

## 核酸医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究

研究分担者 井上 貴雄 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

本研究では、国内外においてガイドラインが存在しない核酸医薬品について、開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究を行う。核酸医薬品は化学合成によって製造される医薬品であるが、低分子医薬品やバイオ医薬品をベースとした規制では対応できない核酸医薬特有の性質がある。その中で特に重要とされるのが「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現であり、その評価法の確立や判断基準の設定が喫緊の課題となっている。すなわち、低分子医薬品等の開発で得られた知見/経験が応用できず全く新規の課題であること、安全性評価の課題でありながら動物を用いた試験ができないことから、核酸医薬品開発の現場でも対応についてコンセンサスが得られておらず、開発が遅延する恐れ出ている。本年度は、複数のタイプが存在するアンチセンス医薬品について調査研究を行い、それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を考察、提案した。さらに、Kynamro®の上市で注目を集めている Gapmer 型アンチセンスに関して、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の誘導を検証した。

### A. 研究目的

本研究では、国内外においてガイドラインが存在しない核酸医薬品について、品質・安全性を評価する試験法の確立、審査指針の根拠となる実験的データの創出、基準策定の土台となるコンセプトの提案など、開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究（RS 研究）を行う。これにより、核酸医薬品の開発を促進し、日本初となる、日本発の核酸医薬品を上市するための体制を整える。さらに、ケーススタディを積み重ねながら、核酸医薬品の開発/審査/承認が滞りなく進行する環境を整備し、核酸医薬品の適用が期待されている難治性疾患や希少疾患の領域にいち早く医薬品を届ける体制を構築する。

#### 1. 核酸医薬品の特性とそれに付随する課題

本研究では、核酸医薬品の RS 研究を行う前

提となる「核酸医薬品に特有の性質」について調査を行ってきた。解決すべき課題を包括的に理解するため、まず核酸医薬品の性質を整理したい。

核酸医薬品とは一般に、「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、蛋白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」と定義できる。従って、核酸医薬品の規制は基本的には化学合成医薬品をベースに考えればよいと思われる。低分子医薬品やバイオ医薬品と比較し、核酸医薬品に特徴的な点としては、以下の項目を挙げることができる。

核酸医薬品は化学合成により製造されるが、分子量は一般的な低分子医薬品より遥かに大きい（3,000–15,000 程度）。また、リ

ン酸部に負電荷を有するポリアニオンであることから細胞膜を通過しにくい。以上の特徴から全身投与された核酸医薬品は特徴的な体内分布を示す（肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、固形癌等に集積）。

核酸医薬品は 3'末端から一塩基ずつ連結していく固相合成法により製造される。このため、N 塩基長のオリゴ核酸を合成する場合、途中で塩基が抜けた N-1、N-2 などの不純物が含まれうる。技術的な限界から、核酸医薬品の不純物は低分子医薬品と比べて含有率が高くなると考えられる。

核酸医薬品ではヌクレアーゼ耐性を付与するため、一般にリン酸ジエステル部がホスホロチオアート化（S 化）されている（図表 5）。これにより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 塩基長のオリゴ核酸を考えた場合、核酸の連結部（不斉点）は 10 箇所存在するため、 $2^{10}=1024$  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、「リン原子の立体化学に起因する異性体はいずれも有効成分」という前提で開発が進められている。実際、アメリカ食品医薬品局で既に承認されている核酸医薬品である Vitravene®（一般名：Fomivirsen）および Kynamro®（一般名：Mipomersen）（図表 2）はいずれもキラルが制御されていない異性体の混合物である。

核酸医薬品は Toll 様受容体に代表されるパターン認識受容体を介して自然免疫系を活性化する場合がある。研究の進展に伴い、受容体に認識されるオリゴ核酸の配列法則性などが明らかにされつつある。

アンチセンスや siRNA に代表される「RNA

を認識する核酸医薬品」は、標的 RNA と相補的に結合することにより有効性を発揮する。これらの核酸医薬品では、標的遺伝子以外の遺伝子と結合することにより発現を抑制する「相補的結合依存的なオフターゲット効果」のリスクが危惧されている。

核酸医薬品をマウス、ラット、サルに投与して観察される共通の毒性として、血液凝固時間の延長、補体の活性化、免疫性細胞の活性化、肝毒性、腎毒性などが知られる。これらの毒性の発現は、配列によって強弱があり、オリゴ核酸の物理化学的性状に依存すると考えられているが、発症機構は不明である。ケーススタディも不足しているため、ヒトへの外挿性に関しては慎重を要する。

## 2. 安全性担保の観点から見た核酸医薬品開発の課題

以上に挙げた核酸医薬品の性質の中で、安全性担保の観点では、と関連して「不純分の許容範囲の設定」、と関連して「相補的結合依存的なオフターゲット効果が起こる条件の解明」、と関連して「ヒトにおける毒性発現を予測する評価法の確立」が特に重要な点と認識されている。「不純分の許容範囲の設定」に関しては、主な不純物が N-1 等の「配列が変化したオリゴ核酸」であるため、そのリスクとしては、「N-1 のオリゴ核酸が標的以外の遺伝子に相補的に結合し、発現を抑制する」という懸念である。従って、不純物に関する課題は、に記載したオフターゲット効果の課題と本質的には同一であり、まずは、オフターゲット効果が起こる条件（配列、濃度等）に関して、基盤研究を進めるべきである。

「ヒトにおける毒性発現を予測する評価法の確立」に関しては、現時点では毒性発現の分子機構がわかっていないため、科学的根拠に裏付

けられた直接的な評価法を構築することは困難である。まずは分子機構を解明する基礎研究が必要であろう。現状では、臨床開発候補品を選択する際、肝毒性等を指標に簡易的にネガティブセレクションを行う場合があり、その後、通常非臨床安全性試験を行い、慎重な考察に基づいて First-in-man 試験に入ることになる。なお、ヒトと動物では核酸医薬品の標的となる遺伝子配列が異なるため、安全性試験を行う際には、サロゲートの利用やヒト遺伝子を導入したトランスジェニック動物の使用が検討される場合がある(ここでは詳細は割愛する)。「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関しては、ゲノム配列の異なる動物では評価できないため、通常非臨床安全性試験では対応不可能である。従って、核酸医薬品に特有の評価系/判断基準が必要となる。

### 3. 「相補的結合依存的なオフターゲット効果」に関する知見

以上に述べた、核酸医薬品の RS 研究に関する課題を俯瞰し、本研究では「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の評価法確立、判断基準の設定が特に緊急性を要すると判断した。理由としては、低分子医薬品等の開発で得られた知見/経験が応用できず、全く新規の課題であること、安全性評価の課題でありながら、動物を用いた試験ができないことが挙げられ、日本の規制当局においても、オフターゲット効果をどのように扱えばよいか、対応に迫られている現状がある。

現在、様々なタイプの核酸医薬品が開発されているが(図表 1, 3, 4)、「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現を考慮すべき核酸医薬品は、RNA を標的とする医薬品であり、現実的にはアンチセンス医薬品および siRNA 医薬品の 2 種類である(図表 1, 3, 7)。これら 2 つの核酸医薬品は開発段階、開発品目数で見れば、上位 1 位、2 位に相当する。今年度

の開発動向を調査したところ(文献 1, 図表 7)、臨床試験段階にあるアンチセンス医薬品候補品は約 50、うち 8 品目が phase 3 であり、2 品目は既に上市されている。一方、siRNA 医薬品は臨床段階にあるのが約 15、うち 1 品目が phase 3 に入ったところである(上市された siRNA 医薬品はまだ存在しない)。すなわち、アンチセンス医薬品の開発が大きくリードしているのが現状である。一方、オフターゲット効果に関する研究については、siRNA に関しては基盤研究が進んでおり、オフターゲット効果が起こる条件が明らかにされているが(Nat Biotechnol. 21(6), 635-637, 2003 など)、アンチセンスについてはほとんど解析されていない。特に、近年開発されている高機能性アンチセンス(後述)を用いたオフターゲット効果の検討は皆無である。以上の点から、アンチセンス医薬品によって引き起こされるオフターゲット効果を本研究課題の中心テーマに設定した。

同じアンチセンス医薬品の範疇にあっても、標的となる RNA の種類(mRNA, pre-mRNA, miRNA)や作用機構(RNA 分解、立体障害)が異なる医薬品が存在し(図表 7)、種類によってオフターゲット効果の概念や評価法が変わってくると予想される。従って、平成 25 年度においては、まず、「アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究」を行ったのち、それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を考察、提案した。さらに、アンチセンス医薬品の中でも最も開発が進んでいる Gapmer 型アンチセンスに関して、「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」を行った。以下に、具体的な研究成果を述べる。

## B. 研究方法

### 1. アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究

国内外の学術集会において、アンチセンス医

薬品の研究開発状況を調査した(第9回核酸医薬国際学会、第6回 AsiaTIDES、第23回アンチセンスシンポジウム、第15回日本RNA学会など)。また平成25年度は、ヒューマンサイエンス振興財団規制動向調査ワーキンググループの調査対象が核酸医薬品であったため、本メンバーと密接に情報交換を行い、調査内容を共有した。さらに、実際にアンチセンス医薬品開発を行っている国内の主要製薬企業とミーティングを行い、オフターゲット効果の評価法に関して議論を行った。

## 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

現在、最も開発段階が進んでいる Gapmer 型アンチセンスを対象にオフターゲット効果を解析した。具体的には、GFP を安定発現するヒト細胞 (HEK293 細胞) に対して、GFP に対するアンチセンスを添加し、抗 GFP アンチセンスと相補的に結合するヒト内在性遺伝子がどのように発現変化するかをマイクロアレイおよび定量 PCR により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要な試料・資料の取り扱いはない。

## C. 研究結果及び考察

### 1. アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類に関する調査研究

アンチセンス医薬品の機能的分類を理解する上で修飾型核酸の開発状況を把握することが必須であるので、まず、修飾型核酸の開発状況に関して調査した結果を述べる。次に、アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類を整理する。

#### 1.1 修飾型核酸の開発状況

従来、核酸医薬品は体内で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背景から、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、2012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(図表2)。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に比べて改善している。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、問題とされてきた細胞毒性の問題も大きく低減した。Toll 様受容体を介する自然免疫活性化も化学修飾により回避できる可能性が指摘されている。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。

核酸の化学修飾は、リン酸部の修飾、糖部の修飾、塩基部の修飾に分類することができる。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 S 化がよく知られており(図表5)、現在開発されている多くの核酸医薬品において S 化がベースとして導入されている(S 化された核酸により合成されたオリゴ核酸は“S オリゴ”と呼ばれる)。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、疎水性が増すことから細胞内への取り込みも改善する。上述のように、リン酸部の S 化によりリン原子上に不斉点が発生するため、S オリゴは立体異性体が混在した化合物として合成される。この点は品質管理の観点から重要であり、核酸医薬品に特有の考慮が必要となる。

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<sup>CO</sup>、BNA<sup>NC</sup>、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®が核酸医薬品としては初の、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与え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<sup>®</sup>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を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にくい。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「コントロール、GFP アンチセンス A、eGFP 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、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、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き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 ~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

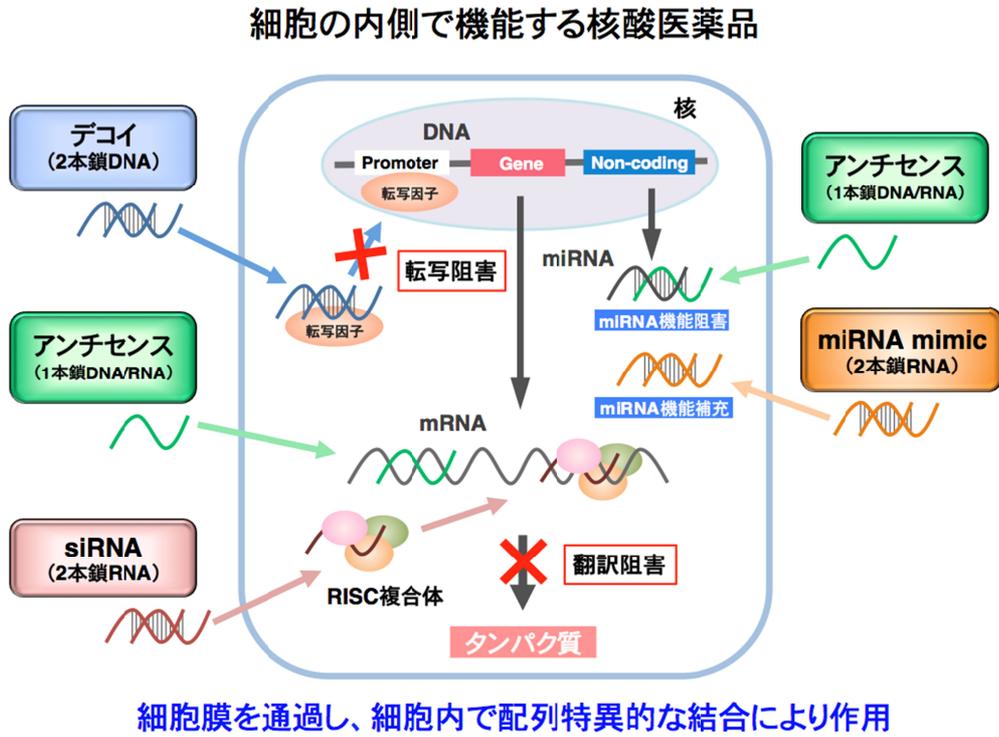
	アンチセンス	miRNA アンチセンス	siRNA	miRNA mimic	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖RNA, ヘアピン1本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
標的	mRNA Pre-mRNA	miRNA	mRNA	mRNA	蛋白質 (転写因子)	蛋白質 (細胞外蛋白)	蛋白質 (TLR9)
作用部位	細胞内 (核内)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (細胞質)	細胞内 (核内)	細胞外	細胞"外" (エンドソーム内)
作用機序	mRNA分解 スプライシング 阻害	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, Prosensa, Sarepta	Santaris, Regulus, MiRagen,	Alnylam, Quark, Arrowhead	Mirna, MiRagen	Anges-MG, Adynxx	Pfizer, Regado, NOXXON	Pfizer, Dynavax

図表 2

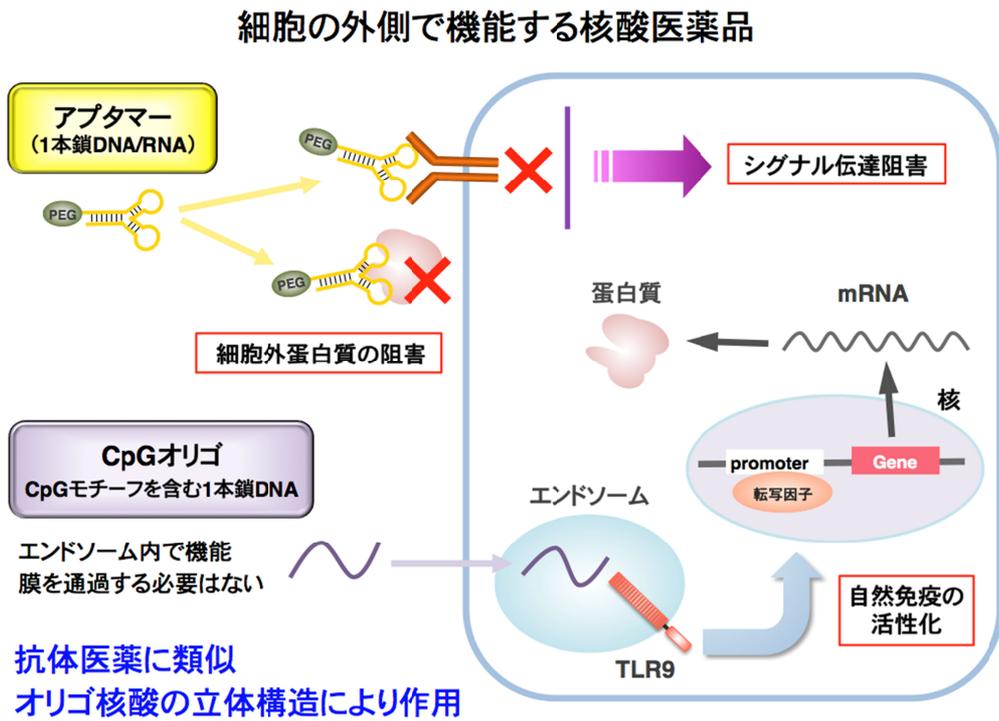
## これまでに上市された核酸医薬品

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

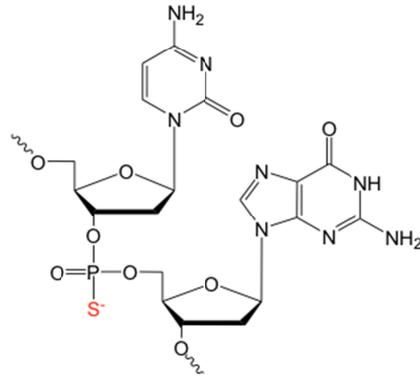


図表 4



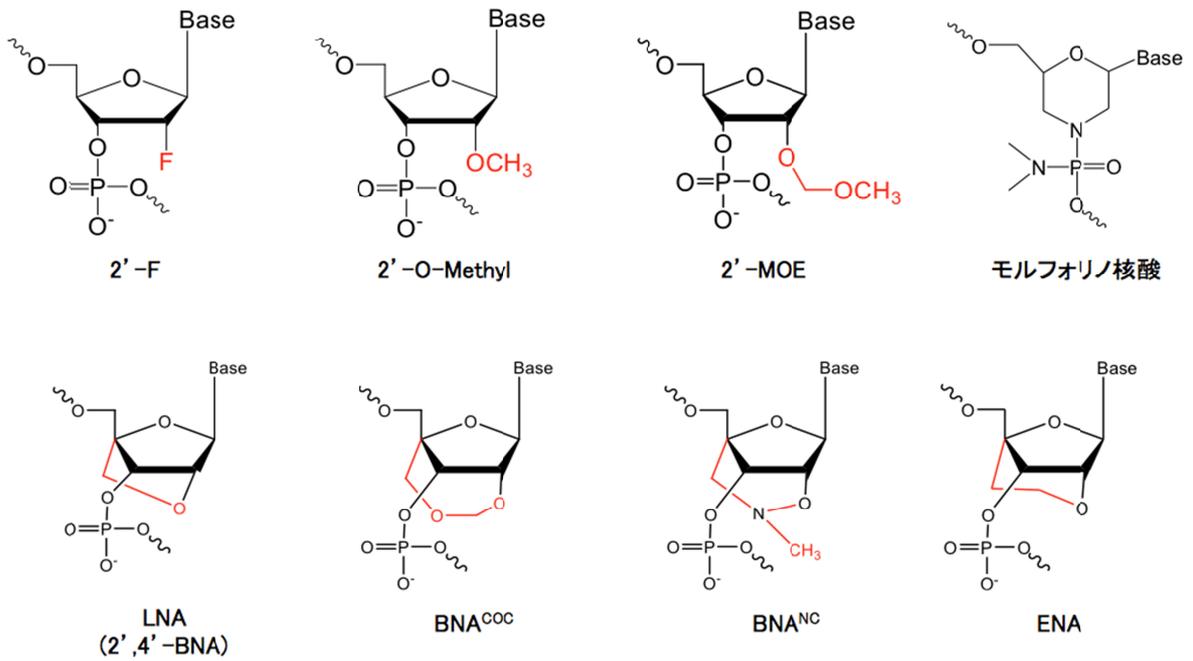
図表 5

### 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

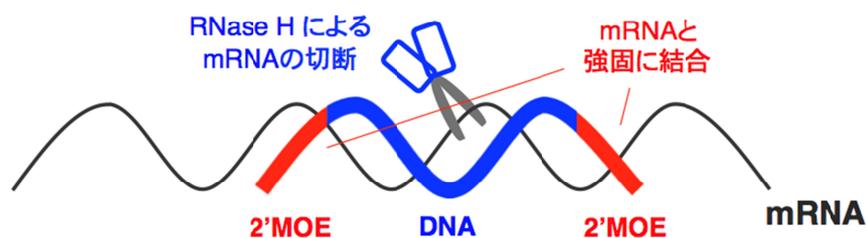
### RNAを標的とする核酸医薬品の分類

	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

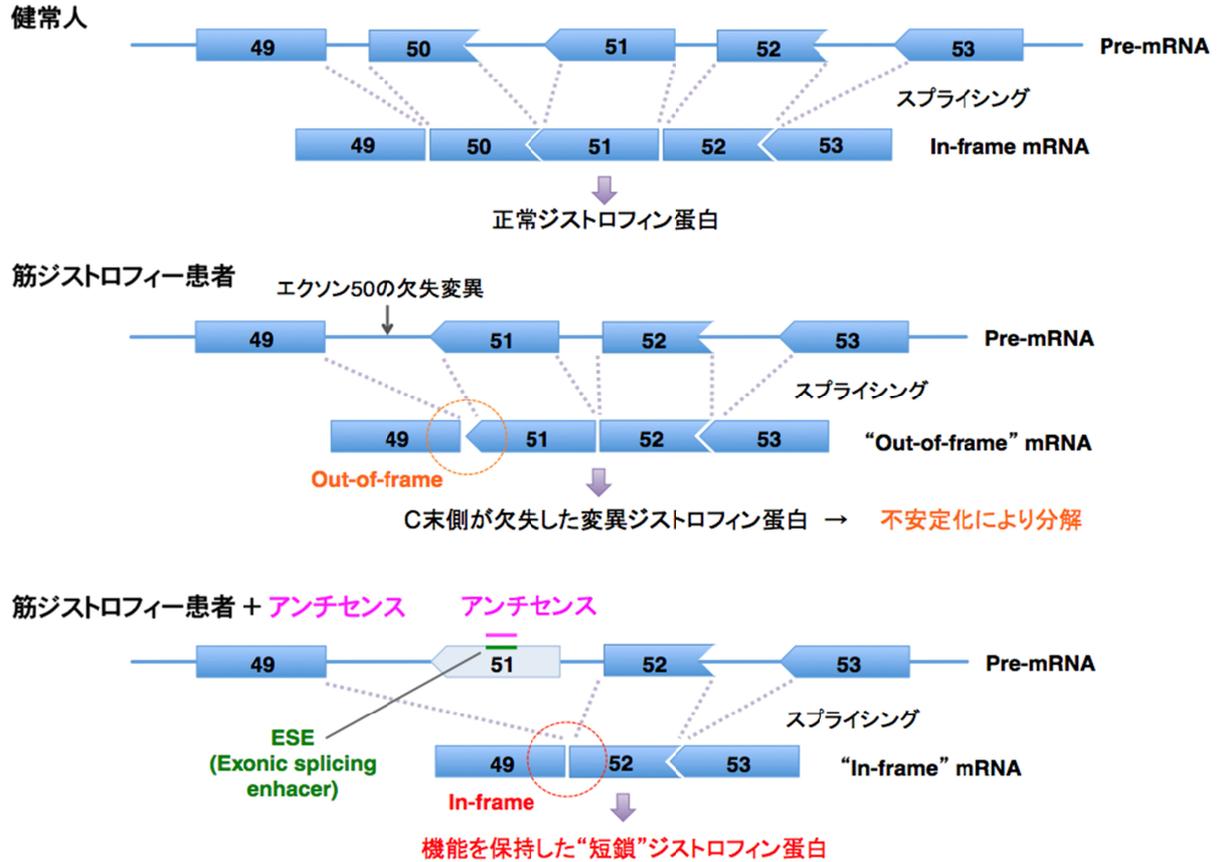
RNase H: DNA/RNA二本鎖を認識し、RNAを切断するエンドヌクレアーゼ



- 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。

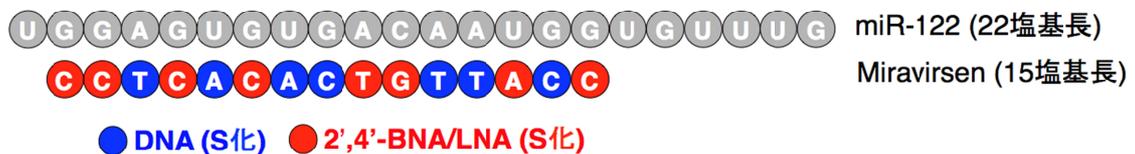
図表 9

### スプライシング制御型アンチセンスの作用機構



図表 10

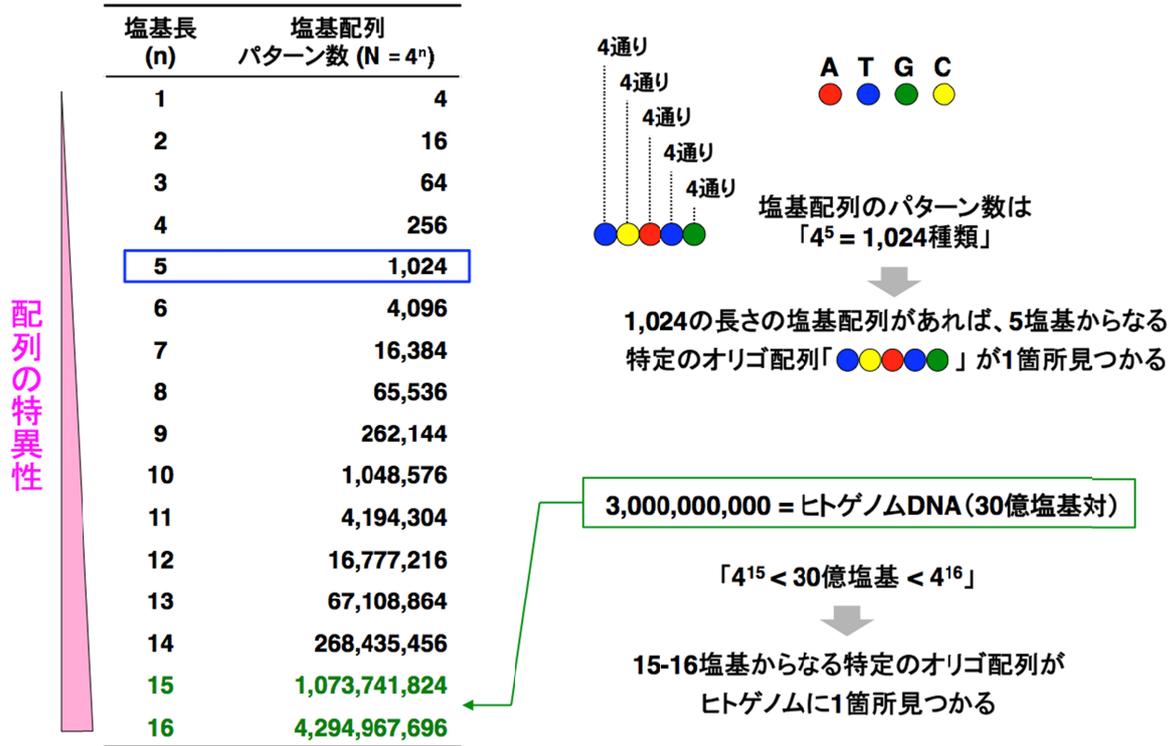
### miRNA阻害型アンチセンス (Miravirsen) の構造



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

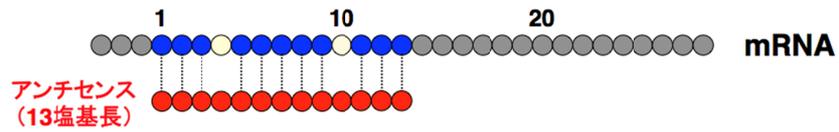
アンチセンスの塩基長	ヒトmRNAコード領域に存在する相補配列の数 (オフターゲット候補遺伝子の数)			
	0塩基 ミスマッチ	1塩基 ミスマッチ	2塩基 ミスマッチ	3塩基 ミスマッチ
22	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	1.1×10 <sup>2</sup>	2.1×10 <sup>-1</sup>
21	<10 <sup>-3</sup>	1.3×10 <sup>3</sup>	3.9×10 <sup>2</sup>	7.3×10 <sup>-1</sup>
20	<10 <sup>-3</sup>	4.9×10 <sup>3</sup>	1.4×10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

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