

糖部の修飾には、2' 位の修飾と架橋型修飾がある。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 (図表 6, 上段)。既に上市された核酸医薬品を例にとると、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の核酸 (シトシン、ウラシル) が 2' -F 化されており、プリン塩基の核酸 (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 2' -MOE が導入されている (後述)。

架橋型修飾は、「揺らぎのある頭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、近年特に注目を集めている (図表 6, 下段)。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、頭部 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。架橋型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。架橋型核酸としては、他に BNA^{COC}、BNA^{NC}、ENA (2' -O, 4' -C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)、cEt BNA などが開発されている (図表 6, 下段)。糖部の“修飾”ではないが、糖部分をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体も核酸医薬品の原料として用いられている (図表 6, 上段右)。モルフォリノオリゴ核酸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る。

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アンチセンス、siRNA において塩基部が修飾されることはほとんどない。一方で、三次元的な立体構造により蛋白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蛋白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。

1.2 アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類

アンチセンス医薬品は、標的 RNA と配列依存的に二重鎖を形成するオリゴ核酸を有効成分とし、標的 RNA の機能を制御することで有効性を発揮する。これまで承認まで至ったアンチセンス医薬品は Vitravene® および Kynamro® の 2 品目であり (図表 2)、日本では承認された例はない (日本ではアプタマー医薬品である Macugen® が承認されたのみ)。特筆すべきは、昨年 (2013 年) に承認された Kynamro® が核酸医薬としては初の、全身投与性の医薬品である点である。Kynamro® は ApoB-100 の 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。上述のように、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。今後は、従来から開発されている局所投与型に加えて、静注/皮下注が可能な全身投与型のアンチセンス医薬品が上市されてくると予想される。

以上のように、アンチセンス医薬品は今最も注目されている核酸医薬品であるが、その応用範囲は拡大しており、標的 RNA や作用機序の違いにより、「Gapmer 型」、「スプライシング制御型」、「miRNA 型」の 3 つに分類することができる (図表 7)。以下にそれぞれのアンチセンスについて概説する。

1.2.1 Gapmer 型アンチセンス

アンチセンス医薬品の開発の歴史は古く、1980-1990年代から開発が行われてきたが、体内で分解されやすく、また、有効性も乏しいことなどから、ほとんどの開発は中止された。しかし、その後も基盤研究が進められ、修飾型核酸の開発ならびに RNase H 研究の進展により、「Gapmer 型アンチセンス」が登場した。上述の Kynamro® が Gapmer 型であることからわかるように、今、最も開発の進んでいる核酸医薬品である。Gapmer 型の作用は、古くから広く知られていた「mRNA と結合したアンチセンスがリボソームのアクセスを阻害することにより蛋白質合成を抑制する」というメカニズムとは異なるもので、siRNA のように「mRNA を分解する」ことにより機能する (図表 8)。Gapmer 型アンチセンスはオリゴ核酸の両端には mRNA との結合力が強い修飾型核酸が導入されており、中央の“Gap”部分には DNA が用いられる。このアンチセンスが標的 mRNA 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。Kynamro® では、結合力を高める修飾型核酸として糖部を修飾した 2' -MOE が使用されているが (図表 6, 8)、現在開発段階にあるアンチセンスでは、さらに結合力の強い架橋型核酸も用いられている。Gapmer 型アンチセンスの開発を牽引しているのはアンチセンス開発の老舗 ISIS 社であり、Genzyme 社と提携して Kynamro® を上市している。世界初の核酸医薬品である Vitravene® を開発したのも ISIS 社である。その他、Santaris 社が架橋型核酸 LNA (2', 4' -BNA) を用いた Gapmer 型アンチセンスを開発している。

1.2.2 スプライシング制御型アンチセンス

現在開発されているアンチセンス医薬品の主流は mRNA を分解する Gapmer 型であるが、立体障害によって蛋白質のアクセスを阻害するタイプのアンチセンスも開発されており、その代表例として「スプライシング制御型アンチセンス」が挙げられる (図表 7)。現在、臨床開発段階にあるスプライシング制御型アンチセンスは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬であり、エクソンスキッピングの機序によって作用する (図表 9)。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では、ジストロフィン遺伝子 (79 個のエクソンで構成される) がエクソン単位で欠失する変異が多く観察されており、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。図表 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だけ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、中央部の配列は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言える。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関与する蛋白質群との結合を阻害することに機能を発現する。図表 9 の作用機構を見てもわかるように、エクソンスキッピング法ではアンチセンス医薬品は 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)。従って、アンチセンスとの pre-mRNA との結合力を高めつつも、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オリゴも用いられる。

エクソンスキッピング療法に用いるアンチセンスとして開発が進んでいるものは、GlaxoSmithKline 社と Prosensa 社が開発している Drisapersen、ならびに Sarepta 社が開発している Eteplirsen がある。いずれも図表 9 に示したエクソン 51 を標的とするもので、前者は 2' -OMe 化アンチセンス、後者はモルフォリノオリゴが用いられている。Drisapersen は日本を含めた複数の国で大規模な国際共同治験 (phase 3) が進行していたが、主要評価項目 (6 分間歩行距離) が有意に改善しなかったことを 2013 年 9 月に発表している (その後、GlaxoSmithKline 社は Prosensa 社に Drisapersen の開発権を返還している)。Eteplirsen は phase 2b で良好な結果が得られており、2014 年に phase 3 が開始される予定である。国内においても第一三共と日本新薬で開発が進められており、それぞれエクソン 45 とエクソン 53 を標的したアンチセンスの開発が発表されている。エクソン 45、エクソン 53 のスキッピングは、エクソン 51 のスキッピングに次いで対象患者数が多いとされている。第一三共は独自に開発した架橋型核酸 ENA (図表 6) を用いており、日本新薬はモルフォリノオリゴを使用している。現在開発が進んでいるスプライシング制御型アンチセンスはエクソン

スキッピングの機序によるものであるが、今後病態の解明が進むにつれ、エクソンインクルージョンなど新しいスプライシング制御型アンチセンスが開発されると考えられる。

1.2.3 miRNA 阻害型アンチセンス

非コード RNA の 1 つである miRNA は、20 数塩基の短い一本鎖 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 の発現が亢進した病態では、miRNA の量を減少させる方法論が必要であるが、miRNA は非常に短い RNA であることから、siRNA によって認識/分解することは事実上不可能である。そこで、miRNA と相補的に結合する「miRNA 阻害型アンチセンス」が miRNA の機能を抑制する手法として用いられる (図表 10)。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 (図表 7)。miRNA 阻害型アンチセンスの開発を行っているのは、アンチセンス医薬品開発の代表格 ISIS 社と siRNA 医薬品開発の代表格 Alnylam 社が合同で設立した Regulus 社、ならびに Santaris 社、Miragen 社がある。現在、miRNA 阻害型アンチセンスで臨床試験段階にあるのは、Santaris 社が開発している Miravirsen である。

Miravirsen は架橋型核酸 LNA (図表 6, 10) を含むアンチセンスであり、皮下注射に投与された後、肝臓で機能する。Miravirsen の標的である miR-122 は肝臓特異的に発現する miRNA で、miR-122 が C 型肝炎ウイルス RNA に結合することがウイルス増殖に必須である。皮下投与された Miravirsen は肝細胞内で miR-122 をトラップするため、C 型肝炎ウイルスの増殖が抑制される。Miravirsen は Phase 2 で良好な結果が得られており、Phase 3 に入るところである。

以上に記載した「修飾型核酸の開発状況」な

らびに「アンチセンス医薬品の開発動向」に関する調査研究の内容は文献1で発表を行った。

1.2.4 オフターゲット効果の評価に関する考察

オフターゲット効果の発現を考える上で、「アンチセンス医薬品が標的 RNA を認識する塩基長」が重要である。一般にアンチセンスの塩基長が長ければ長いほど、ヒトゲノムにおいて完全相補する塩基配列の出現頻度は低くなり、特異性が向上する(図表 11)。すなわち、アンチセンス医薬品が長いほどオフターゲット効果が起きにくいと予想される。

我々は平成 24 年度の成果として、“オフターゲット効果が生じる可能性がある遺伝子(核酸医薬品と相補的に結合する遺伝子 = オフターゲット候補遺伝子)が、ヒトゲノム上にいくつ存在するか”を推定するため、数理計算により理論値を算出してきた(図表 12)。さらに、仮想のアンチセンスを 5000 本以上作成し、独自に作成した検索プログラムを用いて検索を行った結果(*in silico*解析)、数理計算によって導いた理論値をもって、実測したオフターゲット候補遺伝子数を見積もることができることを示した(図表 13)。

オフターゲット候補遺伝子数の理論値(図表 12)を見ると、20 塩基長のアンチセンスでは完全相補(0 塩基ミスマッチ)するヒト mRNA はほぼ存在しないが($<10^3$)、13 塩基長程度まで短くなると完全相補するヒト mRNA が出現する(13 塩基長で 1.3 個)。上市されている Kynamro®は 20 塩基長であるが、標的である ApoB-100 以外に完全相補する mRNA は存在しないことが報告されている。Gapmer 型アンチセンスの場合、修飾核酸の技術進展に伴い、短い塩基長でも mRNA と強固に結合することが可能となっており、また、製造コストの有利性もあり、12-16 塩基長程度の短い塩基長のアンチセンスが開発されている。12-16 塩基の範囲でも

完全相補する mRNA の数は個別に解析できる範囲(数個程度)と見積もられるが、ミスマッチを許容するとオフターゲット候補遺伝子が一気に増加し、数十~数百にも及ぶ。従って、ミスマッチを持つ mRNA が発現抑制されるかを検証することが重要である(図表 12, 13)。この点に関しては、以降の「3. Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証」において、実験的に検証した結果を述べる。

以降、それぞれのアンチセンス医薬品について、オフターゲット効果の評価に関する考察を行い、技術的に可能な評価法を提案する。

1.2.4.1 Gapmer 型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

Gapmer 型アンチセンスは mRNA を分解する作用を持つため、オフターゲット効果の評価には mRNA を定量できるマイクロアレイや定量 PCR が適している。どちらを選択するかは、*in silico* 解析でピックアップしたオフターゲット候補遺伝子の数を考慮し、時間/労力/コストの観点から判断されるが、それぞれの利点があるので併用するのが望ましい。

Gapmer 型アンチセンスは核内に存在する RNase H の作用により mRNA を分解するため、核内で生成するスプライシング前の pre-mRNA も原理的に標的となる。従って、*in silico*でオフターゲット候補遺伝子を抽出する際には pre-mRNA も検索対象にすべきであるが、現状では重複性のない pre-mRNA のデータベースが存在しないという問題がある。一方、Wet 解析では、pre-mRNA が分解されれば対応する mRNA 量も減少するため、上述の方法で mRNA を定量すれば、オフターゲット効果の評価できることになる。Gapmer 型によりオフターゲット効果が起こる配列条件が明らかになっていない点を加味すると、mRNA を対象とした *in silico* 解析に加え、ヒト細胞を用いたマイクロアレイ

解析を行うことが重要と考えられる。

1.2.4.2 スプライシング制御型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

スプライシング制御型アンチセンスは核内において、pre-mRNA と結合し、蛋白性のスプライシング因子の結合を阻害することで機能を発揮する。現在開発が進んでいるエクソスキッピング療法に用いられるアンチセンスの場合、標的となる配列は pre-mRNA 上のスプライシングを促進するシス配列となり、エクソン内にある上述の ESE 配列やイントロン/エクソン境界配列が候補となる。実際にエクソスキッピングを引き起こす pre-mRNA 上の配列は、pre-mRNA 全体から見るとごく限られていると予想される。

エクソスキッピング用アンチセンスが「標的以外の遺伝子のスプライシングに影響を与えるオフターゲット効果」を考えると、*in silico*解析では pre-mRNA を対象に検索を行うべきであるが、上述のとおり pre-mRNA のデータベースは整備されていない。従って、現状ではエクソン内にある ESE 配列を念頭において、mRNA を対象に検索するに留めることとなる。なお、ヒトゲノム全体を検索することは可能であるが、mRNA コード領域以外の配列には一塩基多型が非常に多いことから「どの（誰の）ヒトゲノムを使うのか」という問題がある。さらに、検索を行ってもヒットした配列が遺伝子上のどこに位置するのか（プロモーター領域か、エクソン内か、イントロン内か、遺伝子と遺伝子の間のジャンクションなのか）を整理、提示できる公開されたプログラムが存在しないので、多数の配列がヒットした場合は現実的にはオフターゲット候補遺伝子を抽出することは困難である。

以上に述べたように *in silico*解析だけでは、オフターゲット候補遺伝子の抽出には限界があるが、Wet 解析を行えば網羅的な解析が可能

と考えられる。まず、「標的以外の遺伝子の“スプライシング”に影響を与えるオフターゲット効果」を考える。スプライシングが変化すると mRNA の読み枠がずれ、終始コドンが早期に出現する 경우가多く、その場合は NMD (nonsense-mediated mRNA decay : ナンセンスコドン依存的 mRNA 分解) のメカニズムで mRNA が分解される。このようなケースは mRNA の量を評価するマイクロアレイを用いれば網羅的にオフターゲット遺伝子を抽出することができる。一方、スプライシングが変化するだけで mRNA 量が変わらないケースでは、マイクロアレイによる評価では不十分である（マイクロアレイに貼り付けてあるプローブの中で、スプライシング変化により相補結合性を失うものがあると考えられるが、その変化を検出するだけの感度が保証されない）。この場合は、「mRNA の量の変化」ではなく、「エクソンの量の変化」という概念で定量する必要がある。従来より、エクソン単位での定量が可能なアレイとして「エクソンアレイ」が知られていたが、ごく最近では、スプライシング変化をより高感度に捉えることができる「HTA (Human Transcriptome Array)」が利用可能となっている。

さらに、次世代シーケンサーの開発進展に伴い、「RNA-seq」もスプライシング変化を検出する評価系になり得る。すなわち、mRNA の配列を直接シーケンスすることでスプライシングが生じた部分を検出し、シーケンスのリード数で RNA 量を見積もるといった評価法である。現時点ではコストの面、定量性の面で不利であるが、ハイブリダイズという間接的な手法ではなく、直接的に mRNA 配列を読むので、将来的にはポテンシャルが高い評価法と考えている。

次に、「標的以外の遺伝子の“翻訳”に影響を与えるオフターゲット効果」について考える。スプライシング制御型アンチセンスは RNase H が作用しないようにデザインされており、立体

障害によって機能する。核で機能するが想定されているが、原理的には細胞質に存在する mRNA にも結合しうるため、標的以外の遺伝子に結合し、翻訳を抑制する可能性も考えられる。従来、アンチセンスの立体障害による翻訳の阻害は効率が悪いとされてきたが、近年開発されている修飾型核酸は結合力が強力であることから注意を要する。具体的には、*in silico* 解析で相補的に結合する mRNA を抽出しておき、その遺伝子産物に対する抗体を用いて蛋白量を検出する必要がある。しかし、現実的には遺伝子産物ごとに抗体を準備することは難しい。まずは、「結合力の強いアンチセンスが翻訳にどれくらいの影響を及ぼすか」をモデルシステムを使って検討する必要があるだろう。

1.2.4.3 miRNA 阻害型制御型アンチセンスによるオフターゲット効果の評価

miRNA 阻害型アンチセンスもスプライシング制御型と同様に RNA と結合し、立体障害により機能する。mRNA を分解しないことから、オフターゲット効果の評価に関しては基本的にはスプライシング制御型アンチセンスと同様に考えてよいであろう。

1.2.4.3 miRNA に作用することで生じるオフターゲット効果に関する考察

最後に各種アンチセンスが miRNA に作用することでオフターゲット効果を引き起こすケースについて考察する。まず、*in silico* 解析に関しては、現状では、miRNA、あるいはその前駆体である pri-miRNA (primary-miRNA) や pre-miRNA (precursor-miRNA) に対してのみ、検索できるシステムは整っていない。一方、Wet 解析に関しては、miRNA の作用は標的 mRNA の翻訳抑制あるいは分解であるので、miRNA を介するオフターゲット効果については、前者は蛋白、後者は mRNA で評価しなければいけない。しかしながら、そもそも miRNA の機能は「1つ

の miRNA が数十から種百の mRNA を標的とし、それぞれの発現を“弱く”抑制することで、転写全体のバランスを保つ」というものである。仮にオフターゲット効果として何かしらの miRNA を阻害しても、Wet 解析で検出することは困難と考えられる。*in silico* で検索できるシステムの構築が重要であろう。

以上、それぞれのアンチセンス医薬品に関し、オフターゲット効果が起こりうる点を列挙し、それぞれに対する評価法とその限界を示した。これは、医薬品候補の安全性評価に必ずしも必要というわけではない。現状では検討が行われていないので、「オフターゲット効果が実際に起こるのか」に関して、モデル遺伝子を使って基礎的データを取得する必要があると考えられる。

2. Gapmer 型アンチセンスによって引き起こされるオフターゲット効果の実験的検証

上述のように、Gapmer 型アンチセンスは最も開発段階の進んだ核酸医薬品でありながら、オフターゲット効果の発現は検証されておらず、どれくらいの相補性を持つ mRNA が影響を受けるのかは不明である。そこで、本年度(平成 25 年度)は、Gapmer 型アンチセンスをヒト細胞に添加し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の発現を網羅的に検証した。以下に解析の詳細を述べる。なお、本研究の成果は投稿準備中であるため、具体的な配列、数値、図表に関しては現時点では公開しないこととし、導かれる結論に重点をおいて記述する。

2.1 細胞株の選択

生物種によってゲノム配列は異なるため、ヒトに投与する核酸医薬品の「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関しては、ヒト由来の細胞/組織で検証する必要がある。現在では、ヒト化マウスやヒト iPS 細胞由来の組織など、

ヒト組織を人工的に作出する技術があるが、現状ではこれらのツールは発展途上であり、一定の規格を保証できる状況にない。また、初代培養ヒト細胞は最初のトライアルとしては扱いきれない。従って、本研究では株化ヒト細胞を用いることとした。また、オンターゲット遺伝子に関しては、内在遺伝子の発現に影響を与えないように、外来遺伝子の GFP (Green Fluorescent Protein) を用いることとした。以上の考察のもと、複数の細胞株で検討を行い、アンチセンスが効率よく作用する「GFP 安定発現 HEK293 細胞」を選択した。

2.2 Gapmer 型アンチセンスの配列スクリーニング

Gapmer 型アンチセンスは mRNA を分解する作用を有するが、siRNA と比較すると配列の選択は難しい。すなわち、siRNA はよく効く配列を選ぶプログラムが複数公開されているので、効果の高い siRNA を容易に同定できるが、Gapmer 型アンチセンスに関してはプログラムが存在せず (存在しても公開されていないために)、細胞ベースでスクリーニングを行う必要がある。我々は、現在開発が進んでいる Gapmer 型アンチセンスの塩基長が短くなっていることを念頭におき (図表 12)、本研究で用いるアンチセンスの長さを 13~14 塩基長とした。また、Gapmer 型アンチセンスの両端に配置した修飾核酸 (mRNA との結合力を増強させる修飾核酸、図 8 参照) は現在開発が進むアンチセンスでも用いられている LNA とした。実際にオフターゲット効果の検証に用いた「GFP アンチセンス A」および「GFP アンチセンス B」の配列スクリーニングの経緯は以下のとおりである。

GFP アンチセンス A : GFP mRNA に対するアンチセンスを 60 本以上作成して、GFP 安定発現 HEK293 細胞を用いたスクリーニングを行い、「GFP 発現を 15%まで減少させるアンチセン

ス」 として同定した。

GFP アンチセンス B : 我々が独自に作成した検索プログラム (本研究 24 年度の成果) を用いて、「最も多くのヒト mRNA の相補するアンチセンス」 として同定した。GFP の発現を 50%まで抑制する。

2.3 マイクロアレイ解析の条件設定

アンチセンス医薬品はキャリアを用いない Naked な状態で投与されるが、本研究ではできるだけ効率よくオフターゲット候補遺伝子 (mRNA) とアンチセンスを相互作用させるため、遺伝子導入試薬 (Lipofection2000, Invitrogen) を用いた。コントロールは Lipofection2000 のみの添加、回収時間はオンターゲット遺伝子 (GFP mRNA) が最も効率よく発現抑制される添加 24 時間後、アンチセンス濃度は細胞毒性が出ないことを確認した上で、GFP が十分に抑制される 50 nM とした。実験群は「①コントロール, ②GFP アンチセンス A, ③eGFP アンチセンス B 各 n=3」である。用いたマイクロアレイは Human Genome U133 Plus2.0 Array (Affymetrix 社)、データ解析は GeneSpring を使用した。なお、「オフターゲット効果が生じている」と判断する基準に関しては、コントロールと比較して、標的遺伝子以外の遺伝子の発現が 50%未満まで低下した場合と規定した。これは、①遺伝子改変技術により作製された遺伝子ヘテロ欠損マウスは、ほとんどの場合、表現型を示さないこと、②ヒトの機能欠損型変異による遺伝性疾患に関しても、多くの場合、ヘテロ欠損では異常が現れないこと (ヘテロ欠損で異常が現れたとしても忍容性が高いと考えられること) による。すなわち、遺伝学的な知見から、遺伝子発現が 50%程度保たれていれば機能的に大きな異常を伴わないと考えられる。

2.4 マイクロアレイ解析の結果および考察

以上の解析から、以下の点が明らかになった。

- ・完全相補する標的外遺伝子は、その 60%以上が 50%未満まで発現抑制される。
- ・1 塩基ミスマッチを持つ遺伝子であっても、40%程度の遺伝子は 50%未満まで発現抑制される。
- ・2 塩基ミスマッチを持つ遺伝子でも、50%未満まで発現抑制されるケースがある。ただし、その発生確率は小さいと見積もられる。

以上の解析結果から、13 塩基長の Gapmer 型アンチセンスの場合、少なくとも 1 塩基ミスマッチを有する遺伝子までは、オフターゲット候補遺伝子として *in silico* 解析でピックアップする必要があり、発現抑制の程度をヒト細胞で解析するのが適当と考えられる。図表 12 に示したように、13 塩基長のアンチセンスでは 1 塩基ミスマッチを持つ mRNA は理論的には 52 個存在しており、定量 PCR 等で個別に解析するよりも、マイクロアレイを用いた網羅的解析の方が効率がよいと考えられる(効率のみならず、2 塩基ミスマッチを持つ mRNA の挙動も同時に解析できる利点がある)。

D. 結論

現在、オフターゲット効果の評価に関しては、統一した見解が得られていないが、楽観的には、「完全相補する mRNA の数は限られているので、まず *in silico* 解析を行う。ヒットした遺伝子に関しては情報を収集し、必要があれば、その遺伝子の発現変動を確認しておく。」という見方がある。これは、既に上市されている Gapmer 型アンチセンス Kynamro® の知見に基づく部分が大いように感じられる。すなわち、20 塩基長の Kynamro® では、「完全相補、1 塩基ミスマッチの mRNA は存在せず、2 塩基ミスマッチを持つ 4 つの遺伝子ではオフターゲット効果

は起こらなかった」という記載がある。これにより、「オフターゲット候補遺伝子はそもそも数えるほどしかなく、ミスマッチがあっても発現抑制ケースは少ないのではないか」という認識が広がっていると予想される。Kynamro® では修飾型核酸として 2' -MOE が用いられているが、現在開発されている Gapmer 型の中には 2' -MOE よりはるかに結合力が強い架橋型核酸が使用されるものが含まれており、本研究で用いた架橋型核酸 LNA がその代表例である。今後はミスマッチを持つ mRNA でもオフターゲット効果が十分起こりうるという前提に立って安全性評価を行うべきであろう。

なお、報告書の中では混乱を避けるため、「アンチセンスの塩基長が長ければ長いほど配列を認識する特異性が高く、オフターゲット効果が起こりにくい」という前提で記載した。これは大枠では正しいが、一方で、「塩基長が長ければ長いほど、標的 RNA との結合力は大きくなり、その結果、多少のミスマッチがあっても RNA と相互作用することができる」という側面も考えられる。すなわち、塩基長の長いアンチセンスはミスマッチを許容しやすいと予想される。本研究において、13 塩基長のアンチセンスで 1 塩基ミスマッチの mRNA を分解できたことを考慮すると、13 塩基よりも長いアンチセンスでは 2 塩基ミスマッチ、3 塩基ミスマッチまで認識し、オフターゲット効果を示す可能性も考えられる。この点に関しても、今後検証する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の動向, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45(4), 東京(2014), 印刷中

2. 学会発表

- 1) 吉田徳幸, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤

- 陽治, 井上貴雄:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 日本薬学会第134年会(2014.3)(熊本)
- 2) 井上貴雄:「核酸医薬開発の動向と課題」, 医薬基盤研究所講演会(2013.12)(大阪)
- 3) 吉田徳幸, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治, 井上貴雄:「核酸医薬品のオフターゲット効果に関する基盤研究」, 第11回アンチセンスシンポジウム(2013.11)(徳島)
- 4) 井上貴雄:「核酸医薬品の現状と課題(総論)」, ライフサイエンス技術部会 材料分科会講演会(核酸医薬研究の最前線①～有機合成からのアプローチ～)(2013.11)(東京)
- 5) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の動向と課題」, 第144回ヒューマンサイエンスエキスパート研修会(核酸医薬品開発を巡る国際的展望と期待-核酸医薬は新薬開発の突破口となるか-) (2013.10)(東京)
- 6) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato:「In Silico Analysis of Off-target Effects of Oligonucleotide Therapeutics」, 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (2013.10)(Naples)
- 7) 吉田徳幸, 井上貴雄, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治:「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 第5回日本RNAi研究会(2013.8)(広島)
- 8) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の現状と課題

およびガイドライン策定に向けた取り組み」, ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査WG会議(2013.7)(東京)

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当無し。

図表 1

核酸医薬品の分類

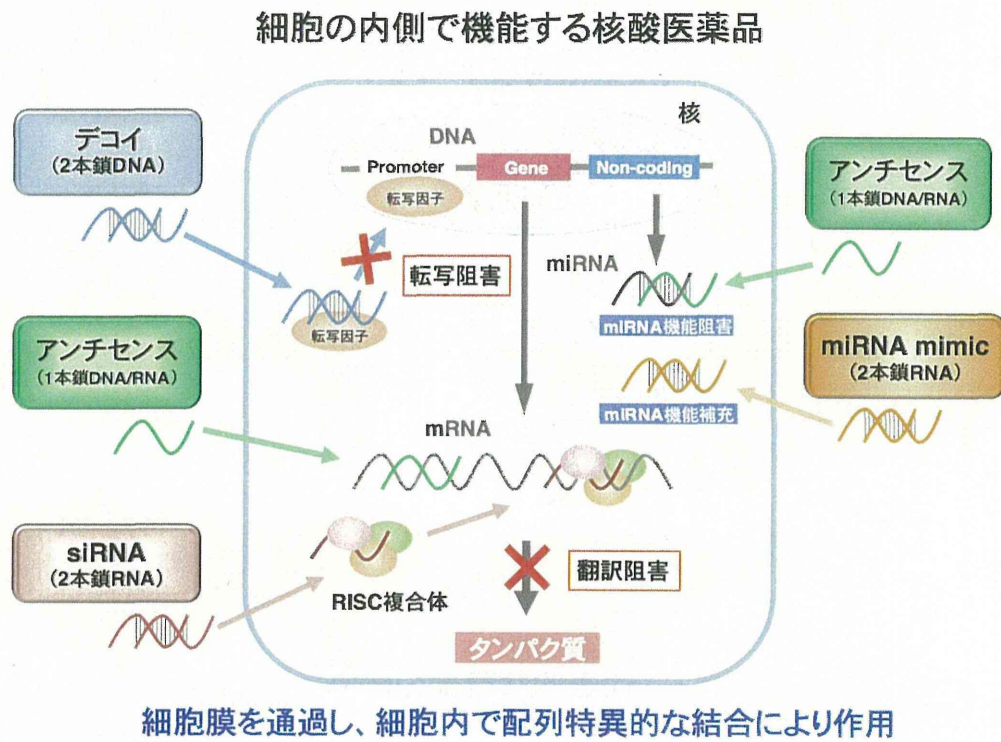
	アンチセンス	miRNA アンチセンス	siRNA	miRNA mimic	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖RNA, ヘアピン1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
標的	mRNA Pre-mRNA	miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞"外" (エンドソーム内)
作用機序	mRNA分解 スプライシング 阻害	miRNA阻害	mRNA分解	miRNAの補充	転写阻害	機能阻害	自然免疫の 活性化
開発段階	承認 2品目 Phase 3	Phase 2→3	Phase 3	Phase 1	Phase 2	承認 1品目 Phase 3	Phase 2
主な 開発企業	Isis, Santaris, Prosenza, Sarepta	Santaris, Regulus, MiRagen,	Alynlam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

図表 2

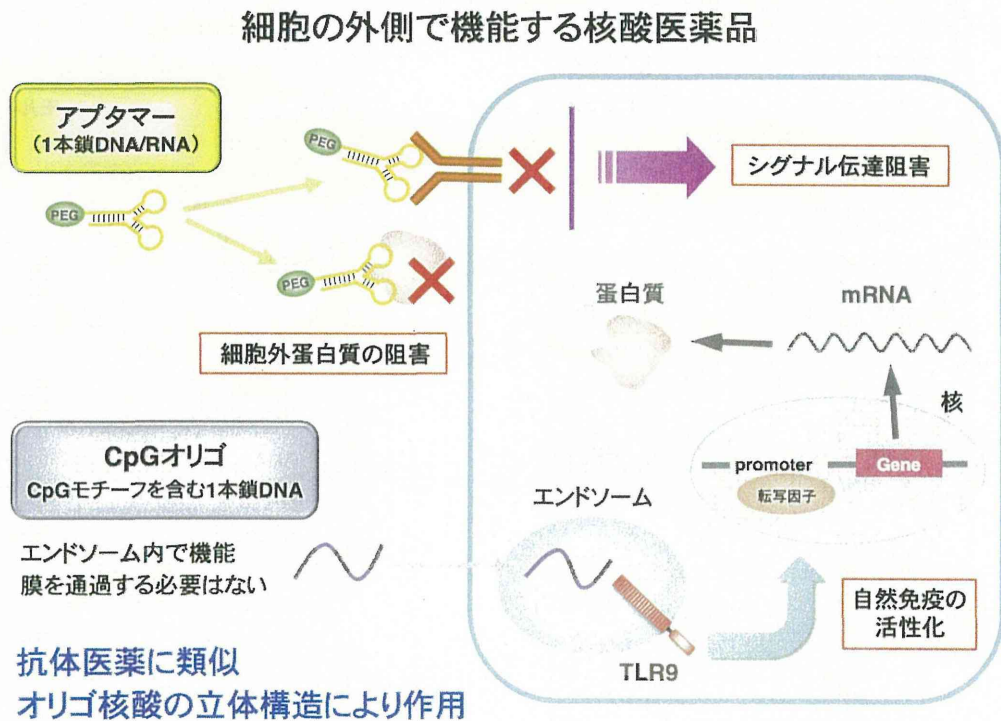
これまでに上市された核酸医薬品

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 局注
Macugen	Pegaptanib	アプタマー	米 2004 EU 2006 日 2008	Vascular endothelial growth factor (VEGF)165 蛋白質	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内 局注
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	皮下注

図表 3

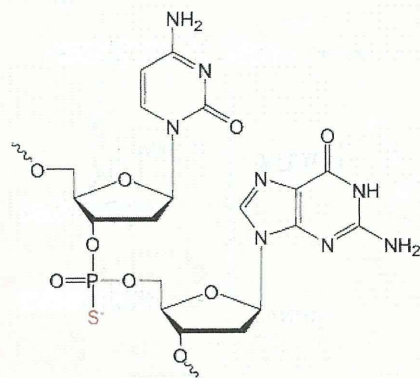


図表 4



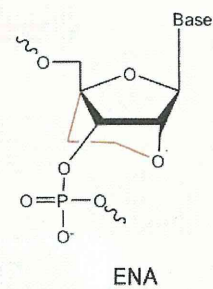
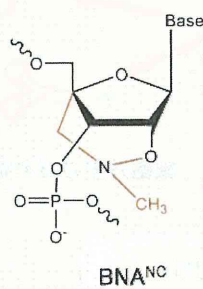
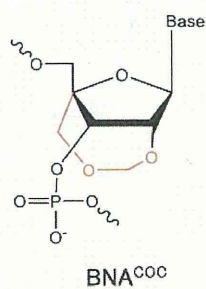
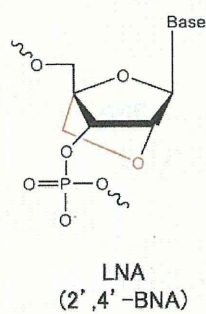
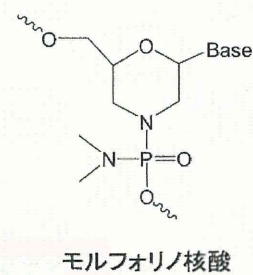
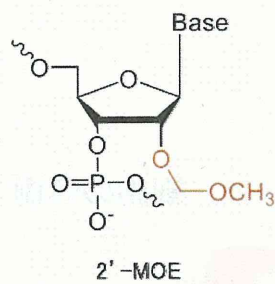
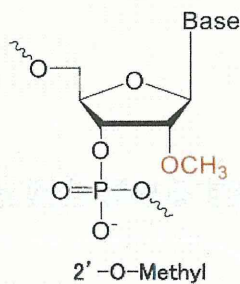
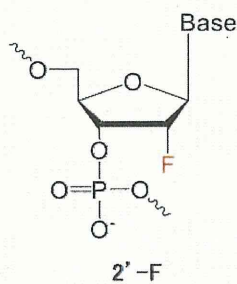
図表 5

代表的なリン酸部の修飾 (ホスホロチオアート化)



図表 6

代表的な糖部の修飾



図表 7

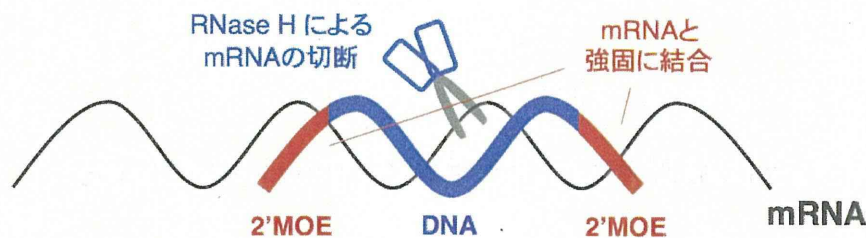
RNAを標的とする核酸医薬品の分類

	アンチセンス			siRNA
	Gapmer型	スプライシング 制御型	miRNA 阻害型	
開発品目数 (臨床試験&上市)		~50 (Phase3: 8品目, 上市: 2品目)		~15 (Phase3: 1品目)
標的	mRNA	pre-mRNA	miRNA	mRNA
作用原理	RNase H	立体障害	立体障害	RISC
作用機構	mRNAの分解	pre-mRNAとスプライス因子 の結合阻害	miRNAとmRNA の結合阻害	mRNAの分解
標的RNAを認識する 塩基長	12-21	20-30	12-16	19
オフターゲット効果が生じる 配列法則性	未解明	未解明	未解明	解明

図表 8

Gapmer型アンチセンスの構造と作用機構

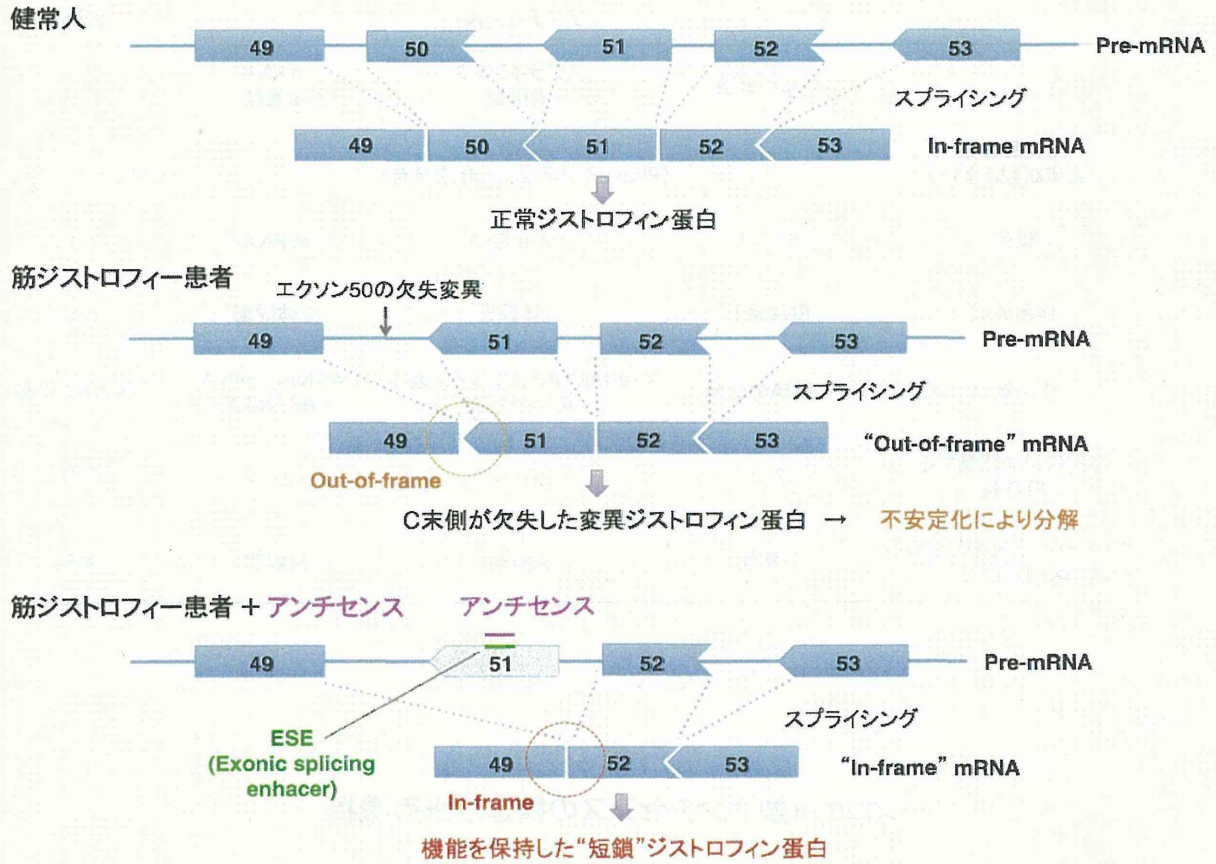
RNase H: DNA/RNA二本鎖を認識し、RNAを切断するエンドヌクレアーゼ



- オリゴ核酸の両端にmRNAとの結合力が強い「糖部を修飾した修飾型核酸 (2'-MOE、LNA、ENA等)」を導入する。
- オリゴ核酸の中央“Gap”部分はRNase Hが基質として認識できるよう、DNA骨格にする(すなわち、糖部の2'位を修飾しない)。
- 一般に、Gapmer型アンチセンスはリン酸部がS化されている。

図表 9

スプライシング制御型アンチセンスの作用機構



図表 10

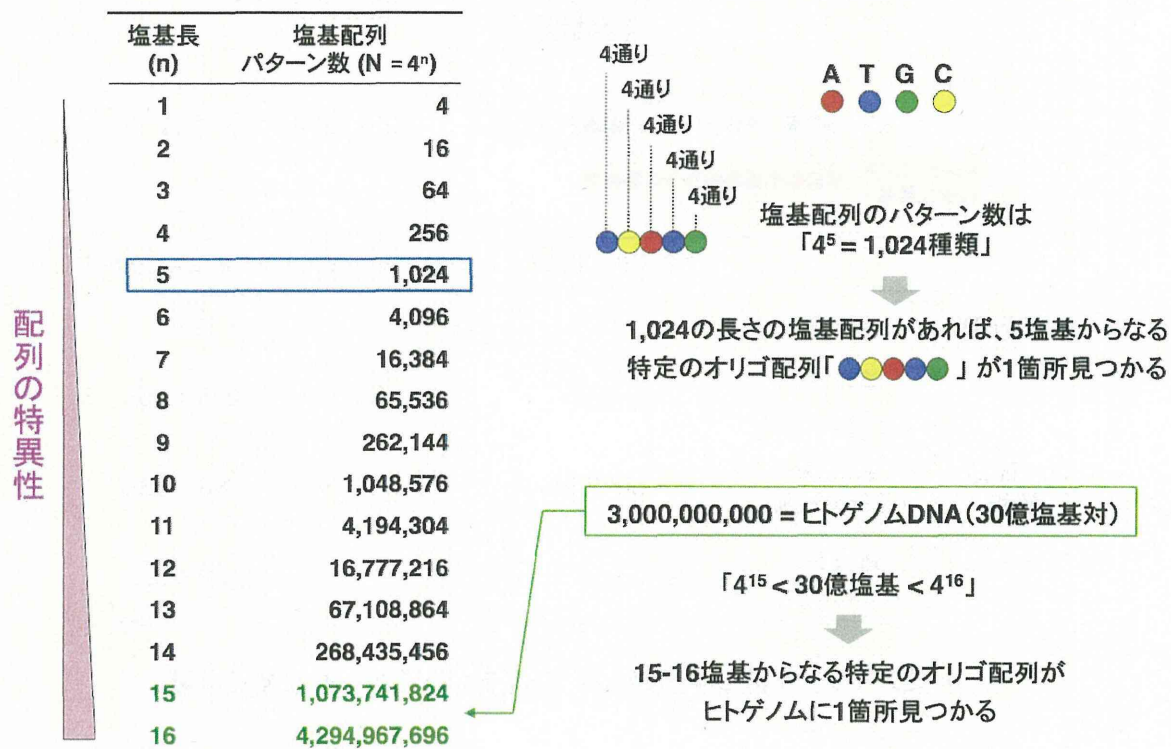
miRNA阻害型アンチセンス (Miravirsen) の構造



RNAとの結合力の強い架橋型核酸をオリゴ核酸内に散りばめて配置 (“Mixmers”と呼ばれる)

図表 1 1

塩基長と塩基配列パターン数



図表 1 2

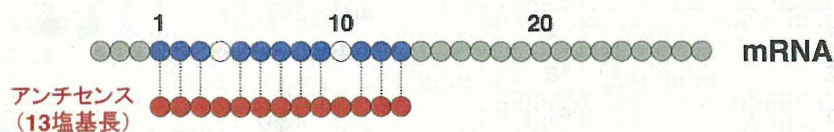
アンチセンスの塩基長	ヒトmRNAコード領域に存在する相補配列の数 (オフターゲット候補遺伝子の数)			
	0塩基ミスマッチ	1塩基ミスマッチ	2塩基ミスマッチ	3塩基ミスマッチ
22	<10 ⁻³	<10 ⁻³	1.1×10 ²	2.1×10 ⁻¹
21	<10 ⁻³	1.3×10 ³	3.9×10 ²	7.3×10 ⁻¹
20	<10 ⁻³	4.9×10 ³	1.4×10 ¹	2.5
19	<10 ⁻³	1.9×10 ²	5.0×10 ⁻¹	8.6
18	1.3×10 ⁻³	7.1×10 ²	1.8	29
17	5.2×10 ⁻³	2.7×10 ⁻¹	6.4	96
16	2.1×10 ⁻²	1.0	23	317
15	8.4×10 ⁻²	3.8	79	1030
14	3.4×10 ⁻¹	14	275	3295
13	1.3	52	941	>10 ⁴
12	5.4	193	3186	>10 ⁴
11	21	708	>10 ⁴	>10 ⁴
10	86	2575	>10 ⁴	>10 ⁴

上市されている
Gapmer型アンチセンス
(Kynamro®)

近年開発されている
Gapmer型アンチセンス

図表 1 3

オフターゲット効果が生じる遺伝子数の見積もり
(13塩基長)



		0塩基 ミスマッチ	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ
数理計算	理論値	1.3	52	941
	↑			
in silico 解析	遺伝子A (n=2383配列)	4.1 ± 10	101 ± 93	1238 ± 651
	↓			
	遺伝子B (n=1389配列)	3.0 ± 3.8	88 ± 68	1166 ± 568
	↓			
	遺伝子C (n=1423配列)	2.8 ± 4.4	85 ± 82	1132 ± 590

→ ミスマッチを持つmRNAが発現抑制されるかを検証する必要あり

タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性に関する研究

分担研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

研究要旨 タンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎを評価する手法（タンパク質の β 緩和時間等を指標にした）として、 ^{13}C -NMR緩和時間の可能性について検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ^{13}C -NMR緩和時間によって評価できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

革新的医薬品として注目を集めているタンパク質性医薬品の品質変化は化学的な分解とともに、分子の高次構造の変化を伴う物理的な変化によっても引き起こされ、有効性、安全性に影響を及ぼす。低分子医薬品に比べ分解メカニズムが複雑であり、医薬品添加剤が品質変化に及ぼす影響も複雑である。タンパク質性医薬品の品質確保のためには品質変化と関連する有効成分、添加剤の因子を明らかにし、その因子を評価し、コントロールする手法を開発ことが不可欠である。特に、安定性を短期間に評価できる標準的な評価法があれば、安定な処方探索のための期間が短縮され、開発を促進するものと考えられる。

本研究においてはタンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼす有効成分側、医薬品添加剤側の因子に関する調査を行うとともに、特に安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎや、有効成分と添加剤との相互作用を評価する手法を開発する。特に、近年タンパク質の安定性との関連が示唆される β 緩和時間等の分子内の局所的な運動性を指標にした評価法について検討する。局所的な運動性はタンパク質医薬品の疎水性相互作用によるタンパク質の凝集反応や酸無水物中間体を経る脱アミド反応に関連することが示唆されている。タンパク質医薬品の安定性に影響を及ぼす因子と実測される保存安定性との関連を明らかにし、安定性評価法と

しての標準化をめざす。

NMR緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎの保存安定性の指標となりうることが示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が5%程度あれば ^{13}C -NMRの測定が可能であり、抗体医薬の市販製剤中のタンパク質の運動性評価に適用できることを明らかにした。本年度はいくつかの抗体医薬の市販製剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を变化させた試料について緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。

B. 研究方法

^{13}C -NMR緩和時間の市販製剤中のタンパク質の局所的な運動性の評価への適用性についてはヒュミラ皮下注（アダリムマブ）、アクテムラ注（トシズマブ）、レミケード注用（インフリキマブ）を用いて検討した。レミケード注用は凍結乾燥品であり、5%溶液になるよう水を加え溶解したものについて測定した。緩和時間はInversion-recovery法によって20°Cにおいて測定した。変性温度はマイクロ熱量計（TAM III、TA Instruments）を用い、毎時1°Cの昇温速度で測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

C. 研究結果

1) タンパク質の動的な揺らぎの ^{13}C -NMR 緩和時間による評価

NMR 緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパク質については動的な揺らぎが保存安定性の指標となりうることを示唆されている。昨年度の検討により、タンパク質濃度が 5%程度あれば ^{13}C -NMR の測定が可能であり、タンパク質カルボニル炭素の緩和時間の測定が可能であることを明らかにした。本年度はいくつかの抗体医薬の市販製剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を変化させた試料についてタンパク質カルボニル炭素の緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。ヒュミラ皮下注のカルボニル炭素の緩和時間は 3.4s であるのに対し、水に対して透析し、塩や添加物濃度を低下させた試料では 2.7s に短縮した。一方、0.9%の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液に対して透析し、塩濃度を増加させた試料では 3.6s であった。溶液状態の試料においては NMR 緩和時間が長いほど分子運動性が良いので、ヒュミラ皮下注に処方されるアダリムマブについては、塩濃度が高いほど分子運動性が高いと考えられる。アクテムラ注に処方されるトシズマブのカルボニル炭素の緩和時間は 2.5s、レミケード注用に処方されたインフリキマブ（凍結乾燥品を 5%の濃度に溶解）については 3.2s であった。

2) 示差走査熱量測定による変性温度の測定

タンパク質溶液を一定速度（毎時 1°C ）で昇温すると変性に伴う吸熱が観測される。吸熱のピーク温度は変性温度 (T_m) といわれ、タンパク質の熱的安定性の指標として用いられる。pH や緩衝塩濃度を変えて測定した変性温度と保存試料の動的散乱の経時的な増加によって見積もられる凝集速度との間に関連があることが報告されており、変性温度は保存安定性の指標として用いることができると考えられる。そこで、本研究におい

ては市販製剤中の抗体タンパク質の保存安定性の指標として T_m を用いた。ヒュミラ皮下注の変性温度の測定例を Fig. 1 に示す。毎時 1°C の昇温速度で試料温度を上昇させると 65°C 付近に吸熱ピークが観測された。水に対して透析し、塩や添加物濃度を低下させた試料では T_m は高温にシフトし、0.9%の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液に対して透析し、塩濃度を増加させた試料では低温にシフトした。表 1 にいくつかの市販製剤中の抗体タンパク質の変性温度を示す。ヒュミラ注に処方されるアダリムマブの変性温度は、塩の濃度の他に pH の影響も受け、pH5 にくらべ pH6 の方が高い変性温度を示した。また、アクテムラ注に処方されるトシズマブの変性温度も溶液の pH、塩濃度の影響を受けることが示された。

抗体タンパク質のカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間と変性温度との関係を図 2 に示す。緩和時間が大きく分子運動性が大きいと考えられる試料ほど、変性温度が低く不安定であることが示された。タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆するものとする。

D. 考察

本年度の検討により、保存安定性の指標として用いたタンパク質の変性温度とカルボニル炭素の ^{13}C -NMR 緩和時間との間に関連があることを示唆する結果が得られた。関連を結論付けるためには更なる検討が必要であると考えられる。たんぱく質の保存安定性の指標として用いた変性温度については、相対的な安定性の比較が可能であり、溶液の pH や緩衝塩の濃度によって T_m が変化し、高い T_m が観測される溶液における凝集が起こりにくいことは明らかであるが、タンパク質間の保存安定性の比較に適用が可能かについては不明である。今回検討した抗体タンパク質においては、タンパク質が異なっても、見かけ上変性温度と緩和時間に関連があるように見える。今後、凝集等の保存安定性を実測し、 ^{13}C -NMR 緩和

時間との関連を明らかにする必要があると考える。NMR 緩和時間と保存安定性との関連が明らかにできれば、実時間での保存に比べ、短時間で安定性評価が可能になり、革新的なタンパク質医薬の実用化促進につながるものと考えられる。

E. 結論

タンパク質の高次構造の揺らぎを ^{13}C -NMR に よって評価する方法について市販モノクロナル抗体製剤を用いて検討した。動的な揺らぎの指標である ^{13}C -NMR 緩和時間は保存安定性の指標として用いた変性温度と関連することが示唆され ^{13}C -NMR 緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 阿曾幸男, 医薬品の発がん性不純物の評価と管理に関するガイダンス. 公衆衛生, 印刷中(2014)

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

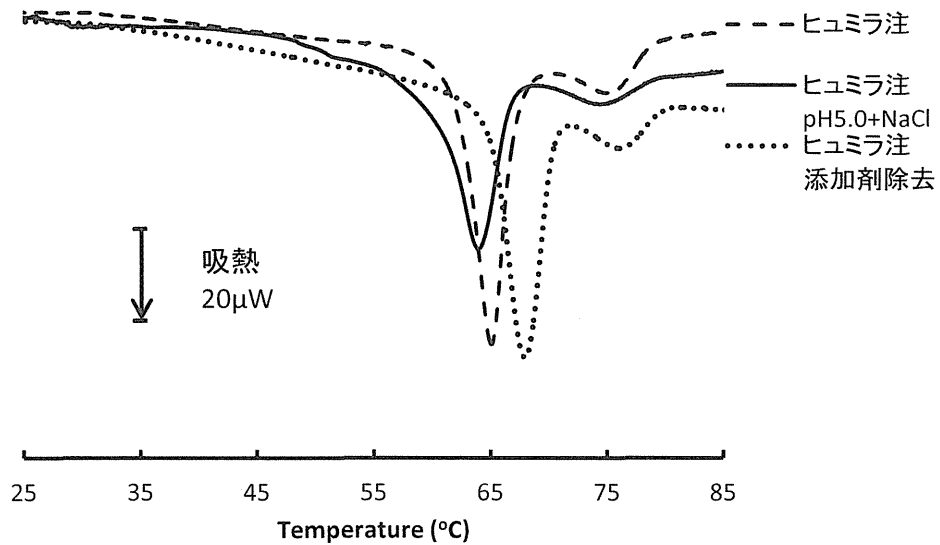


図 1 変性温度の測定例

表 1 変性温度に及ぼすpH、塩濃度の影響

	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
ヒュミラ注	64.8	75.0	
ヒュミラ 水 透析	67.7	77.4	
ヒュミラ pH6.0 透析	67.2	75.7	
ヒュミラ pH8.0 透析	67.1	74.2	
ヒュミラ pH5.0 透析	65.4	75.0	
ヒュミラ pH5.0+0.9%NaCl 透析	63.3	74.6	
アクテムラ注	70.6	76	85.3
アクテムラ 水 透析	71.3	75.5	85.7
アクテムラ pH6.0 透析	71.1	76.7	85.6
アクテムラ pH6.0+0.9%NaCl 透析	67.6	74.8	85.5
レミケード 50mg/mL	64.4	66.2	77.3

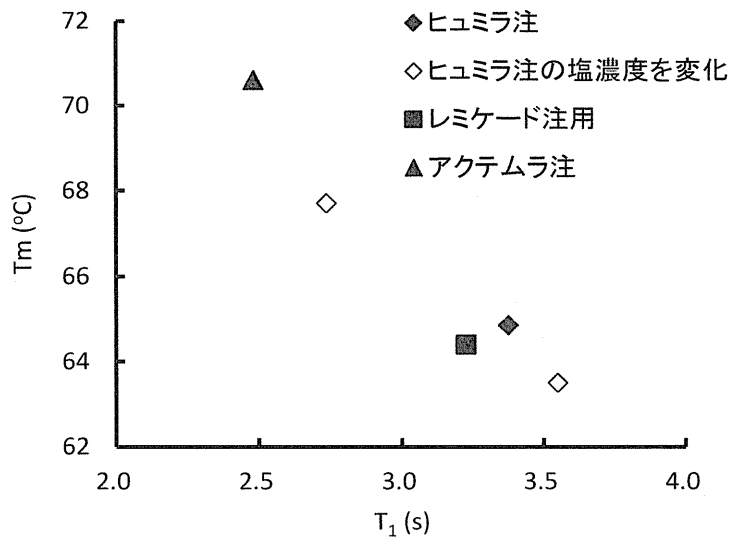


図 2 変性温度と ¹³C-NMR 緩和時間の関係