核酸医薬の製造・精製・分析
ーいま求められること，そして，将来求められることー

国立大学法人大阪大学　大学院薬学研究科　生物有機化学分野　山口（やまぐち）　卓男（たかお）

近年，核酸医薬の研究開発が活発化している。核酸医薬の中でも承認数の多いアンチセンス核酸や siRNA について，その優れた特徴を述べるとすれば，標的遺伝子に合わせて配列を理論的に設計できることや化学合成によって製造できることが挙げられる。このうち，後者については日本が得意とする有機合成化学の力が発揮でき，潜在的に高い競争力があると言っても過言ではない。ただし，中分子サイズの核酸医薬を製造するにはノウハウが必要である。また，製造と関連して，精製や分析の技術も伴っていなければならない。本稿では，急増する核酸医薬の製造・精製・分析において，いま求められること，将来求められるであろうことについて，私見を述べたい。

1　急増する核酸医薬

筆者が学生だった頃，核酸医薬はまだ実用化可能か不可能か定かではない状態を推移していたように思う。しかし，それから 20 年余り，核酸医薬は大きな成長を遂げ，今や有力な創薬モダリティとして製薬業界全体に認知されるようになった。核酸医薬は，十数から数十塩基長程度の長さのオリゴ核酸から構成され，化学合成よって製造される医薬品である。その作用点あるいはその作用機序は様々であり，アンチセンス核酸や siRNA，アプタマー，CpG オリゴ，デコイ核酸，miRNA 医薬など，多様な創薬アプローチを提供する[1) 2)]。また近年，関連研究が進められるなかで，新しい種類の核酸医薬も登場しており，更なる発展性を秘めている。

さて，現在最も承認数が多い核酸医薬は一本鎖 DNA を主骨格とするアンチセンス核酸である（表1）。アンチセンス核酸は，その理論自体が 1970 年代には登場していたものの，それからの医薬品化にはいくつもの大きな壁が立ちはだかった。まず，単純な一本鎖 DNA は生体内で即座に分解されるため，標的組織・細胞にて薬効を発揮させることが困難であった。その点については，核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の切断位置にあたるリン酸ジエステル（PO）結合をホスホロチオアート（PS）結合へと変化させることで，改善がなされてきた。また，糖部フラノース環にも様々な化学修飾が行われ，標的 RNA に対する親和性も向上し，薬効は飛躍的に高まってきた。1998 年に核酸医薬品として初めて承認された fomivirsen は，PS 修飾を採用し，局所投与（硝子体内投与）を選択することで実現した。それから 15 年の年月を経て，2013 年，PS 修飾と糖部修飾が適切に組み合わされることで，初めて全身投与が可能な核酸医薬品 mipomersen が誕生した。PS 修飾されたアンチセンス核酸は肝臓や腎臓に集積しやすく，mipomersen では肝臓を標的としたことが成功の 1 つの鍵であった。このような研究者達の幾多の工夫により，アンチセンス核酸のデザインは研ぎ澄まされていった。その結果，2016 年以降は立て続けに 6 品目のアンチセンス核酸が承認されるまでに成長した。また，時を同じくして siRNA でも化学修飾や薬物送達システム（DDS）の工夫が施され，2018 年の patisiran の承認を皮切りとして，2022年現在までに5品目が承認されるまでに至っている。アンチセンス核酸や siRNA は，医薬品へと磨き上げる技術が高まっており，少なくとも局所投与による当該部位での活性，あるいは，全身投与による肝臓での活性に関しては

表1　承認を受けた核酸医薬品（承認年，対象疾患，分類，標的組織，化学修飾，など）

承認年	「商品名」(一般名)	対象疾患	分類	標的組織	投与方法	構造・化学修飾※1
1998 年	「Vitravene」(fomivirsen)	サイトメガロウイルス網膜炎	アンチセンス	眼	硝子体内	21 mer PS
2004 年	「Macugen」(pegaptanib)	滲出型加齢黄斑変性症	アプタマー	眼	硝子体内	28 mer PEG, 2′-F, 2′-OMe, inverted thymidine
2013 年	「Kynamro」(mipomersen)	ホモ型家族性高コレステロール血症	アンチセンス	肝臓	皮下	20 mer 2′-MOE, PS
2016 年	「Exondys 51」(eteplirsen)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	アンチセンス	筋	静脈内	30 mer PMO, TEG
2016 年	「Spinraza」(nusinersen)	脊髄性筋萎縮症	アンチセンス	髄腔	髄腔内	18 mer 2′-MOE, PS
2017 年	「Heplisav-B」ワクチンアジュバント	B 型肝炎	CpG オリゴ	免疫系	筋肉内	22 mer PS
2018 年	「Tegsedi」(inotersen)	トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー	アンチセンス	肝臓	皮下	20 mer 2′-MOE, PS
2018 年	「Onpattro」(patisiran)	トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー	siRNA	肝臓	静脈内	21 mer + 21 mer RNA, 2′-OMe (DDS: LNP)
2019 年	「Waylivra」(volanesorsen)	家族性高カイロミクロン血症	アンチセンス	肝臓	皮下	20 mer 2′-MOE, PS
2019 年	「Givlaari」(givosiran)	急性肝性ポルフィリン症	siRNA	肝臓	皮下	21 mer + 23 mer 2′-F, 2′-OMe, PS (DDS: GalNAc)
2019 年	「Vyondys 53」(golodirsen)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	アンチセンス	筋	静脈内	25 mer PMO, TEG
2020 年	「Viltepso」(viltolarsen)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	アンチセンス	筋	静脈内	21 mer PMO
2020 年	「Oxlumo」(lumasiran)	原発性高シュウ酸尿症 I 型	siRNA	肝臓	皮下	21 mer + 23 mer 2′-F, 2′-OMe, PS (DDS: GalNAc)
2020 年	「Leqvio」(inclisiran)	動脈硬化性心血管疾患・家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体	siRNA	肝臓	皮下	21 mer + 22 mer 2′-F, 2′-OMe, PS (DDS: GalNAc)
2021 年	「Amondys 45」(casimersen)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	アンチセンス	筋	静脈内	22 mer PMO, TEG
2022 年	「Amvuttra」(vutrisiran)	トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー	siRNA	肝臓	皮下	21 mer + 23 mer 2′-F, 2′-OMe, PS (DDS: GalNAc)

※1　PS：phosphorothioate　2′-F：2′-fluoro　2′-OMe：2′-*O*-methyl　2′-MOE：2′-*O*-methoxyethyl　PEG：polyethylene glycol　TEG：triethylene glycol　LNP：lipid nanoparticle　GalNAc：*N*-acetyl-D-galactosamine　PMO：morpholino　DDS：drug delivery system.

引き出すことが十分可能になってきたと感じている。さらに，近年では mRNA の塩基配列情報を簡便に検索できるデータベースやウェブツールの整備も進み，創薬のスピードアップや成功確率の向上が期待されるところである。また，アプタマーや miRNA 医薬等についても，アンチセンス核酸や siRNA の成功例を手本にして研究開発が加速しており，国内外問わず，核酸医薬業界全体が大きな盛り上がりを見せている。

2　核酸医薬の製造・精製

核酸医薬は，化学合成によって製造される。古くは 1980 年頃から，ホスホロアミダイト体を用いる DNA 連結反応が発展し，固相合成と組み合わされることにより，現在の核酸医薬製造の基礎が確立してきた（図1）。上述の通り，核酸医薬は現在様々な化学修飾がなされ，DDS の観点からも標的組織へと送達するリガンドの付加が行われるなど，化学構造の複雑化が進んでいる。このような複雑な化学構造を有するオリゴ核酸を合成するため，通常は 100 近い多段階反応を固相上にて行う。一方で，精製は固相担体から切り離した後に行うため，一段階ごとに精製の機会がある低分子医薬と比較すると，核酸医薬の精製難易度は高い。核酸医薬の分子量は通常 10,000 程度であり，反応不良により生じる構造類似の不純物については，分離が困難になる場合も少なくない[3) 4)]。

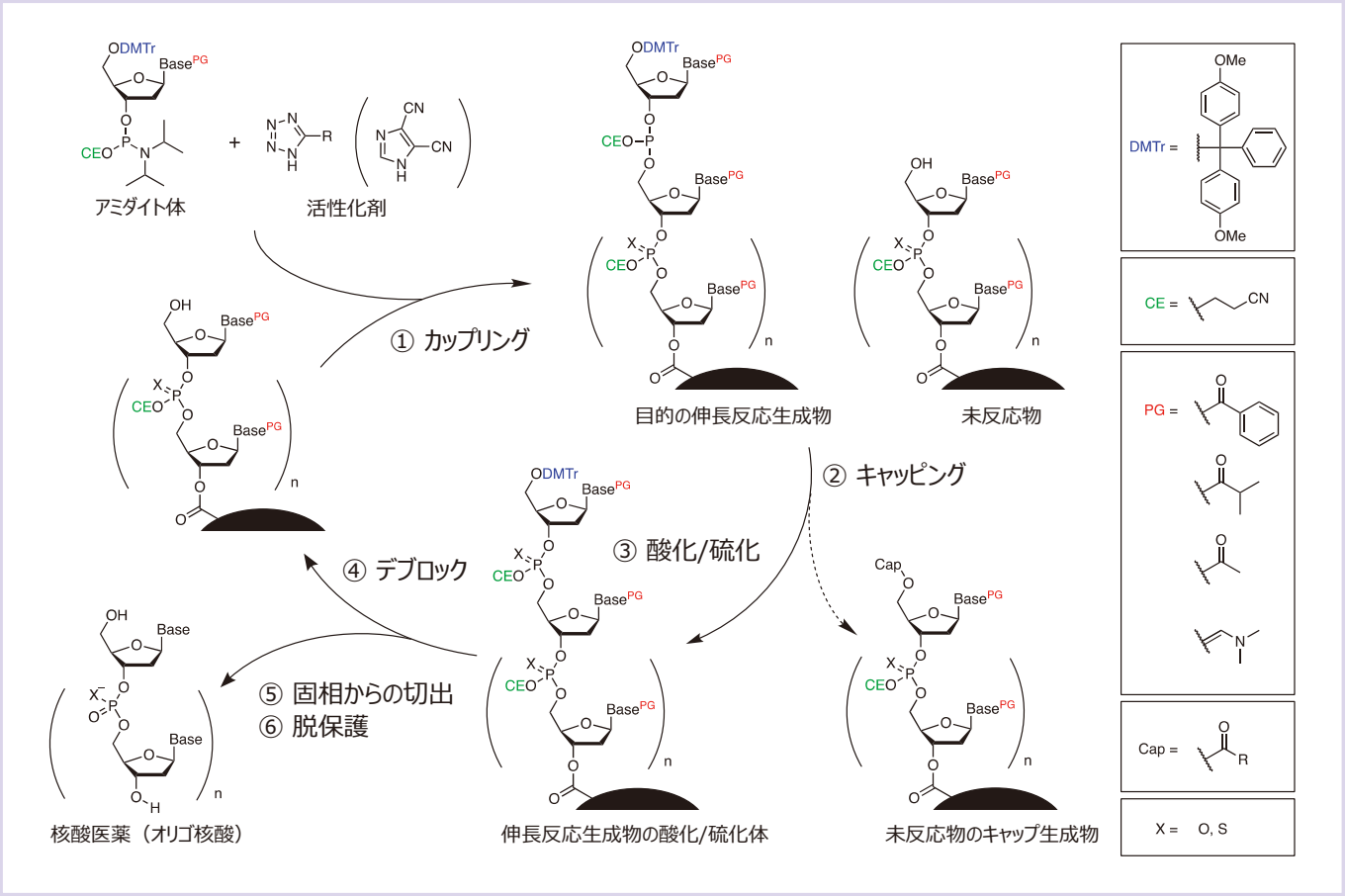

図１　ホスホロアミダイト法による核酸医薬の固相合成（①から④が繰り返されて順次配列が伸長していく）

さて，固相合成の話に立ち返ると，１つのヌクレオチドを連結する際に４つの反応を行なっていることが分かる（図１）。これらは，十分に精査された条件において高い反応効率で進行するものの，個々の反応が 100 % の収率で進行するわけではなく，目的物とは異なる構造の副生成物が少量ずつ多種類生成することが問題になる。また，伸長反応が完了してからも，固相からの切り出し反応や保護基の除去反応において副生成物が生じてしまう。核酸医薬の精製は，通常イオンペア逆相（IP-RP）クロマトグラフィーや陰イオン交換（AEX）クロマトグラフィーにて行うが，目的物と副生成物とをいかに分離するかが課題となる。分離が困難な副生成物としては，ヌクレオチドが１つ欠損した n-1 体や PS 結合が PO 結合に変化した PS/PO 置換体などが挙げられる。また，ヌクレオチドが１つ多く付加した n+1 体や，酸性条件によって生じるプリン塩基の欠損体，保護基であるシアノエチル基が塩基部へと転位したシアノエチル付加体，保護基の除去不良体などが挙げられる。アンチセンス核酸は標的 mRNA と相補的に結合して薬効を発揮するが，例えば，n-1 体は本来の標的とは異なる mRNA に作用する可能性があり，不純物の中でも注意を要する。

３　核酸医薬における分析の重要性

最適化した精製条件においても，目的物と共溶出する不純物は一定割合で存在するため，原薬の純度は 95 % 程度に留まることが多いと思われる。このようななか，精製が困難な不純物については分析条件を最適化した上で不純物の割合を評価し，品質を適切に管理していくことが求められる。PS 修飾を多く含む核酸医薬においては，膨大な数のジアステレオマーが生成するが，そのジアステレオマー分布についても評価していくことが求められる。実際には，複数の分析方法・分析条件を組み合わせることにより不純物プロ

ファイルやジアステレオマー分布を評価し，品質の一貫性を確認していくことが望まれる。クロマトグラフィーによる分離が困難な場合においては，質量分析装置による評価（LC/MS や LC/MS/MS）も有効である。このような多角的な分析・特性解析によって，臨床試験で用いられた原薬との同等性 / 同質性を説明していくことが重要と考えられる。基本的な考え方は低分子医薬の品質管理と変わらないものの，より高度で緻密な分析が核酸医薬製造を支えることになる。

4　複雑化する核酸医薬の構造 [5) 6)]

核酸医薬では，様々な化学修飾によって薬効の増強や副作用の低減が試みられている。例えば，特徴的な化学構造を持つ人工核酸を配列中に適宜配置することでヌクレアーゼに対する安定性を高め，薬効を増強することが可能になってきている。また，核酸の糖部構造にメチル基やメトキシ基などの置換基を適宜導入することで肝毒性が大幅に低減できる研究例などが出てきている。また，標的組織・標的細胞への送達を目的として受容体リガンドや脂質，生理活性物質などを核酸医薬本体にコンジュゲートするアプローチが精力的に試されている。さらには，送達を目的とした抗体とのコンジュゲート化も最近試みられるようになってきている。このような中で，将来的には核酸医薬の構造がより複雑化していくことが予想される。また，mRNA 医薬や遺伝子編集のための長鎖ガイド RNA など，核酸医薬に分類されない核酸材料の需要も今後はますます増えてくると考えられ，より高度な分析技術が求められるようになることは間違いない。

5　我が国における核酸医薬の将来

長年の努力が実り，核酸医薬は今まさに大きな花を咲かせようとしている。特に，アンチセンス核酸や siRNA に関しては基礎的な設計技術が向上し，対象とする遺伝子が決まっていればすぐにでも研究開発が進められるような状況になってきた。国内においては，まずは医薬品受託開発製造企業が供給体制の強化を進めている。これによって，医薬研究開発スピードは近年ますます加速してきたように思う。このような状況下，核酸医薬の製造を支える国内の分析体制についても強化・事業拡大が望まれている。2020 年には，国産初の核酸医薬品「ビルトラルセン」が誕生している。次世代医薬と謳われていた核酸医薬は，もう現在の必須モダリティへと変化しているのである。幸いなことに，日本では昔から核酸に関する研究が盛んに行われており，良い技術・良い素材はすでに国内にいくつも存在している。また，日本が得意分野としてきた創薬化学や有機合成化学の知識・技術が大いに役立つモダリティでもあるため，これから本腰を入れようと考えている企業も少なくないものと思われる。今後，国内の製造体制・分析体制がより強化され，近い将来に本邦から数多くの核酸医薬品が誕生することを心から期待したい。

文　献

1）井上貴雄：実験医学, **37**,（1），（2019）.
2）横田隆徳：実験医学, **39**,（17），（2021）.
3）小比賀聡, 井上貴雄：“核酸医薬品のCMC管理戦略 －品質評価・不純物管理－”,（2022），（サイエンス&テクノロジー社）.
4）関口光明, 伊藤浩介, 齊藤隼, 滝口直美, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄：*Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **51**, 11（2020）.
5）T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood：*Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 673（2020）.
6）J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. B. Thomson, S. Chen, B. R. Leavitt, P. R. Cullis, R. van der Meel：*Nat. Nanotechnol.*, **16**, 630（2021）.

著者略歴

2008年3月　大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程修了. 博士（薬学）
2008年4月　University of Notre Dame, Department of Chemistry and Biochemistry 博士研究員
2010年4月　科学技術振興機構ERATO袖岡生細胞分子化学プロジェクト（理化学研究所） 研究員
2013年2月　大阪大学大学院薬学研究科 特任助教
2014年4月　東京大学分子細胞生物学研究所 助教
2017年4月　大阪大学大学院薬学研究科 講師

〈研究分野〉
有機合成化学，核酸化学，低分子創薬，ケミカルバイオロジー

〈主な受賞歴〉
2018年度　日本薬学会関西支部奨励賞