脾臓への病理変化は Doxil<sup>®</sup>などのリポソーム製剤含めたナノ医薬品に共通する毒性所見であったが、Doxil<sup>®</sup>では siRNA 担持脂質ナノ製剤で見られる免疫刺激による毒性所見は報告されていないため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発にはそれをいかに開発の早期に確度高く評価できるかが非常に重要であり、大きな課題と考えられる。

開発中の lipoplexes と LNPs では、対象疾患或いは投与量も異なり、有効性・安全性の比較評価はできないが、両者に共通した毒性所見が見られ、また lipoplexes の方が低い投与量から有害事象が現れる傾向が見られた。siRNA 或いはカチオン脂質を含めた製剤の構成成分を同一にして、lipoplexes 及び LNPs を作り分け、それら有効性及び安全性を直接比較することができれば、粒子の構造情報含めた製剤の品質特性がどのように有効性、安全性に関与するか、その詳細を解明できる可能性があると考えられた。

## 第3章 核酸医薬品及びナノ医薬品開発に係る法規制に関する調査

### 3-1 緒言

日米欧において、核酸医薬品に特化したガイドラインはまだ存在せず、開発企業は既存の ICH ガイドラインの適切な部分を参照しながら開発を進めている。特に核酸医薬品特有の品質・有効性・安全性を評価するための試験法或いはその判断基準も整備されていないため、開発方針は開発企業の試行錯誤の判断に委ねられており効率的かつ迅速な開発に繋がっていない。また、核酸医薬品の承認薬がまだ少なく、参照できる先例が少ないことも悪循環に繋がっていると考えられる。

本章では、日米欧の3極での核酸医薬品及びナノ医薬品開発に係る法規制動向の比較を行い、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発促進に向けた課題を考察することを目的とした。

### 3-2 核酸医薬品開発に係る政策及び法規制

#### 3-2-1 ICH ガイドラインの規制に関する現状

ICH の品質に関して、不純物に関する項目 (ICH Q3A (原薬)<sup>81</sup>, Q3B (製剤)<sup>82</sup>)、並びに規格及び試験方法の設定に関する項目 (ICH Q6A (新医薬品)<sup>83</sup>, Q6B (生物薬品)<sup>84</sup>) は核酸医薬品を対象としないことが明記されている。不純物に関する項目に関して、核酸医薬品は人工的に修飾されていることが多く、sequences failure により生じた類縁物質は従来の低分子化合物等によるものと同質に、有効性及び安全性へ与える影響に関して扱うことができるか不明であるためと考えられる。また、規格及び試験方法の設定に関して、Capaldi らはオリゴヌクレオチド原薬の品質確保に必要な項目に関する提案を行っている<sup>85</sup>。

一方、非臨床安全性に関して、ICH S6 (R1)「バイオテクノロジー応用医薬品における安全性評価」(平成 24 年 3 月 23 日 薬食審査発 0323 第 1 号)及び ICH M3 (R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請の非臨床試験実施についてのガイダンス」(平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 4 号)が通知されており、核酸医薬品も基本的にこれに従う。ICH S6 (R1) のガイドラインでは、動物種の選択、試験デザイン、免疫原性、生殖発生毒性及び癌原性評価の項目に関して記載されているものの、薬物の特性に応じた対応が必要と考えられている<sup>86</sup>。

国内では、平成 27 年度より医薬品等規制調和・評価研究事業 (ICH S6 対応研究班) が国立衛研の平林らが中心となり、核酸医薬品の安全性評価に関する議論が進められている。その中で、サロゲートを用いた毒性試験、核酸医薬品に由来する代謝物の評価、オフターゲット作用の評価、核酸医薬品のクラスエフェクトの評価などが議論され、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス誌で報告されている<sup>87-92</sup>。一方、ICH M3 (R2) では非臨床安全性試験の実施時期と試験内容が定められている。革新的な治療法 (例えば、siRNA) では、ワクチンアジュバントと同様に、特定の試験の、簡略化、延期、省略、又は追加もあり得る、と記載されており、こちらも薬物の特性に応じたケースバイケースの対応が必要であることが示唆されている。ICH S6 (R1)及び ICH M3 (R2) 共に、3R の原則に従って動物の使用を抑え (3R, 使用動物数の削減/苦痛の軽減/代替法の利用)、新しい *in vitro* 代替法の利用を考慮すべき旨が記載されている。



### 3-2-2 米国における法規制動向

FDA では Center for Drug Evaluation and Research (CDER) が核酸医薬品の審査を担当している。核酸医薬品に特化したガイドラインは作成されていないものの、Kambhampati らは非公式のガイドラインを提案している<sup>93</sup>。

The Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG) が 2007 年に設立され、欧米規制当局と 70 以上の製薬企業等が集まり、遺伝毒性、オフターゲット効果、生殖毒性、発癌性等、種々トピックスについて分科会 (subcommittee) を設け議論が進められている。

### 3-2-3 欧州における法規制動向

アンチセンス核酸の遺伝毒性に関する reflection paper が 2005 年に EMA から発信されている。その中で、① 核酸の分解物が DNA に取り込まれることにより起こる点突然変異と、② 核酸が triplex を形成することによる部位特異性変異の 2 つの課題が挙げられている。日米欧の 3 極で核酸医薬品の薬事規制に関する見解の相違も見られるが、MHRA は原則として化学合成で製造する限り低分子医薬品と同じ規制に適応するとの明確な方針を示している。

### 3-2-4 日本における法規制動向

国内では近年核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスに関する議論が活発化しており、厚生労働省の研究事業の「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」の中で、大阪大学の小比賀らのグループを中心に「核酸医薬品の臨床有効性、安全性の評価方法」<sup>94</sup> が採択されている。PMDA、国立衛研、製薬企業、製造企業などと核酸医薬品の品質管理及び非臨床安全性評価に関する議論が重ねられており、2017 年中に最終的なガイドライン案が提出される予定となっている。その他、北海道大学の松田らのグループは「ナノテクノロジーを基盤とした革新医薬品に関する評価方法」<sup>95</sup> で採択されており、脂質ナノ製剤或いはミセル製剤の品質規格の設定 (CMC) 及び評価法の開発、及び体内動態 (ADME) 評価法の確立を目指し、ガイドラインの作成が予定されている。

核酸医薬品の法規制に関して、2014 年に発出された「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表等について」(平成 26 年 1 月 10 日 薬食審査発 0110 第 1 号) 及び 2016 年に発出された「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」(平成 28 年 3 月 28 日 薬生審査発 0328 第 19 号) の適用範囲には核酸も有効成分として含まれている。更に 2016 年に「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」(平成 28 年 3 月 28 日 事務連絡) が発出され、siRNA に関するリフレクションペーパーが 3 極で初めて出された。

### 3-3 ナノ医薬品開発に係る法規制及び政策

ナノテクノロジーを医薬品に応用することで、難溶解性薬物の溶解性改善、薬物の吸収性改善、或いは DDS 製剤化による薬物の体内動態の改善など、有効性の向上或いは副作用の低減を達成できることが示されており、これまでに多くのナノ医薬品が上市されている。ナノ医薬品の中でも、これまでに承認されているリポソーム製剤を表 3-1 にまとめた<sup>96,97</sup>。

表 3-1 これまでに承認されたリポソーム製剤<sup>96,97</sup> (文献情報をもとに著者作成)

商品名	薬剤	適用	日米欧での承認時期
AmBisome	アムホテリシン B	真菌感染	欧(1990), 米(1997), 日(2006)
Abelcet	アムホテリシン B	真菌感染	米(1995)
Doxil/Caelyx	ドキソルビシン塩酸塩	エイズ関連カポジ肉腫、 卵巣癌、骨髄腫、乳癌	米(1995), 欧(1996), 日(2007)
Amphotec	アムホテリシン B	真菌感染	米(1996)
DaunoXome	ダウノルビシン	エイズ関連カポジ肉腫	米(1996)
DepoCyte	シタラビン	リンパ腫性髄膜炎	米(1999), 欧(2001)
Myocet	ドキソルビシン	転移性乳癌	欧(2000)
Visudyne	ベルテポルフィン	加齢黄斑変性症	米(2000), 欧(2000), 日(2004)
DepoDur	硫酸モルヒネ	慢性疼痛	米(2004)
Marqibo	硫酸ビンクリスチン	フィラデルフィア染色体異常 症、急性リンパ性白血病	米(2012)
Onivyde	イリノテカン	膵臓癌	米(2015), 欧(2015)

ナノ医薬品に関してこれまで計 13 報発出されている<sup>26, 27, 98-108</sup>(表 3-2)。リポソーム製剤である Doxil<sup>®</sup>が 1995 年に FDA から承認を得た後、リポソームを含むナノ医薬品が数多く上市されており、Doxil<sup>®</sup>、AmBisome<sup>®</sup>及び visudyne<sup>®</sup>のリポソーム 3 製剤に特化した後発品開発に関するドラフトガイダンスが 2010 年及び 2014 年に FDA から発出されている<sup>98, 102, 103</sup>。

表 3-2 これまでに発出されたナノ医薬品に関連する法規制文書<sup>26, 27, 98-108</sup> (著者作成)

年	規制当局	対象	法規制文書
2006	EMA	Nano-medicine	Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use
2010	FDA	Liposome	Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride
2010	EMA	Iron-based nano-medicine	Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product application
2013	EMA	Liposome	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal products
2013	EMA	Nano-medicine	Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products
2014	FDA	Nano-medicine	Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology
2014	FDA	Liposome	Draft Guidance on AmphotericinB
2014	FDA	Liposome	Draft Guidance on Verteporfin
2014	MHLW/EMA	Micelle	Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products
2015	FDA	Liposome	Draft Guidance for Industry:Liposome Drug Products
2015	EMA	Iron-based nano-medicine	Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal products
2016	MHLW	Liposome	Guideline for the Development of Liposome Drug Products
2016	MHLW	Nano-medicine	Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products

### 3-3-1 リポソーム製剤に関する法規制

#### 3-3-1-1 米国における法規制

2002年に日米欧で初めてのリポソームに関するガイダンスとなる“Guidance for Industry: Liposome Drug Products- Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, Draft”がFDAから発出された(2015年改訂)<sup>105</sup>。本ガイダンスの中で、リポソーム製剤に特化したNDA或いはANDAのために、CMC、ヒトでの薬物動態及びBioavailability(2015年の改定ではANDAが追加されBioequivalenceも追加記載)、ラベリング文書に対してFDAが推奨する考えが記載されている。また、臨床試験での有効性と安全性、非臨床試験での薬理学或いは毒性学、Bioequivalence評価、ワクチンや生物薬品を用いたリポソーム製剤、及び脂質と薬物の複合体に関しては適用外としている(2015年の改訂ではBioequivalence評価が適用内に変更)。

CMCに関して、製剤の組成、物理化学特性、製品品質に影響を与える製造工程とその管理戦略、添加剤である脂質の管理、リポソーム製剤の管理、製剤の安定性及び製造方法変更時の管理戦略の計7項目(2015年の改訂版では製剤の品質に影響するCritical Quality Attribute (CQAs)に関する項目が追加)が言及されている。リポソーム製剤は製造スケールを含む製造条件の変更時に製剤品質が変化することがあるため、開発段階で製剤の品質特性に影響を与える製造パラメータを特定し、プロセスコントロールを確立することが重要となる。また脂質は添加剤と規定しているものの、脂質の品質はリポソーム製剤の品質や機能に大きく影響するため、主薬同様の管理を推奨している。

FDAでは、リポソーム製剤のNDA或いはANDAに関して、ヒトでの薬物動態及びBioavailabilityに関するデータの提出を要求しており、本ガイドラインの中で生体試料の分析手法、*in vivo*での安定性、タンパク結合、*in vitro*での放出性評価、ヒトでの薬物動態評価及びBioavailabilityに関する計5項目について記載がある。血中でのリポソームからの薬物放出挙動或いは安定性、細胞への取込みなど薬理作用が複雑であるため、単純に血漿中の薬物濃度の測定により標的臓器或いは組織でのBioavailabilityを反映させることは難しいと考えられる。しかしながら、標的臓器或いは組織での薬物濃度測定は臨床試験では難しいため、NDAの際にヒトのBioavailabilityに関して、CDERの担当者と相談することとしている。リポソーム製剤が血中で安定であり薬物漏出を起さないか、或いは起こす場合にはリポソーム内封薬物と遊離薬物の割合がどの程度か評価する必要がある。また、血中でのリポソーム製剤の安定性は、血中タンパク質の結合に大きく影響を受けるため、主要な結合タンパク質を特定することに言及している。リポソーム製剤と内封薬物単独での投与では、体内動態が大きく異なることが考えられるため、同じ投与経路での主薬の吸収、分布、代謝及び排泄(ADME)の比較を行い、リポソーム化の妥当性を評価することが推奨されている。一方、*in vitro*での薬物放出試験に関して、リポソーム製剤の品質、プロセスコントロールの妥当性、長期の薬物放出挙動、或いは製造条件変更等の影響が確認でき、場合によっては*in vivo*評価より有用であるとしている。

### 3-3-1-2 欧州における法規制

先発品を参照して開発されるリポソーム製剤に関する品質、非臨床及び臨床データの作成を支援することを目的に、“Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product”がEMAより2011年にドラフト版が発出されている(2013年に最終化)<sup>100</sup>。本リフレクションペーパーでは、安全性及び有効性に関する先発品との同等性/同質性(Comparability)を科学的に示す根拠データの提出が求められている。FDAのガイダンスでも後発品を適用範囲内としており、先発品との同等性はBioequivalenceを用いているのに対し、本リフレクションペーパーではComparabilityを用いている点異なる。製法変更前後の製剤間の同等性/同質性(Comparability)評価に関して、ICH Q5E「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の製造工程の変更に伴う同等性/同質性評価について」(平成17年4月26日薬食審査発0426001号)に記載があり、同等性/同質性は必ずしも同一であることを要求しているのではなく、類似性が高く、仮に品質特性に何らかの差異があったとしても、最終製品の安全性や有効性に影響を及ぼさないことが保証できることを要求している。リポソームの内包薬物は主に低分子化合物であり、その同等性を示すことは可能であるものの、リポソーム製剤化することで、体内動態を含め先発品と全く同一のプロファイルを提示することは難しいと考えられるため、最終的な安全性或いは有効性に影響を及ぼさないことを保証し、同等性/同質性を示すことが重要との考えからComparabilityの表現を用いていると考えられる。製剤の品質に関する検討のみで有効性及び安全性に影響しないことを示すことができなければ、臨床試験の前に追加的な非臨床試験を行い、同等性/同質性を保証する必要がある。そのため、FDAのガイダンスと異なり、非臨床或いは臨床試験での薬物動態評価の他に、薬力学評価或いは毒性試験を行い、先発品との同等性/同質性を評価することが推奨されている。その他、毒性試験に関し、リポソーム製剤では急性の輸注反応が多いことが知られているため、補体活性化の測定(及び/又はマクロファージや好塩基球の活性化測定)や補体の活性化が惹起するアレルギー反応(CARPA, Complement Activation-Related Pseudo Allergy)を適切な動物モデルを用いた試験を行い、有害事象発現の可能性を評価することとされている。

### 3-3-1-3 日本における法規制

国内では2016年に“Guideline for the Development of Liposome Drug Products”「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」(平成28年3月28日薬生審査発0328第19号)<sup>107</sup>が発出されている。本ガイドラインでは、化学・製造及び品質管理、非臨床試験、及びヒト初回投与試験において考慮すべき事項の3項目が記載されている。記載内容はFDAのガイダンス(Guidance for Industry: Liposome Drug Products)に記載されているCMCに関する内容、及びEMAのガイダンス(Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product)に記載されている非臨床試験全般に関する内容が記載されており、最もバランスの取れた内容となっていると考えられる。また、対象とする有効成分として、低分子化学合成品の他、核酸、又はペプチドやタンパク質等の生物起源若しくはバイオテクノロジー由来成分を規定しているのも本ガイドラインのみである。

化学・製造及び品質管理に関して、記載内容はFDAのガイダンスに非常に似ており、組成・性状、製剤設計及び特性解析、リポソーム製剤の製造工程及び品質管理、リポソーム構成成分の管理、リポソーム製剤の管理、安定性、製法の変更の計7項目に関して記載されている。リポソーム製剤の品質特性、薬物動態学的特性、薬力学的特性及び安全性プロファイルは、脂質組成を含めた処方大きく依存する可能性があるため、製剤処方開発の経緯とその適切性を示すこととしている。また、リポソーム化の目的及び用途に応じた品質・非臨床・臨床上的プロファイルについて明確にすること。また、その上で、剤型及び処方を含めた製剤設計、品質特性、製造方法、容器施栓システム、使用方法等が、使用目的に合うことを裏付けるために実施された開発段階での検討について製剤開発の経緯として記述することを求めている。

一方、非臨床試験に関する内容は、EMAのリフレクションペーパー記載と似ており、大きく薬物動態、薬力学、及び毒性試験の3項目に分けられる。製法の変更により、安全性及び有効性に影響が生じることが想定される場合には、製剤の品質特性への影響評価に加え、非臨床試験による安全性及び有効性の評価が必要となる。非臨床毒性試験として、新有効成分含有医薬品に準じた評価が必要あり、その他追加の試験として、EMAリフレクションペーパーにも記載されている輸注反応のための補体活性化の測定、血液毒性、抗原性或いは免疫毒性が想定される。

ヒト初回投与試験を検討する際は、リポソーム製剤及び有効成分の非臨床薬物データ、予想される臨床使用法及び投与経路など、リポソーム製剤に特有の情報を考慮することが重要となるとしており、FDA及びEMAのガイダンスと概ね記載内容は同様である。

### 3-3-1-4 日米欧3極の記載内容の比較

リポソーム製剤の開発に関する法規制文書の日米欧3極の記載内容を表3-3にまとめた。FDAはCMCに関してかなり詳細に記載されており、開発段階で製剤の品質特性に影響を与える製造パラメータを特定し、プロセスコントロールを確立することを求めている。また、リポソームの品質を評価するための分析手法についても詳細に記載されている。一方、EMAはCMCに特化した記載はないが、代わりに品質(Pharmaceutical Quality)に関する項目を設けており、有効性及び安全性に影響を与える製剤特性を把握することを求めている。MHLWはFDAの記載内容と同様にCMCに関して詳細に記載されており、製剤処方開発の経緯とその適切性を示すことを推奨している。FDAとMHLWに関して、EMAが設けている品質(Pharmaceutical Quality)に関する直接の記載はないが、CMCの項で記載している内容に含まれるため、表中では△で記載している。

非臨床試験に関して、FDAでは薬物動態評価は求めているものの、薬力学評価或いは毒性評価は範囲外としている。一方、EMAでも薬物動態評価を求めている他、製剤の品質で有効性或いは安全性の保証が示せない場合、非臨床試験で薬力学評価或いは毒性評価を行い、同等性/同質性を評価することが推奨されている。また、一般にリポソーム製剤では輸注反応が多く発生することが知られているため、補体の活性化評価等を適切な評価モデルで実施することを推奨している。MHLWはEMAの記載と同様であった。

臨床試験に関して、EMAはFDA或いはMHLW同様に薬物動態試験を求めている他、有効性及び安全性試験が求められるのは、製剤の特性に応じてケースバイケースであり、非臨床のモデルや臨床薬物動態に関するデータでどの程度参照する先発品との差が検出可能であるかで判断されるべきとしている。

表3-3 リポソームに関する規制文書の日米欧の記載内容の比較(著者作成)

		FDA <sup>105</sup>	EMA <sup>100</sup>	MHLW <sup>107</sup>
CMC		○	×	○
Pharmaceutical Quality		△	○	△
Non-Clinical Requirement	Pharmacokinetics (PK)	○	○	○
	Pharmacodynamics (PD)	×	○	○
	Toxicology	×	○	○
Clinical Requirement	Pharmacokinetics (PK)	○	○	○
	Pharmacodynamics (PD)	×	×	×
	Toxicology	×	○	×
Labeling		○	×	×

### 3-3-2 リポソーム製剤以外のナノ医薬品に関する法規制動向

#### 3-3-2-1 米国における法規制動向

FDA からはリポソーム製剤以外のナノ医薬品に関する規制文書は発出されていないものの、ナノ医薬品開発の広がりを受けて、innovation を加速し安全で効果的な製品を生み出すためには、科学的な根拠に基づいて正しく判断することが必要であり、そのためにはレギュラトリーサイエンス研究に力を入れることを宣言している<sup>109</sup>。

また、米国国立がん研究所 (National Cancer Institute, NCI) のもとナノテクノロジー研究所 (Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL) が設置され、ナノマテリアルの評価が行われている。医療機器では ISO 10993 「医療機器の生物学的評価」<sup>110</sup> の中で、血液適合性を含めた生物学的安全性評価項目が記載されているのに対し、ナノ医薬品には同様の定まった評価手法がなく、NCL から報告している評価手法は参考となる(表 3-4)<sup>111</sup>。

表 3-4 ナノテクノロジー研究所から発出されているナノ医薬品の *in vitro* 評価一覧<sup>111</sup>

**Table 1. In Vitro Assays To Test Nanoparticle Compatibility with the Immune System<sup>a</sup>**

assay for analysis of nanoparticles	description	URL
hemolysis	test for nanoparticle ability to damage red blood cells	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-1.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-1.pdf</a>
platelet aggregation	test for nanoparticle potential pro- and anticoagulant properties	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-2.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-2.pdf</a>
plasma coagulation	used in support of platelet aggregation test	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-12.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-12.pdf</a>
complement activation	test for nanoparticle ability to activate complement	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-5.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-5.pdf</a>
plasma protein binding	helps understanding degree of opsonization	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-4.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-4.pdf</a>
phagocytosis	test potential particle uptake by macrophages	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-9.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-9.pdf</a>
CFU-GM	test for nanoparticle effects on bone marrow cells	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-3.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-3.pdf</a>
leukocyte proliferation	identifies particle effects on leukocytes	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-6.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-6.pdf</a>
NO- production by macrophages	test for induction of macrophage oxidative burst	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-7.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-7.pdf</a>
chemotaxis	test for particles property to attract macrophages	<a href="http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-8.pdf">http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_ITA-8.pdf</a>

<sup>a</sup> These assays have been established at Nanotechnology Characterization Lab and optimized to specifically suite nanoparticle studies. URLs are provided for free access to full-text protocols and instructions. The full list of NCL assays is also available at [http://ncl.cancer.gov/working\\_assay-cascade.asp](http://ncl.cancer.gov/working_assay-cascade.asp).



### 3-3-2-2 欧州における法規制動向

鉄ナノ粒子製剤の後発品の非臨床開発のためのリフレクションペーパー “Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications”<sup>99</sup>が2011年にEMAから発出されている。

ナノ医薬品は、投与後の有効成分の体内動態が有効性及び安全性に大きく影響し、それは粒子サイズや血中での安定性に依存することが多いため、非臨床試験にて血中濃度だけでなく、標的の組織や主要臓器への薬物の分布を確認することで、先発品との比較を行うことが必要である。特に、血漿、細網内皮系 (RES)、及び標的組織或いは毒性に影響する主要臓器 (腎臓、肝臓、肺及び心臓など) での薬物濃度の比較試験の実施が推奨されている。

更に、先発品を参照して開発される鉄ナノコロイド製剤を対象としたガイドラインとして、“Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product”<sup>106</sup>が2015年に発出されているが、記載内容は上記リフレクションペーパーと同様である。

2013年には “Reflection paper on surface coating : general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products”<sup>101</sup>が発出されており、ナノ医薬品の表面物性の重要性を説明している。

ナノ粒子の表面にポリエチレングリコール (PEG) 等の高分子ポリマー或いは受容体の ligand や抗体を導入することで、体内動態や組織分布或いは製剤自体の安定性を変えることができる。そのように粒子表面をコーティングする際には、結合様式 (共有結合或いは非共有結合)、被覆の均一性、安定性などを把握する必要がある。特に受容体の ligand や抗体を導入する際は、導入後の配向性やコンフォメーションがアクティブターゲティングには重要となるため、把握することが重要である。また、これら製造の再現性も非常に重要な要素となる。

### 3-3-2-3 日本における法規制動向

東京大学の片岡らのグループが見出したブロック共重合体ミセルを利用して、ナノ医薬品として研究開発が進められており<sup>96</sup>、「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表等について」(平成 26 年 1 月 10 日 薬食審査発 0110 第 1 号)<sup>104</sup> が厚生労働省と EMA とで共同で作成され、2014 年に発出されている。2016 年に発出されたリポソーム製剤の開発に関するガイドラインは、本リフレクションペーパーを基に作成されているため、適用範囲も同様であり、有効成分として、低分子化学合成品、核酸、又はペプチドやタンパク質等の生物起源若しくはバイオテクノロジー由来成分が挙げられている。内包された又はブロック共重合体に結合した有効成分の *in vivo* での薬物動態、安定性及び体内分布に作用するように創製されたブロック重合体の製剤開発、非臨床試験及び初期の臨床試験について記載されている。

ミセルのサイズ、表面電荷、組成及び安定性などブロック共重合体ミセルに固有の物理化学的性質は、安全性及び有効性の重要な決定因子となる可能性があり、必要に応じて *in vivo* での非臨床評価が必要となる。また、リポソーム製剤同様、血液、血漿又は血清中の総有効成分及び遊離の有効成分の両方について、薬物動態パラメータを評価すべきことが言及されている。

また、2016年には日米欧で初めて siRNA に関する法規制文書となる「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」(平成 28 年 3 月 28 日 事務連絡)<sup>108</sup>が発出され、siRNA の開発が非常に注目されていることが窺い知れる。品質或いは非臨床試験に関わる留意事項が記載されているものの、僅か 6 ページ程度の記載となっている (表 3-5)。有効性及び安全性に影響を与える重要品質特性 (特に体内動態、薬力学特性に影響を与える品質特性) を明らかにし、それらの品質特性を評価するための試験法を確立することが重要である、と記載されているのはリポソーム製剤と同様である。

siRNA の脂質複合体はその機能発現メカニズムのために、細胞内動態の制御が非常に重要であると考えられるが、本リフレクションペーパーの細胞内への送達に関わる留意事項には“siRNA を効率的に標的細胞内へ送達させるためには、キャリアの特性や動態の制御が重要な要素となりうる”との記載されているのみである。具体的にキャリアのどのような特性が細胞内への効率的な送達或いは動態の制御に繋がるか、未だ評価手法が確立されておらず、不明な点が多いためこのような記載になっていると考えられる。

非臨床薬物動態試験に関して、リポソーム製剤と同様に有効成分である siRNA の血中濃度及び臓器・組織への分布を定量することが推奨されている。一方で、非臨床毒性試験に関しては、siRNA に由来する毒性の他、キャリアに由来する毒性それぞれに留意すべきとしている点は、リポソーム製剤とは若干異なる。siRNA のキャリアは、通常リポソーム製剤では使用しないカチオン性キャリアが利用されることが多く、カチオン性キャリア成分と細胞膜や細胞小器官との相互作用による炎症反応や細胞毒性、また、キャリア成分による活性酸素産生に起因する炎症性反応や細胞毒性が想定されている<sup>112-115</sup>。

表 3-5 核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパーの記載内容<sup>108</sup>

目次
1. はじめに
2. 適用範囲
3. 品質に関わる留意事項
3-1 体内動態や細胞内への送達に関わる品質上の留意事項
3-1-1 体内動態に関わる留意事項
3-1-2 細胞内への送達に関わる留意事項
3-2 安全性に関わる品質上の留意事項
3-2-1 キャリア構成成分の最適化
3-2-2 製剤の特性最適化
3-2-3 標的指向化
4. 非臨床試験に関わる留意事項
4-1 非臨床薬物動態試験
4-2 非臨床毒性試験
4-2-1 siRNA に由来する毒性
4-2-2 キャリアに由来する毒性
5. ヒト初回投与試験における留意事項

### 3-4 まとめ

本章では、規制面から siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発への課題を抽出した。

日米欧において、核酸医薬品に特化したガイドラインはこれまで存在していないが、作成のための活動は行われており、特に国内で大阪大学の小比賀らが中心にまとめられたものが近く発出される予定である。品質管理或いは非臨床安全性試験の評価項目が中心に議論されており、基本的には低分子薬と同様に考えられるとされている。しかしながら、配列特異的なオフターゲット効果をどのように評価するか、或いは種差の違いからサロゲート配列での非臨床試験にどの程度の意味が有るかなどは現在も議論がされており、標的遺伝子・標的配列・動物での相同性も考慮に入れ、製剤の特性に合わせたケースバイケースの対応が必要と考えられる。

siRNA は標的臓器或いは標的組織に効率良く導入するために、DDS キャリアを用いることが多い点でアンチセンス核酸とは異なり、siRNA は核酸医薬品であると共に多くの場合ナノ医薬品としての側面も併せ持つ。ナノ医薬品に関しては、1990 年代からリポソーム製剤を中心に多くのナノ医薬品が上市され、それに伴い日米欧 3 極で種々の法規制文書が発出されてきた。リポソーム等の DDS キャリアを用いることで、低分子を中心とした有効成分単独の体内動態或いは組織分布が変わり、有効性或いは安全性に大きく影響することから、血漿中だけでなく、標的組織や主要臓器中の薬物濃度を含めた薬物動態評価が求められている。これは主に体内動態の制御を意図したものである。Doxil®を含むナノ医薬品は EPR 効果で腫瘍組織に集積した後、腫瘍組織に過剰発現しているリパーゼなどの酵素により粒子構造が壊され、放出された薬物が細胞内に入り込み機能が発揮することも報告されており<sup>79</sup>、必ずしも標的の細胞内に粒子として取込まれる必要がない。

一方で、siRNA の脂質複合体は粒子として標的の細胞内に導入される必要がある点が、これまでのナノ医薬品の考えと大きく異なる。また、粒子として標的の細胞に取込まれた後、DDS キャリアから離脱し、細胞質内で RISC に取込まれて初めて薬効を発揮するため、細胞内動態の制御が非常に重要になると考えられる。siRNA に関する法規制文書として、2016 年に本邦から「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」が発出された。これは核酸医薬品関連では日米欧の 3 極で初めての規制文書であり、siRNA を用いたナノ医薬品開発に関するレギュレーション整備の観点で欧米を先行していると言える。しかしながら、細胞内動態の制御に関する具体的な記載例はなく、十分な記載内容になっているとは言い難い。これは、細胞内動態の評価手法も確立されている訳ではなく、siRNA の脂質複合体の製剤特性がどのように細胞内動態に関連するかに関する科学的データが十分に蓄積されている訳ではないためと考えられ、レギュラトリーサイエンス研究の推進が不可欠と考えられた。細胞内動態に関する詳細な評価手法或いは科学的データを蓄積することで、法整備化の促進、或いは効率的なトランスレーショナル研究に直結すると考えられる。

## 第 4 章 siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性が有効性・安全性に与える影響評価に関する検討

### 4-1 緒言

臨床試験が進められている lipoplexes 及び LNPs をモデルに製剤を調製し、その調製方法と得られた粒子構造がどのように有効性・安全性に影響を与えるかについて検証した。開発企業はそれぞれ異なる siRNA 配列、脂質種、組成比或いは調製方法で調製した製剤を用いて臨床試験を進めており、また標的部位や投与量も異なるため、その直接的な比較は難しく、具体的にどのような製剤の構造とそれに基づく物性が有効性や安全性に影響を与えるかについては不明な点が多い。そこで、本章では同一の構成成分と組成比の脂質と siRNA から異なる調製法で lipoplexes 及び LNPs を作り分け、同一細胞に同じ実験条件で加えて有効性・安全性に与える影響の相違について実験から検討した。細胞への取込み効率及び mRNA のノックダウン率を有効性評価項目として、臨床試験での有害事象として確認されているサイトカイン産生及び補体の活性化を安全性評価項目とした。

### 4-2 siRNA 担持脂質ナノ製剤の CMC 研究

#### 4-2-1 Lipoplexes 及び LNPs の調製及び製剤物性評価

Lipoplexes 及び LNPs を文献情報を参考に調製した<sup>43, 116</sup>。その際両者の構成成分及び組成比は、DODMA、PEG-DSPE、DSPC 及び cholesterol を 50:1.5:10:38.5 (mol%) に統一した。また siRNA は Alexa647 で蛍光修飾を行った 23 塩基対の siRNA を用いた。Lipoplexes 及び LNPs は共に、調製する際にカチオン脂質と siRNA の比率 (N/P 比) を変えて調製を行った (4-6 項参照)。

製剤の平均粒子径、多分散指数 (polydispersity) 及びゼータ電位は Zetasizer (Malvern) を用いて評価した (表 4-1)。カチオニックリポソームは高圧押し出し法により造粒を行い、最終孔径 50 nm のポリカーボネートフィルターを通過させて、平均粒子径 58 nm、ゼータ電位約 44 mV のリポソームを調製した。その後 siRNA 水溶液と混合し、lipoplexes とした。Lipoplexes は N/P 比が 5 の時平均粒子径約 149 nm でありゼータ電位は約 15 mV であった。過去の報告例の通り<sup>43, 116</sup>、siRNA 水溶液を添加することで平均粒子径は僅かに増加し、ゼータ電位は低下した。平均粒子径は N/P 比 5 の時に最も大きくなり、10 で減少した一方で、ゼータ電位は N/P 比が高い程増加した。これらは他報告例と同様の傾向を示した<sup>117, 118</sup>。

一方、LNPs は siRNA 水溶液と脂質のエタノール溶解液を混合して 1 段階で調製を行った。調製した LNPs は N/P 比が 5 の時平均粒子径約 119 nm でありゼータ電位は約 25 mV で、他の報告例と同程度であった<sup>48, 119</sup>。Lipoplexes と同様に、LNPs は N/P 比 5 で平均粒子径が最も大きくなり、10 で減少した。またゼータ電位も同様の傾向であり、N/P 比が高い程ゼータ電位は大きくなった。

調製した lipoplexes 及び LNPs に含まれる siRNA 及び脂質含量はそれぞれ逆相イオンペア HPLC 法及び CAD を用いた逆相 HPLC 法により評価を行い、各製剤の N/P 比を算出した (4-6-3-4 項参照)。

表 4-1 Lipoplexes 及び LNPs の平均粒子径及びゼータ電位

Formulation	Theoretical N/P value	Particle size (d.nm) ± SD	Pdl	Zeta potential (mV) ± SD	Measured N/P value
Lipoplexes	2	145.6 ± 3.2	0.09	10.3 ± 2.1	2.0
	5	149.2 ± 0.6	0.09	14.6 ± 0.6	3.7
	10	136.5 ± 0.5	0.07	29.3 ± 1.8	8.2
LNPs	2	114.3 ± 0.8	0.08	11.5 ± 4.3	1.3
	5	117.2 ± 1.5	0.09	25.1 ± 0.5	5.2
	10	97.9 ± 0.8	0.11	32.5 ± 2.9	9.1
Cationic liposomes	-	58.1 ± 0.5	0.09	43.6 ± 2.5	-

#### 4-2-2 Cryo-TEM 測定

Lipoplexes は若干凝集傾向であり、約 100 nm 程度の粒子が形成されているのに対し、LNPs は 80 nm 程度であり lipoplexes に比べてサイズは小さく Zetasizer の結果と一致した (図 4-1)。LNPs では凝集は認められず、個々が独立した形態を保っていることが確認された。

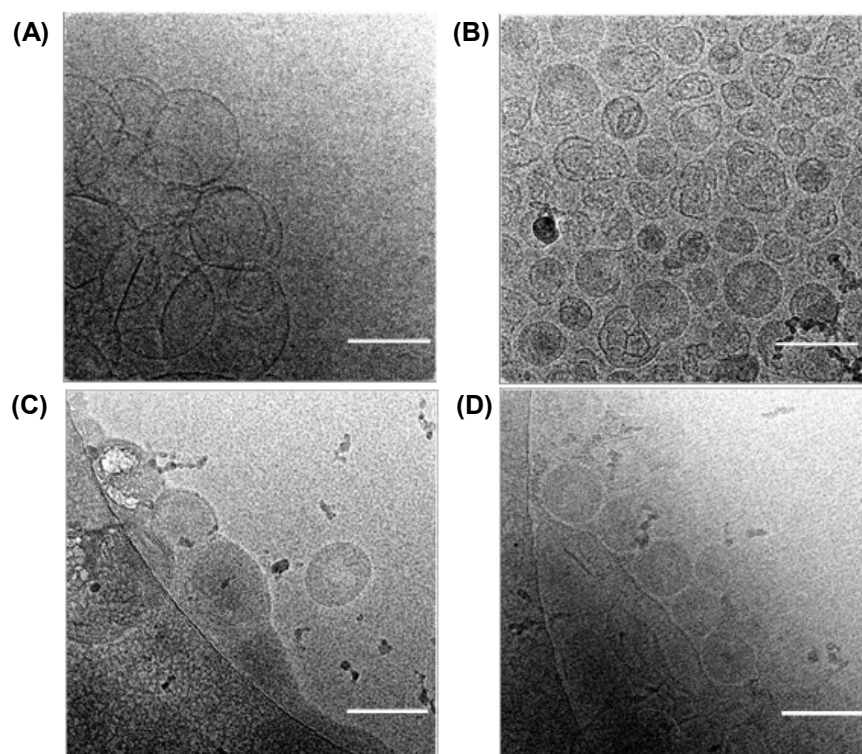


図 4-1 Cryo-TEM による lipoplexes 及び LNPs の形態観察

(A) Lipoplex (N/P = 10); (B) LNPs (N/P = 10); (C) Lipoplex (N/P = 5); (D) LNPs (N/P = 5)  
Bar = 100 nm.

### 4-2-3 Small-angle X-ray scattering (SAXS) 測定

Lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) は共に回折波長  $q = 1 \text{ nm}^{-1}$  で鋭いピークが見られ、面間隔  $d$  ( $d = 2\pi/q$ ) が約 6 nm の周期性を持つことが示された。これは、脂質と siRNA が約 6 nm の間隔でラメラ層を形成していると考えられ、より鋭いピークが見られた lipoplexes は LNPs より規則正しい内部構造を有することが示唆された (図 4-2)。また、lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) は共に球形粒子であり、粒子径はそれぞれ約 80 nm 及び 65 nm であった。

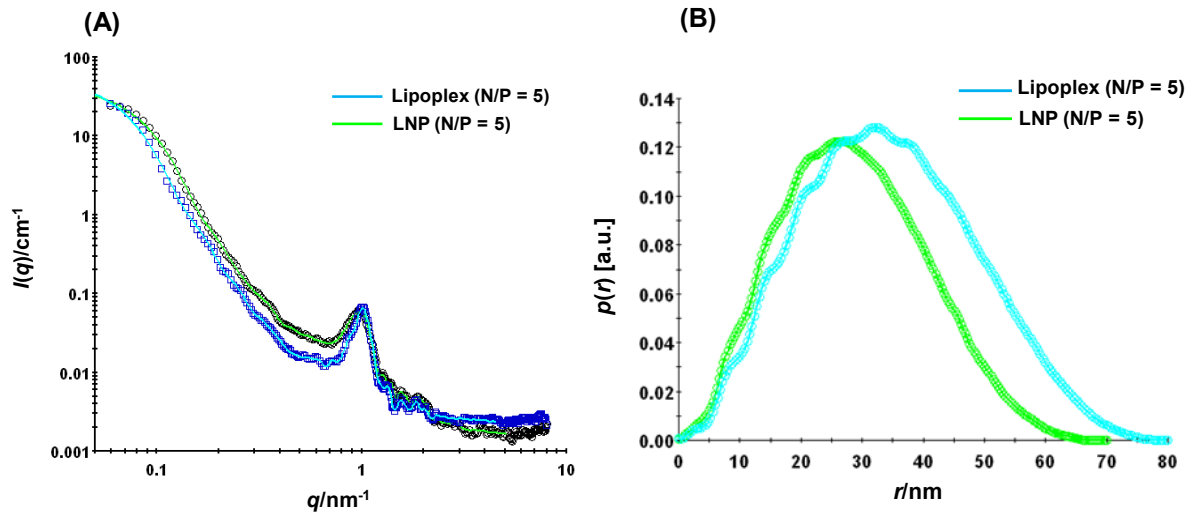


図 4-2 小角 X 線回折による lipoplex 及び LNP の構造解析

(A) 小角 X 線散乱の回折パターン, (B) The pair-distance distribution function,  $p(r)$



#### 4-2-4 製剤物性のまとめ

同一の構成成分及び組成比の混合脂質から、異なる調製手法にて Lipoplexes 及び LNPs を調製した。両者の平均粒子径は、共に N/P 比が 5 で最大値、10 で最小値を示し、いずれの N/P 比においても lipoplexes の方が LNPs に比べ大きかった。一方、ゼータ電位は両者共に N/P 比が大きくなるに従って大きくなり、LNPs の方が lipoplexes に比べ大きかった。

Cryo-TEM による形態観察の結果、lipoplexes は LNPs に比べて凝集傾向であり、サイズも大きかったのに対し、LNPs は個々が独立した粒子を形成していることが確認された。

一方で、SAXS 測定の結果、粒子の内部構造に大きな違いは認められず、両者共に内部にラメラ層を有しており、lipoplexes の方が規則正しい構造であることが示唆された。また、粒子サイズは lipoplexes 及び LNPs でそれぞれ約 80 nm 及び 65 nm と算出され、ゼータサイザーによる動的光散乱の結果からは若干解離が認められたものの、lipoplexes の方が LNPs に比べて若干サイズが大きい傾向は一致した。

## 4-3 siRNA 担持脂質ナノ粒子の有効性評価

### 4-3-1 細胞内取込み評価

共焦点顕微鏡を用いて Alexa647 修飾 siRNA をモニターすることで細胞内の取込み効率を評価した。HeLa 細胞に Alexa647 修飾 siRNA を含む lipoplexes 或いは LNPs を添加し (siRNA: 100 nM, N/P = 5) 24 時間までの細胞内の蛍光強度の経時変化を評価した (図 4-3)。LNPs は lipoplexes に比べ、細胞内の siRNA の蛍光強度が大幅に増加し、siRNA が顕著に細胞内に取込まれていることが判明した。LNPs 添加 30 分後から細胞内に siRNA は導入され、経時的に導入量は増加した。一方、lipoplexes は LNPs に比べ細胞内の siRNA の蛍光強度は有意に低く、最も蛍光強度が強かった 12 時間後で LNPs の蛍光強度の約 1/4 程度であった。細胞への添加後 1 時間 (siRNA: 100 nM) の細胞内の蛍光強度をフローサイトメトリーを用いて評価したが (図 4-4)、共焦点顕微鏡での測定結果と同様に lipoplexes に比べ、LNPs で 19 倍もの高い細胞内導入効果が認められた。

また、lipoplexes 及び LNPs は両者共に N/P 比の増加に伴い細胞内の蛍光強度は増加したものの、いずれの N/P 比においても LNPs は lipoplexes に比べ siRNA の高い細胞内導入を示した (図 4-5)。これは正に帯電させたナノ粒子の細胞内への導入効率が上がることを意味し、種々報告されていることではあるが<sup>117, 120</sup>、今回の系では全ての N/P 比で LNPs は lipoplexes と比較して siRNA の細胞内導入効率は高かった。N/P 比 10 の lipoplexes に比べ、N/P 比 2 の LNPs は粒子のゼータ電位は低い値であるものの (表 4-1)、siRNA の細胞内への導入効率は高かった。これは製剤のゼータ電位に加え、製剤の調製手法も細胞内導入効率は大きく影響を受けることを意味しており、今回の検討において調製方法が異なることでの構造の違いが影響していると考えられた。Alexa647 修飾 siRNA 単独では全く細胞内に導入されず (図 4-6)、脂質ナノ粒子、特に LNPs を利用することで効率的に細胞内に siRNA を導入できることが具体的に示された。

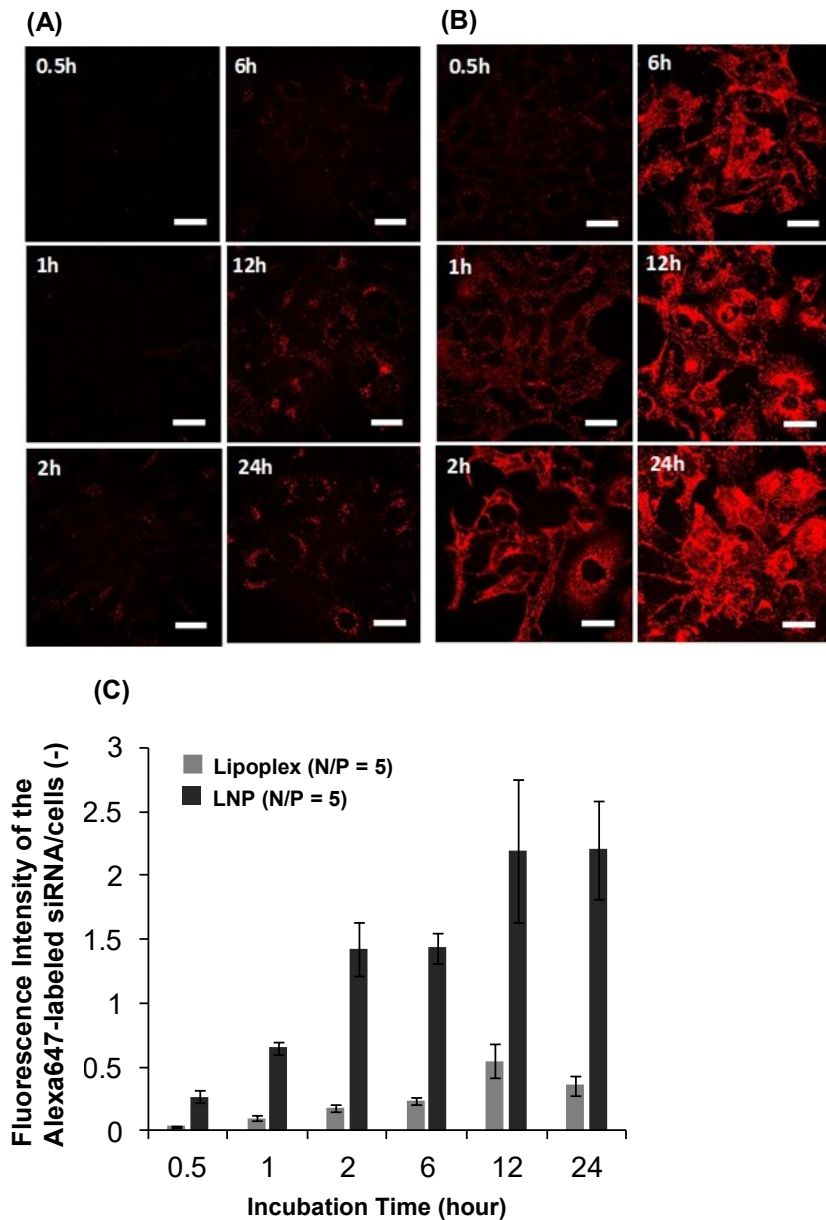


図 4-3 共焦点顕微鏡による lipoplexes 及び LNPs の細胞内取込み評価.

Lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) を HeLa 細胞に添加し、0.5 時間から 24 時間までインキュベートし、Alexa 結合 siRNA の細胞への経時的な取込み量を評価した (siRNA : 100 nM).

(A) Lipoplex (N/P = 5); (B) LNP (N/P = 5); (C) 単位細胞数当りの Alexa647 結合 siRNA の蛍光強度の 24 時間後までの経時変化. Bar = 30  $\mu$ m.

LNPs は lipoplexes に比べ、大幅に高い細胞内導入効率が確認された.

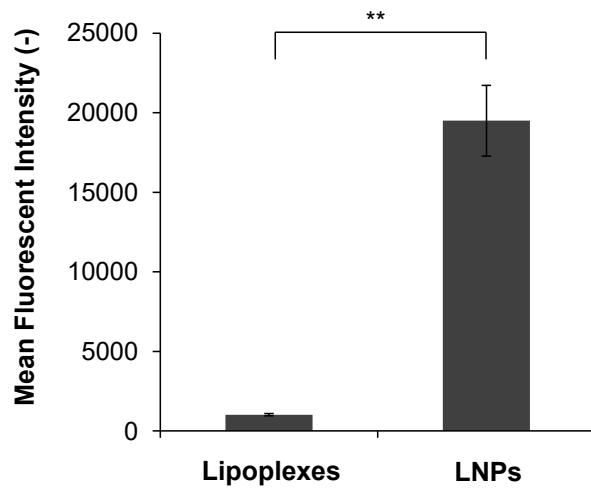


図 4-4 フローサイトメトリーを用いた lipoplexes 及び LNPs の細胞内導入評価

Lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) は siRNA 濃度 100 nM で HeLa 細胞に添加し、1 時間インキュベートした後の細胞内の Alexa647 結合 siRNA の蛍光強度をフローサイトメトリーを用いて評価した. 統計解析には Aspin-Welch test を用いた. **\*\*P < 0.01**.

共焦点顕微鏡による評価と同様、LNPs は lipoplexes に比べ高い細胞内導入効果を示した.

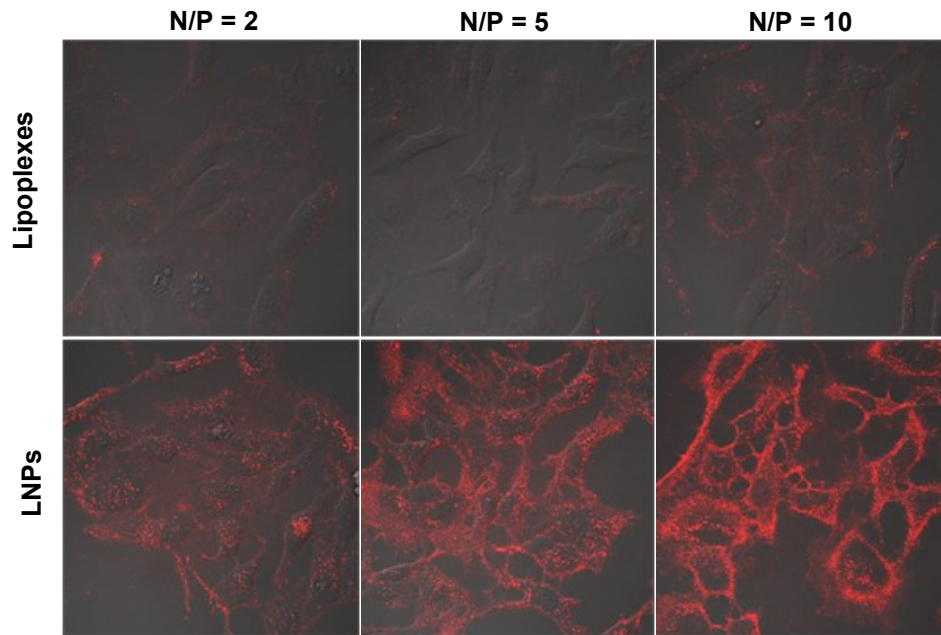


図 4-5 N/P 比による細胞への取込み効率の違い

Lipoplexes 及び LNPs は siRNA 濃度 100 nM で HeLa 細胞に添加し、1 時間インキュベートした後の細胞内の Alexa 結合 siRNA の蛍光強度を共焦点顕微鏡を用いて評価した。

Lipoplexes 及び LNPs は共に、N/P 比の増加に従い、細胞内への Alexa 結合 siRNA の導入率は高くなったが、いずれの N/P 比においても LNPs は lipoplexes に比べ siRNA の高い細胞内導入を示した。

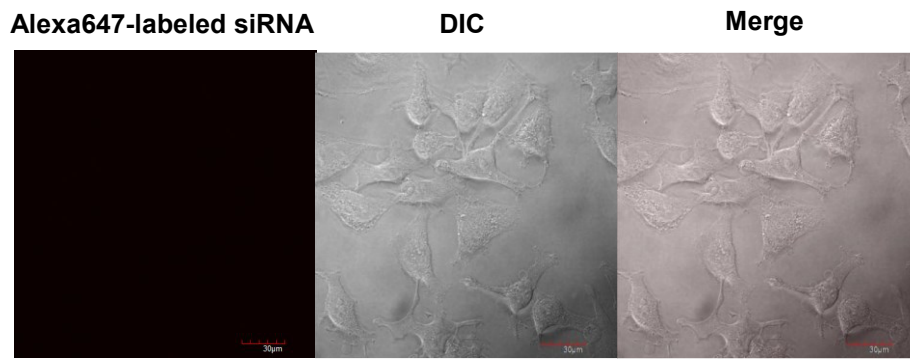


図 4-6 naked 核酸の細胞内導入効率評価

100 nM の濃度で HeLa 細胞に添加した Alexa647 結合 siRNA の、1 時間後の細胞内の蛍光強度を共焦点顕微鏡を用いて評価した. naked の siRNA では HeLa 細胞への取込みは確認されなかった. DIC; Differential Interference Contrast.

#### 4-3-2 siRNA 及び脂質キャリアとの細胞内共局在評価

細胞内での siRNA 及び脂質キャリアの共局在を評価するために脂質キャリアに蛍光マーカーである DiO を導入した。DiO を導入しても lipoplexes 或いは LNPs の製剤物性が変化しないことを確認した (表 4-2)。HeLa 細胞に DiO を導入した lipoplexes 或いは LNPs を添加し (siRNA: 100 nM)、37°C で 1 時間インキュベートし、細胞内の siRNA 及び DiO の蛍光強度を共焦点顕微鏡にて評価した。結果、lipoplexes と LNPs とで大きく傾向が異なることが明らかとなった。LNPs は細胞内の DiO と siRNA の局在が一致しており、複合体として細胞内に取込まれたのに対し、lipoplexes では DiO の蛍光強度が僅かに見られる一方で siRNA の蛍光はほぼ観察できなかった (図 4-7)。そのため、lipoplexes では培地中で siRNA が脂質キャリアから一部解離していることが示唆された。

表 4-2 DiO を導入した lipoplexes 及び LNPs の平均粒子径及びゼータ電位

Formulation	Theoretical N/P value	Particle size (d.nm) $\pm$ SD	Pdl	Zeta potential (mV) $\pm$ SD	Measured N/P value
Lipoplex incorporated with DiO	5	116.7 $\pm$ 0.6	0.09	16.1 $\pm$ 0.6	4.5
LNP incorporated with DiO	5	100.1 $\pm$ 1.2	0.07	27.8 $\pm$ 2.7	5.7

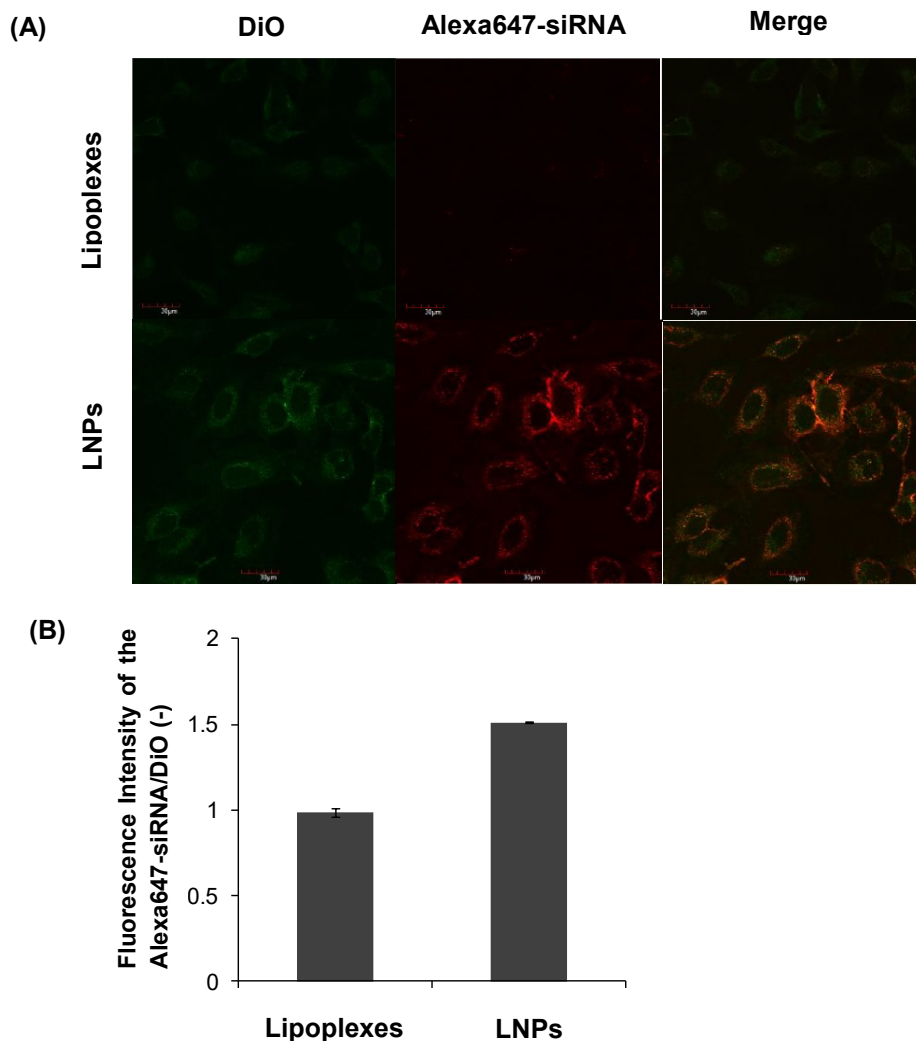


図 4-7 細胞内での siRNA 及び脂質の局在評価

Lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) は siRNA 濃度 100 nM で HeLa 細胞に添加し、1 時間インキュベートした後の細胞内の Alexa647 結合 siRNA の蛍光強度及び脂質キャリアに導入した DiO の蛍光強度を共焦点顕微鏡を用いて評価した。(A) HeLa 細胞内の siRNA 及び脂質キャリアの共局在. 緑色; DiO, 赤色; Alexa647 結合 siRNA. (B) HeLa 細胞内に導入された Alexa647 結合 siRNA の蛍光強度を DiO の蛍光強度で補正した.

LNPs は細胞内で siRNA 及び DiO の局在は一致した. 一方、lipoplexes は細胞内の DiO の蛍光強度は低く、更に siRNA の蛍光強度はほぼ検出できず、細胞内の局在は一致しなかった.



### 4-3-3 RNase による siRNA 失活試験

Lipoplexes の siRNA が培地中で脂質キャリアから解離しやすいことを確認するために、RNase を分散系に添加して RNase が攻撃できない siRNA の割合を評価した。RNase の添加量或いはインキュベーション条件を最適化し (37°C、1 時間)、naked の siRNA が完全に分解する条件であることを確認した後、同条件にて lipoplexes 或いは LNPs での siRNA の分解を行った。結果、LNPs ではほぼ 100%の siRNA が分解されずに残存したのに対し、lipoplexes では約 20%が分解された (図 4-8)。これは、LNPs では全ての siRNA は RNase が反応できない粒子内部に封入されているのに対し、lipoplexes では分解した約 20%の siRNA は RNase が攻撃できる粒子表面に局在しているか粒子から解離していることを意味していると考えられた。

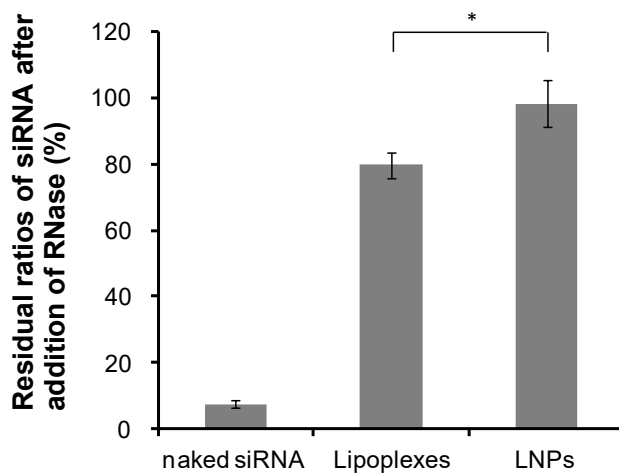


図 4-8 RNase 添加による lipoplexes 及び LNPs 中の siRNA 失活評価

Lipoplex 及び LNPs を HBSS で希釈した後、RNase を添加し 37°C で 1 時間インキュベートした (siRNA: 1.25  $\mu$ M). Proteinase K を添加し RNase の反応を止め、RNase 添加前後の siRNA 濃度から siRNA の失活評価を行った。統計解析には Student's *t*-test を用いた。LNPs は RNase 添加前後で siRNA 含量は変らなかったのに対し、lipoplexes は RNase 添加により、約 20%の siRNA が失活した。

#### 4-3-4 Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価

各種 inhibitor を用いて細胞内への取込み経路評価を行った。クラスリン介在エンドサイトーシスには chlorpromazine、カベオラ介在エンドサイトーシスには nystatin、マクロピノサイトーシスには cytochalasin D を inhibitor として用いた。Lipoplexes は LNPs に比べて細胞内の導入効率が悪いいため、細胞への siRNA 添加濃度を LNPs では 100 nM に対し、lipoplexes は 10 倍量の 1  $\mu$ M とした。結果、lipoplexes 或いは LNPs 共に chlorpromazine 添加では細胞内への取込みが阻害されなかったのに対し、lipoplexes は nystatin 及び cytochalasin D 添加により細胞内の取込みが若干阻害され、LNPs では nystatin 添加により強く阻害された (図 4-9)。そのため、HeLa 細胞を用いた検討において、lipoplexes はカベオラ介在エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスが取込み経路であるのに対し、LNPs はカベオラ介在エンドサイトーシスが主な取込み経路であることが判明した。

次に、カベオラ介在エンドサイトーシスのマーカーとして、Alexa488 を結合した cholera toxin を用いて共局在評価を行った。LNPs は Alexa488 結合 cholera toxin と HeLa 細胞内の局在が一致することからカベオラ介在エンドサイトーシスで細胞内に取込まれることが確認された (図 4-10)。一方、lipoplexes は一部しか局在は一致せず、カベオラ介在エンドサイトーシス以外の取込み経路が働いていることが確認され、inhibitor を用いた評価結果を支持した。

また、興味深いことに lipoplexes 及び LNPs は用いる inhibitor の種類によって細胞内での siRNA の局在が異なることが確認された。すなわち、nystatin 添加により細胞表面の局在が阻害される一方で、cytochalasin D 添加では細胞の中心部の局在が阻害された。これは細胞への取込み経路の違いが大きく影響していることが要因と考えられた。即ち、nystatin を添加することで、マクロピノサイトーシスによる経路で取込まれた粒子は細胞の中心部位へ比較的早く到達するのに対し、cytochalasin D を添加することで、カベオラ介在エンドサイトーシスによって取込まれた粒子は細胞の表面に長く局在することを意味する。カベオラが形成する脂質ラフトは非常に安定であることが知られており<sup>121, 122</sup>、マクロピノサイトーシスによる経路に比べ、細胞内の輸送速度が遅いためこのような局在の違いが生じると考えられた。

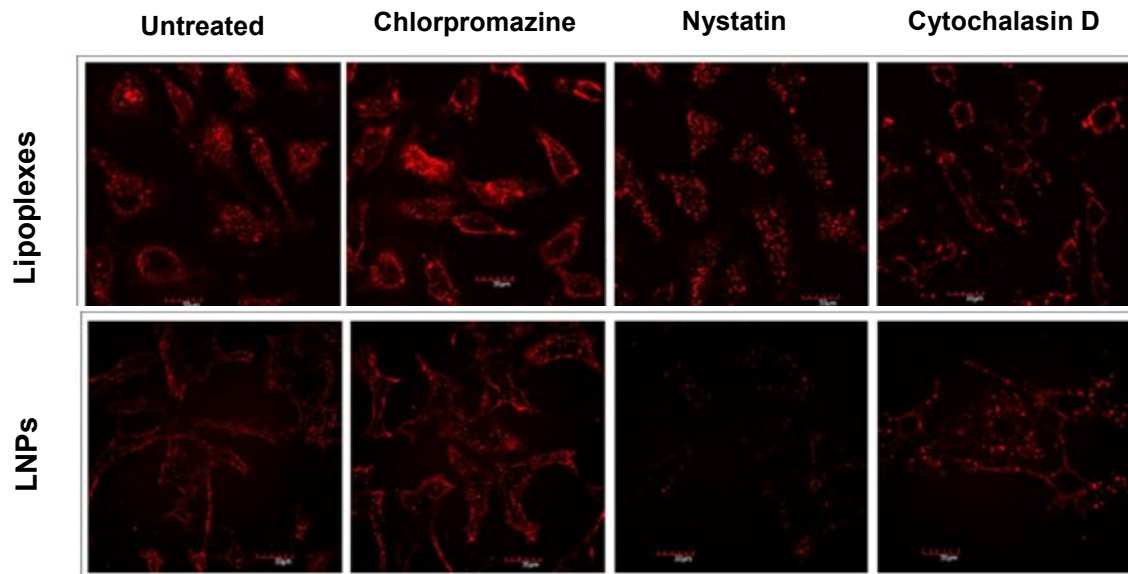


図 4-9 Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価

Chlorpromazine, nystatin 及び cytochalasin D を HeLa 細胞に添加した後 (全て 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、lipoplex (1  $\mu\text{M}$ ) 及び LNPs (100 nM) を添加し 1 時間後の細胞内の Alexa 結合 siRNA の蛍光強度を共焦点顕微鏡にて評価した. Lipoplexes は nystatin 及び cytochalasin により細胞内への取込み量が低下したのに対し、LNPs は nystatin により強く細胞内の導入が阻害された.

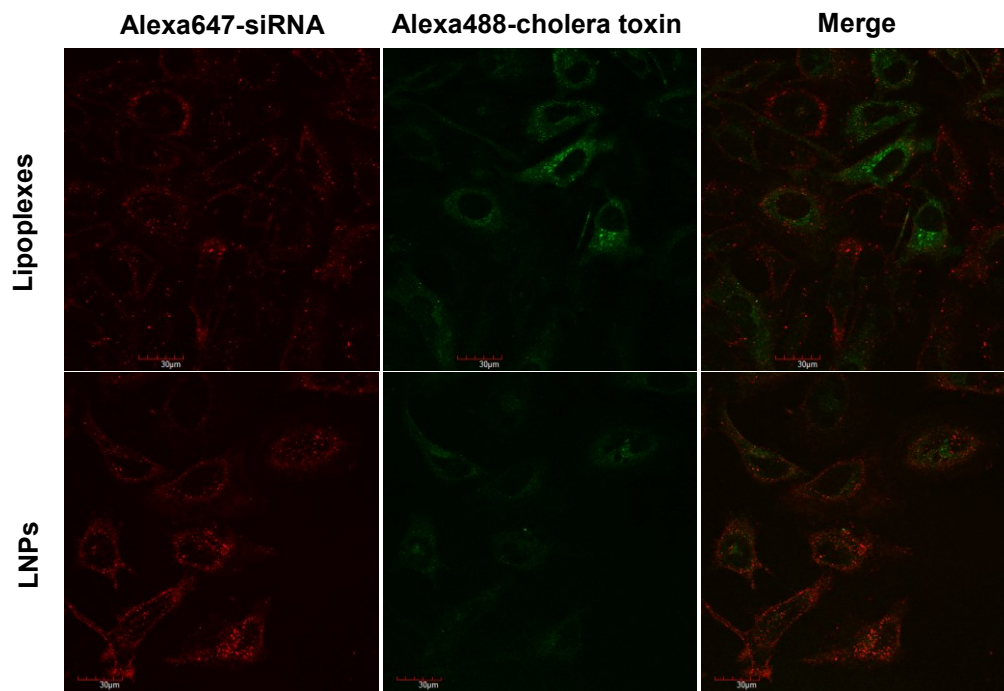


図 4-10 カベオラ介在エンドサイトーシスのマーカーを用いた共局在評価

Alexa488 結合コレラトキシン B と lipoplexes (1  $\mu$ M)及び LNPs (100 nM)を HeLa 細胞に添加し、細胞内での共局在を共焦点顕微鏡にて評価した. 赤色; Alexa 結合 siRNA, 緑色; Alexa488 結合コレラトキシン B.

LNPs は細胞内で両者の局在が一致したのに対し、lipoplexes は一部のみの一致であった.

#### 4-3-5 標的遺伝子のノックダウン活性評価

HeLa 細胞及び MIA PaCa-2 細胞に lipoplexes 或いは LNPs を添加した際の KIF の mRNA 発現量を qPCR にて評価した。結果、細胞への取込み効率と相関して、LNPs は lipoplexes に比べ、低濃度からノックダウン活性を示し、薬効面からも LNPs が有利であることが確認された (図 4-11)。

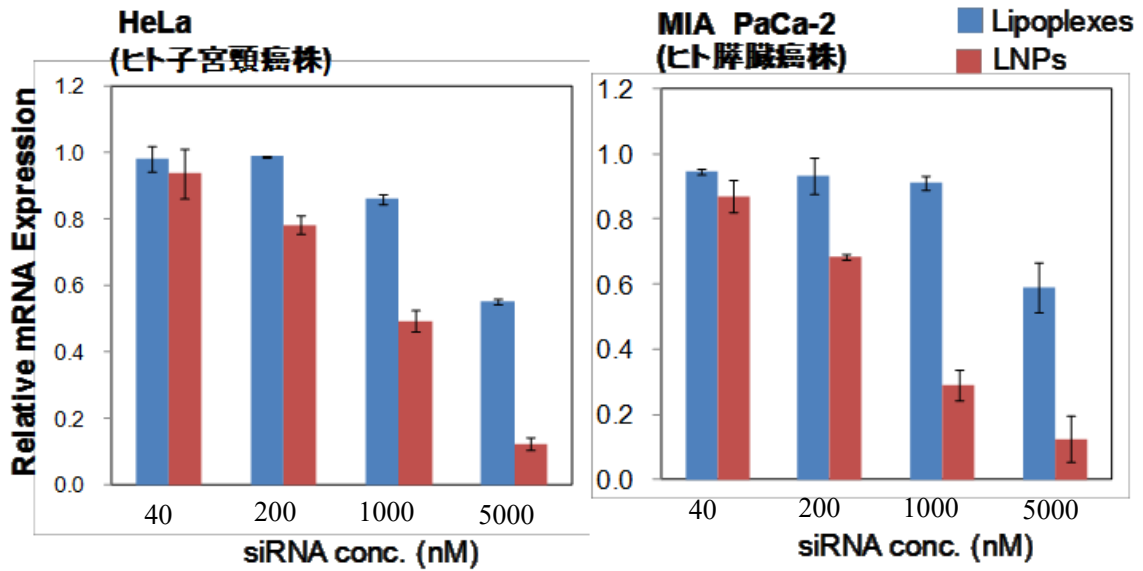


図 4-11 標的遺伝子のノックダウン活性評価

#### 4-3-6 siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性評価のまとめ

Lipoplexes 或いは LNPs を HeLa 細胞に添加したところ、LNPs は非常に効率的に siRNA を細胞内に運搬することが明らかとなった。LNPs は脂質キャリアと siRNA が複合体として細胞内に取り込まれるのに対し、lipoplexes は細胞添加時に粒子表面から siRNA が一部解離していることが示唆された。細胞への取込み経路も異なり、LNPs は主にカベオラ介在エンドサイトーシスであったのに対し、lipoplexes はカベオラ介在エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスであるが、いずれも取込み程度は低かった。

薬効を意味する標的遺伝子のノックダウン効率も lipoplexes に比べ、LNPs で有利であった。しかしながら、LNPs でも 1  $\mu$ M 程度と比較的高い siRNA 濃度から強いノックダウンが認められることから、効率よく siRNA が細胞質の放出されていない、或いは RISC への取込み量が低いなどの要因が考えられた。そのため、細胞に取り込まれてからの薬効発現までの siRNA の細胞内動態の評価が今後の重要課題と考えられた。

## 4-4 siRNA 担持脂質ナノ製剤に関する安全性評価

### 4-4-1 細胞毒性評価

HeLa 細胞に対する lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) の細胞毒性評価を tetrazolium salt (WST) reduction assay<sup>123</sup> を利用して行った。結果、両者共に siRNA 濃度 1-1000 nM の範囲で細胞毒性を示さないことを確認した (図 4-12)。また、これは DODMA 濃度 0.24-240 nM に相当し、カチオン脂質由来の毒性も認められなかった。

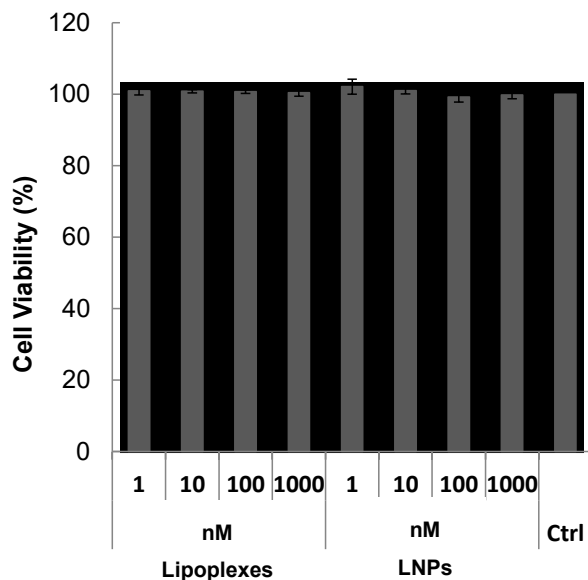


図 4-12 WST-8 アッセイによる細胞毒性評価

Lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) を siRNA の濃度が 1-1000 nM となるように HeLa 細胞に添加し、24 時間インキュベーションを行った。DPBS にて細胞を洗浄した後、WST-8 アッセイキットを用いて細胞毒性評価を行った。結果、1-1000 nM の siRNA 濃度で細胞毒性は示さなかった。

#### 4-4-2 サイトカイン産生評価

siRNA 担持脂質ナノ製剤は細胞に取込まれる際に、免疫刺激を惹起することが数多く報告されている<sup>21, 24</sup>。Lipoplexes 及び LNPs が惹起するサイトカイン産生を評価するために、THP-1 細胞から誘導したマクロファージからの TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の産生量を測定した。HeLa 細胞と同様に、マクロファージにおいても lipoplexes に比べ LNPs は高い取込み量を示した (図 4-13[A])。TNF- $\alpha$  の産生量は、siRNA を担持していないカチオニックリポソームに比べ、lipoplexes 或いは LNPs で高い値を示した (図 4-13[B])。更に、lipoplexes 及び LNPs 共に N/P 比が減少する程その産生量は増加することが確認された。N/P 比が減少する程、1 粒子中の siRNA は増加するため、TNF- $\alpha$  の産生は主に siRNA の刺激に寄ることが示唆された。一方 IL-1 $\beta$  に関して、カチオニックリポソームはポジコン (ATP) と同程度に高い産生量を示した (図 4-13[C])。更に、lipoplexes に関して N/P 比が増加するに従ってその産生量も増加し、N/P 比 10 ではカチオニックリポソームと同程度の産生量を示した。そのため、IL-1 $\beta$  の産生は主にカチオン脂質による刺激によることが示唆された。



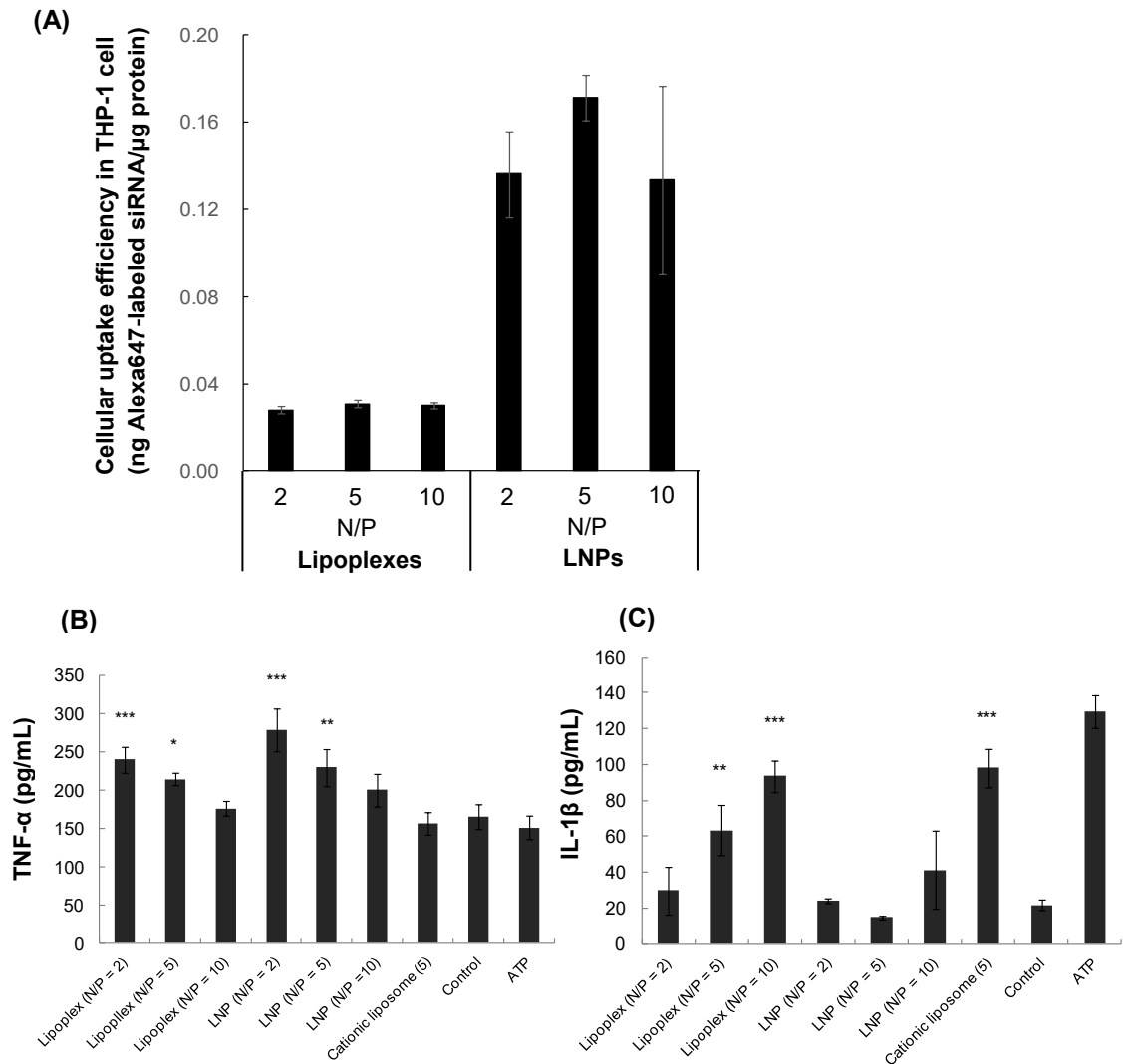


図 4-13 炎症性サイトカイン産生評価

Lipoplexes 及び LNPs を THP-1 細胞から誘導したマクロファージに添加し (siRNA : 100 nM)、24 時間インキュベートした. (A) マクロファージに取込まれた Alexa647 結合 siRNA 量をタンパク質量で補正し、siRNA の導入効率を算出した.

(B) TNF- $\alpha$  の産生量を評価した. (C) IL-1 $\beta$  の産生量を評価した.

統計解析には ANOVA analysis/Dunnett's multiple-comparisons test を用いた.

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 versus control.

#### 4-4-3 補体活性化評価

Lipoplexes 及び LNPs をヒト血清と混合した際の補体の活性化の違いを評価した (図 4-14)。活性化産物 ((A) C3a 及び(B) C5a) のいずれも産生されないことが確認された。今回用いた siRNA は、臨床開発にも用いられている配列であり、免疫刺激性をなるべく低く抑えるように化学修飾されているものであったため、顕著な補体の活性化産物の産生は確認されなかったと考える。

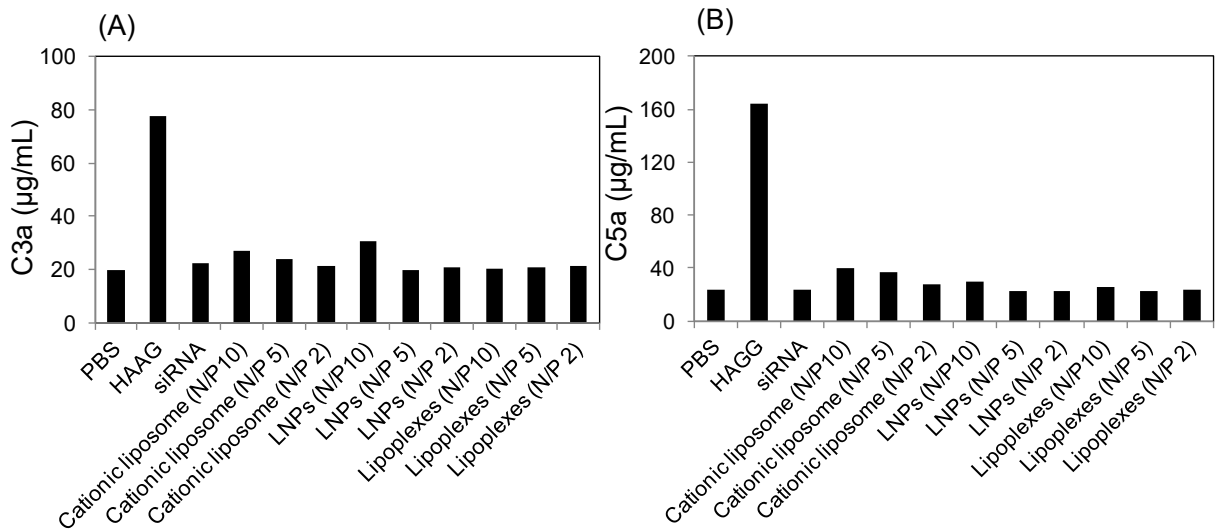


図 4-14 補体の活性化評価 ((A) C3a, (B) C5a)

#### 4-4-4 siRNA 担持脂質ナノ製剤に関する安全性評価のまとめ

Lipoplexes 及び LNPs をマクロファージに添加した際の炎症性サイトカインの産生量の違いを評価したが、lipoplexes に比べ LNPs は TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の両方のサイトカイン種の産生量は低かった。また、サイトカイン産生には siRNA だけでなく用いるカチオン脂質による免疫刺激が考えられ、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には両方の免疫刺激性を考慮する必要があることが明らかとなった。一方、今回用いた lipoplexes 及び LNPs のいずれも補体の活性化は引き起こさなかった。

## 4-5 考察

### 4-5-1 siRNA 担持脂質ナノ製剤の CMC 研究

同一の構成成分及び組成比であるが、異なる調製手法にて Lipoplexes 及び LNPs を調製した。それぞれ異なる分子集合形態を示すと考えられ、その違いがどのように細胞内への取込み効率或いは免疫刺激性に影響を及ぼすかを評価した。約 60 nm のカチオニックリポソームに siRNA 水溶液を添加し lipoplexes を調製した。一方、LNPs は脂質のエタノール溶解液と siRNA 水溶液を混合することで one step で調製を行った。Lipoplexes の粒子径は 130-150 nm であり、LNPs (100-120 nm) に比べ若干大きかった。動的光散乱法により想定したこの結果は、多少数値に乖離があったものの SAXS 測定の結果と一致した (lipoplexes: 80 nm, LNPs: 65 nm)。また SAXS 測定の結果から、lipoplexes 及び LNPs (N/P = 5) は共に内部にラメラ構造を有することが示唆され、粒子サイズに若干の違いがあるものの、大きな構造の違いは認められなかった。また、内部のラメラ構造は lipoplexes の方が規則正しい構造を有することが示唆され、lipoplexes は単純に siRNA が静電相互作用によりカチオニックな粒子の表面に担持されている構造<sup>124-127</sup>ではないことが明らかとなった。

Cryo-TEM 測定において、lipoplexes では凝集形態であったのに対し、LNPs では個々に独立した粒子形態であることが観察された。LNPs は lipoplexes に比べゼータ電位が高く、粒子間の静電反発が強いために凝集傾向が見られない可能性が考えられ、また逆にゼータ電位の低い lipoplexes は LNPs に比べ粒子表面に局在する siRNA の量が多いことが推察された。

#### 4-5-2 siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内取込み効率に関する評価

HeLa 細胞への siRNA の取込み量は lipoplexes と LNPs を用いた際に大きな違いが生じた。LNPs を用いた際に細胞内に導入された siRNA 量は、lipoplexes を用いたときに比べ大幅に増加することが確認された。評価を実施した N/P 比 5 の製剤では、算出した N/P 比は LNPs の方が高い値を示しており、その結果 lipoplexes に比べ高い細胞内導入率を示したことも考えられた<sup>117, 120</sup>。しかしながら、表 4-1 で示した通り、N/P 比やゼータ電位に関わらず LNPs は lipoplexes に比べ顕著に高い細胞内導入効率を示し、これは何かしら構造上の違いが起因していると考えられた。そのため、両製剤で細胞への取込みメカニズムが異なっていると考え、siRNA だけでなく脂質キャリアの細胞内動態を観察するために、脂質キャリアに DiO を導入し、両者の観察を行った。LNPs は細胞添加後 1 時間で siRNA も DiO も細胞内に導入され、細胞内の両者の局在は一致することが確認できた。従って、LNPs では siRNA 及び脂質キャリアの両者が複合体として細胞内に取込まれていることが示された。一方で、lipoplexes に関して siRNA 及び DiO の両者の取込みは非常に僅かであり、LNPs に比べ細胞内への導入効率が低いことが確認された。また、両者の局在も一致しておらず、siRNA は脂質キャリアから一部解離している可能性が考えられた。LNPs に含まれる siRNA に比べ、lipoplexes ではより粒子表面に局在しており、それが培地等で希釈された際に粒子表面から解離し<sup>48, 118</sup>、それは培地に含まれるカルシウムイオン或いはマグネシウムイオンと言った 2 価のカチオン性イオンの存在下で促進することが考えられた。

これを示すため、siRNA を失活させる RNase を添加することで、lipoplexes 及び LNPs の両製剤中の siRNA の局在を評価した。結果、lipoplexes は LNPs に比べ RNase 添加によって siRNA の残存率が低下し、粒子表面に局在する siRNA の量が LNPs に比べ多いことが示され、他報告例と一致した<sup>128</sup>。本結果から、lipoplexes は培地などの外部環境に影響を受けやすく、*in vivo* 投与を考えた場合、LNPs の方が siRNA のキャリアとして有利であると考えられた。

#### 4-5-3 siRNA 担持脂質ナノ製剤の細胞内取込み経路に関する評価

siRNA 担持脂質ナノ製剤は、主にエンドサイトーシスにより細胞内に導入されることが知られており<sup>121, 129, 130</sup>、細胞内動態はその取込み経路に依存することから、lipoplexes 及び LNPs の取込み経路の評価を行った。エンドサイトーシスは飲作用と呼ばれるピノサイトーシスと、食作用と呼ばれるファゴサイトーシスの2つに大まかに分けられることが知られている<sup>131</sup>。ファゴサイトーシスは主にマクロファージと言ったファゴソームが主に取り込むメカニズム<sup>132</sup>であるのに対し、ピノサイトーシスは全ての細胞に共通した取込みメカニズムであり、更に次の4種に分けることができる。即ち、クラスリン介在エンドサイトーシス、カベオラ介在エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、及びクラスリン及びカベオラ非依存エンドサイトーシスである<sup>131-133</sup>。

エンドサイトーシスは取込む粒子のサイズに大きく依存することが知られており、カベオラ介在エンドサイトーシスは100–120 nm、クラスリン介在エンドサイトーシスは50–100 nm、マクロピノサイトーシスは大まかに5 µm、そしてクラスリン及びカベオラ非依存エンドサイトーシスは40–50 nmと言われている<sup>121, 131, 132</sup>。Lipoplexes 或いは LNPs の取込みメカニズムに関する報告は多数あり、製剤物性の他に用いる細胞種など様々な要因が関与することが知られている<sup>121, 122, 132</sup>。また、それぞれの経路に対する阻害剤も知られており、クラスリン介在エンドサイトーシスには chlorpromazine が、カベオラ介在性エンドサイトーシスには nystatin が、マクロピノサイトーシスには cytochalasin D が代表例として知られている<sup>121, 134</sup>。

2つの研究グループが異なるカチオン脂質を含んだ LNPs を用いて細胞への取込みメカニズム、細胞内動態及び siRNA のエンドソームエスケープに関する詳細な報告を行っている<sup>135</sup>。Sahay らは、C12-200 と呼ぶ合成カチオン脂質を用いて調製した LNPs は、HeLa 細胞にマクロピノサイトーシスで取込まれることを Alexa647 標識した siRNA を共焦点顕微鏡でモニターすることで観察している<sup>136</sup>。他方、Gilleron らは蛍光修飾或いは金コロイドで修飾した siRNA を封入した LNPs を利用し、種々細胞株での細胞内動態を評価している<sup>137</sup>。利用した LNPs はマクロピノサイトーシス及びクラスリン介在エンドサイトーシスによって細胞に取込まれることを示した<sup>137</sup>。

今回の検討で調製した lipoplexes 及び LNPs に関しても HeLa 細胞を用いて取込み経路を評価したところ、LNPs は nystatin で取込みが阻害されるためカベオラ介在エンドサイトーシスが主要な経路であるのに対し、lipoplexes は nystatin 及び cytochalasin D で阻害されるためカベオラ介在エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスが主要な経路であることが明らかとなった。Lipoplexes を調製する際に用いたカチオニックリポソームは、lipoplexes と同様に nystatin 及び cytochalasin D で取込みが阻害されることを確認した。Lipoplexes は培地中で粒子表面の siRNA が一部解離していると考えられ、細胞への取込みメカニズムはカチオニックリポソームと同様であることが示唆された。

用いる阻害剤の種類によって、細胞内の動態が異なる様子が観察された。Lipoplexes の細胞内取込みに関して、nystatin を用いた場合 siRNA は細胞の中心部に局在し、細胞膜付近には局在しなかった。つまり、カベオラ介在エンドサイトーシスが阻害されることで細胞膜付近の局在が消失した。一方、cytochalasin D を用いた場合 siRNA は細胞膜を縁取るようにリング状に siRNA が局在し、細胞の中心部には局在しなかった。つまり、マクロピノサイトーシスが阻害されることで細胞の中心部の局在が消失した。これは、カベオラが非常に安定であり<sup>121, 122</sup>、マクロピノサイトーシスに比べカベオラ介在エンドサイトーシスによる取込み速度が非常に遅いためと考えられた<sup>121, 138</sup>。

結論として、lipoplexes を用いた場合、細胞内に効率的に取り込まれる経路はマクロピノサイトーシスであり、カベオラ介在エンドサイトーシスは効率の面で低い経路であると考えられる。一方で、LNPs ではカベオラ介在エンドサイトーシスが主要な取込み経路であるにも関わらず、非常に効率的に短時間で細胞内全体に分布することが確認されている。コレステロールがカベオラ介在エンドサイトーシスに重要な役割を示すことが知られており<sup>139, 140</sup>、LNPs ではそのレセプターに認識されやすいように、例えばコレステロールが粒子の表面に局在しやすいような構造を取っているのかもしれない。しかしながら、それを示す根拠データはなく、詳細な検討が必要である。今回の検討を通して、同一の構成成分及び同一の組成であっても、異なる調製手法で得られた製剤は、細胞への取込みメカニズムが異なり、その後の細胞内動態に大きく影響が生じることが明らかとなった。エンドソームエスケープの効率なども含め、薬効に直結する細胞内動態の更なる詳細の把握が今後重要となる。

#### 4-5-4 siRNA 担持脂質ナノ製剤のサイトカイン産生に関する評価

Lipoplexes 及び LNPs をマクロファージに添加した際の炎症性サイトカイン産生に関して、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の産生量は両者で異なった。Judge らは、siRNA 担持脂質ナノ製剤に含まれる siRNA は、TLRs 3, 7 或いは 8 を刺激し、炎症性サイトカインが産生されるが siRNA 単独では産生されないことを報告している<sup>141</sup>。このことは、siRNA 担持脂質ナノ製剤は細胞内に取り込まれ、細胞内のエンドソームに発現しているそれら TLRs を刺激することで炎症性サイトカインが産生されることを意味している<sup>21, 24, 141</sup>。他方、Kedmi らは、カチオニックなナノ粒子が細胞外表面に発現する TLR4 を刺激し、TNF- $\alpha$  或いは IL-1 $\beta$  と言った炎症性サイトカインの産生を惹起することを報告している<sup>142</sup>。

本検討では、N/P 比が低い程 TNF- $\alpha$  の産生量は増加することから、核酸を認識する細胞内の TLRs 3, 7 或いは 8 が TNF- $\alpha$  の産生に関与していることが考えられた。一方、IL-1 $\beta$  の産生には siRNA の関与は少ないと考えられた。Lipoplexes はマクロファージに添加した際に、粒子表面の siRNA が一部解離していることが示唆されており、カチオニックな粒子が IL-1 $\beta$  の産生に関与したと考えられた。そのため、lipoplexes は細胞内の導入効率は低いものの、培地中で siRNA が解離することでカチオニックな粒子の性質が現れ、細胞外表面の TLR4 を刺激し、IL-1 $\beta$  が産生されたと考えられた。このことから、siRNA 搭載脂質ナノ製剤では、siRNA だけでなくカチオン脂質が関与する免疫刺激性も考慮する必要があると言える。

#### 4-5-5 まとめ

本章では、siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性がどのように有効性及び安全性に影響するかを *in vitro* による評価研究を行った。具体的に、臨床開発が進められている 2 種のタイプの異なる siRNA 担持脂質ナノ製剤をモデルに、異なる調製手法にて製剤を作り分け、粒子の構造解析を含めた製剤の物理化学的性質を評価するとともに、目的の細胞への取込み効率、取込み経路及び標的遺伝子のノックダウン効率 (有効性) と炎症性サイトカインの産生量及び補体の活性化 (安全性) に関して体系的な評価を行い、製剤特性と有効性・安全性との関連性を評価した。

今回調製を行った lipoplexes 及び LNPs では粒子サイズ或いは粒子構造含めた製剤物性に大きな違いは認められなかったものの、細胞の取込み程度には大きな違いが生じた。RNase を利用した検討において、両者粒子中の siRNA の局在は異なり、lipoplexes は粒子表面に siRNA が局在しやすく、培地等に添加した際に一部 siRNA が粒子表面から解離することが細胞の取込み効果に大きく影響を与えていると考えられた。LNPs は siRNA と脂質キャリアが複合体として細胞内に取り込まれているのに対し、lipoplexes は siRNA が一部解離しており、両者の細胞内の取込み経路も異なることが明らかとなった。

安全性に関して、炎症性サイトカインの産生量は lipoplexes に比べ LNPs で低いこと、また炎症性サイトカインの産生には siRNA 及びカチオン脂質の両者が関与するため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には両方の免疫刺激性を考慮する必要があることが明らかとなった。今回の検討に関して、有効性及び安全性の両面から、lipoplexes に比べ LNPs の方が全身投与性の siRNA のキャリアとして適切と考えられた。異なる siRNA 配列或いはカチオン脂質を用いても同様の結果が得られるかは更なる検証が必要と考えられる。



## 4-6 実験の部

### 4-6-1 試薬

Alexa647 ラベル化 PKN3 siRNA は antisense 鎖の 3'末端 Amino C6 linker を介して Alexa647 を結合したものを GeneDesing 社から購入した (sense, 5'-AGACUUGAGGACUCCUGGACAA-3'; antisense, 5'-UUGUCCAGGAAGUCCUCAAGUCU-3')<sup>45</sup>。KIF11 siRNA は invirogen 社から購入した (sense, 5'-CAUUCCCAGGAACUUUGCAAGUUA-3'; antisense, 5'-UUGUCCAGGAAGUCCUCAAGUCUG-3')。1,2-dioleoyloxy-3-dimethylaminopropane (DODMA)、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-(polyethylene glycol-2000) (PEG-DSPE)、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) 及び cholesterol は日油株式会社から購入した。3,3'-dihexadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiOC16) 及び Alexa488-labeled cholera toxin B はモレキュラープローブ社から購入した。chlorpromazine hydrochloride、nystatin 及び cytochalasin D はシグマアルドリッチ社から購入した。RiboShredder RNase Blend は Epicentre Biotechnologies から購入した。Proteinase K はタカラバイオ社から購入した。hKIF11 primer (TaqMan Gene Expression Assay, FAM, Inventoried) 及び hHPRT1 primer (TaqMan Gene Expression Assay, VIC, Inventoried) は Applied Biosystems 社から購入した。Normal Human Serum Complement は QUIDEL 社から購入した。Heat Aggregated Gamma Globulin は和光純薬株式会社から購入した。その他の試薬は市販品特級を用いた。

### 4-6-2 細胞株

HeLa 細胞及び MIA-PaCa2 細胞は JCRB Cell Bank (Osaka, Japan) から入手し、10%ウシ胎児血清及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で培養した。ヒト単球系細胞 (THP-1) は JCRB Cell Bank から入手し、10%ウシ胎児血清及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 (RPMI) で培養した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### 4-6-3 Lipoplexes 及び LNPs の調製及び製剤物性評価

#### 4-6-3-1 Lipoplexes の調製

Lipoplexes は既報に従って調製した<sup>43, 116</sup>。DODMA, PEG-DSPE, DSPC 及び cholesterol は 50:1.5:10:38.5 の組成比でカチオニックリポソームを調製した。脂質はエタノール (3 mL) に溶解後、1N 塩酸 (70.5  $\mu$ L) 及び注射用蒸留水 (6.93 mL) を加え分散させた (total lipids: 7.8 mg/mL)。カチオニックリポソームは、高圧押し出し法により 0.05  $\mu$ m のポリカーボネートフィルター (LiposoFast, Avestin, Canada) を用いて造粒を行い、粒子サイズ約 60 nm のリポソームを得た。このカチオニックリポソームに Alexa647 ラベル化 siRNA 水溶液 (10 mg/mL) を任意の N/P 比となるよう添加し攪拌した。続いて、エタノール濃度が 5%以下となるよう注射用蒸留水を添加し攪拌した。その後、PBS (300 mL) 及びアミコン (MWCO 100 KDa, Merck Millipore, Ireland) を用いて、精製及び buffer 交換を行った。最後に 0.2  $\mu$ m のシリンジフィルター (Acrodisc, Advantec, Japan) にてろ過滅菌を行った。

#### 4-6-3-2 LNPs の調製

Jeffs ら<sup>48</sup> の文献を参考に LNPs を調製した。Alexa647 ラベル化 siRNA を 20 mM クエン酸 buffer (pH 4.0) に溶解した (0.1125 mg/mL, 10 mL)。DODMA, PEG-DSPE, DSPC 及び cholesterol は 50:1.5:10:38.5 の組成比でエタノールに溶解し (total lipids: 3.9 mg/mL for an N/P ratio of 5)、20 mM クエン酸 buffer (pH 4.0) を添加し、エタノール濃度を 90%に調整した。siRNA 水溶液及び脂質のエタノール溶解液をスターラーを用いて混合し、LNP を形成させた。続いて、NaCl を溶解した (300 mM) 20 mM クエン酸 buffer (pH 6.0) を添加し、37°C で 30 分間攪拌した。その後、Q coin filter (Pall 社, USA) を通過させ、注射用蒸留水を添加しエタノール濃度を 5%以下とした。その後、PBS (300 mL) 及びアミコン (MWCO 100 KDa, Merck Millipore, Ireland) を用いて、精製及び buffer 交換を行った。最後に 0.2  $\mu$ m のシリンジフィルター (Acrodisc, Advantec, Japan) にてろ過滅菌を行った。

#### 4-6-3-3 平均粒子径及びゼータ電位測定

平均粒子径及びゼータ電位はゼータサイザーナノ ZS (Malvern Instruments 社, UK) を用いて測定を行った。測定には注射用蒸留水を用いて、各 3 回の測定を行った。

#### 4-6-3-4 siRNA 及び脂質含量測定

Alexa647 ラベル化 siRNA は逆相イオンペア HPLC 法により測定した。測定条件を以下に示した。

LC : Shimazu 20A

Column : Xbridge OST C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm (Waters)

Mobile phase A : 8 mM triethylamine (TEA)/100 mM hexafluoroisopropanol solution (HFIP)

Mobile phase B : Methanol

Gradient program :

Time (min)	0	20
A vol. (%)	95	70
B vol. (%)	5	30

Column temperature : 60°C

Flow rate : 0.5 mL/min

Injection volume : 2  $\mu$ L

UV wavelength : 260 nm

脂質は CAD を用いた逆相 HPLC 法により測定した。測定条件を以下に示した。

Column : Xbridge C8, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm (Waters)

Mobile phase A : 50% isopropyl alcohol, 20% ammonium acetate (10 mM, pH 7.0), 30% MilliQ 水

Mobile phase B : 80% isopropyl alcohol, 20% ammonium acetate (10 mM, pH 7.0)

Gradient program :

Time (min)	0.02	15.0	18.0	18.1	24.0
A vol. (%)	100	0	0	100	100
B vol. (%)	0	100	100	0	0

Column temperature : 60°C

Flow rate : 1.0 mL/min

Injection volume : 10  $\mu$ L

N/P 比は DODMA 及び Alexa-labeled siRNA の測定濃度を用いて、以下の(1)式より算出した。

$$\text{Measured N/P value} = (\text{Concentration of DODMA relative to 1 mg/mL siRNA/Molecular weight of DODMA}) / (\text{The number of base pairs/Molecular weight of siRNA}) \quad (1)$$

#### 4-6-4 Cryo-TEM 測定

Lipoplex 或いは LNPs の脂質濃度は 17.4 mg/mL (N/P = 10) 及び 8.7 mg/mL (N/P = 5) であり、各サンプル 3  $\mu$ L をカーボングリッドに添加し、Vitrobot system (FEI 製, USA) を用いて過剰量のサンプルを拭取り、液体エタン (90 K) にてサンプルを急速凍結させた。凍結下 ( $\sim$ 88 K) にて AMT HR CCD カメラを用いて形態観察を行った (5 万倍率)。測定機器は FEI G20 Lab6 200 kV TEM を用いた。大阪大学超高压電子顕微鏡センターの光岡薫先生の下で測定を行った。

#### 4-6-5 Small-angle X-ray scattering (SAXS) 測定

Lipoplex 或いは LNPs (N/P: 5, siRNA: 31  $\mu$ M) の SAXS 測定を 0.05–28  $\text{nm}^{-1}$  の  $q$ -range にて行った<sup>143</sup>。SAXSess カメラ (Anton Paar, Austria) を用いて測定を行った。サンプルは石英のキャピラリーセルに充填し測定を行った。測定結果はバックグラウンドを差し引き、補正した値を用いた。コリメーションの補正手順は Lake のアルゴリズム<sup>144</sup> を用いた。0.05–8  $\text{nm}^{-1}$  の解析パターンは間接フーリエ変換 (IFT)<sup>145</sup> によって解析した。信州大学繊維学部の佐藤高彰先生の下で測定を行った。

#### 4-6-6 細胞内取込み評価

##### 4-6-6-1 共焦点レーザー顕微鏡を用いた評価

HeLa 細胞を 35 mm ガラス製培養皿に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells/dish)、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養を行った。その後、DPBS で細胞を 2 回洗浄し、lipoplexes 或いは LNPs を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1 mL を細胞に添加した (siRNA: 100 nM)。37°C で各時間 (0.5, 1, 2, 6, 12 及び 24 h) インキュベートした後、細胞を DPBS で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。固定した細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000; Olympus, Japan)<sup>146</sup> を用いて観察した。細胞内の siRNA は Alexa647 の励起波長 635 nm の強度から評価した。細胞内の Alexa647 の細胞内強度は解析ソフト ImageJ を用いて評価した。

##### 4-6-6-2 フローサイトメトリーを用いた評価

HeLa 細胞を 24-well plate に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells/dish)、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養を行った。その後、DPBS で細胞を 2 回洗浄し、lipoplexes 或いは LNPs を含む HBSS 1 mL を細胞に添加した (siRNA: 100 nM)。37°C で 1 時間インキュベートした後、細胞を回収し 10%FBS を含む PBS 中に分散した。その後、フローサイトメトリー (BD LSRFortessa X-20 flow cytometer, BD Biosciences, USA) を用いて評価を行った。

#### 4-6-7 siRNA 及び脂質キャリアとの細胞内動態評価

siRNA は sense 鎖の 5'末端に結合した Alexa647 を、脂質キャリアは疎水性プローブである DiO を導入し、siRNA 及び脂質キャリアの細胞内動態を評価した。DiO は総脂質量の 1 mol%を導入した。HeLa 細胞を 35 mm ガラス製培養皿に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells/dish)、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養を行った。細胞は DPBS を用いて 2 回洗浄した後、lipoplexes 或いは LNPs を含む PBS 1 mL を細胞に添加した (siRNA: 100 nM)。培地中の 2 価イオンの影響を確認するために、glucose (1.0 mg/mL)、CaCl<sub>2</sub> (0.14 mg/mL) 及び MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.18 mg/mL)を含む PBS と、glucose のみ含む PBS を用いた。37°C で 1 時間のインキュベーションの後、細胞は DPBS を用いて 2 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。先述の方法により細胞観察を行った。細胞内の DiO は 473 nm の励起波長から蛍光強度を評価した。

#### 4-6-8 RNase による siRNA 失活試験

Lipoplexes 及び LNPs の粒子表面に局在する siRNA の量を評価するために、RNase 添加による siRNA 含量の測定を行った。Lipoplexes 及び LNPs を HBSS で希釈した後、30 U/mL の RiboShredder RNase Blend を添加し (siRNA: 1.25 µM)、37°C で 1 時間インキュベートした。Proteinase K を添加し RNase を失活した後、siRNA の含量を測定した。siRNA の残存率は以下の式 (2) から算出した。

$$\text{siRNA 残存率 (\%)} = (\text{RNase 添加時の siRNA 濃度}) / (\text{RNase 未添加時の siRNA 濃度}) \times 100 \quad (2)$$

#### 4-6-9 Inhibitor を用いた細胞内取込み経路評価

HeLa 細胞を 35 mm ガラス製培養皿に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells/dish)、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養を行った。細胞を DPBS で洗浄した後、それぞれ chlorpromazine、nystatin 或いは cytochalasin D を含む DMEM 1 mL を添加し (各濃度 : 10 µg/mL)、37°C で 30 分間インキュベートした<sup>134</sup>。DPBS を用いて 2 回細胞を洗浄した後、lipoplexes 或いは LNPs を含む HBSS を 1 mL 添加した。HBSS には各阻害剤 10 µg/mL の濃度で添加した。Lipoplexes は LNPs に含まれる siRNA に比べて細胞への取込み量が大幅に低いことから、LNPs は siRNA 100 nM を細胞に添加したのに対し、lipoplexes は 10 倍濃度の 1 µM で添加した。37°C で 1 時間のインキュベートした後、DPBS にて細胞を 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。先術の方法にて細胞観察を行った。

Alexa488-labeled cholera toxin B を用いて、共局在評価を行った。HeLa 細胞を 35 mm ガラス製培養皿に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells/dish)、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養を行った。DPBS を用いて 2 回細胞を洗浄した後、lipoplexes (siRNA; 1 µM) 或いは LNPs (siRNA; 100 nM) を含む HBSS 1 mL に Alexa488-labeled cholera toxin B (5 µg/mL) を加えたものを添加した。37°C で 1 時間インキュベートし、上記と同様に共焦点レーザー顕微鏡にて細胞の観察を行った。

#### 4-6-10 標的遺伝子のノックダウン活性評価

HeLa 細胞及び MIA PaCa-2 細胞を 96 well の培養皿に播種し ( $1.0 \times 10^4$  cells/well)、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養を行った。培地を吸引除去した後、OPTI-MEM で希釈した製剤を 100 µL 各 well に添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養を行った。培地を吸引除去し、PBS で細胞を洗浄した後、TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit (Applied Biosystems) を用いて細胞を溶解し、cDNA 合成を行った。その後、qPCR 測定により標的遺伝子の KD 率を算出した。以下の式 (3) から KD 率を算出した。

$$2^{-(\text{KIF11 CT} - \text{HPRT1 CT})} = \Delta\text{CT} \quad (3)$$

#### 4-6-11 細胞毒性評価

HeLa 細胞を 96 well の培養皿に播種し ( $5.0 \times 10^3$  cells/well)、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養を行った。培地を吸引除去し、lipoplexes 或いは LNPs を含む DMEM (10% FBS 含有) 100  $\mu$ L 細胞に添加した (siRNA: 1, 10, 100 及び 1000 nM)。37°C で 24 時間インキュベーションした後、DPBS を用いて細胞を 2 回洗浄した。その後、細胞に WST-8 溶液 (Cell Counting Kit-8:DMEM = 1:10) を 100  $\mu$ L 添加し 4 時間室温でインキュベートした。マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus, Bio-Rad Laboratories Inc) を用いて、450 nm の吸光度を測定した。細胞毒性は次の式 (4) から算出した:

$$\% \text{ cell viability} = (\text{Abs. [cells + lipoplexes or LNPs + WST]} - \text{Abs. [WST]}) / (\text{Abs. [cells + WST]} - \text{Abs. [WST]}) \times 100\% \quad (4)$$

Abs. [cells + lipoplexes or LNPs + WST]: 検体の吸光度

Abs. [cells + WST]: 陰性対象の吸光度

Abs. [WST]: blank の吸光度

#### 4-6-12 サイトカイン産生評価

THP-1 細胞に ( $4.0 \times 10^5$  cells/mL) に DMSO に溶解した 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加し、12 well プレートに 1 mL 播種し ( $4.0 \times 10^5$  cells) 播種し 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養を行い、マクロファージへ誘導した。DPBS を用いて PMA を洗浄した後、lipoplexes 及び LNPs を細胞に添加した (siRNA: 100 nM)。37°C で 24 時間インキュベートした後、細胞を遠心分離し (1,500 rpm, 5 分間)、上清を回収し TNF- $\alpha$  或いは IL-1 $\beta$  の生成量を ELISA キットを用いて測定した (DuoSet ELISA assay kit, R&D systems)。これとは別に、他方の 12 well プレート中の細胞を DPBS を用いて 2 回洗浄した後、TritonX-100 (0.5% in DPBS) を添加し、細胞を溶解した。溶解した細胞中の siRNA 濃度を蛍光プレートリーダーを用いて定量した (励起波長: 650 nm、発光波長: 690 nm、SpectraMax PARADIGM, Molecular Devices)。また、蛋白量を Pierce 660 nm Protein Assay を用いて定量した (吸光波長: 660 nm、Thermo Fisher Scientific)<sup>134</sup> THP-1 細胞への lipoplexes 或いは LNPs の取込み効率を定量した Alexa647 修飾 siRNA 量 (ng) 及び蛋白量 ( $\mu$ g) の関係から評価した。

#### 4-6-13 補体活性化評価

##### 4-6-13-1 C3a 測定

核酸濃度を 200  $\mu$ g/mL に希釈した lipoplexes 及び LNPs をヒト血清と 1:1 で混合し、37°C で 30 分間インキュベートし、10 mM EDTA を添加した ELISA キット (Human C3a ELISA Kit, BD 社) 付属の Specimen Diluent で 10,000 倍希釈し、生成した補体活性化産物 (C3a) を測定した。

##### 4-6-13-2 C5a 測定

核酸濃度を 200  $\mu$ g/mL に希釈した lipoplexes 及び LNPs をヒト血清と 1:1 で混合し、37°C で 30 分間インキュベートし、10 mM EDTA を添加した ELISA キット (Monkey Complement C5a Anaphylatoxin ELISA Kit, MyBioSource 社) 付属の Specimen Diluent で 10 倍希釈し、生成した補体活性化産物 (C5a) を測定した。

#### 4-6-14 統計解析

RNase による siRNA 失活試験は student's *t*-test を実施した。フローサイトメトリーによる評価には Aspin-Welch test を実施した。サイトカイン産生評価には Dunnett's multiple-comparisons test による ANOVA 評価を実施した。



## 第5章 結論

### 5-1 本研究の成果と意義

本研究では、siRNA 担持脂質ナノ製剤の実用化に向けた課題を、開発動向・技術の成熟度 (有効性/安全性) 及び法規制の観点から考察し、有効な開発戦略への提言を行うことを目的とした。

開発動向・技術の成熟度 (有効性/安全性) の観点から、第2章にて考察された課題点及びその解決策は以下のようにまとめることができる。

- ① 開発が進められている siRNA の対象疾患は低分子薬或いは抗体医薬品を含めた既存薬では十分な治療効果が見られていない癌や感染症が主であり、臨床開発が進められているプログラムの約 60%は全身投与性の薬剤であった。60%の内訳の中、40%は siRNA 担持脂質ナノ製剤を用いた静脈内投与製剤、20%は皮下投与製剤である GalNAc 核酸であった。siRNA 担持脂質ナノ製剤は目的の細胞内への送達効率、或いは薬効発現までの細胞内動態に関する制御の他、毒性のコントロールが非常に難しく、有効性と安全性のリスクベネフィットのバランスのとれた高い製剤化技術が求められており、その技術的課題のために迅速な開発に繋がっていないと言える。一方、化学合成品として製造可能な GalNAc 核酸は製造面でのコントロールのしやすさから siRNA 担持脂質ナノ製剤からの切り替えが進められているが、現状対象が肝疾患に限られること、siRNA 担持脂質製剤に比べ高い投与量が必要であるという課題を抱える。
- ② 米国のバイオベンチャーが siRNA の開発を先行しており、日本企業或いは海外のメガファーマの開発への参入はごく僅かであった。米国のバイオベンチャーは大学発であることも多く、核酸配列や修飾方法、或いは siRNA の DDS 技術の主要な特許が抑えられており、他社の参入が難しい状況になっていると考えられた。そのため、単独の企業で開発を進めるのは困難であり、siRNA に適した疾患とその標的となる mRNA に関する情報、その相補的な siRNA の配列のスクリーニングと修飾パターンも含めた原薬供給体制の構築、高い薬物送達技術など、アカデミアと産業界との協力によるシーズの創出が必要不可欠と考えられる。
- ③ siRNA の DDS キャリアの違い (ポリマー粒子或いは脂質粒子) で特に発現する毒性プロファイルの違いは無く、infusion reaction、flu 様症状、或いは肝機能の低下など従来ナノ医薬品 (Doxil®) でも見られる毒性所見に加え、炎症性サイトカイン産生など自然免疫に関与することで生じると考えられる毒性所見が認められた。そのため、*in vitro* 評価等によりいかに早期に確度良く評価出来るかが非常に重要であると考えられた。
- ④ 臨床開発されている LNPs に比べ、lipoplexes の方が DLT (Dose Limiting Toxicity) は低く、低用量から有害事象が認められていることが調査の結果から見出された。siRNA 或いはカチオン脂質は各社異なるものを用いているため、有効性及び安全性の直接的な比較はできず、同一の材料を用いて lipoplexes 及び LNPs を作り分け、それら粒子の構造を含めた製剤の品質特性がどのように有効性、安全性に影響するかを評価できれば、今後の開発戦略にも直結する有用な情報になると考えられた。

法規制の観点から、第 3 章にて考察された課題点及びその解決策は以下のようにまとめることができる。

- ① 核酸医薬品に特化したガイドラインはこれまで存在していないが、作成のための活動は行われており、特に国内では年内中の策定が予定されている。しかし、配列特異的なオフターゲット効果をどのように評価するか、或いは種差の違いからサロゲート配列での非臨床試験にどの程度の意味が有るかなど、核酸特有の問題に対して現在も議論が行われており、標的遺伝子・標的配列・動物での相同性も考慮に入れ、製剤の特性に合わせたケースバイケースの対応が必要とされる。
- ② 従来のナノ医薬品は必ずしも標的組織或いは細胞に粒子として導入される必要はなく、これまでに 3 極で発出されているナノ医薬品のガイドラインでは、製剤の体内動態或いは組織分布に関する記述はあるものの、細胞内動態に関してはほとんど記述されていない。siRNA 担持脂質ナノ製剤は粒子として標的の細胞に導入される必要がある点で、従来のナノ医薬品とは大きく異なる。そのため、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には細胞内動態の制御が非常に重要と考えられる。
- ③ 3 極で初めて本邦から「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」が 2016 年に発出されたが、細胞内動態の制御に関する具体例はなく、十分な記載になっているとは言い難い。これは細胞内動態の評価手法が確立されている訳ではなく、siRNA 担持脂質ナノ製剤の製剤特性がどのように細胞内動態に関連するかに関する科学的データが十分に蓄積されてはいないためと考えられ、レギュラトリーサイエンス研究の推進が不可欠と考えられた。

siRNA 担持脂質ナノ製剤は従来のナノ医薬品に比べて、いかに目的の細胞内に効率的に導入し機能を発揮させるかが重要であり、細胞内動態をコントロールし、低い投与量でも有効性及び安全性を発揮させることが開発の鍵と考えられた。Doxil®をはじめとしたナノ医薬品の体内動態に関しては解析が非常に進んでおり、臓器分布等の科学的データは蓄積されているものの、必ずしも粒子として標的の細胞内に取込まれる必要はないため細胞内動態に関する知見はまだ十分には蓄積されていないという課題が見出された。siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性がどのように細胞内動態に関与するか不明な点も多いため、第4章では製剤の品質特性がどのように細胞内動態に影響するかを *in vitro* による評価を行った。具体的に、臨床応用されている lipoplexes 及び LNPs を同一の構成成分から異なる調製手法で製剤を作り分け、粒子の構造情報も含めて製剤の品質特性解析を行うとともに、*in vitro* の系で製剤を細胞に添加することで、その品質特性がどのように細胞への取込み効率に影響を与え、その結果として有効性及び安全性とどのように関連するかを評価した。*In vitro* 評価は非常にシンプルな系では有るが、細胞への取込み効率、取込みメカニズム、薬効或いはサイトカイン産生を含めた安全性を評価するには非常に有用であることを明らかとすることができた。

第4章で実施した *in vitro* による評価研究を通して得られた結果を以下にまとめた。

- ① siRNA 或るはカチオン脂質を含めた同一成分から調製した lipoplexes 及び LNPs を比較したところ、lipoplexes は LNPs に比べ粒子の表面に局在する siRNA 量が多く、細胞へ添加した際に siRNA が脂質粒子から解離しやすいことが判明した。同一の構成成分であるにも関わらず、細胞への取込み効率が大きく異なり、LNPs で非常に高い siRNA の取込み効率が確認され、また細胞への取込みメカニズムも異なることが示された。有効性評価として実施した標的 mRNA のノックダウンも細胞内の取込み効率に相関して LNPs で高いノックダウンが認められ、有効性の観点から lipoplexes に比べて LNPs での有用性が示された。
- ② 安全性の評価のためにマクロファージへ製剤を添加した際の炎症性サイトカインの産生量を評価した結果、lipoplexes は LNPs に比べ高いサイトカインの産生量が認められ、安全性の観点でも lipoplexes に比べて LNPs での有用性が示された。また、今回の評価結果から、これまで言われていた siRNA によるサイトカイン産生だけでなく、カチオン性脂質が惹起するサイトカイン産生も確認され、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には、両者の毒性を考慮する必要がある、それを今回実施した評価のよういかに開発の早期に評価出来るかが非常に重要であることを科学的根拠に基づいて提示することができた。

これら得られた実験結果は次のように結論付けることができる。

- 1) 用いる siRNA の配列、カチオン脂質の種類、或いは製剤の構成成分を変えた製剤の有効性  
或いは安全性を評価した研究は多くあるものの、同一の構成成分及び組成比を用いて、その  
調製手法と得られた粒子構造がどのように製剤の有効性及び安全性に影響を与えるかについ  
て体系的に評価した報告は本研究が初めてである。
- 2) 同じ材料から構成されたナノ製剤であってもその粒子の構造が異なると、標的とする細胞へ  
の取込み効率が大きく異なり、その結果として有効性及び安全性に大きく影響することを科  
学的データに基づいて検証した。また、細胞への取込み効率が大きく異なるのは、細胞に添  
加した際に siRNA が DDS キャリアから遊離すること、またその結果として粒子の表面状態  
が変わり、細胞への取込み経路が変わるからであることを見出した。このことは、血中投与  
後の製剤の安定性を *in vitro* 評価で代替して評価できることを示唆している。
- 3) siRNA 担持脂質ナノ製剤の安全性には、siRNA だけでなくカチオン脂質を由来とする毒性も  
考慮する必要があることを確認した。具体的には、siRNA とカチオン脂質では認識される  
TLRs が異なり、siRNA 担持脂質ナノ製剤に含まれるそれぞれの局在が変わると、炎症性サイ  
トカインが産生パターンも変わることを見出した。
- 4) CMC 研究が製剤の有効性及び安全性に大きく影響し、*in vitro* での体系的な評価が効率的な  
TR 研究に直結すると考えられ、その結果 siRNA の迅速かつ効率的な開発に繋がると考えら  
れた。
- 5) siRNA 担持脂質ナノ製剤が薬効を発現するまでの細胞内動態は大きく、i) 細胞に取込まれる  
効率或いは経路、ii) siRNA が脂質ナノ粒子から解離し、細胞質に放出される過程、iii) 細胞  
質中で antisense 鎖が RISC に取込まれる過程、の 3 つに分けることができる。本研究では、  
siRNA 担持脂質ナノ製剤の製剤特性が i)に関わる関連について一部明らかとした。ii)及び iii)  
の詳細説明は今後の検証課題と考える。

本研究の成果を以下に記述した。

### 本研究の成果：

1. siRNA の実用化促進にはデリバリー技術の高い完成度と深い理解が必須となる。  
異なる手法で調製した siRNA 担持脂質ナノ製剤は、同一の処方であってもその製剤特性が異なり、そのため製剤の有効性及び安全性に大きく影響することを科学的根拠に基づいて検証し、製剤の品質特性の深い理解が不可欠であることを実証した。
2. siRNA 担持脂質ナノ製剤はその作用機序から従来のナノ医薬品と異なり、細胞内動態の制御が非常に重要と考えられ、それを検証する *in vitro* 評価の構築が非常に有用である可能性を示した。

また、これら研究の成果を踏まえて siRNA の実用化促進に向けた提言を以下に記述した。

### siRNA の実用化促進に向けた提言：

1. siRNA 担持脂質ナノ製剤の有効性及び安全性には、細胞内動態が大きく影響するため、非臨床試験での *in vitro* による体系的な細胞内動態の評価が開発成功の鍵となり得る。これは効率的な TR 研究に直結し、その結果として開発のスピード及び成功確率の向上に繋がると考えられる。
2. 体系的な *in vitro* 評価手法は現状確立されておらず、製剤特性と細胞内動態に関する科学的データを集約・蓄積し、非臨床試験で実施すべき項目の整理が必要と考えられる。  
また、法整備化などによりその結果にアクセスしやすい環境作りが siRNA の早期実用化には不可欠と考える。

## 5-2 今後の展望

核酸医薬品はこれまでに標的にされなかった疾患に対する治療薬として、今後更に承認薬は増えて行くと予想される。アンチセンス核酸に関して、国内企業も開発に参入している Duchenne 型筋ジストロフィーのように、核酸医薬品に適した疾患の選定が非常に重要と考えられる。一方、siRNA の開発は現在米国 Alnylam 社によって進められている Patisiran (ALN-TTR02) の開発動向が今後を大きく左右すると考えられる。siRNA のデリバリー技術の開発上の技術的なハードルは非常に高いが、Patisiran のデリバリー技術 (SNALP) は非常に完成度が高く、また siRNA 担持脂質ナノ製剤で送達しやすい肝臓を標的とした疾患であることから、これが承認されない場合は今後の siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発に大きく影響を与えると予想される。

一方で、本研究では siRNA 担持脂質ナノ製剤の実用化促進に向けた課題を精査し、CMC 研究が製剤の有効性及び安全性に大きく影響することを示した。siRNA 担持脂質ナノ製剤の今後の開発動向は、CMC 研究の更なる検証を含めたデリバリー技術の高い完成度が求められると考える。具体的に、製剤の構造情報に関する新たな評価手法の開発が必要と考えられる。siRNA 担持脂質ナノ製剤に含まれる siRNA 或いはカチオン脂質がどのような構造を持って、どのように相互作用しているかが、製剤の有効性及び安全性に大きく影響する要因と考えられる。本研究でも、Cryo-TEM 或いは小角 X 線解析などを用いて粒子の構造情報の解析を行ったものの、未だ十分とは言えない。現在  $^{31}\text{P}$ -NMR 等の評価手法を用いた構造解析も試みられているが<sup>77</sup>、まだ詳細情報の解明には至っていない。

本研究では siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性と細胞への取込み効率或いはその経路に関して一部関連を明らかとしたものの、薬効発現までの更なる細胞内動態を評価する系の確立が必要不可欠と考えられる。つまり、細胞内に取込まれた複合体から siRNA がどのように解離し、また細胞質に抜け出る効率、更に目的の mRNA を分解するまでの一連の細胞内動態を正しく評価できること、またそれが製剤の品質特性とどのような関連を有するかを把握することが非常に重要と考えられる。これらは *in vivo* 評価ではなくよりシンプルな系である *in vitro* 評価でこそ十分に評価を行い、科学的データを蓄積する必要があると思われる。本研究では言及するまでには至らなかったものの、*in vitro* での有効性及び安全性に関する評価結果がどの程度モデル動物を用いた *in vivo* 評価と相関するかは今後の重要な検証課題と言える。ナノ医薬品の体内動態に関する科学的データは既にかかなり蓄積されており、例えば製剤特性と臓器分布或いは主要な毒性に関するデータは既に多くが知られており、十分に検証した *in vitro* 評価とこれら既知データを加味することで、効率的に *in vivo* 評価を進めることができると考えられるが、必要に応じて *in vitro* での検証と *in vivo* での確認のサイクルを効率良く回す必要が生じることが想定される。また *in vivo* 評価で用いるモデル動物の選定には十分検証を行う必要があり、種差の外挿性は非常に重要な課題と考えられる。今回検討した *in vitro* での有効性及び安全性の評価結果が、*in vivo* 評価や臨床試験でのサロゲートな指標となり得るかを追求することも重要である。

siRNA のヒトへの初回投与に当たり、患者ごとで生じる次のような個人差をいかに事前に評価できるかが重要と考える。1) 標的とする mRNA の発現量の違い、2) 炎症性サイトカイン産生或いは補体の活性化量の個人差、3) 代謝経路或いは代謝酵素量の違い。1)に関して、組織等の採取による事前の発現量モニタリングが可能か、可能であればそれを臨床計画に反映することができるかが薬剤の有効性評価のために必要と考えられる。しかしながら、これは組織の事前採取可能な

疾患に限定されることが予想される。2) に関して、これも患者由来の血液サンプルの採取が可能であれば、今回実施したような *in vitro* の評価系が活用できる可能性はあり、*in vitro* での反応性の違いから有る程度予測することは可能と考える。3) に関して、血中で不安定である siRNA に比べ、安定であるカチオン脂質の組織蓄積性等が懸念されるが、*in vitro* での評価は難しいことが予想され、モデル動物を利用した *in vivo* での組織分布、臓器毎の蓄積性或いは代謝酵素との反応性に関する科学的データを基にヒトでの外挿性を議論する必要があると考えられる。

今回の研究を通して、siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発には特に *in vitro* での評価方法に関する情報が不足していることが大きな課題と考え、産官学が連携して評価方法の確立及びその情報の共有化が今後の開発を促進する重要な要素であると言える。siRNA 担持脂質ナノ製剤の品質特性が細胞内動態、血液毒性或いは免疫刺激性とどのように関連するか、またそれら *in vitro* 評価の結果からどの程度非臨床試験での *in vivo* の評価結果を予測できるか、必要不可欠な非臨床試験のパッケージングを整理できる水準まで科学的データが蓄積されるかが非常に重要と考えられ、場合によってはそれら科学的データを集約して法整備化に繋げることで、広く情報共有される体制が構築され効率的な siRNA 担持脂質ナノ製剤の開発に繋がることが期待される。

## 引用文献

1. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol*. 2012;19(1):60-71.
2. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(2):125-40.
3. Zuckerman JE, Davis ME. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(12):843-56.
4. Wu SY, Lopez-Berestein G, Calin GA, Sood AK. RNAi therapies: drugging the undruggable. *Sci Transl Med*. 2014;6(240):240ps7.
5. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138-57.
6. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006;2(12):711-9.
7. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2015;16(9):543-52.
8. Sanghvi YS. A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2011;Chapter 4:Unit 4.1.-22.
9. Shukla S, Sumaria CS, Pradeepkumar PI. Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem*. 2010;5(3):328-49.
10. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:259-93.
11. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2017;35(3):238-48.
12. Khorkova O, Wahlestedt C. Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system. *Nat Biotechnol*. 2017;35(3):249-63.
13. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
14. Fukaya T, Tomari Y. MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2012;48(6):825-36.
15. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*. 2001;294(5543):797-9.
16. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-90.
17. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148.
18. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
19. 平成 27 年度 特許出願技術動向調査報告書 (概要) 核酸医薬 特許庁総務部企画調査課 知財動向班 [https://www.jpo.go.jp/shiryoku/pdf/gidou-houkoku/h27/27\\_11.pdf](https://www.jpo.go.jp/shiryoku/pdf/gidou-houkoku/h27/27_11.pdf).
20. 基盤研セミナー (2013 年 12 月 13 日) 核酸医薬開発の動向と課題 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) 井上貴雄 <http://www.nihs.go.jp/kanren/iyaku/20131213-cgtp.pdf>.



21. Kanasty RL, Whitehead KA, Vegas AJ, Anderson DG. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol Ther.* 2012;20(3):513-24.
22. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-51.
23. Zhang Y, Satterlee A, Huang L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol Ther.* 2012;20(7):1298-304.
24. Buyens K, De Smedt SC, Braeckmans K, Demeester J, Peeters L, van Grunsven LA, et al. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. *J Control Release.* 2012;158(3):362-70.
25. Miller CM, Donner AJ, Blank EE, Egger AW, Kellar BM, Østergaard ME, et al. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(6):2782-94.
26. EMA. Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use. 2006.
27. FDA. Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. 2014.
28. 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 ナノ医薬品 (ナノメディシン) に関する参考情報. <http://www.nihs.go.jp/drug/DrugDiv-J.html> (Accessed 15. 5, 2016)
29. Nair JK, Willoughby JL, Chan A, Charisse K, Alam MR, Wang Q, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc.* 2014;136(49):16958-61.
30. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, et al. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- $\alpha$ 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013;22(24):4914-28.
31. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 2006;441(7089):111-4.
32. Alnylam 社 Corporate Overview (May 2017), [http://www.alnylam.com/web/assets/ALNY-CORP-OVERVIEW-MAY\\_V3.pdf](http://www.alnylam.com/web/assets/ALNY-CORP-OVERVIEW-MAY_V3.pdf) [press release].
33. Bruno JG. A review of therapeutic aptamer conjugates with emphasis on new approaches. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6(3):340-57.
34. Romero-López C, Berzal-Herranz A. Aptamers: Biomedical Interest and Applications. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017;10(1).
35. Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):167-79.
36. Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Control Release.* 2016;240:227-34.
37. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
38. Zatspein TS, Kotelevtsev YV, Koteliansky V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery - going from bench to bedside. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3077-86.
39. Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2705-16.

40. Santel A, Aleku M, Röder N, Möpert K, Durieux B, Janke O, et al. Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models. *Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5469-80.
41. Leenders F, Möpert K, Schmiedeknecht A, Santel A, Czauderna F, Aleku M, et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *EMBO J.* 2004;23(16):3303-13.
42. Kaufmann J, Ahrens K, Santel A. RNA interference for therapy in the vascular endothelium. *Microvasc Res.* 2010;80(2):286-93.
43. Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, et al. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther.* 2006;13(16):1222-34.
44. Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Durieux B, et al. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther.* 2006;13(18):1360-70.
45. Aleku M, Schulz P, Keil O, Santel A, Schaeper U, Dieckhoff B, et al. Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res.* 2008;68(23):9788-98.
46. Strumberg D, Schultheis B, Traugott U, Vank C, Santel A, Keil O, et al. Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2012;50(1):76-8.
47. Pancreatic cancer study Atu027-I-02 Interim analysis (1 June 2015), Silence Therapeutics, <http://silence-therapeutics-com.s3-eu-west-1.amazonaws.com/app/uploads/2014/09/Atu027-Phase-2a-Pancreatic-Cancer-Interim-Analysis.pdf>.
48. Jeffs LB, Palmer LR, Ambegia EG, Giesbrecht C, Ewanick S, MacLachlan I. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm Res.* 2005;22(3):362-72.
49. Akinc A, Querbes W, De S, Qin J, Frank-Kamenetsky M, Jayaprakash KN, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther.* 2010;18(7):1357-64.
50. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013;369(9):819-29.
51. Adami RC, Seth S, Harvie P, Johns R, Fam R, Fosnaugh K, et al. An amino acid-based amphoteric liposomal delivery system for systemic administration of siRNA. *Mol Ther.* 2011;19(6):1141-51.
52. Rodriguez WV, Woolliscroft MJ, Ebrahim AS, Forgey R, McGovren PJ, Endert G, et al. Development and antitumor activity of a BCL-2 targeted single-stranded DNA oligonucleotide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(1):151-66.
53. Andreacos E, Rauchhaus U, Stavropoulos A, Endert G, Wendisch V, Benahmed AS, et al. Amphoteric liposomes enable systemic antigen-presenting cell-directed delivery of CD40 antisense and are therapeutically effective in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):994-1005.
54. Siepi E, Lutz S, Meyer S, Panzner S. An ion switch regulates fusion of charged membranes. *Biophys J.* 2011;100(10):2412-21.
55. Tolcher AW, Rodriguez WV, Rasco DW, Patnaik A, Papadopoulos KP, Amaya A, et al. A phase 1 study of the BCL2-targeted deoxyribonucleic acid inhibitor (DNAi) PNT2258 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;73(2):363-71.
56. ProNAi 社 HP, ProNAi Reports Interim Data from Wolverine Phase 2 Trial of PNT-2258 in DLBCL. <http://www.prnewswire.com/news-releases/pronai-reports-interim-data-from-wolverine-phase-2-trial-of-pnt2258-in-dlbcl-581947101.html> [press release]. (Accessed 20. 5, 2017)

57. Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* 2012;3:120.
58. Daige CL, Wiggins JF, Priddy L, Nelligan-Davis T, Zhao J, Brown D. Systemic delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(10):2352-60.
59. Mirna 社 HP, Mirna Therapeutics Halts Phase 1 Clinical Study of MRX34. <http://investor.mirnarx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=990204> [press release]. (Accessed 26. 9, 2016)
60. Chaturvedi K, Ganguly K, Kulkarni AR, Kulkarni VH, Nadagouda MN, Rudzinski WE, et al. Cyclodextrin-based siRNA delivery nanocarriers: a state-of-the-art review. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(11):1455-68.
61. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature.* 2010;464(7291):1067-70.
62. Wooddell CI, Rozema DB, Hossbach M, John M, Hamilton HL, Chu Q, et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol Ther.* 2013;21(5):973-85.
63. Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetskoy VS, et al. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(6):380-90.
64. Prakash TP, Graham MJ, Yu J, Carty R, Low A, Chappell A, et al. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(13):8796-807.
65. Stelma F, van der Ree MH, Sinnige MJ, Brown A, Swadling L, de Vree JM, et al. Immune phenotype and function of NK and T cells in chronic hepatitis C patients who received a single dose of anti-miR-122, RG-101. *Hepatology.* 2017.
66. Alnylam 社 HP, <http://investors.alnylam.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=992320>. (Accessed 15. 5, 2016).
67. FDA Briefing Document, NDA 203568, Mipomersen Sodium Injection 200 mg/mL (October 18, 2012), <https://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/endocrinologicandmetabolicdrugsadvisorycommittee/ucm323927.pdf>.
68. Cheson BD. Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(5):855-70.
69. Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov Today.* 2017;22(5):823-33.
70. Barros SA, Gollob JA. Safety profile of RNAi nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(15):1730-7.
71. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010;375(9719):998-1006.
72. Akdim F, Visser ME, Tribble DL, Baker BF, Stroes ES, Yu R, et al. Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2010;105(10):1413-9.
73. Suhr OB, Coelho T, Buades J, Pouget J, Conceicao I, Berk J, et al. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:109.

74. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* 2013;3(4):406-17.
75. Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(2):295-312.
76. Wan C, Allen TM, Cullis PR. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv Transl Res.* 2014;4(1):74-83.
77. Leung AK, Hafez IM, Baoukina S, Belliveau NM, Zhigaltsev IV, Afshinmanesh E, et al. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.* 2012;116(34):18440-50.
78. Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2014;32(36):4141-8.
79. ドキシル注 20 mg 審査報告書 平成 21 年 1 月 14 日.
80. ドキシル注 20 mg (ドキソルビシン塩酸塩 リポソーム注射剤) 添付文書 (第 3 版).
81. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン/ICHQ3A (R2) ガイドライン. 薬食審査発第 877 号 平成 7 年 9 月 25 日.
82. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン/ICH Q3B (R2) ガイドライン. 薬食審査発第 539 号 平成 9 年 6 月 23 日.
83. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 新医薬品の規格及び試験方法の設定に関するガイドライン/ICH Q6A (R2) ガイドライン. 薬食審査発第 586 号 平成 6 年 9 月 1 日.
84. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 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に関するガイドライン/ICH Q6B (R2) ガイドライン. 薬食審査発第 571 号 平成 13 年 5 月 1 日.
85. Daniel Capaldi KA, Doug Brooks, Judy Carmody, Ken Draper, Rao Kambhampati, et al. Quality Aspects of Oligonucleotide Drug Development: Specifications for Active Pharmaceutical Ingredients. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science.* 2012;46(5).
86. 大谷章雄ら. 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 (2), 158-163 (2010).
87. 平林容子ら. 核酸医薬の非臨床安全性を考える. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 46 (5), 286-289 (2015).
88. 平林容子ら. 核酸医薬品に由来する代謝物の評価. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 46 (8), 523-527 (2015).
89. 平林容子ら. 核酸医薬品のオフターゲット作用の評価. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 46 (10), 681-686 (2015).
90. 平林容子ら. 核酸医薬品のクラスエフェクトの評価. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 46 (12), 846-851 (2015).
91. 平林容子ら. 核酸医薬の非臨床安全性試験における動物種選択. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 47 (2), 101-104 (2016).
92. 平林容子ら. 核酸医薬の遺伝毒性評価. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 47 (4), 250-253 (2016).

93. Kambhampati RV, Chiu YY, Chen CW, Blumenstein JJ. Regulatory concerns for the chemistry, manufacturing, and controls of oligonucleotide therapeutics for use in clinical studies. *Antisense Res Dev.* 1993;3(4):405-10.
94. 平成 24 年度 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業. 核酸医薬の臨床有効性安全性の評価方法. <http://www.pmda.go.jp/files/000164170.pdf>.
95. 平成 24 年度 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業. ナノテクノロジーを基盤とした革新的医薬品に関する評価方法. <http://www.pmda.go.jp/files/000163753.pdf>.
96. HS 財団創薬技術調査ワーキンググループ：創薬基盤技術の最新動向を探る -ナノテクノロジーの創薬・医療への応用、DDS 技術を中心に-. ヒューマンサイエンス財団平成 25 年度創薬技術調査報告書. 2014.
97. Sainz V, Coniot J, Matos AI, Peres C, Zupancic E, Moura L, et al. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):504-10.
98. FDA. Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride. 2010.
99. EMA. Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product application. 2010.
100. EMA. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal products. 2013.
101. EMA. Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products. 2013.
102. FDA. Draft Guidance on Amphotericin B. 2014.
103. FDA. Draft Guidance on Verteporfin. 2014.
104. MHLW/EMA. Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products. 2014.
105. FDA. Draft Guidance for Industry: Liposome Drug Products. 2015.
106. EMA. Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal products. 2015.
107. MHLW. Guideline for the Development of Liposome Drug Products. 2016.
108. MHLW. Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products. 2016.
109. FDA's Strategic Plan for Regulatory Science (August 2011).
110. 医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方. <http://www.pref.tokushima.jp/docs/2011102500136/files/t120302i0070.pdf>.
111. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm.* 2008;5(4):487-95.
112. Ballarín-González B, Howard KA. Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: adverse effects and solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(15):1717-29.
113. Akhtar S. Cationic nanosystems for the delivery of small interfering ribonucleic acid therapeutics: a focus on toxicogenomics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(11):1347-62.
114. Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res.* 1994;11(8):1127-31.
115. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release.* 2006;114(1):100-9.

116. Maurer N, Wong KF, Stark H, Louie L, McIntosh D, Wong T, et al. Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. *Biophys J*. 2001;80(5):2310-26.
117. Zhang Y, Li H, Sun J, Gao J, Liu W, Li B, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Int J Pharm*. 2010;390(2):198-207.
118. Xu Y, Hui SW, Frederik P, Szoka FC. Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophys J*. 1999;77(1):341-53.
119. Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release*. 2005;107(2):276-87.
120. Chono S, Li SD, Conwell CC, Huang L. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J Control Release*. 2008;131(1):64-9.
121. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev*. 2006;58(1):32-45.
122. Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*. 2005;12(24):1734-51.
123. Pérez SE, Gándola Y, Carlucci AM, González L, Turyn D, Bregni C. Formulation Strategies, Characterization, and In Vitro Evaluation of Lecithin-Based Nanoparticles for siRNA Delivery. *J Drug Deliv*. 2012;2012:986265.
124. Huebner S, Battersby BJ, Grimm R, Cevc G. Lipid-DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy. *Biophys J*. 1999;76(6):3158-66.
125. Weisman S, Hirsch-Lerner D, Barenholz Y, Talmon Y. Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys J*. 2004;87(1):609-14.
126. Kapoor M, Burgess DJ, Patil SD. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *Int J Pharm*. 2012;427(1):35-57.
127. Dan N, Danino D. Structure and kinetics of lipid-nucleic acid complexes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;205:230-9.
128. Buyens K, Lucas B, Raemdonck K, Braeckmans K, Vercammen J, Hendrix J, et al. A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum. *J Control Release*. 2008;126(1):67-76.
129. Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1278(1):41-50.
130. Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem*. 2002;277(20):18021-8.
131. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
132. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873-96.
133. Lamaze C, Schmid SL. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(4):573-80.
134. Li T, Takeoka S. Enhanced cellular uptake of maleimide-modified liposomes via thiol-mediated transport. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2849-61.

135. Wang Y, Huang L. A window onto siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* 2013;31(7):611-2.
136. Sahay G, Querbes W, Alabi C, Eltoukhy A, Sarkar S, Zurenko C, et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol.* 2013;31(7):653-8.
137. Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, Borodovsky A, Marsico G, Schubert U, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol.* 2013;31(7):638-46.
138. Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 22):4327-39.
139. Martin S, Parton RG. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(2):163-74.
140. Bae YU, Huh JW, Kim BK, Park HY, Seu YB, Doh KO. Enhancement of liposome mediated gene transfer by adding cholesterol and cholesterol modulating drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(12):3017-23.
141. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol.* 2005;23(4):457-62.
142. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials.* 2010;31(26):6867-75.
143. Sato T, Sakai H, Sou K, Medebach M, Glatter O, Tsuchida E. Static structures and dynamics of hemoglobin vesicle (HBV) developed as a transfusion alternative. *J Phys Chem B.* 2009;113(24):8418-28.
144. O G. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *J. Appl. Crystallogr.*; 1977.
145. JA L. An iterative method of slit-correcting small angle x-ray data. *Acta Cryst.*1967. p. 191-4.
146. Li T, Takeoka S. A novel application of maleimide for advanced drug delivery: in vitro and in vivo evaluation of maleimide-modified pH-sensitive liposomes. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3855-66.





## 謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成に際して多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました、早稲田大学教授 武岡真司 先生に心より感謝申し上げます。大学学部生の頃武岡先生の研究室に配属させて頂いて以来、医工連携に根差した研究の面白さ、魅力を教えて頂きました。解釈が難しい問題に対しても、いつも多角的な視点から有意義なご助言を頂け、本研究に関しても意義のある方向へと導いて頂き、先生と議論させて頂いた時間は研究者としての私の大きな財産となりました。重ねまして厚く御礼申し上げます。

早稲田大学特命教授 池田康夫 先生および東京女子医科大学教授 有賀淳 先生には、本論文をまとめるにあたり多大なご指導・ご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

早稲田大学教授 梅津光生 先生、伊関洋 先生、岩崎清隆 先生、早稲田大学特命教授 笠貫宏 先生、東京女子医科大学教授 正宗賢 先生、大和雅之 先生、准教授 南部恭二郎 先生には、研究指導におきまして多大なるご指導を頂きました。また、早稲田大学助教 軽部裕代 先生には学生生活或いは研究の進め方に関して親身に教えて頂きました。諸先生方に心より御礼申し上げます。

本大学院にて同期として共に学んだ齋藤正美氏、田中穰氏、山家弘雄氏、山脇理弘氏、大形竜也氏、関根信幸氏、松田卓磨氏、角真智子氏、平野朝士氏に感謝致します。同期の皆さんからはいつも刺激をもらい、色々教えて頂くことが多かったです。皆さんのお陰で最後までやり通すことができました。本当に有難うございました。

武岡研究室の李天舒博士には本研究の実験部分に関して、多くの助言を頂きました。また澤木一晃君、大西浩平君には、本研究の実験に関する多くのデータを取得して頂きました。研究をまとめられたのも皆さんのお陰です。本当に感謝しています。

協和発酵キリン株式会社 CMC 研究センター 友田寛センター長には、仕事と学業を両立できるようにいつも気を配って頂きました。3年半の中で色々ご迷惑をお掛けすることも多々あったかと思いますが、お陰様で無事にやりきることができました。心から感謝致します。

協和発酵キリン株式会社 CMC 研究センター 青木匡博士、CMC 開発部 山内雅博博士には、仕事でお世話になるとともに、辛い時に激励頂き最後まで頑張ることができました。心から感謝致します。CMC 研究センター 曾川裕介氏、石川瑞枝氏 (現アステラス製薬株式会社)、小河原里美氏、高橋卯女氏には製剤の分析手法或いは細胞実験に関して丁寧に教えて頂きました。がん研究所 笹山裕美氏、TRU 薬物動態 2G 摺木志保氏には細胞を用いた実験に関して有益な助言を頂きました。お陰さまで上手くまとめることができました。心から感謝致します。

仕事と学業の両立を応援してくれた家族、友人達に心から感謝します。有難う御座いました。

2017年7月 久保田恒平



## 研究業績

論文	1) Kohei Kubota, Kohei Onishi, Kazuaki Sawaki, Tianshu Li, Kaoru Mitsuoka, Takaaki Sato and Shinji Takeoka, Effect of the nanoformulation of siRNA-lipid assemblies on their cellular uptake and immune stimulation, <i>International Journal of Nanomedicine</i> (accept)
講演 ポスター 発表	1) 久保田恒平、武岡真司, siRNA/脂質複合体の有効性及び安全性評価に関する研究, RS 研究会, 2016年8月26日 2) 久保田恒平、武岡真司, Effect of the nanoformulation of siRNA-lipid assemblies on their cellular uptake and immune stimulation. 日本薬剤学会第32年会, 2017年5月13日

