

第1章 核酸医薬品における開発の現状と安全性評価

1節 核酸医薬品の開発動向

井上貴雄

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部第2室（核酸医薬室） 室長 博士（薬学）

（株）技術情報協会

2017年4月発刊「先端治療技術の実用化と開発戦略
（核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品）」抜刷

第 1 節 核酸医薬品の開発動向

はじめに

アンチセンス, siRNA (small interfering RNA), アプタマーに代表される核酸医薬品は, 抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている。現在, 製薬業界では創薬シーズの枯渇が大きな問題となっているが, 核酸医薬品は従来の低分子化学合成医薬品 (以下, 化成品) や抗体医薬品では標的にできなかった RNA をターゲットにできる点において魅力的である。核酸医薬品の標的となる RNA はタンパク質をコードする pre-mRNA, mRNA に留まらず, 近年, 生理機能の解明が進んでいる非コード RNA も対象であり, RNA 研究の進展と共に今後, 創薬対象が大きく拡大していくと考えられる。これまで核酸医薬品は生体内における易分解性等の問題が指摘されていたが, 修飾核酸技術や DDS (Drug delivery system) 技術が著しく進展したことから, 安定で有効性の高い候補品が次々と開発されている。核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で, 化成品と同じく化学合成により製造することができる。また, 薬効本体が核酸モノマーを連結したオリゴ核酸で構成されるという共通の特徴を有すること, 有効性の高いオリゴ核酸配列のスクリーニングが化成品と比較して容易であることなどから, 1つのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新薬が誕生すると考えられている。

核酸医薬品は実用例が少ないことが長らく指摘されてきたが, 2013年に3番目の核酸医薬品となる Kynamro, 2016年には2つの核酸医薬品 (Exondys 51, Spinraza) が米国で相次いで承認され, ここにきて勢いを増している (表 1)。Phase 3 の段階にある候補品も 20 程度存在し, 特に難治性疾患の領域を中心に今後も実用化が進むと考えられる。本節では, まさに花開こうとしている核酸医薬品について, その基本的性質と開発動向を概説したい。

表 1 上市された核酸医薬品

商品名	一般名	分類	承認国 承認年	標的	適応	投与ルート
Vitravene	fomivirsen	アンチセンス	米 1998 EU 1999	サイトメガロウイルス (CMV) 遺伝子 IE2 mRNA	CMV 性網膜炎 (AIDS 患者)	硝子体内
Macugen	pegaptanib	アプタマー	米 2004 EU 2006 日 2008	Vascular endothelial growth factor (VEGF) 165 タンパク質	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro	mipomersen	アンチセンス	米 2013	ApoB100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51	eteplirsen	アンチセンス	米 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza	nusinersen	アンチセンス	米 2016	SMN 2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内

1. 核酸医薬品の特徴

1.1 核酸医薬品の定義

これまで核酸医薬品の明確な定義づけはなされていないが, 一般には, 「核酸あるいは修飾型核酸が直鎖状に結合したオリゴ核酸を薬効本体とし, タンパク質発現を介さず直接生体に作用するもので, 化学合成により製造される医薬品」を指す。DNA 合成を阻害する抗がん剤として核酸モノマーの誘導体あるいは核酸塩基部の誘導体が用いられるが, これらの医薬品は核酸医薬の範疇には入らない。核酸医薬品の英訳としては, nucleic acid drugs, nucleic acid therapeutics, oligonucleotide therapeutics 等の表現が使われるが, 核酸が連結したオリゴ核酸 (oligonucleotide) が薬効本体であるという観点から, 「oligonucleotide therapeutics」が適当と考えられ, 実際に核酸医薬品を示す用語として最も多く用いられている。

核酸で構成される医薬品としてはもう 1 つ遺伝子治療薬があるが, 作用発現にタンパク質への翻訳を介する点, 生

物学的に製造される点において核酸医薬品とは異なる。ウイルス等により shRNA (short hairpin RNA) を細胞内に導入し、細胞内で生成した siRNA が標的 mRNA を分解する治療法が試みられているが、この手法は作用機構としては siRNA と同じであるが、核酸をベクターで細胞内に導入する観点から規制的には遺伝子治療薬に分類される。また、近年、*in vitro* で酵素的に合成した mRNA を標的細胞に導入し、遺伝子発現を介して治療を試みる技術が開発されているが、この技術も核酸医薬品と遺伝子治療薬の両方の要素を兼ね備えており、規制の観点から今後議論が必要である。

1.2 核酸医薬品の分類

核酸医薬品は構造や標的、作用機序の違いから様々な種類が存在するが、細胞の内側で作用するか、外側で作用するかにより、大きく2つに分類することができる(図1、図2、表2)。細胞内で作用する核酸医薬品としては、RNA を標的とするアンチセンスや siRNA が挙げられ、また、タンパク質(転写因子)と結合して転写段階を抑制するデコイがある(図1)。一方、細胞外で作用する核酸医薬品としては、抗体医薬品と同様に細胞外タンパク質と結合して機能を阻害するアプタマーが広く知られている。さらに、Toll 様受容体9 (TLR9) に作用して自然免疫を活性化させる医薬品として「CpG オリゴ(CpG oligodeoxynucleotides)」が開発されている(図2)。CpG オリゴはエンドサイトーシスによって細胞に取りこまれた後、エンドソーム内で TLR9 に作用するが、膜との配向性を考えると細胞質と膜を挟んで反対側(つまり細胞の外側)で機能する。細胞膜を通過する必要があるという点ではアプタマーと同様であり、細胞外で作用すると捉えることができる。

「標的」の観点で分類すると、アンチセンス、siRNA は核酸(RNA)が標的であり、アプタマー、デコイ、CpG オリゴはタンパク質が標的である(表2)。前者については、標的となる RNA も核酸医薬品の種類によって異なっており、エクソンスキッピング療法等に用いられるスプラシング制御型アンチセンス(後述)の標的は pre-mRNA、siRNA の標的は mRNA である。近年、「DNA → RNA → タンパク質」のセントラルドクマに乗らない非コード RNA の生理機能が明らかになりつつあり、その代表例としてマイクロ RNA (miRNA) が特に注目されているが、miRNA の機能を阻害する核酸医薬品も開発されている(miRNA 阻害型アンチセンス)。

以上に述べた作用部位、標的、構造等の観点から核酸医薬品を分類し、一覧表として取りまとめた(表2)。簡略化のため、各項目には例外が含まれる場合があるのでご留意願いたい。

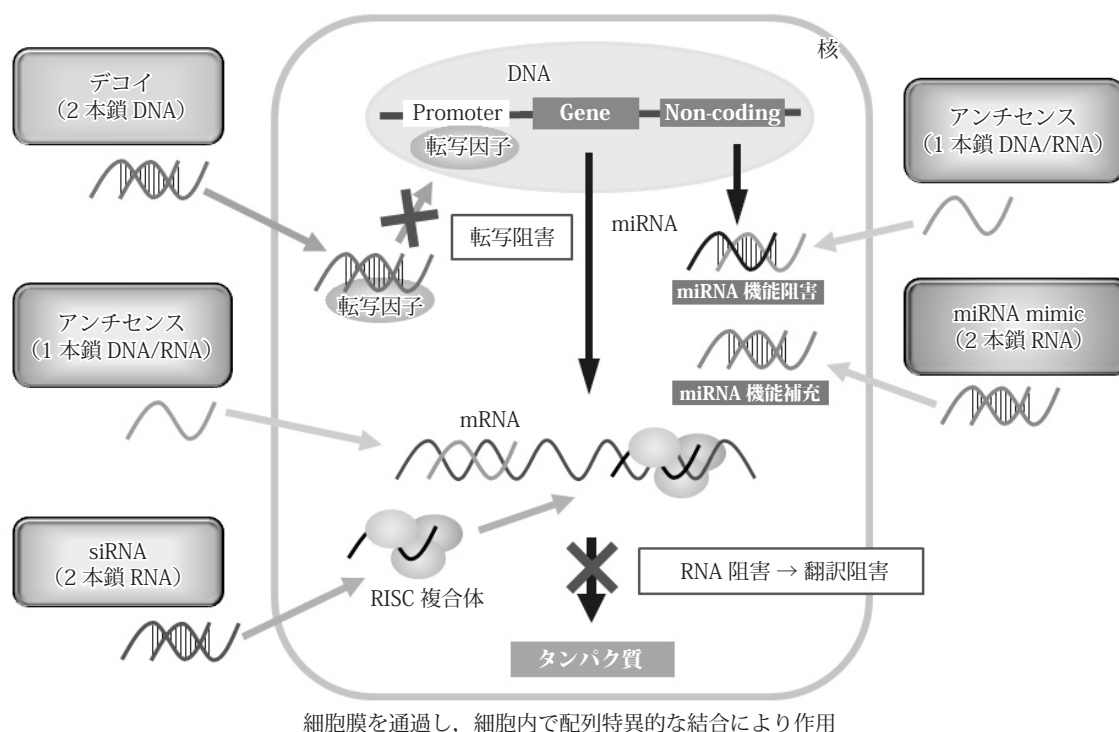
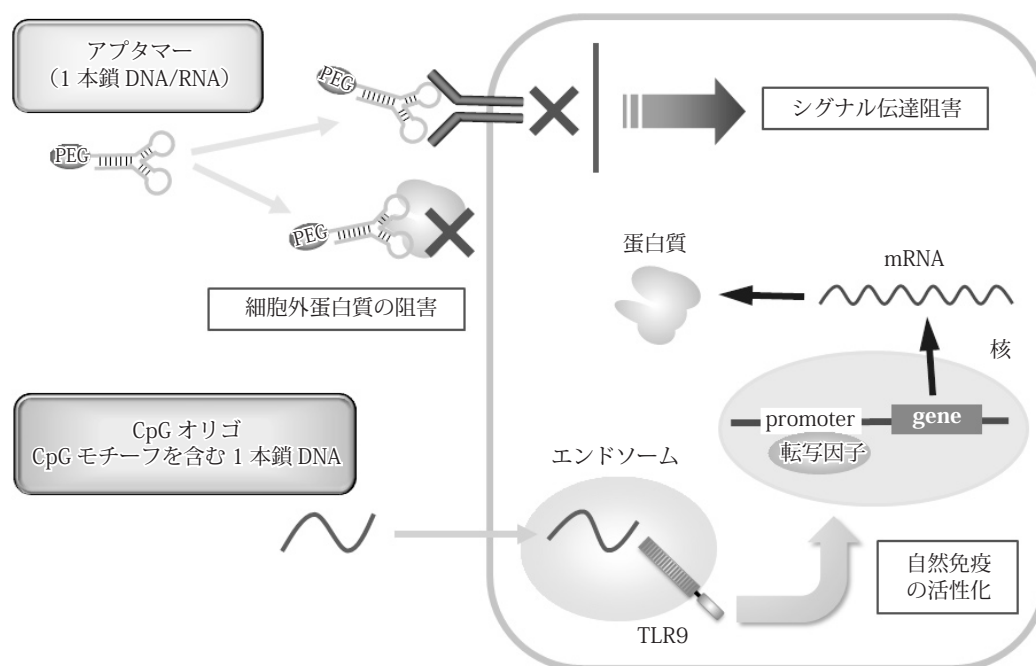


図1 細胞内で機能する核酸医薬品

※ カラーの図は巻頭ページを参照



オリゴ核酸の立体構造により作用

図2 細胞外で機能する核酸医薬品

※ カラーの図は巻頭ページを参照

表2 核酸医薬品の分類

	アンチセンス	siRNA	miRNA	デコイ	アプタマー	CpG オリゴ
構造	1 本鎖 DNA/RNA	2 本鎖 RNA	2 本鎖 RNA, ヘアピン型 1 本鎖 RNA	2 本鎖 DNA	1 本鎖 DNA/RNA	1 本鎖 DNA
塩基長	14 ~ 30	20 ~ 25	20 ~ 25 > 49	20 程度	26 ~ 45	20 程度
標的	mRNA pre-mRNA miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核, 細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核)	細胞外	細胞外 (エンドソーム内)
作用機序	mRNA 分解 スプライシング制御 miRNA 阻害	mRNA 分解	miRNA の補充	転写阻害	蛋白質の 機能阻害	自然免疫の 活性化

1.3 核酸医薬品の大きさ

核酸医薬品の基本骨格であるヌクレオチドの分子量は 310 ~ 330 程度であり, 近年開発が進む修飾型核酸(「2. 核酸医薬品に用いられる修飾型核酸」で詳述)でもその値は大きくは変わらない。したがって, 10 ~ 30 塩基長の核酸医薬品を考えた場合, 分子量は 3,000 ~ 10,000 程度となる。既に上市されたアンチセンス医薬品(表 1)である Vitravene (一般名: fomivirsen, 21 塩基長, $C_{204}H_{243}N_{63}Na_{20}O_{114}P_{20}S_{20}$), Kynamro (一般名: mipomersen, 20 塩基長, $C_{230}H_{305}N_{67}Na_{19}O_{122}P_{19}S_{19}$), Exondys 51 (一般名: eteplirsen, 30 塩基長, $C_{364}H_{569}N_{177}O_{122}P_{30}$), Spinraza (一般名: nusinersen, 18 塩基長, $C_{234}H_{323}N_{61}Na_{17}O_{128}P_{17}S_{17}$) は分子量がそれぞれ 7,122, 7,595, 10,306, 7,501 である。siRNA は一般に 20 数塩基の長さであるが, 2 本鎖であることから分子量は 13,000 程度となる。アプタマー医薬品は三次元的にタンパク質を認識するという特徴から塩基鎖が長い傾向にあり, また, 血中滞留性を向上させるため

に PEG 化されるケースも多い。日米欧で承認されている RNA アプタマー Macugen（一般名：pegaptanib, 28 塩基長, $C_{294}H_{342}F_{13}N_{107}Na_{28}O_{188}P_{28}[C_2H_4O]_{2n}$, $n \approx 900$ ）も PEG 化されており、分子量は 50,000 程度である。以上のように、核酸医薬品はいずれの種類も数千を超える分子量を持っており、一般に分子量が 1,000 未満である化成品と比べ、はるかに大きい医薬品といえる。

1.4 核酸医薬品の性質および体内動態

上述のように核酸医薬品は高分子であり、また、負電荷を持つホスホジエステル構造が連続したポリアニオン構造を有することから、疎水性の細胞膜を透過しにくいという特徴がある。上述の核酸医薬品の分類の中で、細胞の内側で機能するアンチセンス、siRNA、デコイに関しては、オリゴ核酸が細胞膜を通過して細胞内に到達しなければならない。さらに、アンチセンスの中でも Gapmer 型アンチセンスおよびスプライシング制御型アンチセンスは核内で機能するため、さらに核膜を通過する必要がある（表 3）。オリゴ核酸の細胞内への移行に関わる分子機構は不明であるが、エンドサイトーシスによって取り込まれたオリゴ核酸がエンドソーム内に移行した後、エンドソーム膜を通過して細胞質に入ると考えられている。エンドソームは「初期エンドソーム → 後期エンドソーム → リソソーム」と成熟していくため、エンドソーム膜を通過できなかったオリゴ核酸はリソソーム内で分解される。このため、核酸医薬品が有効性を発揮するためには、エンドソームの段階で細胞質に移行する必要がある。上述のように、核酸医薬品は分子量数千以上のポリアニオンであることから、エンドソーム膜を通過できるオリゴ核酸の割合は低いと考えられている。この問題を克服するため、オリゴ核酸を構成するヌクレオチドの分子内に改変を加えたり、オリゴ核酸の末端に修飾を施したりするなど、疎水性を高める改良が行われている。また、リポソームや高分子複合体を用いてオリゴ核酸を細胞内に到達させる DDS 技術の開発も精力的に進められている。

表 3 アンチセンス医薬品の分類

分類	標的	原理	作用部位	作用機構
Gapmer 型	mRNA	分解 (RNase H 依存)	核	mRNA の分解
スプライシング制御型	pre-mRNA	立体障害 (RNase H 非依存)	核	pre-mRNA とスプライシング 関連タンパク質の結合阻害
miRNA 阻害型	miRNA	立体障害 (RNase H 非依存)	細胞質	miRNA と mRNA の結合阻害

2 本鎖の siRNA は 1 本鎖のアンチセンスに比べて分子量、負電荷とも大きくなることから、膜透過性はさらに低下する。この 1 本鎖と 2 本鎖の違いは、培養細胞にオリゴ核酸を添加する実験を行うとイメージしやすい。すなわち、リポフェクトアミン等の遺伝子導入試薬を使用せず、オリゴ核酸をそのまま培地に添加した場合、1 本鎖アンチセンス (S オリゴ：後述) では数 100 nM まで濃度を上げると、作用発現が確認される程度まで細胞内に取り込まれるが、2 本鎖 siRNA は高濃度にしても取り込まれない。これは *vivo* においても同様であり、一般には「1 本鎖はキャリアがなくても取り込まれるが、2 本鎖ではキャリアが必要」とされている。取り込み効率には、分子量、電荷、物性といったオリゴ核酸側の要因のみならず、生体側のシステムにも大きく依存すると考えられる。例えば、スカベンジャー受容体を多く発現する貪食細胞はポリアニオンを認識して、オリゴ核酸を効率よく取り込む。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患においては、健常人の筋細胞よりオリゴ核酸が取り込まれやすい。これは、筋細胞の破壊・再生が活発な病態の筋組織においては初期発生段階の筋繊維が多く存在しており、この段階で効率よくオリゴ核酸が取り込まれるため、と考えられている¹⁾。投与経路や標的組織にも依存しており、硝子体内注射や肺への吸入など局所的に投与する場合にはキャリアを必要としない場合がある。

以上、細胞の外から細胞の中にオリゴ核酸が移行する点に着目して述べたが、より巨視的に全身投与されたオリゴ核酸の組織分布を考察したい。全身性に投与されたオリゴ核酸は、各組織の毛細血管の内皮細胞シートを通過した後、組織を構成する細胞の細胞膜を通過して細胞内に到達する。したがって、全身投与されたオリゴ核酸の組織分布は毛細

血管の内皮細胞の構造に大きく依存する。毛細血管は内皮細胞の構造により「連続型毛細血管」,「有窓型毛細血管」,「洞様毛細血管」に分類されるが,オリゴ核酸は上述の性質から内皮細胞が隙間なく敷きつめられた連続型毛細血管を通過することができない。一方,内皮細胞が薄く,窓のような構造を持つとされる有窓型毛細血管や内皮細胞間に隙間のある洞様毛細血管では内皮細胞シートを通過することが可能となる。実際,全身投与されたオリゴ核酸はこのように“緩い”内皮細胞シートを持つ肝臓,腎臓,脾臓,骨髄,固形癌などに集積しやすい。核酸医薬品の体内動態に関しては優れた総説が発表されているので,詳細はそちらを参照して頂きたい²⁾。

2. 核酸医薬品に用いられる修飾型核酸

従来,核酸医薬品はヌクレアーゼにより速やかに分解される易分解性が課題となってきたことから,分解の影響を受けにくい局所投与型の核酸医薬品が先行して開発されてきた。実際,2008年までに承認されたVitravene(アンチセンス)およびMacugen(アプタマー)はいずれも硝子体内へ局注する医薬品であった。しかし,近年,修飾型核酸の開発が顕著に進展したことにより,オリゴ核酸のヌクレアーゼ耐性が向上し,体内での安定性は大きく改善した。また,化学修飾により標的配列との結合性が著しく向上し,細胞内への取り込み効率も従来より改善している。さらに,これら一連の流れにより,より低濃度で有効性を得ることが可能となり,毒性発現の問題も改善しつつある。CpG配列を持つオリゴ核酸はTLR9を活性化するが,この作用はCpGのシトシンの5位をメチル化することにより抑制されることが示されている。このように,オリゴ核酸によるパターン認識受容体を介した自然免疫活性化については,化学修飾により回避できると考えられている。以上のような利点から,現在開発されているほとんどの核酸医薬品は何かしらの化学修飾が施されている。以下に核酸の化学修飾について,リン酸部の修飾,糖部の修飾,塩基部の修飾に分けて概説する。

2.1 リン酸部の修飾

リン酸部の修飾としては,O(酸素原子)をS(硫黄原子)に置換したホスホロチオエート修飾(S化)がよく知られており(図3),開発されているアンチセンス医薬の多くはS化されている。S化は核酸と核酸をつなぐリン酸ジエステル結合部の修飾であることから,ヌクレアーゼ耐性の獲得に大きく寄与し,また,脂溶性が増すことから細胞内への取り込み効率も改善する。S化されたオリゴ核酸(Sオリゴ)ではリン原子上に不斉点が発生し,合成されたオリゴ核酸は立体異性体が混在した化合物となる。例えば,11塩基長のSオリゴを考えた場合,核酸の連結部(=不斉点)は10箇所存在するため, $2^{10} = 1,024$ 個の異性体の混合物となる。現在の技術では,これらの異性体を完全分離することができないため,一般には「リン原子の立体配置に起因する異性体はいずれも有効成分」という前提で開発/審査が進められている。また,Sオリゴは天然型と比較し,非特異的なタンパク質結合が増加することが知られている。S化に関しては,WAVE Life Sciences社を中心に,リン原子の立体配置を厳密に制御する合成法の開発が精力的に進められている。S化以外のリン酸部修飾としては,他に酸素原子をボラン(BH_3)に置換したボラノホスフェートDNA/RNA等の開発が進んでいる³⁾。

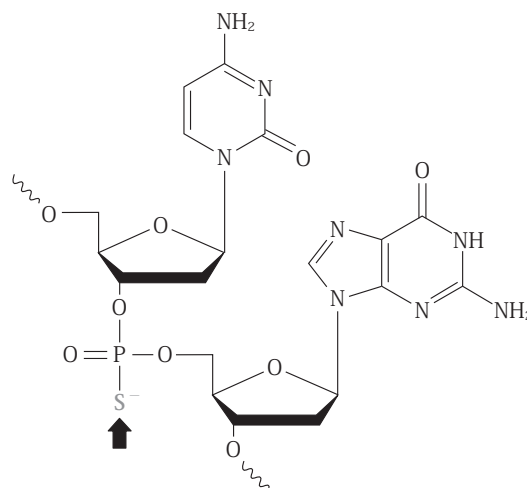


図3 リン酸部の修飾例:ホスホロチオエート化

※ カラーの図は巻頭ページを参照

2.2 糖部の修飾

糖部の修飾としては、2' 位の修飾と架橋型修飾が挙げられる（図 4）。2' 位の修飾は核酸医薬品開発の初期段階から試みられており、2'-F、2'-O-Methyl(2'-OMe)、2'-O-Methoxyethyl(2'-MOE) などが知られている。既に上市された核酸医薬品（表 1）を例にとると、Vitravene は S 化のみで糖部は修飾されていないが、Macugen ではピリミジン塩基を持つ核酸（シトシン、ウラシル）の糖部が 2'-F 化されており、プリン塩基を持つ核酸（アデニン、グアニン）は 2'-OMe が施されている。Kynamro については、S 化に加えて、オリゴ核酸の両端に位置する核酸糖部に 2'-MOE が導入されている（図 8）。また、Spinraza は全ての核酸が 2'-MOE 化された S オリゴである。

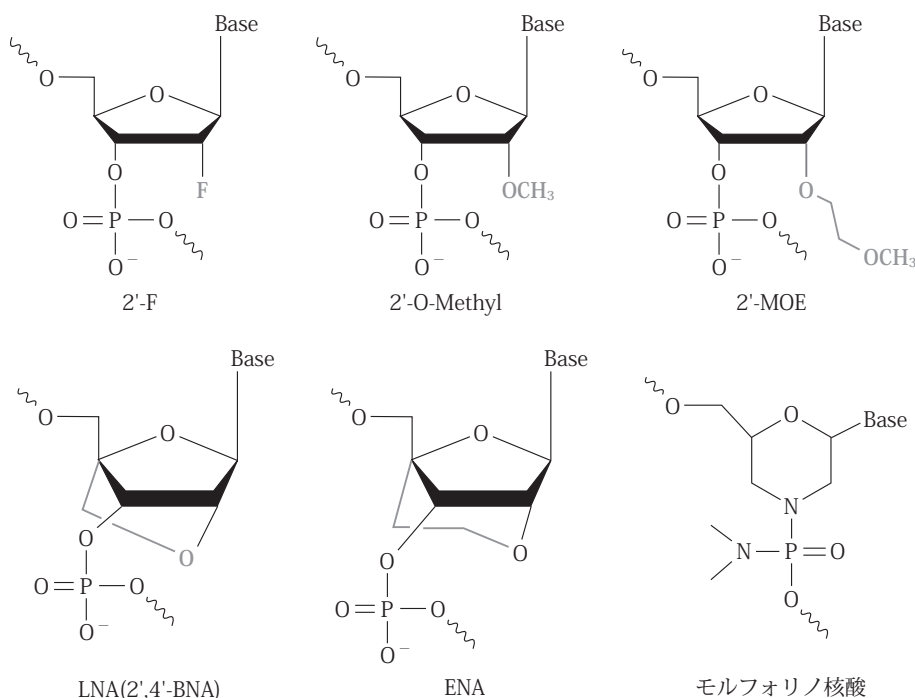


図 4 糖部の修飾例

※ カラーの図は巻頭ページを参照

架橋型修飾は、「揺らぎのある糖部の立体配座を架橋により固定化する」というコンセプトにより創製されたものである。通常、核酸は RNA 型（N 型）と DNA 型（S 型）の両方のコンフォメーションをとることができるが、糖部 2' 位と 4' 位を化学的に架橋することにより、厳密に RNA 型（N 型）に固定することができる。これにより、相補鎖との結合力が顕著に向上すると共に、ヌクレアーゼに対する立体障害によりヌクレアーゼ耐性も付与される⁴⁾。糖部架橋型人工核酸は日本が世界に先駆けて開発を進めており、1997 年に大阪大学薬学部の今西、小比賀らによって 2',4'-BNA [2',4'-Bridged Nucleic Acid, 別名 LNA (Locked Nucleic Acid)] が開発されたのが最初の報告である⁵⁾(図 4)。架橋型核酸としては、他に ENA (2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids, 文献⁶⁾, 図 4), AmNA, GuNA, scpBNA などが開発されている⁴⁾。糖部修飾ではないが、糖部をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体（モルフォリノ核酸、図 4）も核酸医薬品の原料として用いられている。モルフォリノ核酸で構成されるモルフォリノアンチセンスはヌクレアーゼで分解されず、また毒性が低いという利点があり、開発例としては Exondys 51 が挙げられる（表 1）。

2.3 塩基部の修飾

オリゴ核酸の塩基部は相補鎖との結合に特に重要であることから、相補鎖形成が前提である核酸医薬品（アンチセンス、siRNA のアンチセンス鎖等）においては塩基部が修飾されることは少ない。一方で、三次元的な構造によりタンパク質を認識するアプタマーでは、立体構造の多様性獲得あるいはタンパク質との親和性増強を狙って、塩基部が修飾されるケースがある。アプタマーの配列選択に用いられる試験管内人工進化法（SELEX 法）では PCR のステップが含ま

れることから、アプタマー選別の際に用いられる核酸はポリメラーゼに認識される必要があり、また、相補鎖を形成するカウンター核酸が必要である。このことから、アプタマー開発においては、修飾型核酸を認識する改変ポリメラーゼの開発が行われており、また、A, U, G, C に続く第 5, 第 6 の核酸を生む人工塩基対の開発も試みられている⁷⁾。また、既に述べたように、TLR9 を介した自然免疫の活性化を回避する目的で、CpG 配列を持つオリゴ核酸において CpG のシトシン 5 位がメチル化される。

3. 核酸医薬品の開発動向

3.1 上市された核酸医薬品

これまで上市された核酸医薬品はアンチセンス 4 品目 (Vitravene, Kynamro, Exondys 51, Spinraza)、アプタマー 1 品目 (Macugen) の 5 品目である (表 1)。特筆すべきは、近年になり全身投与性 (皮下投与、静脈内投与等) の核酸医薬品が実用化されている点である。Kynamro は ApoB-100 mRNA をターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬であり、キャリア無しで皮下投与される。全身投与したオリゴ核酸は肝臓や腎臓等に集積する性質があるが、Kynamro は肝臓に発現する ApoB-100 mRNA を分解することで有効性を発揮する。Exondys 51 は静脈内投与されるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬であり、ターゲットは筋細胞に発現するジストロフィン遺伝子の pre-mRNA である。上述のように、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患においては、健常人の筋細胞よりオリゴ核酸が取り込まれやすい性質があり、これにより有効性を発揮する。今後は、従来から開発されている局所投与型の核酸医薬品に加えて、皮下注／静注が可能な全身投与型の核酸医薬品が実用化されてくると予想される。

核酸医薬品の開発動向については、本節執筆時点では、特許庁の「平成 27 年度特許出願技術動向調査報告書 核酸医薬⁸⁾」、ならびに、シード・プランニング社の「2016 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望⁹⁾」に最新の状況がまとめられており、内容も充実している。両報告書では核酸医薬品の分類、対象疾患の分類等で多少の違いがあるが、基本的には同様の調査結果となっている。特許出願技術動向調査報告書については、特許庁ホームページから概要版を入手することができ¹⁰⁾、全体版は冊子体での配布となっている。以降、開発状況に関しては、特許庁の報告書に記載されている内容を参照するが、各社ホームページ等で更新可能なものについては適宜更新することにする。

2015 年 10 月末現在、臨床試験が行われている核酸医薬の候補品数は 140 程度であり、そのほとんどが RNA を標的とする核酸医薬品 (アンチセンス：68 品目、siRNA：47 品目) である (図 5)。

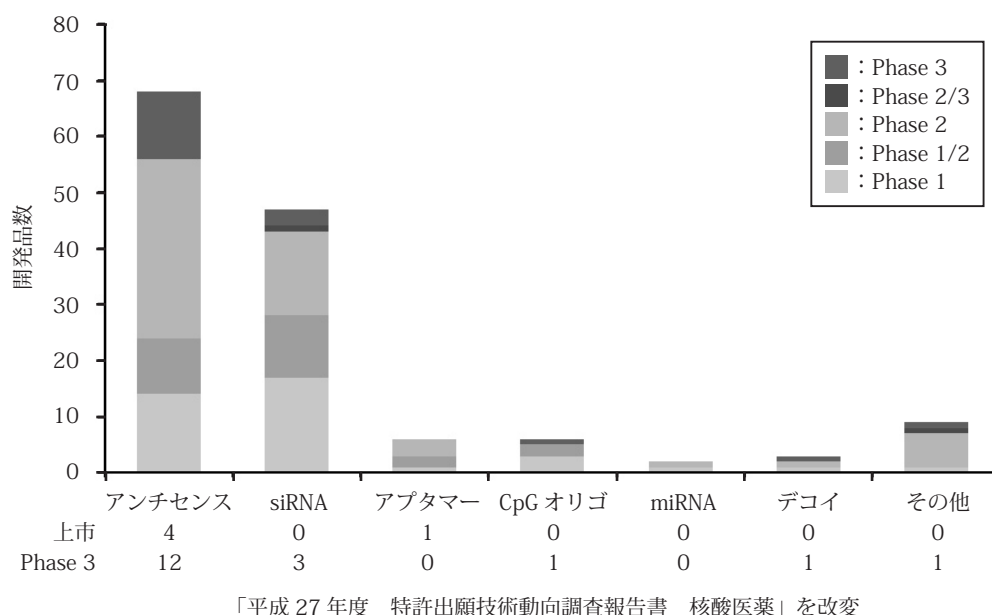
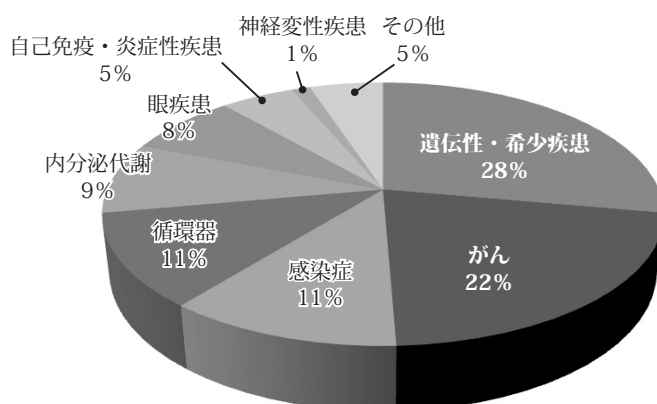


図 5 核酸医薬品の開発状況

※ カラーの図は巻頭ページを参照

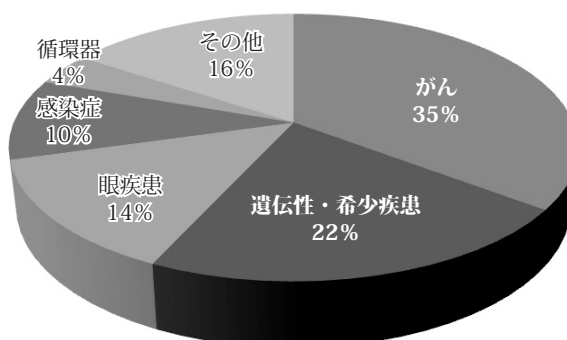
タンパク質を標的とするアプタマーとデコイは現時点ではそれぞれ 10 に満たない。Phase 3 の段階にある候補品は 20 近くあり、近い将来、後続の核酸医薬品が誕生するものと期待される。対象疾患としては、がんをはじめとする難治性疾患や遺伝性・希少疾患が先行しており、アンメットニーズに対する核酸医薬品をまず実用化することにより、市場が拡大していくと考えられる（図 6、7）。以降で、それぞれの核酸医薬品の開発状況を概説する。



「2016 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望（シード・プランニング）」を改変

図 6 アンチセンス医薬の対象疾患領域（臨床試験段階）

※ カラーの図は巻頭ページを参照



「2016 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望（シード・プランニング）」を改変

図 7 siRNA 医薬の対象疾患領域（臨床試験段階）

※ カラーの図は巻頭ページを参照

3.2 アンチセンス

アンチセンス医薬品は、標的 RNA と配列依存的に 2 重鎖を形成するオリゴ核酸を有効成分とし、標的 RNA の分解あるいは標的 RNA とその結合因子（タンパク質、RNA）の結合阻害により有効性を発揮する。現在、臨床試験が行われているアンチセンスを作用機序で分類すると、Gapmer 型、スプライシング制御型、miRNA 阻害型の 3 つに大別できる（表 3）。

3.2.1 Gapmer 型アンチセンス

Gapmer 型アンチセンスは標的 RNA を切断／分解することにより機能する核酸医薬品である。Gapmer 型アンチセンスにおいては、オリゴ核酸の両端（Wing 部分）に RNA との結合力が強い修飾型核酸が配置されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる（図 8）。このアンチセンスが標的 RNA と結合すると、「DNA と RNA の相補鎖を認識して RNA 鎖を切断するヌクレアーゼ」である RNase H がオリゴの中央部で DNA/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖を切断する。RNase H は生体内の組織／細胞に普遍的に発現する酵素で、主に核内に存在することから、Gapmer 型アンチセンスは

核内で機能していると考えられている。上述の Kynamro は代表的な Gapmer 型アンチセンスであり、Wing 部分には結合力を高める修飾型核酸として 2'-MOE が使用されている（図 4，8）。Gapmer 型アンチセンスの開発を牽引しているのは Kynamro を開発した IONIS 社（旧 ISIS 社）であり、その他の開発品目としては volanesorsen（Apolipoprotein C-III mRNA を標的とする家族性高脂血症治療薬：現在 Phase 3）がある。他社の開発品としては、Roche 社の RG6061（標的：HIF-1 α mRNA，適応：固形がん）や Isarna 社の ISTH0036（標的：TGF- β mRNA，適応：緑内障）がある。いずれも Wing 部分に 2',4'-BNA/LNA が用いられており、Phase 1 の段階にある。

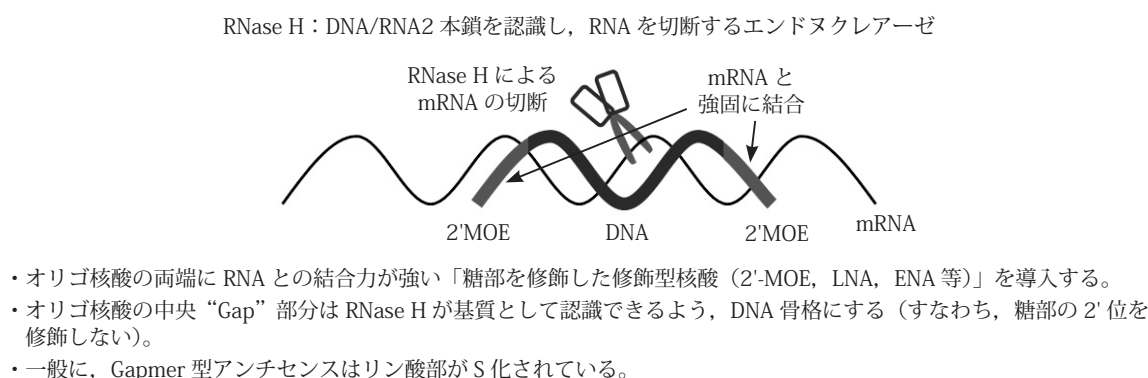


図 8 Gapmer 型アンチセンスの構造

※ カラーの図は巻頭ページを参照

3.2.2 スプライシング制御型アンチセンス

Gapmer 型アンチセンスが RNA を切断するのに対し，スプライシング制御型アンチセンスは標的 pre-mRNA に結合し，pre-mRNA とスプライシング関連タンパク質の結合を阻害する。これにより，そのスプライシングを変化させ，mRNA 配列を修正あるいは安定化することにより有効性を発揮する（表 3）。

(1) エクソンスキップの機序で作用するアンチセンス

代表的なスプライシング制御型アンチセンスとしては，デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬が知られており，エクソンスキップの機序によって作用する（図 9，文献¹¹⁾）。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では，79 個のエクソンで構成されるジストロフィン遺伝子がエクソン単位で欠失する変異が多く（60～70%），この結果，筋細胞の維持に必須であるジストロフィン蛋白が生成しない。図 9 に示した例では，エクソン 50 の欠失により，「エクソン 49 と 51 が連結した mRNA」が生じ，エクソン 51 以降で読み枠がずれることにより，早期にストップコドンが生じる。この結果生じた「C 末側が欠失した変異ジストロフィン蛋白」は不安定なため，分解される。この状況において，エクソン 51 の ESE 領域（Exonic splicing enhancer：スプライシングを促進するシス配列）と相補的に結合するアンチセンスを導入すると，スプライシングが変化し，エクソン 51 がスプライスアウト（すなわち“スキップ”）される。これにより生じる「エクソン 49 とエクソン 52 が連結した mRNA」は読み枠が合うことから，C 末端まで翻訳されることとなり，「エクソン 50，51 にコードされるアミノ酸が欠失した少し短いジストロフィン蛋白」が生成する。重要な点は，ジストロフィン蛋白は N 末側のモチーフと C 末側のモチーフが機能発現に必須であるが，中央部には繰り返しモチーフがあり，多少抜けても機能が保持される点である。エクソンスキッピング法はこのジストロフィン蛋白の性質を生かした治療法といえる。本手法で用いるアンチセンスのターゲットは pre-mRNA であり，pre-mRNA とスプライシングに必要なタンパク質との結合を阻害することに機能を発現する（表 3）。図 9 の作用原理を見てもわかるように，エクソンスキップ法ではアンチセンスは RNA 鎖に結合すればよく，Gapmer 型のように RNA 鎖を切断する必要はない（むしろ，切断してはいけない）。したがって，アンチセンスの結合力を高めつつ，RNase H が作用しないように修飾型核酸が配置される。また，RNase が作用しないモルフォリノアンチセンスも用いられる。

図 9 に示した「ジストロフィン遺伝子のエクソン 51 を標的とした核酸医薬品」として，Exondys 51（一般名：eteplirsen，モルフォリノアンチセンス，30 塩基長，静脈内投与）が米国で承認されている。これはアメリカ食品医薬

品局（FDA）の迅速承認制度（accelerated approval）によるものであり、市販後に臨床上的有用性を確認することが承認条件とされた、いわば“仮免許”に相当する。エクソン 51 を標的としたアンチセンスとしては、他に BioMarin 社が Kyndrisa（一般名：drisapersen, 2'-OMe 化 PS オリゴ, 20 塩基長, 皮下投与）を承認申請していたが、米国、欧州の双方で申請取り下げ（開発中止）になっている。

国内においては、日本新薬がエクソン 53 を標的としたモルフォリノアンチセンス（NS-065/NCNP-01）を開発している。本候補品は先駆け審査指定制度において初の対象品目に選定されており、2016 年 1 月より国内で Phase 1/2 の臨床試験が開始されている。また、米国ではファストトラック指定を受けており、2016 年 3 月より Phase 2 試験が開始されている。第一三共はエクソン 45 を標的としたアンチセンスを開発しており、独自に開発した架橋型人工核酸 ENA を含むオリゴ核酸を用いている。2016 年 2 月に国内において Phase 1/2 の臨床試験を開始している。なお、エクソン 53 ならびにエクソン 45 のエクソンスキップ療法は、エクソン 51 に次いで対象患者数が多いとされているもので、対象患者が多いエクソンから順に国内外で開発が進められている。

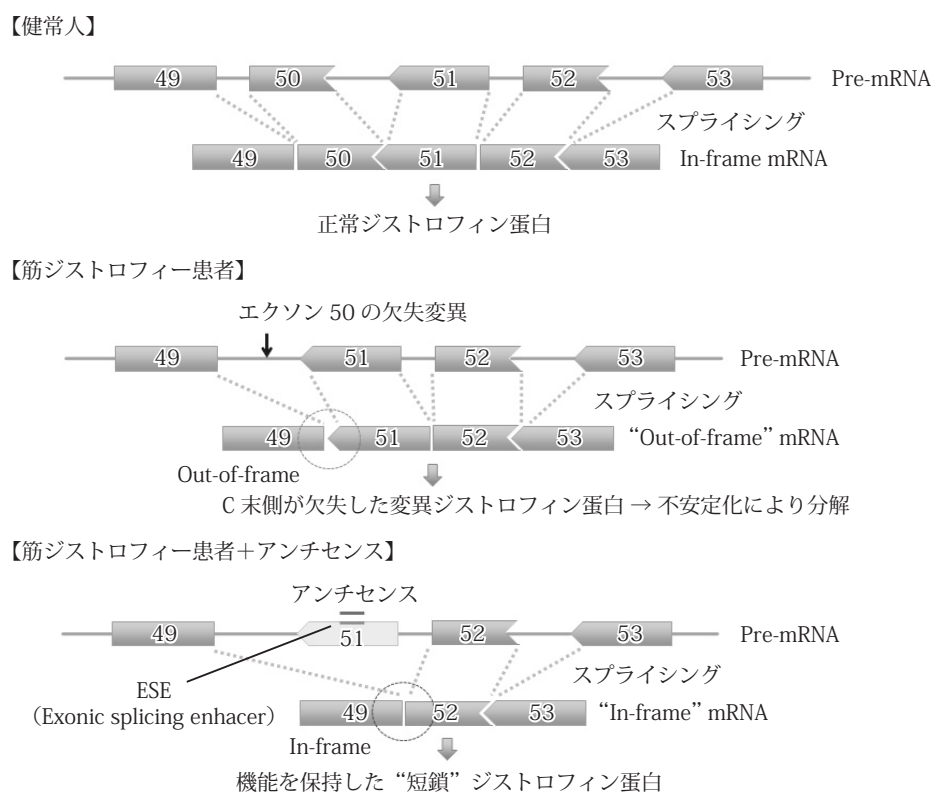


図9 エクソンスキップ療法の例

※ カラーの図は巻頭ページを参照

(2) エクソンインクルージョンの機序で作用するアンチセンス

スプライシング制御型アンチセンスの作用機序としては、「エクソンスキップ」のほかに、「エクソンインクルージョン」ならびに「潜在的スプライシング部位の抑制」がある¹²⁾。エクソンインクルージョンはエクソンスキップとは逆に、「スプライスアウトされてしまう運命にあるエクソンを、アンチセンスの作用によりスプライスインし、mRNAに組み込む手法」である^{13,14)}。エクソンインクルージョンの機序で作用するアンチセンス医薬品としては、脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy：SMA）の治療薬である Spinraza（一般名：nusinersen）があり、2016 年 12 月に米国で承認されている（表 1, 図 10）。Spinraza は 18 塩基長の 2'-MOE 化 PS オリゴであり、髄腔内投与される。以下に Spinraza が適用される疾患とその作用機序について解説する。

SMN1（survival of motor neuron 1）は神経細胞の核に存在するアポトーシス抑制タンパク質であり、SMN1 をコードする *SMN1* 遺伝子のホモ欠損は重度の脊髄性筋萎縮症（運動ニューロン疾患）を引き起こす。ヒトには *SMN1* 遺

伝子に隣接し、*SMN1* 遺伝子と 11 塩基のみが異なる *SMN1* 遺伝子のコピー（*SMN2* 遺伝子）が存在する（図 10）。*SMN1* 遺伝子に由来する mRNA は「Exon1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 +「7」+ 8」のエクソン構造を有しており、エクソン 7 が mRNA に含まれている。一方、*SMN2* はエクソン 7 上の塩基配列の違い（C → T）から *SMN1* とはスプライシング様式が異なっており、通常はエクソン 7 が含まれない mRNA 「Exon1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 8」が優先的に生成する。この「エクソン 7 が含まれない mRNA」から生じる SMN2 タンパク質はフレームシフトより C 末側が欠失することから不安定であり、通常は機能しない（すなわち、*SMN2* 遺伝子は通常は偽遺伝子と考えてよい）（図 10、「健常人」を参照）。Spinraza は *SMN1* ホモ欠損患者において、*SMN2* の機能を回復させることを意図したアンチセンスである。Spinraza は *SMN2* pre-mRNA のエクソン 7 に近接するイントロンに相補結合するように設計されており、これにより「エクソン 7 のスプライシングインを抑制する因子」が pre-mRNA に結合するのを阻害する。この原理から、Spinraza の投与により *SMN2* mRNA にエクソン 7 を組み込むことが可能となり（＝エクソンインクルージョン）、その結果、SMN1 欠損を補完する機能的な SMN2 タンパク質を発現させることができる（図 10、「*SMN1* ホモ欠損患者＋アンチセンス」の段を参照）。

Spinraza の例では病態の原因遺伝子（*SMN1*）とアンチセンスの標的遺伝子（*SMN2*）が異なるが、エクソンインクルージョンの機序は選択的スプライシングの破綻に起因する病態において原因遺伝子に対してアンチセンスを設定するケースも考えられ、エクソンスキップと合わせ、今後さらなる成功例が期待される。なお、Spinraza に関しては、欧州、日本でも承認申請されており、日本で承認されれば、Macugen に続き、2 例目の核酸医薬品となる。

「潜在的スプライシング部位の抑制」に関しては、日本人に多く、重度な症状を呈する福山型筋ジストロフィーに対するアンチセンスが例として挙げられる¹⁵⁾。福山型筋ジストロフィーに対するアンチセンス医薬の開発は、日本新薬が神戸大学医学系研究科と共同開発を行っている。作用機構に関しては、文献^{12,15)}を参照して頂きたい。

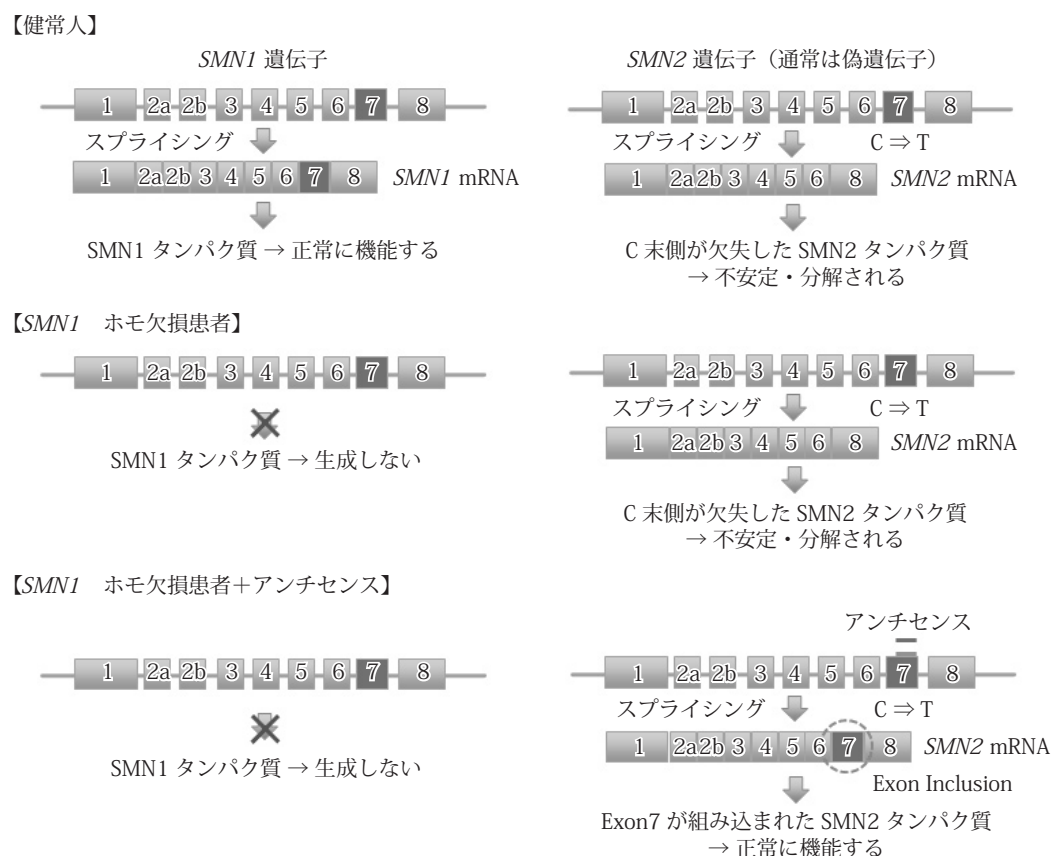


図 10 エクソンインクルージョン療法の例

※ カラーの図は巻頭ページを参照

3.2.3 miRNA 阻害型アンチセンス

非コード RNA の 1 つである miRNA は 20 数塩基の短い 1 本鎖 RNA で、主に mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することで、mRNA の機能を阻害する。miRNA の生成機構／作用機構は siRNA のパスウェイと類似している。すなわち、ゲノム DNA から転写された pri-miRNA は二段階の切断を受けて siRNA と同じ 2 本鎖 RNA となる。その後、siRNA と同様に RISC 複合体に取り込まれた後、相補鎖であるパッセンジャー鎖が除かれて、1 本鎖ガイド鎖 (= miRNA) が RISC 複合体に残る。この複合体がガイド鎖に相補的な mRNA を認識し、mRNA の翻訳抑制あるいは分解を引き起こす。

miRNA に関連する核酸医薬品は「miRNA の発現異常によって引き起こされる病態を、miRNA の量を正常化することによって治療する」というコンセプトで創製される。miRNA の発現が亢進した病態では、miRNA の量を減少させる方法論がまず考えられるが、上述のとおり、miRNA は短い RNA であることなどから、siRNA 等によって分解することは難しいと思われる。そこで、miRNA の機能を抑制する手法として、miRNA と相補的に結合するアンチセンスが用いられる。miRNA 阻害型アンチセンスは、miRNA と標的 mRNA の結合をブロックするものであり、アンチセンス医薬品の分類としては「立体障害」となる (表 3)。miRNA 阻害型アンチセンスの開発例としては、Regulus 社が開発を進める RG-012 が挙げられる。RG-012 は慢性腎炎等を呈するアルポート症候群の発症に関与するマイクロ RNA-21 (miR-21) を阻害するアンチセンスであり、miR-21 が高発現する病態腎組織で機能し、腎線維化を抑制する。現在、Phase 1 試験が行われている。

3.3 siRNA

RNAi という現象はもともとアンチセンスを用いた研究が契機で発見された。すなわち、「アンチセンスのネガティブコントロールとしてセンス鎖 RNA を線虫に注入したところ、予想外にもセンス鎖でも遺伝子機能が阻害された表現型が得られた」という一文が 1995 年の Cell 誌に記載され¹⁶⁾、この原因を追究したところ、「センス鎖 RNA に微量に混入した 2 重鎖 RNA が mRNA の分解を引き起こしている」という事実が明らかになったのである¹⁷⁾。この線虫における RNAi の発見の後、RNAi が誘導されるためには 2 重鎖 RNA が 20 塩基程度の短い 2 本鎖 RNA (siRNA) に切断される必要があることが示され、さらに、2001 年にはヒト細胞においても、合成した siRNA を導入すれば RNAi が誘導されることが明らかにされた¹⁸⁾。siRNA はアンチセンスに比べて低濃度で mRNA を分解できることから、核酸医薬品のシーズとして大きな注目が集まったが、DDS が予想以上に難しく、また、自然免疫系を活性化される例が報告されたことなどから¹⁹⁾、臨床応用への期待が下火になった経緯がある。しかし、最近の技術進展により、再び注目を集めている。

まず、自然免疫を活性化する副次的作用の問題については、2 重鎖 RNA のセンサーである TLR3 の研究が進んだこと、修飾型核酸の導入により活性化を低減できることが明らかになったことから、リスクをあらかじめ回避できるようになった。DDS に関しては、全身投与が可能な siRNA として、末端にコレステロールを付加した siRNA が報告されたが²⁰⁾、個体レベルの作用としては不十分であった。その後、Tekmira 社がリポソームの脂質成分を徹底的にスクリーニングすることで、SNALP (stable nucleic acid lipid particles) と呼ばれるリポソーム製剤を開発し、全身投与された siRNA が肝臓において効率よく機能する技術が確立された²¹⁾。現在では、リポソームの改良がさらに進み、0.02 ~ 0.1 mg/kg (ED50) という低用量で発現抑制を実現している。Alnylam 社はこの技術を用いて、アミロイドーシスの原因となるトランスサイレチン (TTR) を抑制する siRNA 医薬品 patisiran の開発を行っており、現在、Phase 3 の段階にある。TTR は主に肝臓で発現し、血中で機能するタンパク質であるが、TTR 遺伝子に特定の変異が導入されると変異 TTR 蛋白からなるアミロイド (水に溶けない繊維状の蛋白) を生じ、全身の臓器に沈着する。静脈内投与された patisiran は肝臓で機能し、血中の変異 TTR を減少させる効果がある。

「1.4 核酸医薬品の性質および体内動態」の項で、「2 本鎖 siRNA を全身投与するためには基本的にリポソーム等のキャリアが必要」と述べたが、近年、糖鎖を siRNA の末端に付加した「GalNAc-conjugated siRNA」と呼ばれるキャリアを必要としない技術が開発されている。Alnylam 社が開発したこの技術は肝実質細胞の細胞表面に発現するアシアロ糖タンパク質受容体と GalNAc (N - アセチルガラクトサミン) の結合を利用したもので、全身投与 (皮下投与) によ

り、肝臓に集積し、機能する。開発当初は「Standard Template Chemistry (STC)-GalNAc-conjugate delivery」と呼ばれる手法であったが、siRNA に用いられている修飾型核酸をより高度なものに改変した「Enhanced Stabilization Chemistry (ESC)-GalNAc-conjugate delivery」技術が新たに開発されており、STC に比べ、有効性が 10 倍程度向上するとされている。GalNAc-conjugated siRNA で最も開発が進んでいるのは、PCSK9 を標的とする高コレステロール血症治療薬 ALN-PCSsc であり、現在、Phase 2 の段階にある。ALN-PCSsc では ESC が用いられている。GalNAc-conjugated siRNA として先行して開発されていた revusiran（標的：TTR mRNA）は毒性発現が原因で Phase 3 で開発中止となったが、STC を ESC に変更した ALN-TTRsc02 に切り替えて開発が進められている。

国内企業の話題としては、日東電工 / Quark 社が開発する肝硬変治療薬 ND-L02-s0201（標的：HSP47 mRNA）があり、海外で Phase 2 が開始されるところである。ND-L02-s0201 においては、肝臓における活性化星細胞に取り込ませることを目的として、ビタミン A を結合したリポソームが用いられている。また、国立がん研究センターでは、乳がんの治療抵抗性に関わる Ribophorin II（RPN2）に対する siRNA を開発しており、2015 年 7 月に医師主導治験を開始している。DDS としては界面活性剤ペプチドである A6K を用いており、RPN2 siRNA/A6K 複合体として腫瘍周辺部に局所投与される。

3.4 miRNA

miRNA の発現が亢進した病態に対して、miRNA 阻害型アンチセンスが用いられることは上に述べたが、miRNA の発現が減少する病態については、miRNA を補充する試みが行われる。miRNA とは「3.2.3 miRNA 阻害型アンチセンス」の冒頭で述べた miRNA 生成経路の最後に生じる 1 本鎖 RNA を指すが、miRNA が機能を獲得するためには前駆体である 2 本鎖の状態を RISC 複合体に取りこまれた後、相補鎖が解離して、1 本鎖 RNA（＝miRNA）になる必要がある。したがって、miRNA を補充する療法では基本的には 2 本鎖 RNA で細胞内に導入することとなる。短鎖 RNA を 2 本鎖で導入するという点は siRNA と同様であり、したがって、投与方法、DDS の考え方も siRNA と同様と考えることができる。miRNA 補充の目的で使われる 2 本鎖 RNA は、内在性 miRNA と区別する意味も含めて、“miRNA mimic”とも呼ばれる。一般に癌組織においては miRNA の発現が減少しており、miRNA の補充により治療効果が期待される例が多く出ていることから、miRNA mimic は特にがんへの適応が注目されている。miRNA に関連する核酸医薬品に関しては文献²²⁾も合わせて参照して頂きたい。

3.5 デコイ

デコイ核酸医薬品は転写因子が結合する DNA 領域の塩基配列を人工的に合成した 2 本鎖の DNA である。デコイを細胞内に導入すると、標的の転写因子に「おとり（＝デコイ）」として結合し、この結果、本来のプロモーター DNA 領域と転写因子の結合が阻害される。したがって、デコイはアプタマーと同様にタンパク質の標的とする核酸医薬品である。一般に転写因子はある特定の現象に関わる遺伝子群を同時に発現制御することから、転写因子を標的とした医薬品は効果的に有効性を発揮する可能性を秘めている。デコイ核酸医薬品の開発はアンジェス MG において進められており、炎症に関連する遺伝子群を制御する転写因子 NF κ B（Nuclear Factor-kappa B）を標的としたデコイの臨床研究が進められている。NF κ B が関与する病態は、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、血管再狭窄、関節症など多岐に渡っており、NF κ B デコイの応用範囲は広いと期待される。アトピー性皮膚炎への適応で開発されていた AMG0101（軟膏剤）は Phase 3 試験において主要評価項目で有意差が得られなかったと発表されている。AMG0101 の椎間板性腰痛症への適応（注射剤）については Phase 1/2 試験の準備中である。本開発については、文献²³⁾に詳しいので、そちらを参照して頂きたい。

デコイ核酸医薬品としては、もう 1 つ Adynxx 社が開発する AXX1 がある。AXX1 は early growth response protein 1（EGR1）と呼ばれる転写因子と結合し、その機能を阻害する。EGR1 は神経可塑性に関与することが知られており、EGR1 の阻害により痛みの伝達が遮断される。現在、手術時に単回投与し、手術後の痛みを低減するという目的で臨床試験が行われている。現在、Phase 2 が終了している。

3.6 アプタマー

アプタマーは1本鎖RNAまたはDNAで構成され、その立体構造により標的タンパク質と結合して機能を阻害する核酸医薬品である。SELEX法によって取得される。アプタマーの利点としては、標的タンパク質への結合性／特異性が高い、免疫原性が低い、化学合成可能で製造、保存が容易であることなどが挙げられる。アプタマーは細胞外でタンパク質と結合して機能を発揮するため、原理的に抗体医薬品と競合する。上に述べたアプタマーの優位性はあるものの、抗体医薬品が大きく先行しているのが現状である。現在、臨床試験が行われているアプタマー医薬候補はNOXXXON社のNOX-A12およびNOX-H94があり、それぞれPhase 2の段階にある。NOX-A12はケモカイン受容体CXCR4のリガンドであるCXCL12/SDF-1を標的としており、再発性多発性骨髄腫や再発性慢性リンパ性白血病への適応が検討されている（既存抗癌剤との併用）。NOX-H94は鉄のホメオスタシスに重要なヘプシジン（hepcidin）に対するアプタマーであり、ヘプシジンの過剰産生により引き起こされる貧血を対象としている。また、Ophthotech社が加齢黄斑変性症への適応で補体C5に対するアプタマーZimuraを開発しており、現在、Phase 2/3の段階にある。アプタマー開発においては、Regado社が開発していたRNAアプタマーREG1（血液凝固因子IXa阻害薬pegnivacogin＋中和薬anivamersen）が有望と考えられていたが、Phase 3試験で重度アレルギー反応が10例報告され、開発中止が発表されている。

3.7 CpG オリゴ

CpGオリゴはここまで述べてきた核酸医薬品において副作用と懸念される点を、主作用とする医薬品である。すなわち、オリゴ核酸がTLRに代表されるパターン認識受容体を介して引き起こす自然免疫系の活性化を、免疫賦活化作用という有効性として捉えた医薬品である。CpGオリゴはワクチンを投与する際の核酸アジュバントとして利用されるケースが多く、1本鎖DNAを認識するTLR9を介して作用する。Dynavax社が開発するHEPLISAV-B（適応：B型肝炎）、InDex社が開発するKappaproct（適応：潰瘍性大腸炎）がPhase 3の段階にある。また、日本においては大阪大学微生物病研究所において開発されているBK-SE36/CpG-ODN（K3）（適応：マラリア感染）がPhase 1を終了している。文献²⁴⁻²⁶⁾も参照されたい。

おわりに

以上述べてきたように、アンチセンスを中心に核酸医薬品は現在の技術でも十分に実用化可能な段階に達している。デリバリーの観点から既存の送達可能な技術・投与方法・組織を選択し、アンメットニーズの観点から対象疾患を絞り込むことで、有効性の点からも、リスク・ベネフィットを考慮した安全性の点からも、実用化可能な候補品が探索できると考えられる。そのような核酸医薬シーズを化学・生物・DDS・臨床の分野が連携することで効率よく発掘し、産官学の連携で強力に研究開発を推し進めれば、日本発の核酸医薬品を創出する基盤が構築できると考える。核酸医薬品の規制面については、現状ではケーススタディが少なく、世界的に整備されていない状況であるが、国内においても核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスを議論する動きが生まれている。今後、医薬品開発とレギュラトリーサイエンス研究の両輪で前進し、日本発の核酸医薬品が早期に誕生することを期待したい。

文 献

- 1) Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice.
Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, Takeda S.
Hum Mol Genet. 2013 Dec 15 ; 22 (24) : 4914-28. doi : 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
- 2) 西川元也, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, Vol. 43, No. 9, 778-785 (2012)
- 3) 額賀陽平, 和田 猛, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 60-69 (2016)
- 4) 小比賀聡, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 29-39 (2016)

- 5) Obika S, et al : Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and-cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar puckering. Tetrahedron Lett 38 : 8735-8738 (1997)
- 6) 小泉 誠, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 40-48 (2016)
- 7) 平尾一郎, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 87-95 (2016)
- 8) 特許庁, 平成 27 年度特許出願技術動向調査報告書 核酸医薬
- 9) シード・プランニング社, 2016 年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望
- 10) http://www.jpo.go.jp/shiryuu/pdf/gidou-houkoku/h27/27_11.pdf
- 11) 齊藤 崇, 武田伸一, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 247-257 (2016)
- 12) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, Vol. 45, No. 1 (2014)
選択的スプライシングを調節するアンチセンス医薬品の開発について
齊藤 崇, 武田伸一, 23-32
- 13) Bifunctional RNAs targeting the intronic splicing silencer N1 increase SMN levels and reduce disease severity in an animal model of spinal muscular atrophy.
Osman EY, Yen PF, Lorson CL.
Mol Ther. 2012 Jan ; 20 (1) : 119-26.
- 14) Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy.
Sivanesan S, Howell MD, Didonato CJ, Singh RN.
Transl Neurosci. 2013 Mar ; 4 (1), doi : 10.2478/s13380-013-0109-2.
- 15) Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy.
Taniguchi-Ikeda M1, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T.
Nature. 2011 Oct 5 ; 478 (7367) : 127-31.
- 16) par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed.
Guo S, Kemphues KJ.
Cell. 1995 May 19 ; 81 (4) : 611-20.
PMID : 7758115
- 17) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.
Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.
Nature. 1998 Feb 19 ; 391 (6669) : 806-11.
PMID : 9486653
- 18) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.
Nature. 2001 May 24 ; 411 (6836) : 494-8.
PMID : 11373684
- 19) Sequence-and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3.
Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J.
Nature. 2008 Apr 3 ; 452 (7187) : 591-7. doi : 10.1038/nature06765.

- 20) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs.
Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP.
Nature. 2004 Nov 11 ; 432 (7014) : 173-8.
- 21) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates.
Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I.
Nature. 2006 May 4 ; 441 (7089) : 111-4. Epub 2006 Mar 26
- 22) 山田陽史, 吉田哲郎, miRNA 医薬開発の現状と展望, 遺伝医学 MOOK 23 号, 208-213 (2012)
- 23) 森下竜一, 核酸医薬の創製と応用展開, 和田 猛, シーエムシー出版, 258-269 (2016)
- 24) Hancock, RE. ; Nijnik, A. ; Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10 (4), p. 243-254
- 25) Galluzzi, L. ; Vacchelli, E. ; Eggermont, A. ; Fridman, WH. ; Galon, J. ; Sautès-Fridman, C. ; Tartour, E. ; Zitvogel, L. ; Kroemer, G. Trial Watch : Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2012, 1 (5) : p. 699-716
- 26) Bode, C. ; Zhao, G. ; Steinhausen, F. ; Kinjo, T. ; Klinman, DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011, 10 (4) : p. 499-511