

目 次

I.	「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」	
	分担研究報告書	
	「核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発」	
1.	スプライシング制御型アンチセンスによって引き起こされる「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」ならびに「自然免疫活性化」の評価に関する研究 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部第2室 室長 井上 貴雄 ……………	1
2.	スプライシング制御型アンチセンスによって引き起こされ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評価に関する研究 (<i>in silico</i> 解析) 日本新薬株式会社 東部創薬研究所 所長 高垣 和史 ……………	23
3.	スプライシング制御型アンチセンスによって引き起こされ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評価に関する研究 (オンターゲット効果の確認) 第一三共株式会社 研究開発本部 バイオ統括部 バイオ研究企画G 主査 飯村 信 ……………	29
4.	スプライシング制御型アンチセンスによって引き起こされる自然免疫活性化の評価に関する研究 扶桑薬品工業株式会社 主任研究員 富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 協力研究員 山本 誠司 ……………	33
5.	図表 ……………	41
II.	学会等発表実績 (3) ……………	73
III.	研究成果の刊行物・別刷 ……………	75

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発

研究分担者 井上 貴雄

国立医薬品食品衛生研究所 室長

スプライシング制御型アンチセンスによって引き起こされる
「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」
ならびに「自然免疫活性化」の評価に関する研究

近年、アンチセンスや siRNA など「RNA を標的とする核酸医薬品」の開発が著しく進展している。これらの医薬品の安全性を考える上で、核酸医薬品の薬効本体であるオリゴ核酸が標的遺伝子以外に作用し、有害作用を引き起こす「オフターゲット効果」に留意する必要がある。核酸医薬品によるオフターゲット効果は、①標的外 RNA と相補結合することにより生じる毒性（ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果）、②Toll 様受容体等のパターン認識受容体と結合することにより生じる毒性（自然免疫活性化）、③細胞内タンパク質と結合することにより生じる毒性、に分類することができるが、核酸医薬が先進的であるが故に、その評価法や安全性担保の評価基準は整備されていない。本研究課題では、近年開発が進んでいるスプライシング制御型アンチセンス医薬品に焦点を絞り、「①ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」ならびに「②自然免疫活性化」の評価法の確立を目指し、その基盤研究を行った。

スプライシング制御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ついては、「スプライシング変化を検出するポテンシャルを有する“高密度エクソンアレイ”が安全性評価の試験法になり得るか」を検証した。さらにこの過程で、「スプライシング制御型アンチセンスとどの程度の相補性を有する RNA のスプライシングが影響を受けるのか」についても検討を行った。この結果、高密度エクソンアレイによりスプライシングの変化（オフターゲット効果によりスプライスアウトされたエクソン）を検出することが可能であり、また、アンチセンスと RNA の相補性が高いほどエクソンスキップが起こりやすいことを見出した。また、「オフターゲット効果の影響を受ける RNA の配列条件」を明らかにした。

一方、自然免疫活性化に関しては、Toll 様受容体（TLR）導入細胞を用い、修飾型核酸を含むアンチセンスの自然免疫活性能について検証を行った。具体的には、近年開発されているアンチセンス医薬候補品の塩基長が短くなっていることを考慮し（<20 塩基）、20 塩基長

り短い配列でTLR9を活性化するポジティブコントロールのオリゴ配列を決定した。さらに、高機能性を付与する修飾型核酸を当該配列に導入することで、“スプライシング制御型アンチセンスとして機能しうるオリゴ核酸”をデザインし、これらの自然免疫活性化能をTLR9導入細胞により解析した。この結果、今回調べた修飾型核酸の多くについては、TLR9の活性化能を抑制する効果があることを見出した。

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

飯村 信：

第一三共株式会社・バイオ研究企画G主査

高垣 和史：

日本新薬株式会社・東部創薬研究所 所長

山本 誠司：

扶桑薬品工業株式会社・主任研究員

小泉 誠：

第一三共株式会社・主幹研究員

田村 正和：

第一三共株式会社・主任研究員

多賀谷 光洋：

日本新薬株式会社・研究員

浦辺 郁也：

日本新薬株式会社・研究員

萩原 衆子：

扶桑薬品工業株式会社・研究員

堀内 祥行：

扶桑薬品工業株式会社・主任研究員

奥井 文：

扶桑薬品工業株式会社・上席研究員

松久 明生：

扶桑薬品工業株式会社・上席研究員

植村 英俊：

扶桑薬品工業株式会社・主席研究員

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

A. 目的

A-1. 核酸医薬品開発の現状における本研究の位置づけ

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（井上, 医療機器レギュラトリーサイエンス, 45(4), 288-298, 2014）。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。

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核酸医薬品として「CpGオリゴ（CpG oligodeoxynucleotides: CpG ODN）」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、エクソスキッピング療法に用いられるスプラシング制御型アンチセンスの標的はpre-mRNA（後に詳述）、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。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）。従って、本研究課題「核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発」を考えるにあたっては、まず、RNAを標的とする核酸

医薬品に特有の毒性発現に対して優先的に取り組むこととした（図表5）。RNAを標的とする核酸医薬品に特有の問題となるのは、「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」による毒性発現のリスクである。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。

もう一点、核酸医薬品の安全性を考える上で特有の問題となるのは、核酸医薬品（オリゴ核酸）がTLRに代表されるパターン認識受容体と結合し、自然免疫系を活性化する有害作用のリスクである。この点に関しては、天然型オリゴ核酸と複数存在するTLRの反応性について解析が行われているが、近年開発が進んでいる修飾型核酸を含むオリゴ核酸のTLRに対する作用や、TLR以外のパターン認識受容体を活性化する可能性については十分な検討が行われておらず、従って、自然免疫活性化のリスクを回避するための試験法は十分に整備されていない。

以上の背景から、本研究ではRNAを標的とする核酸医薬品を対象に、「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」

ならびに「自然免疫活性化」の評価法を開発/標準化を目指し、これに必要な基盤研究を行った。なお、ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果に関しては、主に第一三共・飯村信氏ならびに日本新薬・高垣和史氏を中心とするグループとの共同研究、自然免疫活性化に関しては、主に扶桑薬品工業・山本誠司氏を中心とするグループとの共同研究として事業を進めた。国立医薬品食品衛生研究所のグループは、上記3社と密接に連携し、本事業の取りまとめを行っているが、本報告書では簡略化のため、「ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果」の評価に関する研究成果に焦点を絞って記載し、「自然免疫活性化」の評価に関する具体的な研究成果は、山本誠司氏の報告書の中に一括して記載することとする。また、本研究の成果は原著論文としては未発表であるため、具体的なデータについては一部非公開とし、得られたデータから導かれる結論を重点的に議論する。

A-2. ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果の研究状況と本研究の目的

上述のように「RNA を標的とする核酸医薬品」の安全性評価については、ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果の発現を考慮する必要があるが、そ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さらに2つに分類することができる(図表6)。

- ① RNA を分解するタイプの核酸医薬品
 - ・ Gapmer 型アンチセンス
(RNase H による RNA 切断)
 - ・ siRNA および RNAi 関連オリゴ核酸
(Argonaut による RNA 切断)
- ② RNA に結合し、立体障害により作用するタイプの核酸医薬品
 - ・ スプライシング制御型アンチセンス
(スプライシング因子の pre-mRNA へ結合を阻害)
 - ・ miRNA 阻害型アンチセンス
(miRNA の標的 RNA への結合を阻害)

①に関しては、オフターゲット効果により標的外 RNA 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(図表51)。①のうち、Gapmer 型アンチセンス(図表7)のオフターゲット効果に関しては、厚生労働科学研究「医薬品等規制調和・評価研究事業」における「革新的医薬品の研究環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究」の26年度報告書の中で議論するため、ここでは詳細を割愛する。siRNA のオフターゲット効果に関しては先行研究が進んでおり、複数の論文で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(*Nat Biotechnol.* 21, 635-637, 2003 等)。一方、②の作用機序の核酸医薬品に関しては、オフターゲット効果に関する研究はほとんど行われていないのが現状である。

以上の背景のもと、本研究ではスプライシング制御型アンチセンスのオフターゲット

ット効果について研究を行い、評価法の確立に資する基礎的な研究データを収集した。

B. 研究方法

B-1. スプライシング制御型アンチセンス

(背景)

まず、研究立案の背景となるスプライシング制御型アンチセンスに関する知見を概説する。スプライシング制御型アンチセンスとは、「pre-mRNA に相補的に結合し、スプライシングに関与するタンパク質群 (スプライシング因子) の pre-mRNA への結合を阻害することによってスプライシングを変化させるオリゴ核酸」であり、その結果、コドンの読み枠を正常化することで機能を保持したタンパク質を発現させ、病態を改善する。スプライシング制御型アンチセンスの代表例としてデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) に対する治療薬があり、エクソンスキッピングの機序によって作用する。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タンパクが生成しない。例えば、図表 8 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 (Out of frame)、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タンパク」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タンパク」が生成する。重要な点は、ジストロフィンタンパクは 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り、エクソンスキッピング法はこの性質を生かした治療法と言える。

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、Prosensa 社が開発している Drisapersen (承認申請中 : FDA)、ならびに Sarepta 社が開発している Eteplirsen (phase 2b 終了) がある。いずれも図表 8 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 (20 塩基長)、後者はモルフオリノオリゴ (30 塩基長) が用いられている (図表 9)。国内においては、本研究事業に参画している第一三共と日本新薬において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 (図表 10 : 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 (2'-O, 4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)

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。

スプライシング制御型アンチセンスには、エクソスキッピングの機序だけでなく、エクソンインクルージョンのメカニズムで有効性を獲得するものもある (Sivanesan et al., *Transl Neurosci.*, 4, 2013; Osman et al., *Mol Ther.*, 20, 119-126, 2012)。ISIS 社の開発する脊髄性筋萎縮 (spinal muscular atrophy : SMA) に対するアンチセンス医薬品 (ISIS-SMN_{Rx} : 現在 phase 2) はその代表例であり、SMN2 遺伝子の選択的スプライシングを変化させることで機能的な SMN2 タンパクを増加させる。以上のように、スプライシング制御型アンチセンスは実用化に非常に近い段階まで開発の進んでいる核酸医薬品である。

B-2. スプライシング制御型アンチセンスのデザイン

B-2-1. 導入する修飾型核酸の選択とその配置

スプライシング制御型アンチセンスはその作用機序から、標的 RNA に強固に結合するほど有効性が高いと考えられる。これまで、アンチセンスと RNA との結合力を高める技術として、核酸の糖部を中心に様々な修飾が施されてきた。その代表例である架橋型人工核酸は、「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、近年注目を集めている。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、ヌクレアーゼ耐性も向上する (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 (Obika et al., *Tetrahedron Lett.*, 38, 8735-8738, 1997)。架橋型核酸としては、他に BNA^{COC}、BNA^{NC}、ENA、cEt BNA などが開発されている (図表 11)。

本研究では、2014 年に小比賀ら (阪大薬) が報告した「架橋型人工核酸 LNA を含むスプライシング制御型アンチセンスに関する論文 (Simo et al., *Nucleic Acids Research*, 42, 8174-8187, 2014)」の知見を基に“LNA と DNA が交互に配置されたアンチセンス (LNA/DNA アンチセンス)”をスプライシング制御型アンチセンスのデザインとして用いることとした (図表 12)。本デザインを用いる理由としては、①架橋型人工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中心的に用いられる可能性が高いこと、②LNA は架橋型人工核酸の先駆けであり、LNA で得られた知見は他の修飾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既に臨床開発されている 2'-OMe 化アンチセンスと比べ、効果が著しく向上していること、④オリゴ核酸の中に LNA を高い割合で導入すると逆に有効性が低下するなど、デザインに関して一定の知見が得られていること、等が挙げられ

る。

B-2-2. 標的 RNA の選択

スプライシング制御型アンチセンスの標的 RNA に関しても同論文を参考とし、「ジストロフィン遺伝子 エクソン 58」を標的にすることにした(図表 13)。同論文では、培養細胞を用いた解析により、エクソン 58 に対して高いスキップ活性を有するアンチセンスを複数同定している。これらのアンチセンスはこれまで臨床開発されているスプライシング制御型アンチセンス (Drisapersen = 20 塩基長、Eteplirsen = 30 塩基長) より短く、15 塩基長や 13 塩基長でも効率のよいエクソンスキップ活性を示すものを見出している。すなわち、RNA との相補結合能力が高い架橋型人工核酸を用いることにより、従来のもより短い塩基長でスプライシングを変化させることが可能になっている。本論文で同定されたアンチセンスも今後塩基長の違いによるオフターゲット効果発現への影響を比較検討する際に有用と考えられる。

なお、上述の論文ではジストロフィン遺伝子のエクソン 58 のスキップ活性を検出するために、エクソン 57, 58, 59 を含むヒトゲノム配列をクローニングし、人工遺伝子として安定発現させた HEK293 細胞を使用している(ヒトゲノムは一部改変されている)。すなわち、アンチセンスの有効性である「オンターゲット効果」が検出しやすいように工夫されている。本研究ではオンターゲット効果とオフターゲット効果を同等に評価するために、内在的にジストロフィン遺伝子を発現しているヒト筋由来細胞 (RD 細胞) を選択し、スプライシング制御型アンチセンスの

スクリーニングならびにオフターゲット効果の検証を行った。

B-3. スプライシング制御型アンチセンスの配列の決定

B-3-1. ヒト培養細胞を用いた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

(*in vitro* 解析 : 140 配列 → 32 配列)

本研究では、18 塩基長のアンチセンスを用いてオフターゲット効果の検証を行うこととした。ジストロフィン遺伝子・エクソン 58 を標的とする上述の論文 (Simo et al., *Nucleic Acids Research*, 42, 8174-8187, 2014) では、18 塩基長のアンチセンスについては検証が行われていないので、本研究において有効性の高い配列を選択すべく、網羅的なスクリーニングを行った。以下にスクリーニング条件の概要をまとめる。

【アンチセンスのデザイン】

- LNA と DNA が交互に導入されたオリゴ核酸 (LNA/DNA アンチセンス : 図表 12)
- 18 塩基長 (図表 12)
- ジストロフィン遺伝子エクソン 58 に対して相補的な配列 (図表 13, 14)
- 候補配列 : 考えられるすべての配列エクソン 58 及びその前後 18 塩基を網羅する 140 本のアンチセンスを合成
図表 14, 15, 16 参照

【用いる細胞種・導入条件 (図表 17)】

- RD 細胞 (ヒト横紋筋肉腫由来, 7 歳女

児)

- ・ 細胞数 1×10^4 cells/well (96 well plate)
- ・ Lipofection 法 (Lipofectamine2000)
- ・ 最終濃度 100nM 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

【エクソンスキップ活性の検出 (図表 18)】

RD 細胞から抽出した total RNA (100ng) に対し、ジストロフィン遺伝子 (DMD) のエクソン 57 とエクソン 59 上に設計したプライマー (Forward primer : tgc acc ttt ctc tgc agg aa, Reverse primer : tgc cag gat ccc ttg atc ac) を用いた Reverse Transcription PCR (RT-PCR) を行った。PCR 産物をマイクロチップ電気泳動装置 Multina (島津製作所) で泳動し、PCR 断片の鎖長の違いからエクソンスキップの有無を判断した。エクソンスキップした DMD mRNA (DMD57-59) は 333bp、エクソンスキップしていない DMD mRNA (DMD57-58-59) は 454bp のバンドとして検出される。また、エクソンスキップ活性を鎖長毎のピーク強度 (≒PCR 産物量) を用いて以下の式により算出した。

「エクソンスキップ活性」 =
“DMD57-59 のピーク強度” / (“DMD57-59 のピーク強度” + “DMD57-58-59 のピーク強度”)

すべての DMD mRNA でエクソン 58 がスキップされていると、エクソンスキップ活性は「1」となる。エクソンスキップした DMD mRNA の検出に関しては、リアルタイム PCR を用いた解析も同時に行っているが、本報告書では割愛する。

B-3-2. GGRNA および GGGenome を用いた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

(*in silico* 解析 : 32 配列 → 3 配列)

当該研究は日本新薬グループが担当した。詳細は日本新薬 高垣和史氏の報告書を参照して頂きたい。概要としては、オンターゲット効果の強度で選択した 32 本のアンチセンス配列について、ヒト遺伝子を対象とした *in silico* 解析を行い、相補箇所が多い 3 本のアンチセンスを抽出した。

B-4. オンターゲット効果の確認、ED₅₀ の算定

当該研究は第一三共グループが担当した。詳細は第一三共 飯村信氏の報告書を参照して頂きたい。概要としては、以降の高密度エクソンアレイ解析に用いるアンチセンス濃度を一つの指標を基準に設定するため、*in vitro* 解析と *in silico* 解析から抽出したアンチセンスに関して、ED₅₀ 値を決定した。

B-5. オフターゲット効果の評価の選定

- 高密度エクソンアレイ -

上述のように、スプライシング制御型アンチセンスは RNA 鎖を切断せず、スプライシングのパターンを変化させる (図表 13, 18)。従って、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を評価する際には、標的外遺伝子のスプライシングの変化を検出する必要がある。スプライ

シングの変化は、「成熟 mRNA において各エクソンが存在するか否か(スプライスアウトされるか、スプライスインされるか)」を検出することにより評価できると考えられる。通常、遺伝子の発現解析に用いられるマイクロアレイ (Affymetrix 社 GeneChip® 3'IVT アレイ等) は、各遺伝子のスプライシングバリエーションを包括したトータルの発現量を検出することが想定されており、mRNA を検出するためのプローブは 3' 非翻訳領域 (3'UTR) 付近に設定されている (図表 20)。このプローブ選定は、遺伝子の発現量を評価するという目的には適しているが、「成熟 mRNA における各エクソンの存在」を検知することは原理的にできない。そこで我々は各エクソンの存在量を検出するために、エクソン毎にプローブが設定されているエクソンアレイに着目した (図表 20)。

従来から用いられているエクソンアレイの 1 つである Affymetrix 社 GeneChip® エクソン ST アレイは 1 エクソンあたり約 4 個のプローブが設定されているが、近年新たに開発された Affymetrix 社 GeneChip® Human Transcriptome Array2.0 (HTA2.0) は 1 エクソンあたり 10 個のプローブが配置されている (以降、HTA2.0 を“高密度エクソンアレイ”と呼ぶ)。さらに、高密度エクソンアレイにはエクソン ST アレイには設定されていない「隣接するエクソン間をまたぐプローブ」が別途 4 つ配置されている。これらの特徴から、高密度エクソンアレイの方が各エクソンの存在をより正確に検出できると考えられ、本研究においても高密度エクソンアレイを評価法の第一選択として採用することとした。なお、高密度エクソンアレイに

ついては、①販売されてから日が浅いこと、②1 解析当たりデータが膨大であること (プローブ数 730 万以上/アレイ)、③データ解析ソフトが作成されているものの、それを用いた解析経験が乏しいこと、などから、現時点ではスプライシングの変化を検出する手法として汎用されているとは言いがたい。従って、高密度エクソンアレイ解析のノウハウを集積することも本研究の重要な成果になると考えられる。上述の点を含め、高密度エクソンアレイの特徴を以下にまとめる。

- 各エクソンあたり 10 個、各エクソンジャンクションに 4 個のプローブを設計しているため、各エクソンの発現量に関し、正確性の高いデータが期待される。
- 合計 730 万を上回るプローブが搭載されている。
- 全転写産物アイソフォームの遺伝子レベルおよびエクソンレベルでの発現解析が可能である。
- プローブの 70%はタンパク質をコードする遺伝子のエクソンに設定されており、残り 30%は近接するエクソン間にまたがるプローブか、非コード転写産物に設定されたプローブである。

各エクソンあたりのプローブ数は通常 10 個であり、これを“プローブセット”と呼ぶ。1 つのエクソンに複数のプローブセットが設定されている場合もある (図表 21)。1 エクソンあたりのプローブセット数の平均値は 1.55 である。

B-6. オフターゲット候補エクソンの抽出および分類

ヒト転写産物データベース (NCBI: Refseq60) を対象とした *in silico* 解析により、オフターゲット効果の解析に用いるスプライシング制御型アンチセンスと相補性を有するエクソン (= オフターゲット候補エクソン) を検索、同定した。*in silico* 解析は日本新薬が担当されたので、抽出手順等の詳細は日本新薬・高垣和史氏の報告書を参照して頂きたい。オフターゲット候補エクソンの抽出にあたり本研究で重要視した点は、アンチセンスとエクソンの相補性の条件をできる限り緩くし、技術的に可能な範囲で幅広く候補エクソンを抽出したことにある。考えられるすべてのオフターゲット候補エクソンを選択し、それらのエクソンが実際に変動するか否かを検証することで、オフターゲット効果が起こる配列条件を漏れなく精査した。

オフターゲット候補エクソンは、アンチセンスとの相補結合を考えた場合にエクソン側の配列に

- ・ 部分的な不一致 (ミスマッチ : mis)
- ・ 部分的な挿入 (インサクション : ins)
- ・ 部分的な欠失 (デリーション : del)

が入ることを許容して抽出した (図表 22)。これら 3 つの「相補の不完全性のパラメータ」は 1 つのアンチセンスと 1 つのエクソンの間で混在する場合があるが、そのようなケースは “mix” と表記することとした。例えば、「2 mix」と表記した場合の結合様式には、「1 mis + 1 ins」、「1 mis + 1 del」、「1 del + 1 ins」のいずれかが考えられるが、これらを区別

せずに「2 mix」に分類した (図表 23)。

1 つのアンチセンスが 1 つのエクソンに対して、複数箇所相補結合する場合がある。例えば、アンチセンス A がエクソン B に対して 3 箇所相補結合する場合、それぞれ「1 mis」、「2 ins」、「3 mix」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 ins」、「3 mix」の 3 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、アンチセンス A とエクソン B の結合様式を「1 mis」に分類することとした (図表 24)。

また、アンチセンス C がエクソン D に対して「2 mis」、「2 ins」、「2 del」、「2 mis」の 4 箇所相補結合する場合には、優先順位として「mis > ins > del > mix」を適応し、アンチセンス C とエクソン D の結合様式を「2 mis」に分類することとした (図表 24)。優先順位を「mis > ins > del > mix」とした明確な科学的根拠はないが、不適合箇所が同数となるケースは全体の中では極めて少ないため、データの解析・解釈を容易にすることを優先し、簡略化のためのルールとした。

B-7. 高密度エクソンアレイ解析

B-7-1. 高密度エクソンアレイのサンプル調製

基本的に「B-3-1. ヒト培養細胞を用いた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」で述べた手順でサンプルを調製した。詳細は以下のとおりである。

- RD 細胞
- n=4
- 細胞数 1.5×10^5 cells/well (12 well plate)
- Lipofection 法 (Lipofectamine2000)
- 最終濃度 ED₅₀ の 10 倍の濃度でアンチセンスを導入 ($2.76 \times 10 = 27.6$ nM)
- 37°C, 5%CO₂ で培養
- 24 時間培養後 total RNA を抽出

B-7-2. 高密度エクソンアレイ解析

高密度エクソンアレイの解析はタカラバイオ株式会社の協力のもと、国立医薬品食品衛生研究所で遂行した。高密度エクソン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。

1. 解析ソフトウェア Affymetrix Expression Console Software 1.3 (Expression Console) を用いて CHP ファイルを出力する。
2. CHP ファイルに出力したエクソンの発現データを RMA (Robust Multichip Analysis) を使用し正規化を行う。
3. 正規化したシグナル値について、解析ソフトウェア Affymetrix Transcriptome Analysis Console Software 2.0 (TAC) を用い

て、コントロール群とアンチセンス作用群の発現の比較を行う。

4. 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 判定陽性」のものを有効データとする。

5. コントロール群とアンチセンス群間の全プローブセットを対象として統計検定を行い、p. value 及び多重性を考慮して q. value を算出する。

B-7-3. オフターゲット効果の評価

in silico 解析により、アンチセンスと相補性を有するオフターゲット候補エクソンを抽出し、上述した「アンチセンスとエクソンの結合様式の分類ルール (図表 22-24)」に従って分類した後、それぞれのオフターゲット候補エクソンに関して、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 25 と対応させて参照のこと)。

1. *in silico* analysis

ヒト転写産物データベース (NCBI : Refseq60) に対する *in silico* 解析でオフターゲット候補エクソンを抽出し、結合様式毎に分類した後、それぞれのエクソン数を算出した。

2. On Array

「1. *in silico* analysis」で抽出したエクソンに対して、HTA 2.0 上に実際に設定されているプローブセットの数を記載した。

注1) ここではオフターゲット効果を受けるエクソンの数および割合を求めることを目的としているので、エクソンジャンクションに設定されたプローブセットは考察から除外し、カウントしていない。

注2) 基本的には1つのエクソンに1つのプローブセット(10プローブ)が設定されているので、プローブセット数はエクソン数と同義と考えてよい、しかし、①1つのエクソンに複数のプローブセットが用意されている場合があること(図表21)、②*in silico analysis* で用いたヒト転写産物データベース(NCBI: Refseq60)とHTA 2.0のプローブセットを設定する際に使用されているゲノムデータベースが異なることから、「*in silico analysis*」に示したエクソン数と「On Array」で示したプローブセット数は厳密には一致しない。

3. Present

「2. On Array」で選んだプローブセットのうち、コントロールあるいはアンチセンス添加サンプルのいずれかにおいて、試行回数4回中3回以上で“Present”と判定されたプローブセットの数(≒RD細胞に発現していると考えられるエクソンの数)を記載した。

4. Varied

アンチセンスの添加で発現が有意に変動したプローブセットの数を記載した(p value < 0.05)。

5. Down regulated

アンチセンスの添加で発現が50%未満に変動したプローブセットの数を記載した。

6. Percentage

[[「Down regulated」×100 / 「Present」] の値を算出し、記載した。この数値は、「RD細胞に発現するエクソンのうち、アンチセンスの添加で発現が50%未満に変動したエクソンの割合(%)」を示している。

図表25の「Others」とはアンチセンスと相補性がないエクソンのグループである。

「Others」における「Percentage」は、アンチセンスの添加によりハイブリダイゼーション“非依存”に発現が50%未満に変動したエクソンの割合を示している。

上記の表によるデータ整理に加え、高密度エクソンアレイの解析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。

Scatter Blot 図: 横軸にコントロール検体における各エクソンの発現量を、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(図表26, 30, 34, 38, 44)

Histogram 図: 縦軸にエクソンの数を、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(図表27, 31, 35, 39, 45)

Cumulative 図: 縦軸にエクソンの累積数を、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(図表28, 32, 36, 40, 46)

(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. 結果

高密度エクソンアレイの実験データは、厳密にはエクソン単位の遺伝子発現変化ではなく、各エクソンに設定されたプローブセット毎の遺伝子発現変化を示すものである。従って、例えば、50%未満に発現変動した「プローブセット数」はわかるが、「エクソン数」は正確にはわからない。ただ、両者はほぼ同様の変動を示すと考えて差し支えないため、本報告書では議論の理解を助けるため、「プローブセット」という言葉は用いずに「エクソン」で代替することとする。

C-1. スプライシング制御型アンチセンスの配列の決定

ジストロフィン遺伝子のエクソン 58 に対して 140 本のアンチセンスをデザイン・合成し (図表 13, 14, 15, 16)、それぞれを RD 細胞に導入して、エクソン 58 のスキップ活性を調べた (図表 17, 18)。この結果、今回スクリーニング条件 (アンチセンス濃度: 100nM、リポフェクション法) では、59 本のアンチセンスで 80%以上のスキップ活性が認められた (図表 19)。以上の検討は、図表 18 の上図に示した RT-PCR によるスクリーニングの結果であるが、これに加えて、図表 18 下図に示した「エクソンスキップした mRNA のみを定量する quantitative real-time PCR (qRT-PCR)」も行い、双方のデータを総合的に評価して、高いエクソンスキップ活

性を有するアンチセンスを 34 本選択した (qRT-PCR についてはデータ未掲載)。本研究の目的は有効性の精査ではなく、アンチセンスのオフターゲット効果を検証する点にあるので、次にこれら 34 本のアンチセンスについて、*in silico* 解析を行い、「できるだけ多くのヒト mRNA と相補結合するアンチセンス」を選別した。ヒットする mRNA が多いほど、アレイ解析から得られるオフターゲット効果に関する情報も多くなると期待される。本解析は日本新薬の高垣和史氏のグループによって行われたので、詳細は高垣氏の報告書を参照して頂きたい。

上述の *in silico* 解析より抽出されたアンチセンスは、「高いエクソンスキップ活性を有し、かつ、ヒト mRNA にできるだけヒットする 18 塩基長のスプライシング制御型アンチセンス」である。我々はこのアンチセンスを splice-switching oligonucleotides 18-2 (SSO18-2) と命名し、以降の解析を行った。

C-2. オンターゲット効果の確認、ED₅₀ の算定

SSO18-2 のジストロフィン遺伝子のエクソン 58 をスキップする活性 (オンターゲット効果) を詳細に解析し、「標的エクソンがスプライスアウトされた mRNA の割合が半分となるアンチセンス濃度 = ED₅₀ 値」を決定した。本検討の詳細は第一三共の飯村信氏の報告書を参照して頂きたい。

C-2. オフターゲット効果の解析

本研究の目的は、「①高密度エクソンアレイで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を評価でき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」であるので、オフターゲット効果ができるだけ観察されやすいと思われる条件を選定した。すなわち、できるだけ高濃度のアンチセンスを導入し、かつ、細胞毒性がみられない濃度（細胞生存率 80%以上）として、最終的に ED₅₀ の 10 倍の濃度を設定し、オフターゲット効果の検証を行った。「ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果あり」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エクソンの発現量が 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。

SSO18-2 を RD 細胞に導入した後、24 時間後に total RNA を抽出し、高密度エクソンアレイで各遺伝子のエクソン毎の発現変動を解析した（試行回数 n=4）。高密度エクソンアレイにおいて、ジストロフィン遺伝子エクソン 58 の発現は十分に確認されなかったため（コントロール群の 4 検体のうち、“発現あり”を示す Present 判定は 1 検体のみ）、オフターゲット効果は上述の RT-PCR で確認した。エクソン 58 の発現が十分に観察されなかった要因としては、①RD 細胞におけるジストロフィン遺伝子の発現量が他の遺伝子と比較して相対的に少ない（PCR 系では増幅できるが、ハイブリダイゼーションの原理では検出が難しい）、②ジストロフィン遺伝

子エクソン 58 に設定されたプローブセットの検出感度が十分ではない等の理由が考えられる。

次に、上述の「オフターゲット候補エクソンの分類」に従ってグループ分けした各エクソン群について、遺伝子発現変動を解析した。

SSO18-2 とミスマッチを許容して相補結合するエクソンの発現変動（図表 25）

まず、ミスマッチを有するエクソン群について解析を行った結果、SSO18-2 と相補性のないエクソン（Other）が 50%未満に減少する割合は 0.09%であるのに対し、SSO18-2 と 2 塩基、3 塩基、4 塩基、5 塩基ミスマッチするエクソンではそれぞれ 5.88%、4.82%、0.82%、0.18%であった。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。なお、完全相補、1 塩基ミスマッチのエクソンに関しては、対応するプローブセットが HTA2.0 には搭載されていなかった。Scatter Blot 図（図表 26）、Histogram 図（図表 27）、Cumulative 図（図表 28）を見ると、Scatter Blot 図、Histogram 図ではミスマッチの違いによる影響を判別することは難しいが、Cumulative 図では 2 塩基ミスマッチ（黄緑）や 3 塩基ミスマッチ（緑）のエクソンにおいて、発現抑制されているエクソンの割合が大きいことを視覚的に捉えることが可能である（図表 28：黄緑、緑のラインが左にシフトしている）。以上の結果から、スプライシング制御型アンチセンスによりハイブリダイゼーション依

存的なオフターゲット効果が実際に引き起こされることが明らかとなった。また、この結果は、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の評価法として、高密度エクソンアレイが有用であることを示している。

SSO18-2 とデリーションを許容して相補結合するエクソンの発現変動 (図表 29)

SSO18-2 とデリーションを有するエクソン群についても、50%未満に発現抑制された割合 (Percentage) を見るとミスマッチと同様の傾向がみられるが、発現抑制されたエクソンの数が非常に少ないことから解釈には慎重を要する (図表 29)。一方、発現変動の程度を加味した Cumulative 図を見ると、2 デリーション、3 デリーションを有するエクソンは明らかに発現抑制の影響を受けやすいことがわかる (図表 32)。Scatter Blot 図 (図表 30)、Histogram 図 (図表 31) では影響が捉えにくい。

SSO18-2 とインサージョンを許容して相補結合するエクソンの発現変動 (図表 33)

インサージョンを有するエクソン群については、18 塩基長まで長くなると、該当するエクソン数自体が少なくなるため、ヒト内在エクソンを使った解析では影響を評価することが難しい (図表 33-36)。

SSO18-2 とミスマッチ、インサージョン、デリーションの混合 (mix) を許容して相補結合するエクソンの発現変動 (図表 37)

図表 22, 23 で示した “mix” に分類されるオフターゲット候補エクソンは、比較的抽出

される数が多く、信頼性の高い解釈が可能と考えられる。2 mix、3 mix、4 mix、5 mix に分類されるエクソンが 50%未満に減少する割合は、それぞれ 12.5%、2.57%、0.46%、0.1%であり、相補性の程度と発現抑制の割合がオフターゲット効果の概念と一致していた。“mix” に関しても、Cumulative 図 (図表 40) において、相補性の影響が顕著に示されており、SSO18-2 と 2 mix あるいは 3 mix で相補結合するエクソンは明らかに発現抑制の影響を受けている (図表 40: 黄緑、緑のラインが左にシフトしている)。

本研究では 18 塩基長のアンチセンスを用いて解析を行っているが、13 塩基長、15 塩基長等のより短いアンチセンスでは配列の特異性が下がるため (図表 41)、ヒットするゲノム領域が多くなる。従って、オフターゲット候補エクソンの数についても、ミスマッチ、デリーション、インサージョンの分類のそれぞれにおいて、エクソン数が大幅に増え、それぞれの不適合性がオフターゲット効果に及ぼす影響も解析しやすい (データ未掲載)。一方、本解析から、18 塩基長程度まで長くなると、ミスマッチ、デリーション、インサージョン、3 種混合 (mix) の 4 つに分類すると各グループの解析データの母数が小さくなり、傾向がつかみにくいことがわかった。一方で、ミスマッチ、デリーション、インサージョンに分類できない mix においては、相補性の程度とオフターゲット効果の相関がはっきり現れることがわかった (図表 37, 40)。以上の考察から、18 塩基長では

オフターゲット候補エクソンをミスマッチ、デリーション、インサージョン、3種混合 (mix) の4つに分類するのではなく、ミスマッチ、デリーション、インサージョンを同等に捉えた“不適合性 (incompatibility: inc)”という新たなパラメータで整理して、その総数でオフターゲット候補エクソンを分類することとした (図表 42)。

SSO18-2 と不適合性 (incompatibility) を許容して相補結合するエクソンの発現変動 (図表 43)

SSO18-2 とエクソンの相補結合におけるミスマッチ、デリーション、インサージョンを区別することなく、不適合性 (inc) の総数で分類した結果を図表 43 に示した。「inc 2」、「inc 3」、「inc 4」に分類されるエクソンが50%未満に減少する割合は、それぞれ10.0%、2.75%、0.51%であり、SSO18-2 と相補性のないエクソン (Other) の0.09%と比べ、高い数値であった。図表 46 に示した Cumulative 図においても、不適合箇所が2~3箇所のオフターゲット候補エクソン (inc 2、inc 3) が明確に影響を受けている様子がわかる。また、「inc 2」から「inc 6」のそれぞれについて、発現抑制された割合を調べると「inc 2」および「inc 3」で影響を受けている傾向がある (図表 47)。

D. 考察

以下の考察においては、アンチセンスとオフターゲット候補エクソンの相補結合部位におけるミスマッチ、デリーション、インサージョンを区別せずに、不適合性 (inc) の

指標で取り扱い、「inc」の総数で分類した解析結果 (図表 43-46) に基づいて議論を行うこととする。

オフターゲット候補エクソンの抽出

今回の解析において、RD細胞に発現するエクソンの数は「356,345」であり、このうち、我々がオフターゲット候補エクソンとして抽出したエクソンの割合は、

$$\begin{aligned} & \text{「inc 2」} + \text{「inc 3」} + \text{「inc 4」} + \text{「inc 5」} + \\ & \text{「inc 6」} = (50 + 654 + 8958 + 43349 + 80956) \\ & = \text{「133,967」} \end{aligned}$$

である (図表43)。これはRD細胞に発現するエクソンの37.6%に当たる。データには示さないが、18塩基長の場合、今回のように6つの不適合性 (inc 6) までを許容して検索を行うと、エクソン総数の3分の1程度のオフターゲット候補エクソンが抽出される。これを7つの不適合性 (inc 7) まで拡大すると、どのエクソンにもヒットしてしまうほど特異性が低くなり、*in silico*解析の目的が失われる。すなわち、18塩基長のアンチセンスの場合、オフターゲット候補エクソンの抽出は、上記の観点から「inc 6」まで行えば十分と考えられる。

オフターゲット効果の影響を受ける遺伝子の配列条件

次に、「inc 2」から「inc 6」に分類したオフターゲット効果エクソンが実際に影響を受けるか否かについて考察する。まず、50%未満に発現抑制された割合 (Percentage) について、U検定で有意差検定を行うと、「inc 2」から「inc 6」のいず

れのグループにおいても、「SSO18-2と相補性のないエクソン群 (Other) と比べて、有意に50%未満に抑制される」という結果が得られる (図表48: 有意水準5%)。すなわち、「inc 5」や「inc 6」が50%未満に抑制される割合は「Other」と同程度であるが (それぞれ0.10%、0.11%、0.09%)、統計的には有意差があるという判定となる。次に、「50%未満に発現抑制されたエクソンの割合」ではなく、発現抑制の程度で考えると、図表46、47に示すように、「inc 2」、「inc 3」は「other」に比べて明確に影響を受けているが、「inc 4」、「inc 5」、「inc 6」への影響は「inc 2」、「inc 3」に比べると極めて小さいことがわかる。以上を考え合わせると、18塩基長のスプライシング制御型アンチセンスでは、

- ① 「inc 6」までのオフターゲット候補遺伝子を抽出しておき、その発現変動を培養細胞で検証することが有効であると考えられる
- ② 抽出したエクソンの中で、実際にオフターゲット効果の影響を受ける可能性があるのは、「inc 3」までのエクソンと考えられる。ヒト培養細胞に発現していないエクソン (遺伝子) については、実際にオフターゲット効果の影響を受けるか否かの検証することができないが、そのような場合には「inc 3」までのエクソンがオフターゲット効果の影響を受けうるという前提で考察する必要があると思われる。

以上の考察は、「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果が極めて起こりやすい条件 (アンチセンス濃度 = $ED_{50} \times 10$)

で検証を行った結果に基づくものである。エクソンスキップ療法に用いられる際のアンチセンスの有効濃度は、 ED_{50} の1~数倍程度であると見積もられる (*Gene Med.*, 11, 257-266, 2009; *Mol. Ther.*, 18, 1995-2005, 2010)。このことを加味すると、ヒト組織で実際に起こるオフターゲット効果は今回の解析結果よりも弱いと推測され、安全性評価の対象として「inc 3」までのエクソンを考慮することで安全性を担保できると思われる。この点を実験的に示すため、アンチセンス濃度を減少させた際のオフターゲット候補エクソンの発現変動について、引き続き解析を進める。核酸医薬の開発現場においても、アンチセンスの有効濃度を考慮して、ヒト細胞を用いた*in vitro*試験 (アレイ解析) をデザインすることが望ましいと考えられる。

発現抑制を受けるオフターゲット候補エクソンの割合に関する考察

本研究では、スプライシング制御型アンチセンスについてオフターゲット効果の検証を行っているが、50%未満まで発現抑制の影響を受けるエクソンの割合は、相補性が高くても10%程度である (図表43)。これは、RNAを分解するタイプのGapmer型アンチセンスと比較すると遙かに小さい (厚生労働科学研究 医薬品等規制調和・評価研究事業 「革新的医薬品の研究環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究」26年度報告書参照)。この要因としては、Gapmer型アンチセンスはRNA鎖のどの部分に結合しても切断するポテンシャルがあるが、スプライシング制

御型アンチセンスについては、スプライシング因子が結合する部位（Exonic splicing enhancer：ESEに相当）に結合しないとエクソンスキップを誘導し得ないというメカニズムの違いが考えられる。スプライシング制御型アンチセンスは完全相補してもスプライシングに影響しない確率の方が高いので、この観点からも培養細胞を用いた検証が重要であると考えられる。

発現抑制の程度と安全性の関連

mRNA を切断・分解する核酸医薬の場合、「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。

この議論を踏まえて、スプライシング制御型アンチセンスについてオフターゲット効

果の線引きを考えると、オフターゲット候補エクソンの発現が50%未満になると正常遺伝子の発現も50%未満になるため、正常機能が維持できなくなると解釈できる。従って、線引きは「オフターゲット候補エクソンの発現が50%未満」と考えるのが妥当であろう。以上は、アンチセンスがオフターゲット遺伝子に対して機能欠失型の影響を与える場合、すなわち、エクソンスキップによりオフターゲット遺伝子のタンパクの読み枠がずれ、遺伝子機能が失われることを前提とした議論である。一方で、エクソンスキップが起こっても読み枠がずれずに、途中のアミノ酸は欠失するもののC末端までタンパクが翻訳されるケースが想定される（確率3分の1で起こりえる）。このケースは、内在には発現していないタンパクが新たに現れるため、当該変異タンパクの存在が与える影響を考察する必要がある。例えば、オフターゲット遺伝子の遺伝子産物が細胞内でタンパク複合体を形成するための足場タンパクとして機能する場合、部分的に欠失した変異タンパクがドミナントネガティブ体として作用し、タンパク複合体の機能を阻害する恐れがある。この場合は、オフターゲットエクソンの発現抑制の程度では線引きができないため、変異タンパクが実際に安定に生じるのか、有害作用を及ぼしうるのか等、ケースバイケースで安全性の観点から総合的に考察する必要がある。

アンチセンスの塩基長とオフターゲット効果が起こる遺伝子数の関連

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 49）。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も考えられる。まだプレリミナリーな段階であるため、本報告書ではデータを示さないが、この二面性は実際には前者の影響の方が圧倒的に大きく、塩基長が短いアンチセンスの方がオフターゲット効果を受ける遺伝子の数が多くなることになっている。また、この傾向は、スプライシング制御型アンチセンスに限らず、Gapmer 型アンチセンスについても同様である（厚生労働科学研究 医薬品等規制調和・評価研究事業 「革新的医薬品の研究環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究」 26 年度報告書参照）。アンチセンスの塩基長に関する以上の検討については、複数のアンチセンスで検討を行っているため、一般性があると考えられる。

本研究では、LNA と DNA が交互に配置されたアンチセンスを用いて、オフターゲット効果の検証を行った。修飾型核酸の種類や配置を換えると RNA 鎖との結合力が変化すると考えられるため、今回の結果を解釈する際には注意を要する。核酸医薬の開発現場においては、開発候補品を用いて本研究と同様の解析を行い、実際に変動する遺伝子を把握する必要がある。

オフターゲット効果の評価系に関する考察

本研究では高密度エクソンアレイを用いて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を検証した。この結果、高密度エクソンアレイで一定の評価ができることが明らかになったが、ジストロフィン遺伝子の発現が検出できなかったことに代表されるように（C-2. オフターゲット効果の解析を参照）、プローブと RNA のハイブリダイゼーションを利用した検出法にも限界があると推定される（この点は高密度エクソンアレイに限定された問題ではなく、アレイ解析に共通した“検出系の限界”と捉えるべきであろう）。これを補うために、オフターゲット効果が起こる可能性が高いと考えられる遺伝子については、PCR をベースとした評価系を組み合わせることが有効である。また、将来的には RNA の配列をダイレクトに読む次世代シーケンス解析（RNA-seq）も評価法の候補と考えられる。今後、これらの手法と高密度エクソンアレイによる解析を比較し、その整合性を検証しておくことも重要と考える。

E. まとめ

近年、RNA 鎖との結合力の高い修飾型核酸の開発が進展したことにより、アンチセンス医薬品の塩基長が短くなる傾向にある（図表 50）。これはコストや細胞内取り込みの効率の観点から有利であるが、一方で、オフターゲット効果の影響を受けやすくなるのではないかという安全性の