

Adalimumab Mogamulizumab Panitumumab Natalizumab Muromonab CD3

Human

No homologous protein

Cynomolgus

No homologous protein

Mouse

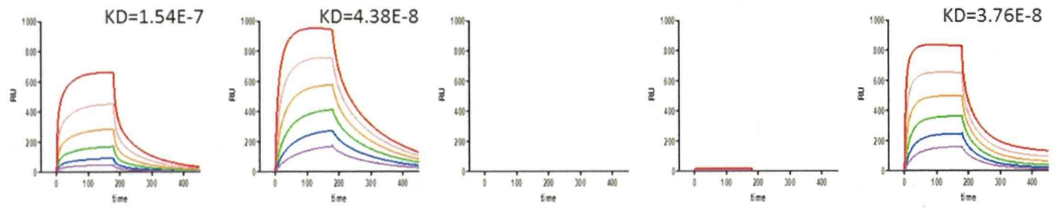
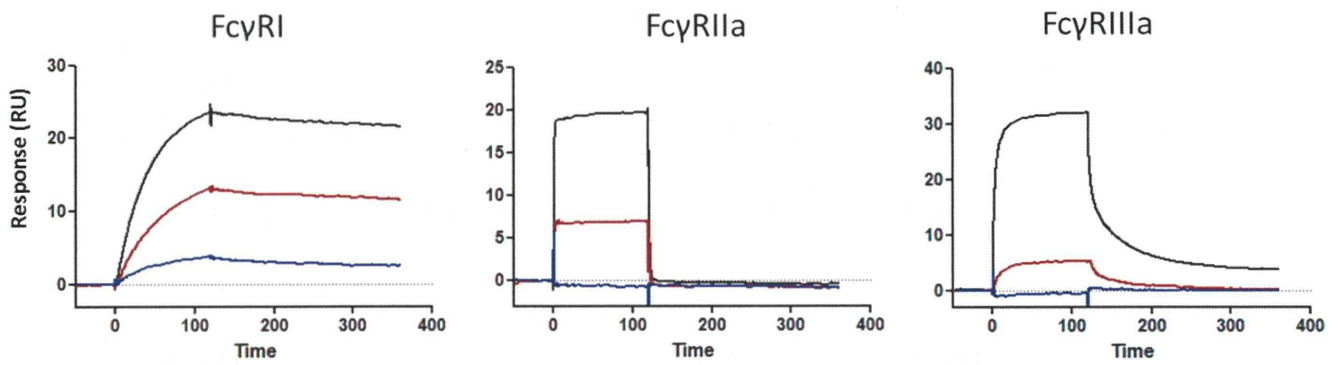


図7 マウスFcγRIVに対する抗体医薬品の結合親和性



Ligand capture level (RU)

Ligand	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIIa
Infliximab	72	348	348
hLF-hinge-CH2-CH3	70	410	397
hLF-CH2-CH3	76	422	436

— Infliximab
— hLF-hinge-Ch2-CH3
— hLF-Ch2-CH3

図8 SPR法によるLF-FcのヒトFcγRI、IIa、IIa 結合性解析

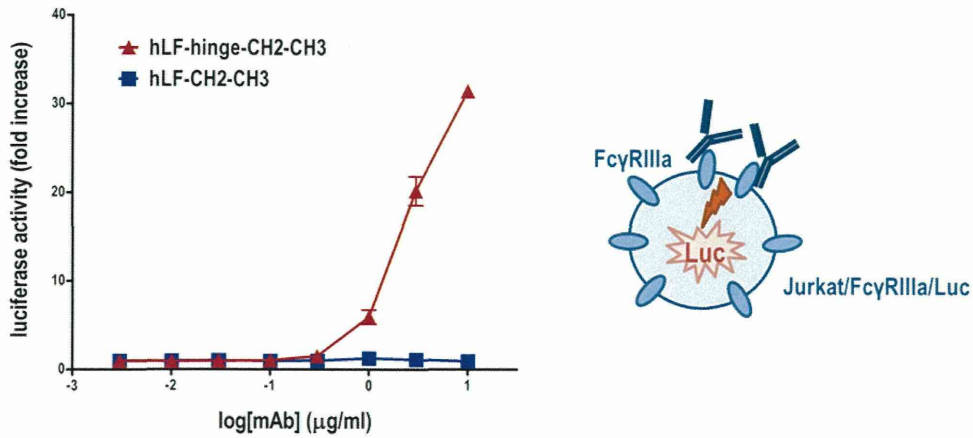


図9 Fc γ RIIIa発現レポーター細胞を用いたLF-FcによるヒトFc γ RIIIa活性化の解析

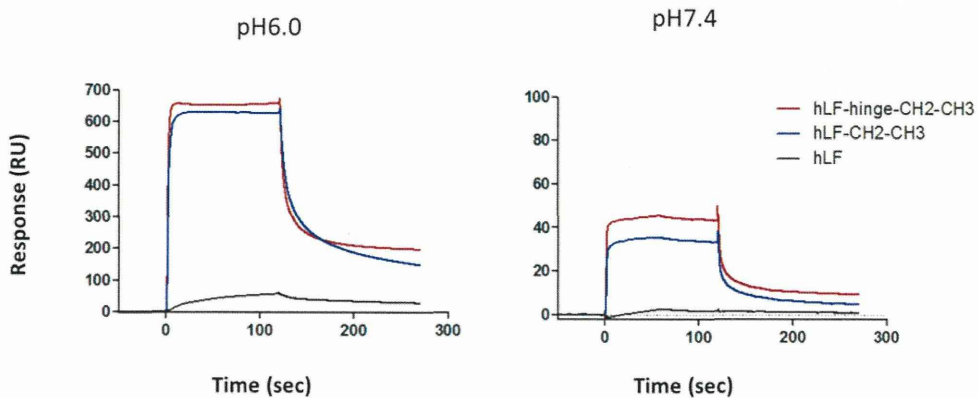


図10 SPR法によるLF-FcのヒトFcRn結合性解析

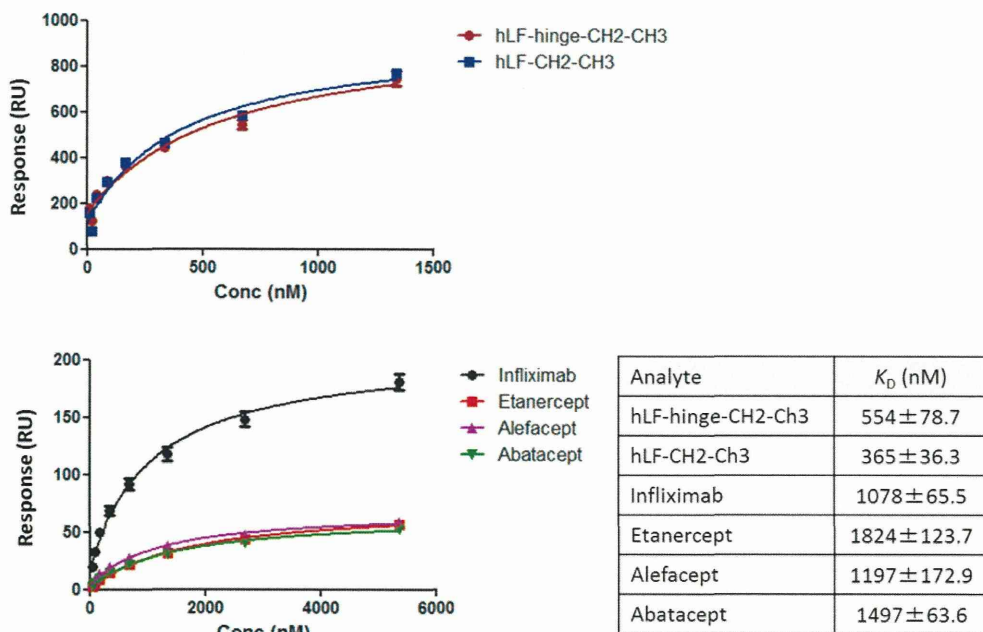


図11 SPR法によるヒトFcRn結合親和性解析 (平衡値解析)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
分担研究報告書

－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－
～ Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果に関する検討 ～

研究分担者：井上 貴雄（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 室長）

研究協力者：吉田 徳幸（大阪大学大学院薬学研究科 特任助教）

（国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員）

佐々木 澄美（国立医薬品食品衛生研究所 博士研究員）

内藤 雄樹（ライフサイエンス統合データベースセンター 特任助教）

小比賀 聡（大阪大学大学院薬学研究科 教授）

研究要旨

本研究では、国内外においてガイダンス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品に特有の性質がある。その中で特に重要な課題とされるのが、RNAを標的とする核酸医薬品（アンチセンス、siRNA等）における「ハイブリダイゼーション依存的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課題となっている。すなわち、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果は、①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、②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においても、その対応についてコンセンサスが得られていないのが現状である。以上の問題を解決するため、本研究では、全身投与性の核酸医薬品として初めて上市されたKynamro®に代表される「Gapmer型アンチセンス」を対象とし、オフターゲット効果の評価に関する包括的な解析を行った。

A. 目的

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、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。遺伝子治療薬も核酸で構成される医薬品であるが、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。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、細胞の内側で機能するか、外側で機

能するかにより、大きく2つに分類することができる（図表1、2）。細胞内で作用する核酸医薬品としては、mRNAを標的とする「アンチセンス」や「siRNA」が挙げられ、また、転写因子等のタンパク質と結合して転写段階を抑制する「デコイ」がある（図表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、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(図表2)。「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、デコイ核酸、CpGオリゴはタンパク質が標的である(図表3)。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に用いられるスプライシング制御型アンチセンスの標的はpre-mRNA、mRNAを分解する機能を有するGapmer型アンチセンスやsiRNAの標的はmRNAである(Gapmer型アンチセンスについては後に詳述する)。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の存在が明らかになっており、その代表格としてマイクロRNA(miRNA)の機能が注目されているが、miRNAを標的とした核酸医薬品も開発されている(miRNA阻害型アンチセンス)。

以上のように、核酸医薬品には多様な種類が存在するが、現在、特に開発段階が進んでいるのは、アンチセンスやsiRNAに代表される「RNAを標的とする核酸医薬品」である(図表4)。RNAを標的とする核酸医薬品による毒性発現の機序には複数の経路があるが(図表5)、その代表例として「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」による毒性発現のリスクが挙げられる。すなわち、核酸医薬品の標的遺伝子と似た配列を有するRNAに核酸医薬品が相補的に結合し、その発現を抑制したり、機能を阻害したりすることにより有害作用を引き起こす危険性である。ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果は、①従来の低分子医薬品や抗体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、②安全性評価の課題でありながら動物を用いた試験では対応できないことから、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。

ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の発現機構は核酸医薬品の種類によって異なるため、評価手法も各核酸医薬品の特性に応じて個別に考察しなければならない。RNAを標的とする核酸医薬品はその作用機序から、「RNAを分解するタイプ」と「RNAに結合し、立体障害により作用するタイプ」

の2つに分類することができる(図表6)。前者に関しては、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果により標的外RNA鎖が分解されるリスクがあり、その評価にはRNA量の増減を網羅的に検出できるマイクロアレイ解析が有用と考えられる。このタイプには、siRNAとGapmer型アンチセンスがあるが、siRNAについてはオフターゲット効果に関する研究が既に行われており、オフターゲット効果の起こる配列法則性や回避するための方法論が報告されている(Jackson AL et al., *Nat Biotechnol.* 21, 635-637, 2003等)。一方、Gapmer型アンチセンスについては、Kynamro®の承認に象徴されるように医薬品として上市可能なレベルにまで技術開発が進んでいるが(図表11)、オフターゲット効果に関する解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果に関する基盤研究を行い、オフターゲット効果のリスクを予測/判断するために必要な実験的データを創出することとした。

後者の「RNAに結合し、立体障害により作用するタイプ」に関しては、スプライシング制御型アンチセンスとmiRNA阻害型アンチセンスの開発が進んでいるが、これらのアンチセンスに関してもオフターゲット効果の検証はほとんど行われていない(図表6)。我々は、本研究事業とは別に、スプライシング制御型アンチセンスのオフターゲット効果についても解析を行っている。この成果については、「厚生労働科学研究 創薬基盤推進研究事業」における「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発、Ⅲ. 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発」の26年度報告書にとりまとめているのでそちらを参照して頂きたい。

図表5に示すように、「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」は広い意味で用いられる「オフターゲット効果(広義)」に含まれる現象の1つである。本研究では、Gapmer型アンチセンスのハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に焦点を絞って解析を行い、広義のオフターゲット効果については議論しない。従って、以降では表記を簡略化するため、「ハイブリダイゼーション依存的オ

「オフターゲット効果」のことを単に「オフターゲット効果」と記載することとする。また、「オフターゲット効果が起こっている」と判断するための線引きについては、ここでは便宜的に「コントロールと比較して当該遺伝子の発現量が50%未満に減少した場合」と定義する。この線引きの考え方については、「D. 考察」の項目で議論する。

B. 研究方法

B-1. Gapmer型アンチセンス（背景）

まず、研究立案の背景となるGapmer型アンチセンスの知見を概説する。Gapmer型アンチセンスは、古くから知られている「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タンパク合成を抑制する」というメカニズムとは異なる機構で機能するオリゴ核酸で、mRNAを分解することにより有効性を発揮する。図表7に示すように、Gapmer型アンチセンスの両端（Wing領域：赤）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”領域（青）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Gap領域でDNA/RNA二重鎖を認識し、RNA鎖を切断する。

Gapmer型アンチセンスとして特筆すべきは、2013年にGapmer型アンチセンス医薬品Kynamro®（一般名：mipomersen）が全身投与の核酸医薬品として初めて上市された点である（図表111）。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。全身投与されたオリゴ核酸は肝臓や腎臓等へ集積する性質があるが、Kynamro®についても肝臓に到達したオリゴ核酸（mipomersen）が肝臓に発現するApoB-100 mRNAを分解することで有効性を発揮する。Kynamro®では、結合力を高める修飾型核酸として核酸の糖部2位を修飾した2'-MOEが使用されており（図表7、8）、Kynamro®を開発したISIS社では、2'-MOEを用いたGapmerの開発が引き続き行われている。また、2'-MOEよりさらに結合力の強い「架橋型核酸」もGapmer型アンチセ

ンスの開発に用いられている。

架橋型核酸とは、揺らぎのある核酸糖部の立体配座を架橋により固定化するもので、糖部の2'位と4'位を架橋することにより、相補鎖との結合力が顕著に向上する（小比賀ら、医薬ジャーナル、48(1)、2012）。架橋型核酸は日本が世界に先駆けて開発した技術であり、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（Obika et al., *Tetrahedron Lett.*, 38, 8735-8738, 1997）（図表8）。架橋型核酸を用いたGapmer型アンチセンスとしては、Santaris社がLNAをWing領域に配置したGapmerについて開発を進めている。以上のように、Gapmer型アンチセンスは既に実用化されている核酸医薬品であり、さらに高い有効性を持つ開発候補品が臨床試験されている状況である。

B-2. オフターゲット効果の評価に用いるGapmer型アンチセンスの配列の選択

B-2-1. 「ヒト培養細胞株を用いた解析」に用いるアンチセンスの選択

オフターゲット効果の発現はアンチセンスの塩基長に大きく依存すると予想される（図表9）。上述のKynamro®は20塩基長であるが、修飾核酸技術の進展によりアンチセンスの塩基長が短くなる傾向にあり、現在では12-19塩基程度のGapmer型アンチセンスが中心的に開発されている。そこで本研究では、13、15、18塩基長のGapmer型アンチセンスについてオフターゲット効果の発現を検証することとした。アンチセンスの標的遺伝子（オンターゲット遺伝子）としては、発現抑制された際に内在遺伝子の発現に影響を与えないように、培養細胞に安定導入した外来遺伝子を標的にすることにした。具体的には、eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) を安定発現するHEK293細胞を用い、eGFP mRNAに対するアンチセンスを設計することとした。

本研究の目的はオフターゲット効果の検証であるため、選択するアンチセンスの条件としては、「できるだけ多くのヒトmRNAと相補結合し、かつ、高い

eGFP mRNA分解活性を有するもの」とした。これにより、オフターゲット効果の影響が観察されやすくなり、より多くのデータが抽出できると期待される。また、比較のため、「できるだけヒトmRNAと相補結合せず、かつ、高いeGFP mRNA分解活性を有するもの」についても探索を行った。これにより、配列の選択によりオフターゲット効果がどれくらい回避できるかが考察できると思われる。

Gapmer型アンチセンスのWing領域に導入する修飾型核酸としては架橋型核酸LNAを採用することとした。この理由としては、①架橋型核酸は日本発の技術であり、かつ、今後世界的にも核酸医薬創薬で用いられる可能性が高いこと、②LNAは架橋型核酸の先駆けであり、LNAで得られた知見は他の架橋型核酸を含む核酸医薬品の解釈に応用可能と考えられること、③上述の2'-MOEに代表される糖部の2位を修飾した核酸と比べ、有効性が著しく向上していること、等が挙げられる。

以下に、アンチセンス配列を決定する具体的な手順を示す。以降では、アンチセンスと相補性のあるmRNAを「オフターゲット候補遺伝子」と呼ぶこととする。

【Step.1】

オフターゲット候補遺伝子数によるアンチセンスの絞り込み (図表10)

(*in silico*解析 : 2117配列 → 60配列)

仮想アンチセンスのデザイン

- eGFP mRNAに対して相補的な配列
 - 候補配列 : 13、15、18塩基長で考えられる全ての配列
- 13塩基長 : 708本
15塩基長 : 706本
18塩基長 : 703本 合計 : 2117配列

*in silico*解析の概要

- 検索アルゴリズム : GGRNA
(以下に概要を記載)
- 検索対象 : ヒト転写産物データベース

(NCBIが提供するRefseq60)

- 相補の不適合性 :
ミスマッチを許容して検索、ミスマッチの最大許容数は以下のとおり (図表11)

13 塩基長アンチセンス : 最大許容数 2

15 塩基長アンチセンス : 最大許容数 3

18 塩基長アンチセンス : 最大許容数 3

- 「できるだけオフターゲット候補遺伝子数の多いアンチセンス配列」および「できるだけオフターゲット候補遺伝子数の少ないアンチセンス配列」を選択

GGRNA :

ライフサイエンス統合データベースセンターの内藤らが、2012年に開発した新しい検索システム (Naito Y, et al., *Nucleic Acids Res*, 40, W592-596, 2012)。NCBIが提供するヒト転写産物Refseqのデータベースに対して検索可能。その利点として、①塩基配列の類似性を高速で検索することが可能である、②完全相補する配列だけでなく、部分的な不一致(ミスマッチ)を許容した検索が可能である (version.1で対応可能)、③十数塩基長の短い配列の検索に最適化されており漏れがないこと、が挙げられる。

オフターゲット候補遺伝子の分類

オフターゲット候補遺伝子の分類については、基本的に「アンチセンスと遺伝子間のミスマッチの数」を基準に整理を行う。*In silico*解析を行うと、1つのアンチセンスが1つの遺伝子に対して、複数箇所でもミスマッチを有する場合がある。例えば、アンチセンスAが遺伝子Bに対して2箇所でもミスマッチを有する場合、それぞれ「1ミスマッチ (1 mis)」、「2ミスマッチ (2 mis)」のような結合様式の組み合わせが考えられる。このような結合様式の組み合わせは多岐に渡り、すべてのパターンを区別してデータ解析しても統計的に意味のある数値は出てこないと考えられる。そこで、このようなケースでは、「オフターゲット効果の影響を最も受けやすいと考えられ

る結合様式」を重視し、その結合様式を代表として分類することとした。例えば、「1 mis」、「2 mis」の2つの結合様式がある場合には、不適合箇所が最も少ない「1 mis」がオフターゲット効果の影響を最も受けやすいと判断し、遺伝子Bを「1 ミスマッチを有するオフターゲット候補遺伝子群」に分類することとした（図表11）。

【Step.2】

オンターゲット効果の強度によるアンチセンスの絞り込み（図表12）】

（*in vitro*解析：60 配列 → 8 配列）

アンチセンスのデザイン（図表13）

- 1 本鎖DNAの両端にLNAを配置（図表11）
 - 13塩基長（LNA2 - DNA8 - LNA3）
 - 15塩基長（LNA4 - DNA8 - LNA3）
 - 18塩基長（LNA4 - DNA10 - LNA4）
- 配列：上述の*in silico*解析で抽出したオフターゲット候補遺伝子の多いアンチセンス配列：38本
オフターゲット候補遺伝子の少ないアンチセンス配列：22本
合計60本

用いる細胞種・導入条件

- eGFP安定発現HEK293細胞
- 細胞数 1×10^4 cells/well（96 well plate）
- Lipofection法で導入（Lipofectamine2000）
- 最終濃度50 nMのアンチセンスを導入
- 37°C、5 %CO₂で培養
- 24時間培養後total RNAを抽出

eGFP mRNA発現抑制効率の検証

eGFP-HEK293細胞から抽出したtotal RNAを用いてquantitative real-time PCR（qRT-PCR）を行い、eGFP mRNA量を定量した。選別したアンチセンスは、下記のように命名した（図表14）。

13塩基長アンチセンス（3本）

：ASO13-1、ASO13-2、ASO13-3

15塩基長アンチセンス（3本）

：ASO15-1、ASO15-2、ASO15-3

18塩基長アンチセンス（2本）

：ASO18-1、ASO18-2

（ASO：AntiSense Oligonucleotide）

B-2-2. 「マウス肝培養細胞株を用いた解析」に用いるアンチセンスの選択

核酸医薬品のオフターゲット効果はヒトとゲノム配列が異なる動物では評価できないため、原理的にヒト由来の培養細胞を用いて評価する必要がある。一方、「ヒト由来細胞で評価したオフターゲット効果の発現が、ヒト組織におけるオフターゲット効果を予測できるか」については、実際に検証することは難しく、その答えは推測の域を出ない。そこで、本研究では「オフターゲット効果の発現を細胞レベルで予測/評価することの妥当性」について科学的根拠を示すために、「マウス由来細胞を用いた解析でマウス個体におけるオフターゲット効果の発現を予測できるか」について検証を行った。上述のようにGapmer型アンチセンスは、肝臓に発現する遺伝子を標的とする医薬品の開発が先行しているため、細胞と個体の比較として、マウス肝由来培養細胞とマウス肝臓を用いることとした。具体的な研究方法は以下のとおりである。

使用アンチセンス

マウス個体で有効性（オンターゲット効果）が報告されている以下の2つのGapmer型アンチセンス

アンチセンス名：mApoB-13

- オンターゲット遺伝子：マウスApoB
- 配列：GCattggtatTCA

（小文字はDNA、大文字はLNA）

- 13塩基長
- 参考文献：Straarup EM et al.,

Nucleic Acids Res, 20, 7100-7111, 2010

アンチセンス名：mPCSK9-13

- ・オンターゲット遺伝子：マウスPCSK9
- ・配列：GTctgtggaGCG
(小文字はDNA、大文字はLNA)
- ・13塩基長
- ・参考文献：Gupta N et al.,
PLoS One, 5, e10682, 2010

B-2-3. 「マウス個体を用いた解析」に用いるアンチセンスの選択

使用アンチセンス

「B-2-2. マウス肝培養細胞株を用いた解析に用いるアンチセンスの選択」に記載した2本のアンチセンス

- ・mApoB-13 (13塩基長)
- ・mPCSK9-13 (13塩基長)

実験条件の設定

マウスにGapmer型アンチセンスを投与して、肝臓を回収するタイミングについて、mApoB-13を用いて条件検討を行った。投与量については上述の論文に基づき、20 mg/kgに固定した。

- ・C57/BL6マウス (♂、6週齢)
- ・n=2
- ・使用アンチセンス：mApoB-13
- ・尾静脈内投与
- ・投与濃度: 20 mg/kg
- ・投与後24、48、72時間後に肝臓を摘出し、total RNAを抽出
- ・抽出したtotal RNAに対して、qRT-PCRを行い、マウスApoB mRNA量を定量、発現抑制を確認

B-2-4. 「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた解析」に用いるアンチセンスの選択

近年、細胞／組織の一部がヒト由来の細胞に置き換わった「ヒト化動物」の研究が進んでいるが、中でも肝臓がヒト肝臓細胞に置き換わった「ヒト肝細胞キメラマウス」については安定提供されるまでに技術進展している。このマウスでは、ヒト肝臓における薬物の代謝／動態の予測がある程度可能であり、

また、ヒト肝臓における代謝／動態の影響を加味した薬物の安全性評価についても一定の成果が期待される(図表15)。

我々はアンチセンス医薬品のオフターゲット効果の評価についても、ヒト肝細胞キメラマウスが有用である可能性を考え、検証を行うこととした。有用と考える根拠としては、①アンチセンスのオフターゲット効果はゲノム配列の異なる動物では評価できないが、ヒト肝細胞キメラマウスを用いれば、原理的には個体においてオフターゲット効果の解析が可能になること、②全身投与性のアンチセンスは肝臓に集積する性質があるため、肝臓がヒト肝臓細胞に置き換わった個体は体内動態の観点から適していること、③アンチセンスによる肝毒性の発現を予測／評価できる可能性があること(本研究の対象ではないが、アンチセンスは配列により肝毒性を誘発するポテンシャルがある)、が挙げられる。

現在、一般の研究者が使用可能なヒト肝細胞キメラマウスとしては、PXBマウス(フェニックスバイオ社が作製・販売)、FRGマウス(Yecuris社が作製、クラボウ社が販売)、TK-NOGマウス(実験動物中央研究所が作製、In-Vivo Science社が販売)の3つがある。ここでは3つの詳細な比較は割愛するが、本研究では、①作製匹数が多く、安定的な供給が可能であること、②使用実績および研究論文数が多いことから、PXBマウスを採用することにした。PXBマウスの概要は以下のとおりである。

PXBマウス

Host Strain : c-DNA-uPA^{+/+}/SCID^{+/+}

- ・cDNA-uPA : ホモ接合性 (B6 ; 129SvEv- Plau, 遺伝子型 : cDNA-uPA^{+/+})
肝障害を誘発するuPA (ウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベータ) を発現するトランスジェニックマウス、マウス肝臓細胞が自然に死滅する
- ・SCID : Fox Chase SCID C.B-17/Icr-scld/ scld Jcl, 遺伝子型 : SCID^{+/+})

重度複合免疫不全：T細胞・B細胞欠損、マクロファージ・NK細胞あり

肝障害を誘発するuPA（ウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベータ）を発現するアリルと重度免疫不全状態となるSCIDのアリルを共にホモ接合体で有するマウスに、ヒト肝細胞を移植・生着させることで作製する。血中ヒトアルブミン濃度を測定することにより、ヒト肝細胞への置換率をモニターし、70%以上が置換されたものを“PXBマウス”として使用する。PXBマウスの特徴は以下のとおりである。

1. 肝臓に70%以上の置換率でヒト肝細胞を有する（実質的には約80%の肝細胞がヒト肝細胞に置換されている）
2. 組織学的に正常な肝臓を形成する
3. マウスにおいて“肝臓”として機能し、ヒトアルブミンを産生する
4. 肝組織でのヒト代謝酵素及びトランスポーターを発現する
5. ヒト肝炎ウイルス（HCV/HBV）の感染が可能である
6. 12-16週齢で試験への供給が可能である

使用アンチセンス

「B-2-1. ヒト培養細胞株を用いた解析に用いるアンチセンスの選別」に記載した2本のアンチセンス

- ・ASO13-1（13塩基長）
- ・ASO13-2（13塩基長）

実験条件の設定

PXBマウスは高価であるため（50万円/匹）、実験条件の設定においては、正常マウスを用いることとした。使用したアンチセンス（ASO13-1）がマウス肝臓において有効性（オンターゲット効果）を示す条件を決定する必要があるが、ASO13-1はもともと「できるだけ多くのヒトmRNAと相補結合し、かつ、高いeGFP mRNA分解活性を有するアンチセンス」として選別しているため、マウス肝臓には当初想定し

たオンターゲット遺伝子（=eGFP mRNA）は存在しない。そこで、ASO13-1と相補結合するマウスmRNAを*in silico*で検索し、それらの遺伝子がASO13-1で効率よく分解されることを確認することで、オンターゲット効果が現れる条件を設定することとした。具体的には、ASO13-1と完全相補するマウス遺伝子4つの中からマウス肝臓に発現するものとしてColi、Rps6kb2の2つを選択し、これらをオンターゲット遺伝子として、条件検討を行った。

- ・C57/BL6マウス（♂、6週齢）
- ・n=2
- ・使用アンチセンス：ASO13-1
- ・尾静脈内投与
- ・投与濃度：10 mg/kg
- ・投与後24、48、72時間後に肝臓を摘出し、total RNAを抽出
- ・抽出したtotal RNAに対して、qRT-PCRを行い、マウスColiおよびRps6kb2 mRNAの量を定量、発現抑制を確認

B-3. オフターゲット効果の評価

B-3-1. *in silico*解析によるオフターゲット候補遺伝子の再抽出

「B-2. オフターゲット効果の評価に用いるGapmer型アンチセンスの配列の決定」における*in silico*解析では、大量の仮想eGFPアンチセンス（2117配列）の中から、「多くのヒト遺伝子と相補結合するアンチセンス配列」を選別するため、検索アルゴリズムGGRNA（公開版）を用いて高速検索を行った。具体的には、ミスマッチの最大許容数として以下の値を用いた。

- 13 塩基長アンチセンス：最大許容数 2
- 15 塩基長アンチセンス：最大許容数 3
- 18 塩基長アンチセンス：最大許容数 3

ここで行う*in silico*解析では、上述の*in silico*解析と*in vitro*解析で選別された配列に関して、より広くオフターゲット候補遺伝子を抽出するためにGGRNA

を独自に改良し、ミスマッチの許容範囲を以下のよう
に拡大した。

- ・ 検索アルゴリズム：
GGRNAを独自に改変してミスマッチの許容数を
拡大
- ・ 検索対象：ヒト転写産物データベース
(NCBIが提供するRefseq60)
- ・ 相補の不適合性：
ミスマッチを許容して検索、ミスマッチの最大許
容数は以下のとおり

13 塩基長アンチセンス：最大許容数 3 (注)

15 塩基長アンチセンス：最大許容数 4 (注)

18 塩基長アンチセンス：最大許容数 5 (注)

(注) 上記の許容数を超えて検索を行うと、ほとん
どのヒト遺伝子がヒットしてしまうほど特異性が
失われる。すなわち、上に示したミスマッチの許
容数はそれぞれの塩基長において「最も相補性の
条件を緩めた設定」と考えることができる。

B-3-2. マイクロアレイ解析

B-3-2-1. ヒト培養細胞株を用いた解析

マイクロアレイのサンプル調整

- ・ eGFP安定発現HEK293細胞
- ・ n=4
- ・ 細胞数 1.5×10^5 cells/well (12 well plate)
- ・ Lipofection法で導入 (Lipofectamine2000)
- ・ 使用アンチセンス (図表14)
ASO13-1, ASO13-2, ASO13-3
ASO15-1, ASO15-2, ASO15-3
ASO18-1, ASO18-2
- ・ 最終濃度10 nMでアンチセンスを導入
- ・ 37°C、5 %CO₂で培養
- ・ 24時間培養後total RNAを抽出

オンターゲット効果の確認

eGFP-HEK293細胞から抽出したtotal RNAを用い
て、eGFP mRNAの発現についてqRT-PCRで発現を確

認した。

細胞生存率の評価

- ・ Cell Count Reagent SF (ナカライテスク)を用いて、
添付のプロトコールに従いWST-8アッセイを実施
した。
- ・ ミトコンドリアの酵素によりWSTが還元されて
生成した水溶性のホルマザン量 (=ミトコンドリ
ア酵素活性 \propto 細胞の生存率)を450 nmにおける吸
光度を測定し、下記の計算式で細胞生存率を算出
した。

「細胞生存率」=

“アンチセンス作用群の450 nmにおける吸光度” /
“コントロール群の450 nmにおける吸光度”

- ・ コントロール群はLipofectamine2000のみ (アンチ
センス無し) 作用群とした。

B-3-2-2. マウス肝培養細胞株を用いた解析

マイクロアレイのサンプル調整

- ・ Numuli細胞 (マウス肝由来細胞株)
- ・ n=4
- ・ 細胞数 1.5×10^5 cells/well (12 well plate)
- ・ Lipofection法で導入 (Lipofectamine2000)
- ・ 最終濃度50 nMでアンチセンスを導入
- ・ 37°C、5 %CO₂で培養
- ・ 24時間培養後total RNAを抽出

オンターゲット効果の確認

Numuli細胞から抽出したtotal RNAを用いて、マウ
スApoB mRNA、あるいは、マウスPCSK9 mRNAの
発現についてqRT-PCRで発現を確認した。

細胞生存率の評価

「B-3-2-1. ヒト培養細胞株を用いた解析」と同様
に解析を行った。

B-3-2-3. マウスを用いた解析

マイクロアレイのサンプル調整

- ・ C57/BL6マウス (♂、6週齢)
- ・ n=4
- ・ 尾静脈内投与
- ・ 投与濃度
mApoB-13 : 5 mg/kg
mPCSK9-13 : 20 mg/kg
(対照群は生理食塩水を投与)
- ・ 投与後24時間後 (mApoB-13投与群、mPCSK9-13投与群)、48時間後 (mApoB-13投与群、mApoB-12投与群) に肝臓を摘出し、total RNAを抽出

オンターゲット効果の確認

マウス肝臓から抽出したtotal RNAを用いて、マウスApoB mRNA、あるいは、マウスPCSK9 mRNAの発現についてリアルタイムPCRで発現を確認した。

B-3-2-4. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた解析

マイクロアレイのサンプル調整

- ・ PXBマウス (♂、12週齢)
- ・ n=3
- ・ 尾静脈内投与
- ・ 投与濃度
ASO13-1 : 20 mg/kg
ASO13-2 : 20 mg/kg
(対照群は生理食塩水を投与)
- ・ 投与後72時間後に肝臓を摘出し、total RNAを抽出

B-3-3. マイクロアレイのデータ解析

マイクロアレイ解析およびマイクロアレイにより得られたデータの解析手順の概要は以下のとおりである。

使用アレイ

Affymetrix社の以下のアレイを使用。

- ・ Human Genome U133 Plus2.0 Array
(ヒト培養細胞、ヒト肝細胞キメラマウス)
- ・ Mouse Genome 430 2.0 Array

(マウス肝培養細胞、マウス個体)

データ解析の手順

1. 解析ソフトウェアGeneChip Operating software 1.4 (MAS5.0) を用いて、プローブセットごとのシグナル値を算出した。
2. GeneChipによる遺伝子発現データを解析に使用するため、GeneChip Operating Software 1.4を用いてシグナル値の平均が一定となるようにデータを正規化した。
3. Detection call (各シグナル値の信頼性の指標 : Present, marginal, absent) に基づいて、信頼性の低いデータを除去した。その際、コントロール群あるいはアンチセンス作用群でn=4のうち少なくとも3つ以上のデータでPresent判定のものを有効データとした。
4. 2群間比較を行い、得られたp.valueから統計学的多重性を考慮しBenjamini-Hochberg (BH) 法を用いて、False Discovery Rate (FDR) を算出し、 $FDR \leq 0.05$ を満たすプローブセットを抽出した。
5. オフターゲット遺伝子の発現変動の解析において、1つの遺伝子に対して複数のプローブセットがある場合は、Fold Change (FC) 値 (FC = アンチセンス作用群のシグナル値 / コントロール群のシグナル値) の変動が最も大きいものを採用した。

B-3-4. オフターゲット効果の評価

「B-3-1. *in silico*解析によるオフターゲット候補遺伝子の再抽出」において抽出したそれぞれのオフターゲット候補遺伝子群 (完全相補群、1塩基ミスマッチ群、2塩基ミスマッチ群等) に関して、アンチセンス導入による発現変動を統計解析した。データ整理の手順は以下のとおりである (図表22と対応させて参照のこと)。

1. *in silico* analysis

「B-3-1. *in silico*解析によるオフターゲット候補遺伝子の再抽出」において算出した数値を記載した。

2. On Array

「1. *in silico* analysis」で抽出した遺伝子に対して、Human Genome U133 Plus2.0 Array、あるいはMouse Genome 430 2.0 Array上に実際にプローブセットが設定されている遺伝子の数を記載した。

3. Present

「2. On Array」で選んだ遺伝子のうち、コントロールあるいはアンチセンス添加サンプルのどちらかにおいて、試行回数4回中3回以上で“Present”と判定された遺伝子の数を記載した。ただし、「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた解析」では、例数3で実施したため、試行回数3回中2回以上で“Present”と判定された遺伝子の数を記載した。

4. Varied

「3. Present」の遺伝子群のうちアンチセンスの添加で発現が有意に変動した遺伝子の数を記載した。

ヒト培養細胞・マウス肝培養細胞

: FDR<0.05

マウス個体・ヒト肝細胞キメラマウス

: p value<0.05

5. Down regulated

「4. Varied」の遺伝子群のうちアンチセンスの添加で発現が50%未満に変動した遺伝子の数を記載した。

6. Percentage

「Down regulated」×100／「Present」の値を算出し、記載した。この数値は、「細胞あるいは肝臓に発現する遺伝子の数のうち、アンチセン

スの添加で発現が50%未満に有意に変動した遺伝子の数の割合(%)」を示している。

なお、図表22の「Others」とはアンチセンスと相補性がない遺伝子群のグループを示している。今回のマイクロアレイ解析の結果を視覚的に捉えるために、“Present”と判定された有効データを使って、Scatter Blot図、Histogram図、Cumulative図の3つのグラフで遺伝子発現変動を表現した。それぞれの詳細は以下のとおりである。

Scatter Blot図：横軸にコントロール検体における各遺伝子の発現量を、縦軸にアンチセンス導入による発現変化の割合(log値表示)を示した図

Histogram図：縦軸に遺伝子の数を、縦軸にアンチセンス導入による発現変化の割合(log値表示)を示した図

Cumulative図：横軸に遺伝子の累積数を、縦軸にアンチセンス導入による発現変化の割合(log値表示)を示した図

本報告書では研究内容とマイクロアレイの解析データの間を整理するため、図表16に「掲載データ一覧表」をまとめた。適宜、参照して頂きたい。

B-3-5. 「細胞」と「個体」におけるオフターゲット効果発現の比較

「B-3-4. オフターゲット効果の評価」の解析結果をもとに、「マウス細胞とマウス個体」のオフターゲット候補遺伝子の発現変動について、比較を行った。マイクロアレイ解析において、1つの遺伝子に対して複数のプローブセットがある場合は、Fold Change (FC) 値 (FC=アンチセンス作用群のシグナル値/コントロール群のシグナル値) の変動が最も大きいものを発現変化の値として用いている。これを「細胞」と「個体」の比較にそのまま適応すると、同じ遺伝子に対して異なるプローブセットで比較してしまう可能性がある。これを回避するために、本解析

においては1つの遺伝子に対して複数のプローブセットがある場合は、すべてのプローブセットで比較を行うこととした。このようなケースは全体数と比較して少数であるため、以降では「プローブセット」を「オフターゲット候補遺伝子」として扱い、表記することとした。

培養細胞を用いたオフターゲット効果の解析から個体組織のオフターゲット効果を予測する前提として、培養細胞に発現する遺伝子群が組織に発現する遺伝子群と類似していることが望ましい。この観点を検証するために、マウス肝培養細胞とマウス肝臓で共通に発現する遺伝子がどの程度存在するか検証を行った。具体的には、“Present”と判定されたプローブセットを当該細胞 or 組織に発現している遺伝子と考え、マウス肝培養細胞とマウス肝臓の関係をベン図として表現した(図表79、80、81)。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した「ヒト肝細胞キメラマウス」の作成の際に用いた「ヒト肝細胞」については、インフォームド・コンセントが得られた市販のヒト凍結肝細胞を利用した。動物実験においては、国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規定に従った。

C. 結果

C-1. ヒト培養細胞を用いたオフターゲット効果の解析

オフターゲット効果の検証に用いるアンチセンスの選別

eGFP mRNAに対して、13、15、18塩基長で考えられる全ての相補配列を設計し(13塩基長:708本、15塩基長:706本、18塩基長:703本)、*in silico*解析により「できるだけ多くのヒトmRNAと相補結合するアンチセンス」および「できるだけ相補しないアンチセンス」を選別した(図表10)。抽出されたオフターゲット候補遺伝子の数の結果の一部を、図表17-19にまとめている。*in silico*解析の結果をもとに、13塩基長のアンチセンスを3本、15塩基長のアンチセンスを18本、18塩基長のアンチセンスを39本、合計60

本選別・合成し、「オンターゲット効果の強度によるアンチセンスの絞り込み(図表12)」に進めた(図表10)。

次に、60本のアンチセンスそれぞれをeGFP安定発現HEK293細胞に導入し、eGFP mRNAの発現抑制効率を調べた(図表12)。その結果、26本のアンチセンスにおいて50%未満まで発現抑制が観察された(図表20)。この結果と*in silico*解析の結果を考慮して、以降のオフターゲット効果の解析に用いる8本のアンチセンス(13塩基長:ASO13-1、ASO13-2、ASO13-3、15塩基長:ASO15-1、ASO15-2、ASO15-3、18塩基長:ASO18-1、ASO18-2)のアンチセンスを決定した。このうち、ASO13-3、ASO15-3、ASO18-2は「オフターゲット候補遺伝子が極力少なく、かつ、高いeGFP mRNA分解活性を有するアンチセンス」として同定したものである(図表14)。

オフターゲット効果の解析

本研究の目的は、「①Gapmer型アンチセンスがオフターゲット効果を誘導するのか検証を行うこと」、「②オフターゲット効果が起こる配列条件を明らかにすること」である。そこで、本研究ではオフターゲット効果が観察されやすいと思われる条件として、「できるだけ高濃度のアンチセンスを導入し、かつ、顕著な細胞毒性がみられないこと(細胞生存率70%以上)」を設定し、オフターゲット効果の検証を行うこととした。具体的には、ASO13-1、ASO13-2、ASO13-3、ASO15-1、ASO15-2、ASO15-3、ASO18-1、ASO18-2の各アンチセンスを最終濃度10 nMでeGFP HEK293細胞に導入した後、24時間後にeGFP mRNAの発現ならびに細胞生存率を調べた(図表21)。いずれのアンチセンスにおいても40%未満まで発現抑制が認められ、かつ、70%以上の細胞生存率が確認されたため、この条件でオフターゲット効果の解析を行うこととした。マイクロアレイ解析は試行回数n=4で行い、ミスマッチを有するオフターゲット候補遺伝子の発現変動を調べた。

本研究で用いたアンチセンスは、オフターゲット候補遺伝子が多いものが5本(ASO13-1、ASO13-2、ASO15-1、ASO15-2、ASO18-1)、オフターゲット候

補遺伝子が少ないものが3本 (ASO13-3、ASO15-3、ASO18-2) である (図表14)。以降では、基本的にオフターゲット候補遺伝子が多いアンチセンスについての結果を議論することとし、一部でオフターゲット候補遺伝子が少ないアンチセンスとの比較を行う。

ASO13-1を用いた解析では、ASO13-1と相補性のない遺伝子 (Other) が50%未満に減少する割合は11.2%であるのに対し、ASO13-1と0塩基 (完全相補)、1塩基、2塩基、3塩基のミスマッチを有する遺伝子ではそれぞれ73.3%、57.9%、31.0%、19.2%であった (図表22)。すなわち、「50%未満に減少する割合」はオフターゲット効果の概念から予測されるように、相補性の程度と完全に相関していた。Scatter Blot図 (図表23)、Histogram図 (図表24)、Cumulative図 (図表25) を見ると、いずれにおいても完全相補 (赤)、1塩基ミスマッチ (黄色)、2塩基ミスマッチ (黄緑)、3塩基ミスマッチ (緑) の遺伝子の順に、50%未満まで発現抑制されている遺伝子の割合が大きいことを視覚的に捉えることができる。ASO13-2についても、50%未満に減少する割合は相補性の程度と相関していた (図表26-29)。ASO13-1、ASO13-2のいずれにおいても、3塩基ミスマッチを有するオフターゲット候補遺伝子の抑制効果は相補性のない遺伝子 (Other) よりも大きいことから、13塩基長のGapmer型アンチセンスは、今回の条件 (培養細胞にリポフェクション法でアンチセンスを高濃度で導入) では、少なくとも3塩基ミスマッチを有する遺伝子まではオフターゲット効果の影響を受ける可能性があるといえる。

次に「オフターゲット候補遺伝子が非常に少ない」アンチセンスであるASO13-3の結果とASO13-1およびASO13-2の結果を比較すると、明確な違いが2点観察される。1つ目はScatter Blot図において、ASO13-3はASO13-1、ASO13-2と比較して、遺伝子発現変動が非常に小さいこと (図表31 vs 図表23、27)、もう1つは、相補性のない遺伝子群 (Other) において50%未満に発現抑制される割合が小さい点である (ASO13-3 : 1.6% vs ASO13-1、ASO13-2 : 11.2%、4.1%)。いずれの現象においても、違いが生じる要因の一つと考えられるのは、オフターゲット効果に

続いて起こると考えられる二次的な発現変動の影響である。すなわち、オフターゲット候補遺伝子が多いアンチセンスは相補結合する遺伝子の数が多いため、それに伴い発現変動する遺伝子が多くなるが、さらにオフターゲット遺伝子が抑制された影響により二次的に発現変動する遺伝子も増加すると考えられる。これらの二次的発現変動は、①発現抑制と発現亢進の両方が起こる、②アンチセンスと相補性がない遺伝子に関しても発現の変動が起こる、③オフターゲット遺伝子が転写を制御するシグナル経路の上流に位置する場合、1つの遺伝子発現抑制が多くなる遺伝子の発現変動に繋がる、という特徴が考えられ、実際に観察される現象とつじつまがあう。特に①に関しては、ASO13-1およびASO13-2のScatter Blot図 (図表23、27) がASO13-3 (図表31) と比べ、発現抑制だけでなく、発現上昇の方向にも大きく変動していることと一致する。以上の傾向は、15塩基長 (ASO15-3 vs ASO15-1、ASO15-2)、18塩基長 (ASO18-2 vs ASO18-1) でも同様であり、ヒトmRNAと相補性の少ないアンチセンスを選択することにより、直接的な影響を抑制できるだけでなく、遺伝子発現変動に起因するリスク全体を大幅に低減させることができると考えられる。

15塩基長および18塩基長のアンチセンスでは (図表34-53)、13塩基長のアンチセンスと比べ、ミスマッチの影響が小さくなる傾向が観察された。例えば、13塩基長と15、18塩基長のCumulative図を比較すると (図表25、29 vs 図表37、41、49)、3ミスマッチを有する遺伝子群の発現変動は塩基長が長い方が左にシフトしており、オフターゲット効果の影響を受けやすいと考えられる。「50%未満に発現抑制される割合」で見た場合にも、例えば、2塩基ミスマッチを有する遺伝子は、ASO13-1およびASO13-2では31.0%と11.1% (図表22、26)、ASO15-1およびASO15-2では51.4%と21.7% (図表34、38)、ASO18-1では87.5% (図表46) であり、塩基長が長くなるほど同じミスマッチ数を許容しても発現抑制の起こる確率は高くなる傾向にあることがわかった。以上の結果は、図表9で示した「オフターゲット効果とアンチセンス塩基長の関係の二面性」の概念のうち、

「塩基長が長いほど、アンチセンス-RNA間の結合力は増大するため、ミスマッチを許容しやすい」ことを実験的に示していると思われる。

「オフターゲット効果の影響を受ける可能性があるアンチセンスの配列条件」としては、「50%未満に発現抑制される割合」で評価すると、15塩基長のアンチセンスでは少なくとも4塩基ミスマッチを有する遺伝子まで(図表34、38)、18塩基長のアンチセンスでは少なくとも5塩基ミスマッチを有する遺伝子まで(図表46)がオフターゲット効果の影響を受ける可能性があるといえる(ただし、後に詳述するように、この結果は培養細胞にアンチセンスを高濃度で導入した時の遺伝子発現変化であることに留意する必要がある)。

C-2. マウス肝培養細胞とマウス個体を用いた解析

本研究では、「オフターゲット効果の発現を細胞レベルで予測/評価することの妥当性」について科学的根拠を示すために、同じアンチセンスを用いて、培養細胞(マウス肝臓細胞)と個体(マウス肝臓)におけるオフターゲット効果を検証し、両者を比較することとした。

マウス肝培養細胞を用いたオフターゲット効果の解析

本研究では、ヒト細胞を用いた解析と同様に、オフターゲット効果が観察されやすいと思われる条件として、「できるだけ高濃度のアンチセンスを導入し、かつ、顕著な細胞毒性がみられないこと(細胞生存率70%以上)」を設定し、オフターゲット効果の検証を行うこととした。具体的には、mApoB-13およびmPCSK9-13の各アンチセンスを最終濃度50 nMでNumuLi細胞に導入した後、24時間後に各アンチセンスのオンターゲット遺伝子(mApoB mRNAあるいはmPCSK9 mRNA)の発現ならびに細胞生存率を調べた(図表54)。いずれのアンチセンスにおいても70%以上の発現抑制が認められ、かつ、80%以上の細胞生存率が確認されたため、この条件でオフターゲット効果の解析を行うこととした。マイクロアレイ解析は試行回数n=4で行い、ミスマッチを有するオフ

ターゲット候補遺伝子の発現変動を調べた。

まず、mApoB-13について解析すると、mApoB-13と相補性のない遺伝子(Other)が50%未満に減少する割合は3.4%であるのに対し、mApoB-13と完全相補、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチを有する遺伝子ではそれぞれ100%、50.0%、14.8%、6.8%であった(図表55)。なお、ここでの「完全相補遺伝子」にはオンターゲット遺伝子であるmApoBが含まれており、「Down Regulated」における「1」はmApoBに該当するので、オフターゲット効果の議論からは外すこととする。Scatter Blot図(図表56)、Histogram図(図表57)、Cumulative図(図表58)からも、1塩基ミスマッチ(黄色)、2塩基ミスマッチ(黄緑)、3塩基ミスマッチ(緑)の遺伝子の順に、50%未満まで発現抑制されている遺伝子の割合が大きいことを視覚的に捉えることができる。mPCSK9についても、mApoB13と同様の傾向が認められている。ヒト培養細胞を用いた解析と同様に、少なくとも3塩基ミスマッチを有する遺伝子までは、相補性がない遺伝子(Other)に比べて50%未満に減少する割合が高くなっており、オフターゲット効果の影響を受ける遺伝子が含まれていると考えられる(図表59-62)。

マウス個体を用いたオフターゲット効果の解析

次に、マウス個体を用いた解析を行った。まず、mApoB-13を用いて、オフターゲット効果の評価する条件設定を行った。mApoB-13を20 mg/kgでC57/BL6マウス(♂、6週齢)に尾静脈内投与し、それぞれのグループで24、48、72時間後に肝臓を摘出し、mApoB mRNAの発現量を調べた(図表63)。その結果、投与後24、48、72時間のいずれのタイミングの肝臓においても、著しい発現抑制が認められた(図表64)。この結果を受け、オフターゲット効果の解析においては、投与後24および48時間後の肝臓を用いることとした。また、投与量に関しては、十分な発現抑制が観察された「mApoB-13 : 5 mg/kg」および「mPCSK9-13 : 20 mg/kg」の条件を用いた(データ未掲載)。以上の条件でマイクロアレイ解析に用いるマウス肝臓由来のtotal RNAを調製し、オンターゲット

ト遺伝子が20%以下に発現抑制されることを確認した。マイクロアレイ解析は試行回数n=4で行い、ミスマッチを有するオフターゲット候補遺伝子の発現変動を調べた(図表65、66)。

本解析は2本のアンチセンス(mApoB13、mPCSK9-13)について、2つのタイムポイント(24 or 48時間後)で解析を行っているが、ここでは「mApoB-13、24時間後」の結果について記述する(図表67-70)。mApoB-13の投与24時間後においては、mApoB-13と相補性のない遺伝子(Other)が50%未満に減少する割合は0.7%であるのに対し、mApoB-13と完全相補、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチを有する遺伝子ではそれぞれ50.0%、13.6%、3.7%、0.9%であった(図表67)。すなわち、マウス肝臓においても相補性の程度に応じてオフターゲット効果が誘導されていることがわかった。マウス肝培養細胞での解析と同様に、ここでの「完全相補遺伝子」はオンターゲット遺伝子であるmApoBを含んでおり、「Down Regulated」に記載されている「1」はmApoBに該当するので、オフターゲット効果の議論からは外すこととする。マウス肝培養細胞の結果と比較すると、いずれのミスマッチ群でも50%未満に減少する割合は低下しており、Scatter Blot図(図表68)、Histogram図(図表69)、Cumulative図(図表70)からも視覚的に判断できた。なお、mApoB-13の投与後48時間後、ならびにmPCSK9-13の投与後24、48時間後を用いた解析においても、同様の傾向が認められている(図表71-78)。

マウス細胞とマウス個体を用いたオフターゲット効果の解析の比較

「オフターゲット効果の発現を細胞レベルで予測/評価することの妥当性」を検証するため、細胞(マウス肝培養細胞)と個体(マウス肝臓)における遺伝子発現変動を比較した。まず、「培養細胞に発現する遺伝子群が組織に発現する遺伝子群とどれくらい共通性があるか」を検証した。マイクロアレイ解析から、「Present」と判定されたプローブセットを当該細胞 or 組織に発現している遺伝子と考え、マウス肝培養細胞とマウス肝臓で共通して発現している遺

伝子群を調べた。「マウス肝培養細胞を用いたオフターゲット効果の解析」および「マウス個体を用いたオフターゲット効果の解析」で用いたControl群について比較すると、マウス個体で“Present”と判定された遺伝子の約80%はマウス細胞で“Present”と判定された遺伝子と共通であった(図表79)。また、mApoB-13あるいはmPCSK9-13を用いた解析で“Present”と判定された遺伝子を比較しても、同様の結果であった(図表80-81)。すなわち、マウス肝臓に発現する遺伝子の約8割は、マウス肝培養細胞を用いたオフターゲット効果の解析によって評価できると考えられる。一方で、培養細胞に発現していない残り2割の遺伝子に関しては、*in vitro*試験では評価ができないことになる。

次に、共通して“Present”と判定された遺伝子の中に含まれるオフターゲット候補遺伝子のうち、50%未満に発現抑制が認められた遺伝子の数を算出した。図表82は、mApoB-13を投与して24時間後のマウス肝臓と、同じアンチセンスを添加したマウス肝培養細胞の結果を比較したものであるが、マウス肝臓において50%未満に発現抑制された遺伝子は全て、マウス肝培養細胞においても50%未満に発現抑制されていた(図表82)。Scatter Blot図を見ると、マウス個体で発現抑制の程度が強いものはマウス肝培養細胞でも強く抑制されている傾向がわかる(図表83-85)。また、上述のように個体で50%未満に抑制される遺伝子のほとんどは、細胞でも50%未満に抑制される様子が観察される(図表83-85)[マウス肝臓においてオフターゲット効果がみられた遺伝子(横方向の青い点線より下側にプロットされた遺伝子)のほとんどは、培養細胞を用いた解析でも50%未満まで抑制されている(縦方向の青線より左にプロットされる)]。以上の結果から、個体の組織で起こるオフターゲット効果は、培養細胞を用いた*in vitro*試験において高い確率で予測できると考えられる。

共通して“Present”と判定されたオフターゲット候補遺伝子について、50%未満に発現抑制された遺伝子の割合を見ると、いずれの遺伝子群においてもオフターゲット効果が起こる確率は「細胞>個体」

となる傾向が認められた(図表87)。この結果は、リポフェクション法で高濃度のアンチセンスを投与する今回の条件では、培養細胞の方が個体組織よりオフターゲット効果が起こりやすいことを示している。オフターゲット効果が起こる遺伝子をもれなくピックアップするという意味で、今回の培養細胞を用いた解析条件は有用と考えられる。一方で、個体におけるオフターゲット効果の発現をより正確に再現するためには、細胞に投与するアンチセンスの濃度を調整して検討することも重要であろう。なお、mApoB-13を投与して48時間後のマウス肝臓との比較(図表88-93)、mPCSK9-13を投与した際の細胞と肝臓の比較(図表94-99)についても同様の傾向が認められている。

以上の考察は、組織に発現している遺伝子が培養細胞にも発現している場合(およそ80%の確率で該当)に成り立つものであり、細胞に発現していない場合には予測できないので留意が必要である。

C-3. ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス)を用いた解析

本研究では、「Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果の評価におけるヒト肝細胞キメラマウスの有用性」の検証を行った。まず、本解析で使用するASO13-1を用いて、オフターゲット効果を解析する条件設定を行った。ASO13-1を10 mg/kgで正常マウスに尾静脈内投与後、24、72時間後に肝臓からtotal RNAを抽出し、肝臓に発現するColi mRNAおよびRps6kb2 mRNA(=ASO13-1が完全相補するマウス遺伝子)の発現を調べた(図表100)。その結果、20~40%程度まで発現が抑制された(図表101)。マウス個体を用いたアンチセンスの有効性としては、mApoBおよびmPCSK9を標的としたアンチセンスでも検討を行っているが、この際は10%程度まで発現が抑制されている(図表64、66)。この観点から、ヒト肝細胞キメラマウスに対する投与量は、より強いオンターゲット効果を期待して20 mg/kgに設定した。解析のタイミングは、より強い発現抑制が観察される投与後72時間後とした(図表101)。マイクロアレイ解析は試行回数n=3で行い、ミスマッチを有する

オフターゲット候補遺伝子の発現変動を調べた。

まず、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓における遺伝子発現変動を、ヒト細胞や通常マウスを用いた解析と比較すると、発現変動している遺伝子の絶対数が非常に少ない傾向が観察された。例えば、相補性のない遺伝子群(Other)において有意に発現変動した遺伝子数(Varied)を比較すると、ヒト細胞や通常マウスを用いた解析では4桁(数千)の遺伝子が有意に変動するのに対し(図表22、26、30、34、38、42、46、50、55、59、67、71、75)、ヒト肝細胞キメラマウスでは317(図表102:ASO13-1投与)および354(図表106:ASO13-2投与)と3桁の遺伝子数しか変動していなかった。このように発現変動した遺伝子数が全体として1オーダー低い値となっていることから、ヒト肝細胞キメラマウスでは細胞内に到達したアンチセンス量が十分ではなかったと考えられる。今回の投与量は、正常マウスではオンターゲット効果が十分に確認できる程度にアンチセンスが肝臓に到達していることから(図表101)、通常マウスの肝臓とヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、アンチセンスの細胞内取り込みの過程などに違いがみられると予想される。ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓に十分量のアンチセンスを導入するには、さらに高い投与量が必要と考えられ、投与量を設定する際にもヒト肝細胞キメラマウスを用いる必要があると思われる。

以上のように、ヒト肝細胞キメラマウスでは十分量のアンチセンスが取りこまれていないと考えられるが、この前提でオフターゲット候補遺伝子の発現変動に関して結果を述べる。ASO13-1では、完全相補する遺伝子がヒト肝細胞キメラマウスの肝臓に16発現しているが、このうち2つの遺伝子は50%未満に発現抑制されていた(図表102)。Scatter Blot図(図表103)およびCumulative図(図表105)においても、完全相補の遺伝子(赤)が発現抑制の影響を受けている様子が観察される。従って、肝臓に到達したアンチセンスの量は少なかったと予想されるものの、相補性の高い遺伝子については、オフターゲット効果の影響を受けていることがわかり、ヒト肝臓のオフターゲット効果を個体で検証できるという点にお

いて、ヒト肝細胞キメラマウスが有用であることが示唆された。なお、ASO13-2では完全相補する遺伝子数が少なく、今回の投与条件ではオフターゲット候補遺伝子の発現変動を明確に捉えることができなかった(図表106-109)。ASO13-1、ASO13-2のいずれについても、投与量を増加させた条件で再検討する必要がある。

D. 考察

発現抑制の程度と安全性の関連

Gapmer型アンチセンスのように、mRNAを切断・分解するタイプの核酸医薬の場合、「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、「ヒト培養細胞に対し、核酸医薬品を添加していない条件(あるいはコントロールのオリゴ核酸を添加した条件)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」と考えるのが適当と思われる。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いう遺伝学的な知見に基づき、「50%未満まで低下した場合」と規定するのが妥当と考えられる。以上は、一般論から導いた線引きであるので、遺伝子によっては当該遺伝子に特有の性質を加味して安全性を判断すべきと考えられる。以降では、「オフターゲット効果あり」の判断基準を、「アンチセンスと相補性を有する遺伝子が50%未満に発現抑制された場合」とする。

オフターゲット候補遺伝子を抽出する際の相補性の基準

「B-3-1. *in silico*解析によるオフターゲット候補遺伝子の再抽出」では、オフターゲット候補遺伝子を抽出する際、ミスマッチの最大許容数を「3塩基長アンチセンス=3」、「15塩基長アンチセンス=4」、「18塩基長アンチセンス=5」とした。

まず、13塩基長のアンチセンスについて、ミスマッチの許容数の妥当性を考える。例えば、「ASO13-1」を用いた解析の場合、eGFP安定発現HEK293細胞で“Present”と判定された遺伝子数は「12,404」であるのに対して、抽出したオフターゲット候補遺伝子の数は、

$$\begin{aligned} & \text{「0 mis」} + \text{「1 mis」} + \text{「2 mis」} + \text{「3 mis」} \\ & = 15 + 114 + 1,195 + 4,246 = \text{「5,570」} \end{aligned}$$

であった(図表22)。これは、HEK293細胞に発現する遺伝子の「44.9%」に当たる。培養細胞を用いた解析で使用した他の13塩基長アンチセンス(ASO13-2、ASO13-3、mApoB-13、mPCSK9-13)についても同様の計算を行うと、それぞれ、39.3%、11.3%、27.2%、31.0%の遺伝子がオフターゲット候補遺伝子として抽出された(図表110)。また、マウス個体を用いた解析においても、その数値は同程度のものであった(図表110: 26.9%、27.0%、30.1%、43.8%、38.5%)。このように、13塩基長の場合、今回のようにミスマッチの許容数を「3」とすると、オフターゲット候補遺伝子は遺伝子総数の4分の1から半分程度の遺伝子が「オフターゲット候補遺伝子」として抽出される(ASO13-3は、「できるだけヒト遺伝子にヒットしない配列」として選別したため、割合が低くなっている)。この値は、確率論で算出した「13塩基長のアンチセンスにおいて、3塩基ミスマッチまでの不適合性を許容した際のヒト遺伝子数の理論値」が「 $33 + 596 + 6,559 = 7,188$ (図表113)」であり、ヒト遺伝子の3~4割程度に相当することと一致している。

この状況において、13塩基長のアンチセンスに対し、仮にミスマッチの許容数を「4」まで拡大すると、殆どの遺伝子にヒットしてしまうほど特異性が低くなり(データ未掲載)、*in silico*解析の目的が失われてしまう。以上の考察から、13塩基長のアンチセンスの場合、オフターゲット候補遺伝子の抽出は、「ミスマッチ3」まで検索を行えば十分であると考えられる。同様の考え方に基づき、15塩基長のアンチセンスでは「ミスマッチ4」、18塩基長のアンチセンスでは「ミスマッチ5」までのオフターゲット候補遺伝子を抽出すれば十分である(図表110)。

オフターゲット効果の影響を受ける遺伝子の配列条件

ヒト培養細胞を用いた解析では、13塩基長のアンチセンスは3塩基まで、15塩基長のアンチセンスは4塩基まで、18塩基長のアンチセンスは5塩基までのミスマッチを有する遺伝子は、ハイブリタイゼーション依存的オフターゲット効果(=50%未満まで発現抑制)の影響を受ける可能性があることがわかった。完全相補や1塩基ミスマッチなど相補性が高い遺伝子はオフターゲット効果を受ける確率が高いが、相補性が低くても影響を受ける場合があると解釈される。この結果について留意すべき点として、今回の解析は、「オフターゲット効果が最も起こりやすい条件」で検証を行っている点が挙げられる。すなわち、高濃度のアンチセンスをリポフェクション法で細胞に導入した解析結果から得られた基準である。

一方、実際にアンチセンスが作用する個体の組織においては、オフターゲット効果の発現は培養細胞を用いた上記の条件と比較して弱いと考えてよい。一例として、13塩基長のアンチセンスmApoB-13を導入した際の1塩基ミスマッチの遺伝子群の変化を考える(図表84)。mApoB-13と1塩基ミスマッチを有する遺伝子群はマウス肝培養細胞、マウス肝臓ともに発現が抑制される傾向にあり、第3象限にプロットが集まるが、プロットは「 $y=x$ 」を示す斜めのグレーラインより、左/上側に集中している(図表84)。これは横軸に示した培養細胞における発現抑制より、縦軸に示したマウス肝臓における発現抑制の程度が弱いことを示している。また、プロットされた点は右上がりに配置される傾向にあり(すなわち正の相関があり)、マウス肝臓において発現が強く抑制された遺伝子は、培養細胞においても強く発現抑制される傾向にあることがわかる。以上に指摘した点は、他のアンチセンスの結果を含め、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチのオフターゲット候補遺伝子で顕著である(図表84、85、90、91、96、97)。

完全相補する遺伝子は、マウス肝臓、マウス肝培養細胞のいずれにおいても強く抑制されており、個体組織においてもオフターゲット効果の影響を非常

に高い確率で受けると考えてよいであろう。一方、3塩基ミスマッチを有する遺伝子については、上述した第3象限にプロットが集まる傾向や正の相関性が失われている(図表86、92、98)。従って、マウス肝臓においては3塩基ミスマッチを有する遺伝子はオフターゲット効果の影響がほとんどないと解釈できる。

上記の考察は遺伝子発現抑制の程度を限定していないが、図表87、93、99では、マウス肝培養細胞とマウス肝臓において50%未満に発現抑制される遺伝子に限定して、その割合を示している。マウス個体(肝臓)は、マウス肝培養細胞よりもオフターゲット効果の影響を受けにくく、また、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチの遺伝子については、マウス肝臓ではほとんど影響を受けないことがわかる。

以上の点を考えあわせると、①個体組織におけるオフターゲット効果の発現は培養細胞よりも弱い傾向にある、②培養細胞を用いた解析で、個体組織におけるオフターゲット効果が予測できる、③相補性が高い遺伝子(完全相補、1塩基ミスマッチ)に関しては特に予測性が高い、と考察できる。また、マウス肝臓において、オフターゲット効果が誘導される遺伝子の配列条件については、「1塩基ミスマッチを有する遺伝子までがオフターゲット効果の影響を受ける」と結論づけられる(ただし、13塩基長アンチセンスに限定した結果である)。

以上は、今回解析を行った複数本のGapmer型アンチセンスから導かれた結論であり、オフターゲット候補の発現に関し、おおよその目安を与えるものである。実際には、Gapmer型アンチセンスの開発候補品毎に発現変動の程度が変化すると考えられるので、ヒトにおいてオフターゲット効果が起こる遺伝子を予測するには、以下のような手順が一つのモデルになると考えられる(ここでは例としてヒト肝臓におけるオフターゲット効果の予測を想定する)。

1. *in silico*解析: 適切な検索アルゴリズム^(注)を用いてオフターゲット候補遺伝子を幅広く抽出する。目安は、13塩基長アンチセンス: 3塩基ミスマッチまで、15塩基長アンチセンス: 4塩基ミスマッチま

で、18塩基長アンチセンス：5塩基ミスマッチまでが適切と思われる。

(注) 適切な*in silico*解析の検索アルゴリズムに関しては、「厚生労働科学研究 創薬基盤推進研究事業」における「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発、Ⅲ. 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発」の26年度報告書にとりまとめているのでそちらを参照して頂きたい。

2. *in vitro*解析(その1): ヒト肝培養細胞に十分にオンターゲット効果が得られる量のアンチセンスを導入し、マイクロアレイで50%未満に発現抑制されるオフターゲット候補遺伝子を特定する。

3. *in vitro*解析(その2): 医薬品を投与した際に予測されるヒト肝臓や他のヒト組織におけるアンチセンスの作用濃度を推定し、ヒト組織内の状況を模した条件で解析を行う。ここで50%未満まで発現抑制されるオフターゲット遺伝子はヒト組織でも抑制される可能性が高いので、当該遺伝子の発現時期、機能等を包括的に考え、有害作用の発現リスクを考察する必要がある。

4. 「1」で抽出したオフターゲット候補遺伝子のうち、「2」、「3」の解析で培養細胞に発現していないものはオフターゲット効果の発現を予測できていないことになる。図表87、93、99を考慮すると、解析できなかった遺伝子についても、完全相補、1塩基ミスマッチを有する遺伝子は50%未満まで発現抑制される可能性が高いと考えられる。これらの遺伝子は、「3」でポジティブだった遺伝子と同様に、発現抑制された際の有害作用の発現リスクを考察する必要があろう。

アンチセンスの塩基長とオフターゲット効果の関連

アンチセンスの塩基長とオフターゲット効果の発現には密接な関連があり、両者には二面性があると推定される(図表9)。すなわち、①塩基長が短いほど完全相補するRNA数は多くなるため、オフターゲ

ット候補遺伝子は増加すると考えられるが、一方で、②塩基長が長いほど、アンチセンス-RNA間の結合力は増大するため、ミスマッチ等の不適合性があってもオフターゲット効果は起こりやすいと考えられる。図表113には、13塩基長、15塩基長、18塩基長のアンチセンスと相補結合するヒトmRNA数の理論値を示している(理論値の算出に関しては、本研究課題の24年度報告書を参照して頂きたい)。本研究では、ヒト培養細胞を用いた解析から、13塩基長のアンチセンスは3塩基まで、15塩基長のアンチセンスは4塩基まで、18塩基長のアンチセンスは5塩基までのミスマッチを有する遺伝子がオフターゲット効果の影響を受ける可能性があることを示したが、その理論値はそれぞれ「 $33+596+6,559=7,188$ 」、「 $2+50+652+5,869=6,573$ 」、「 $1+18+206+1,727=1,952$ 」である(注)。つまり、塩基長が長くなるほど影響を受ける可能性のある遺伝子は減少する。特に、18塩基長を超えると相補結合する遺伝子が顕著に減少することから(図表113)、塩基長が長いアンチセンスの方がオフターゲット効果を受けにくいと示唆される。

(注) オフターゲット効果を受ける遺伝子数を算出するには、上記の理論値のそれぞれに「50%未満に発現抑制される割合」を乗じる必要がある。しかし、今回の検証ではアンチセンス毎に抑制される割合にある程度のバラツキがあり、平均値を算出するには検討本数が不十分であるため、この点の検証は行っていない。

オフターゲット効果の発現は個々のアンチセンスの配列に依存するので、より短い配列であっても配列を選択すれば影響を軽減できる可能性がある。今回解析を行った「ヒト遺伝子にできるだけ相補結合しないアンチセンス」であるASO13-3およびASO15-3の結果(図表30、42)を考えると、ヒトmRNAと相補性の少ないアンチセンスを選択することにより、オフターゲット効果の直接的なリスクだけでなく、二次的な発現変動によるリスクも低減させることができると考えられる。従って、医薬品開発の現場においては、アンチセンスを選別する比較的早い