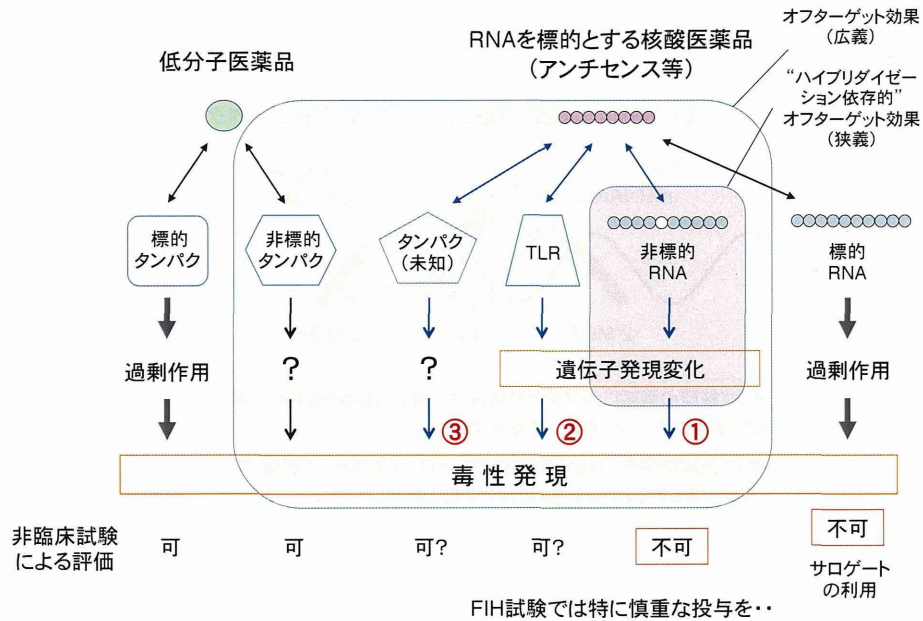


【図表5】 RNAを標的とする核酸医薬品の毒性発現機序の分類



【図表6】

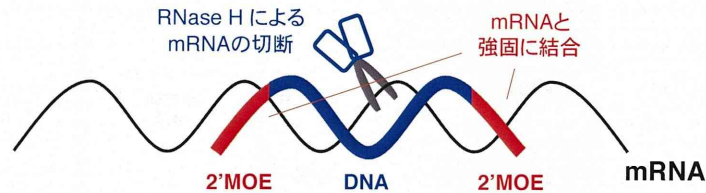
RNAを標的とする核酸医薬品の分類

	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
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7】

Gapmer型アンチセンスの構造と作用機構

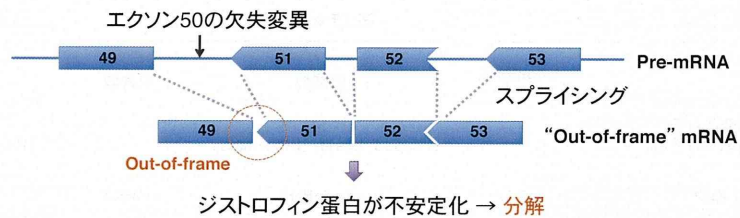
RNase H: DNA/RNA二本鎖を認識し、RNAを切断するエンドヌクレアーゼ



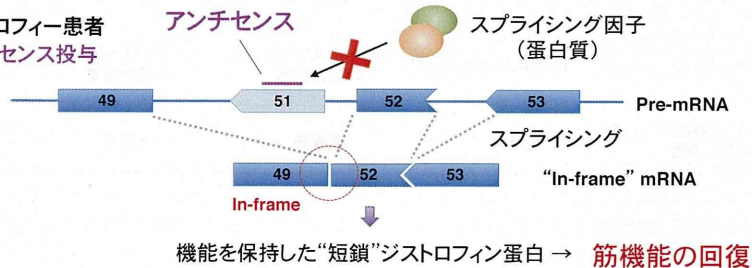
- オリゴ核酸の両端にmRNAとの結合力が強い「糖部を修飾した修飾型核酸 (2'-MOE、LNA、ENA等)」を導入する。
- オリゴ核酸の中央“Gap”部分はRNase Hが基質として認識できるよう、DNA骨格にする(すなわち、糖部の2'位を修飾しない)。
- 一般に、Gapmer型アンチセンスはリン酸部がS化されている。

【図表8】 スプライシング制御型アンチセンスの作用機構 (エキソンスキップの誘導)

筋ジストロフィー患者



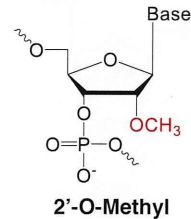
筋ジストロフィー患者 + アンチセンス投与



【図表9】 スプライシング制御型アンチセンスの開発状況

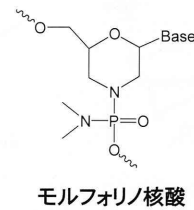
Drisapersen(Prosensa社)

- 標的エクソン: 51
- 2'-OMe化アンチセンス, 20塩基長
- 承認申請中(FDA)



Eteplirsen (Sarepta Therapeutics社)

- 標的エクソン: 51
- モルフォリノアンチセンス, 30塩基長
- Phase IIb



【図表10】 スプライシング制御型アンチセンスの開発状況

日本新薬

国立精神・神経医療研究センター(武田伸一先生)

- 標的エクソン: 53 (NS-065/NCNP-01)
- モルフォリノアンチセンス
- 国産アンチセンスとして初の臨床試験
(医師主導治験)

第一三共

産業革新機構

神戸学院大学(松尾雅文先生)

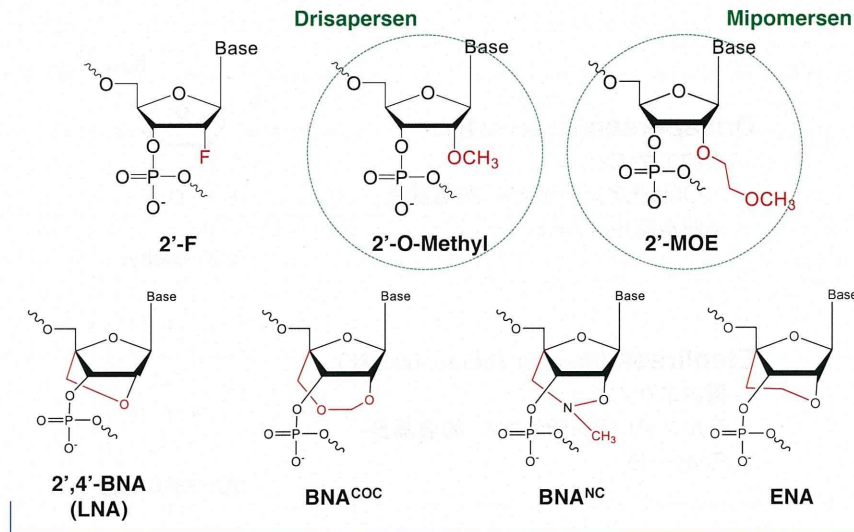
- 標的エクソン: 45
- 架橋型人工核酸ENAを含むアンチセンス
(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)
- 前臨床段階

ランク	標的エクソン	対象患者 (%)
1	51	13.0
2	45	8.1
3	53	7.7
4	44	6.2
5	46	4.3
6	52	4.1
7	50	4.0
8	43	3.8
1-8	合計	51.2

【図表11】

修飾型核酸

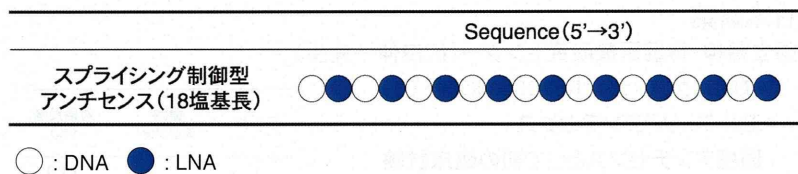
(株)ジーンデザイン・佐藤秀昭氏より供与



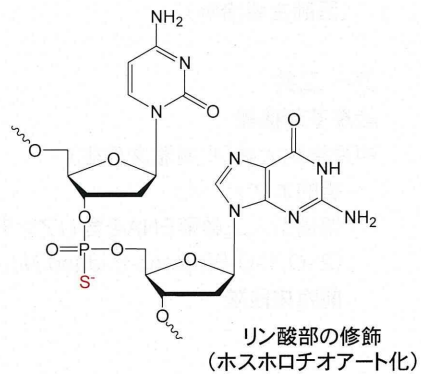
架橋型人工核酸: 日本発の技術, RNA鎖と結合力が強い
現在も日本が世界をリード

【図表12】

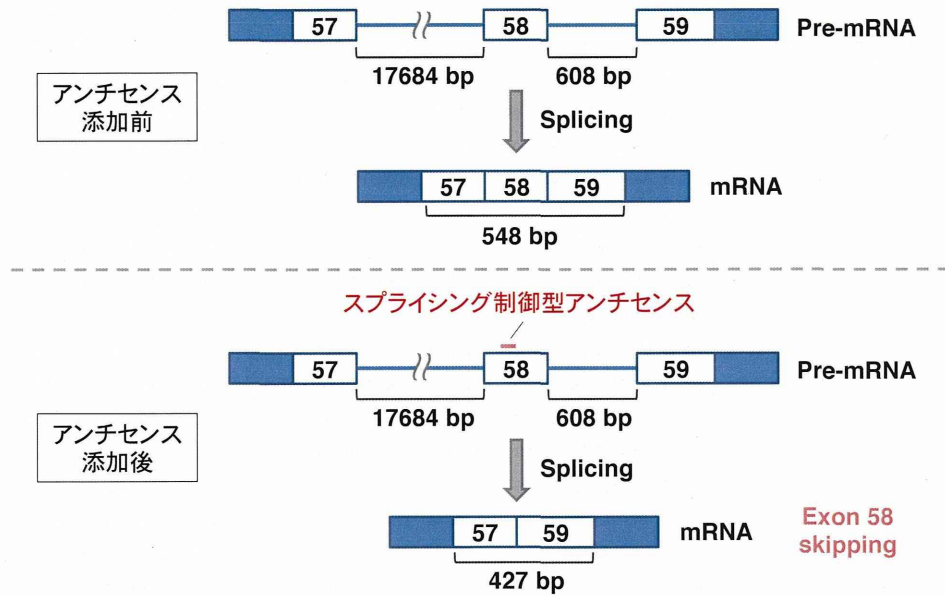
スプライシング制御型アンチセンスのデザイン



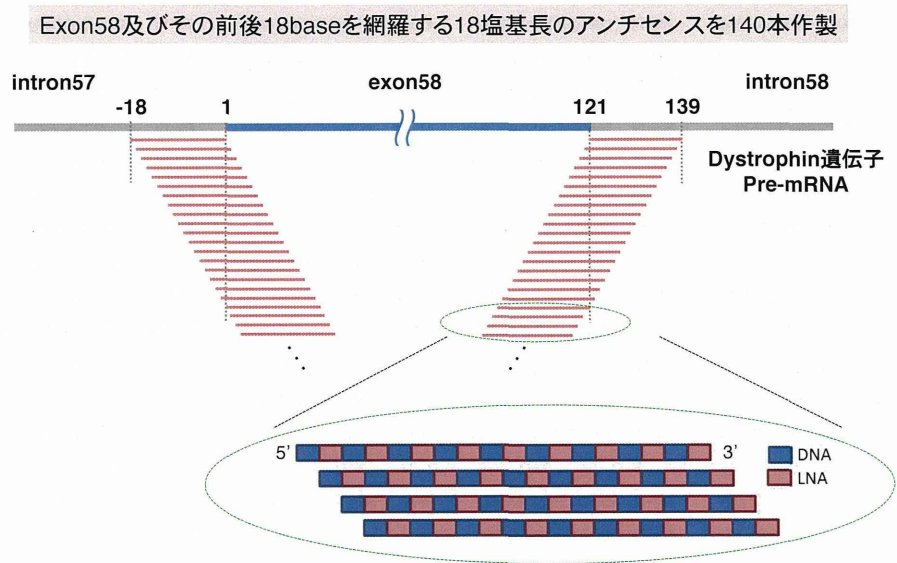
- オリゴ核酸のリン酸ジエステル結合部分はすべてホスホロチオエート化(酸素原子1つを硫黄原子に置換)し、ヌクレアーゼ耐性を付与。
- RNase H(RNA鎖とDNA鎖の二重らせん構造を認識し、RNA鎖を切断する酵素)の基質とならないように配慮(DNAが連続して連結する領域を作らない)。



【図表13】 本研究におけるエクソンスキップのモデル



【図表14】 DMD遺伝子エクソン58のスキップを誘導するアンチセンスのスクリーニング(18塩基長)



【図表15,16】

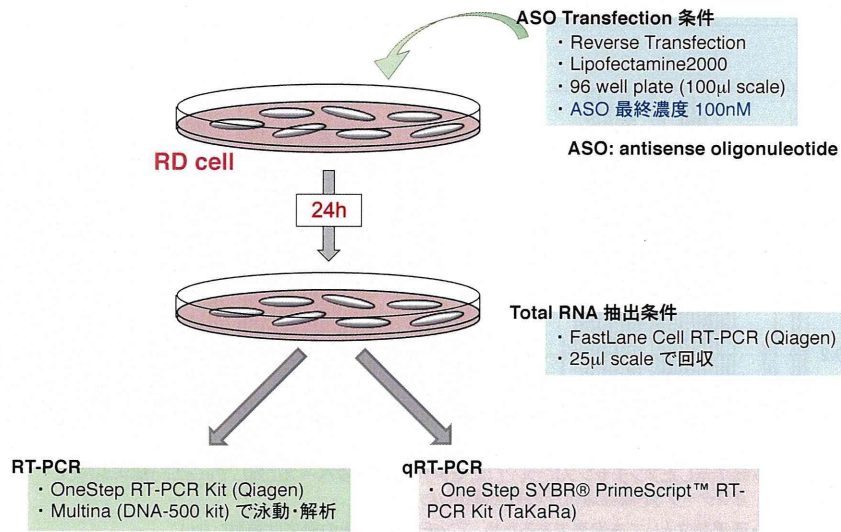
(次頁に続く)

「DMD遺伝子エクソン58」
 に対して設計した140本の
 アンチセンス

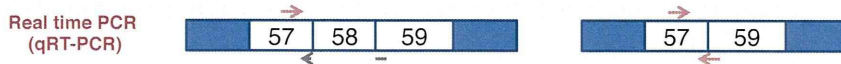
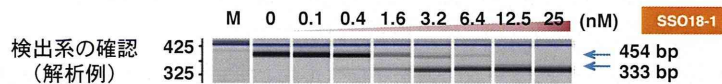
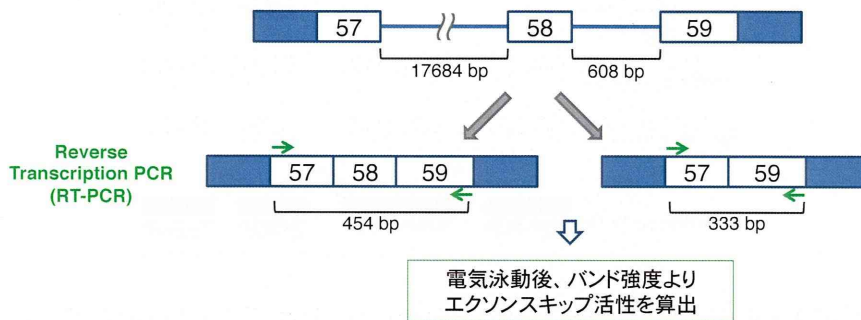
スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)	スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)	スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)
#122-18 cTgTgAaAtGaGgTgAaA	#102-18 tTcAaTtCcCtCtTgAaG	#82-18 tGaTtAcAgGtTcTtTaG
#121-18 cCtGtGaAaTgAgAtGaA	#101-18 tTcAaTtCcCtCtTtGaA	#81-18 aTgAtTaCaGgTtCtTA
#120-18 gCcTgTgAaAtGaGgTgA	#100-18 tTtCaAaTtCcCtCtTgA	#80-18 cAtGaTtAcAgGtTcTtT
#119-18 gGcCtGtGaAaTgAgAtG	#99-18 gTtTtCaAtTcCcTcTtG	#79-18 tCaTgAtTaCaGgTtCtT
#118-18 aGgCcTgTgAaAtGaGgT	#98-18 aGtTtCaAaTtCcCtCtT	#78-18 cTcAtGaTtAcAgGtTcT
#117-18 aAgGcCtGtGaAaTgAgA	#97-18 tAgTtTtCaAtTcCcTcT	#77-18 aCtCaTgAtTaCaGgTtC
#116-18 gAaGgCcTgTgAaAtGaG	#96-18 tTaGtTtCaAaTtCcCtC	#76-18 tAcTcAtGaTtAcAgGtT
#115-18 tGaAgGcCtGtGaAaTgA	#95-18 tTAgTtTtCaAtTcCcT	#75-18 gTaCtCaTgAtTaCaGgT
#114-18 tTgAaGgCcTgTgAaAtG	#94-18 cTtTaGtTtCaAaTtCcC	#74-18 aGtAcTcAtGaTtAcAgG
#113-18 cTtGaAgGcCtGtGaAaT	#93-18 tCtTAaGtTtCaAtTcC	#73-18 aGgTaCtCaTgAtTaCaG
#112-18 tCtTgAaGgCcTgTgAaA	#92-18 tTcTtTaGtTtCaAaTtC	#72-18 aGaGtAcTcAtGaTtAcA
#111-18 cTcTtGaAgGcCtGtGaA	#91-18 gTtCtTAaGtTtCaAtT	#71-18 aAgAgTaCtCaTgAtTaC
#110-18 cCtCtTgAaGgCcTgTgA	#90-18 gGtTcTtTaGtTtCaAaT	#70-18 cAaGaGtAcTcAtGaTtA
#109-18 cCcTcTtGaAgGcCtGtG	#89-18 aGgTtCtTAaGtTtCaA	#69-18 tCaAgAgTaCtCaTgAtT
#108-18 tCcCtCtTgAaGgCcTgT	#88-18 cAgGtTcTtTaGtTtCaA	#68-18 cTcAaGaGtAcTcAtGaT
#107-18 tTcCcTcTtGaAgGcCtG	#87-18 aCaGgTtCtTAaGtTtCaA	#67-18 tCtCaAgAgTaCtCaTgA
#106-18 aTtCcCtCtTgAaGgCcT	#86-18 tAcAgGtTcTtTaGtTtT	#66-18 gTcTcAaGaGtAcTcAtG
#105-18 aAtTcCcTcTtGaAgGcC	#85-18 tTaCaGgTtCtTAaGtTtT	#65-18 aGtCtCaAgAgTaCtCaT
#104-18 cAaTtCcCtCtTgAaGgC	#84-18 aTtAcAgGtTcTtTaGtT	#64-18 cAgTcTcAaGaGtAcTcA
#103-18 tCaAtTcCcTtTgAaGgG	#83-18 gAtTaCaGgTtCtTAaGtT	#63-18 aCaGtCtCaAgAgTaCtC

スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)	スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)	スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)	スクリーニング用配列 (小文字:DNA, 大文字:LNA)
#62-18 tAcAgTcTcAaGaGtAcT	#42-18 tGcTcTgTcAgAaAtAtT	#22-18 tCtCAgTcCtTcCaAaG	#2-18 tCtGgGcTcCtGgTaGaG
#61-18 gTaCaGtCtCaAgAgTaC	#41-18 cTgCtCtGtCaGaAaTaT	#21-18 tTcTcTaGtCtTtCcAaA	#1-18 cTgGgCtCtGtGtAgAgT
#60-18 cGtAcAgTcTcAaGaGtA	#40-18 gCtGcTgTcAgAaAtA	#20-18 tTtCtCAgTcCtTcCaA	#-1-18 cCtCtGgGcTcCtGgTaG
#59-18 tCgTaCaGtCtCaAgAgT	#39-18 gGcTgCtCtGtCaGaAaT	#19-18 gTtTcTcTaGtCtTtCcA	#-2-18 aCcTgGgCtCtGtGtAgA
#58-18 tTcGtAcAgTcTcAaGaG	#38-18 aGgCtGcTcTgTcAgAaA	#18-18 aGtTtCtCAgTcCtTcC	#-3-18 tAcCtCtGgGcTcCtGgT
#57-18 aTtCgTaCaGtCtCaAgA	#37-18 aAgGcTgCtCtGtCaGaA	#17-18 aGgTtTcTcTaGtCtTtC	#-4-18 tTaCcTgGgCtCtGtGtA
#56-18 tAtTcGtAcAgTcTcAaG	#36-18 aAaGgCtGcTcTgTcAgA	#16-18 aGaGtTtCtCAgTcCtT	#-5-18 aTtAcCtCtGgGcTcCtG
#55-18 aTaTtCgTaCaGtCtCaA	#35-18 cAaAgGcTgCtCtGtCaG	#15-18 tAgAgTtTcTcTaGtCtC	#-6-18 aAtTaCcTgGgCtCtGgT
#54-18 aAtAtTcGtAcAgTcTcA	#34-18 cCaAaGgCtGcTcTgTcA	#14-18 gTaGaGtTtCtCAgTcC	#-7-18 cAaTtAcCtCtGgGcTcC
#53-18 aAaTaTtCgTaCaGtCtC	#33-18 tCcAaAgGcTgCtCtGtC	#13-18 gGtAgAgTtTcTcTaGtC	#-8-18 tCaAtTaCcTgGgCtCtC
#52-18 gAaAtAtTcGtAcAgTcT	#32-18 tTcCaAaGgCtGcTcTgT	#12-18 tGgTaGaGtTtCtCAgT	#-9-18 tTcAaTtAcCtCtGgGcT
#51-18 aGaAaTaTtCgTaCaGtC	#31-18 cTtCcAaAgGcTgCtCtG	#11-18 cTgGtAgAgTtTcTcTaG	#-10-18 aTtCaAtTaCcTgGgCtC
#50-18 cAgAaAtAtTcGtAcAgT	#30-18 cCtTcCaAaGgCtGcTcT	#10-18 cCtGgTaGaGtTtCtCA	#-11-18 cAtTcAaTtAcCtCtGgG
#49-18 tCaGaAaTaTtCgTaCaG	#29-18 tCcTtCcAaAgGcTgCtC	#9-18 tCcTgGtAgAgTtTcTcT	#-12-18 aCaTtCaAtTaCcTgGgC
#48-18 gTcAgAaAtAtTcGtAcA	#28-18 gTcCtTcCaAaGgCtGcT	#8-18 cTcCtGgTaGaGtTtCtC	#-13-18 cAcAtTcAaTtAcCtCtG
#47-18 tGtCaGaAaTaTtCgTaC	#27-18 aGtCtTtCcAaAgGcTgC	#7-18 gCtCtTgGtAgAgTtTcT	#-14-18 cCaCaTtCaAtTaCcTgG
#46-18 cTgTcAgAaAtAtTcGtA	#26-18 tAgTcCtTcCaAaGgCtG	#6-18 gGcTcCtGgTaGaGtTtC	#-15-18 tCcAcAtTcAaTtAcCtC
#45-18 tCtGtCaGaAaTaTtCgT	#25-18 cTaGtCtTtCcAaAgGcT	#5-18 gGgCtCtTgGtAgAgTtT	#-16-18 tTcCaCaTtCaAtTaCcT
#44-18 cTcTgTcAgAaAtAtTcG	#24-18 tCtAgTcCtTcCaAaGgC	#4-18 tGgGcTcCtGgTaGaGtT	#-17-18 gTtCcAcAtTcAaTtAcC
#43-18 gCtCtGtCaGaAaTaTtC	#23-18 cTcTaGtCtTtCcAaAgG	#3-18 cTgGgCtCtTgGtAgAgT	#-18-18 aGtTcCaCaTtCaAtTaC

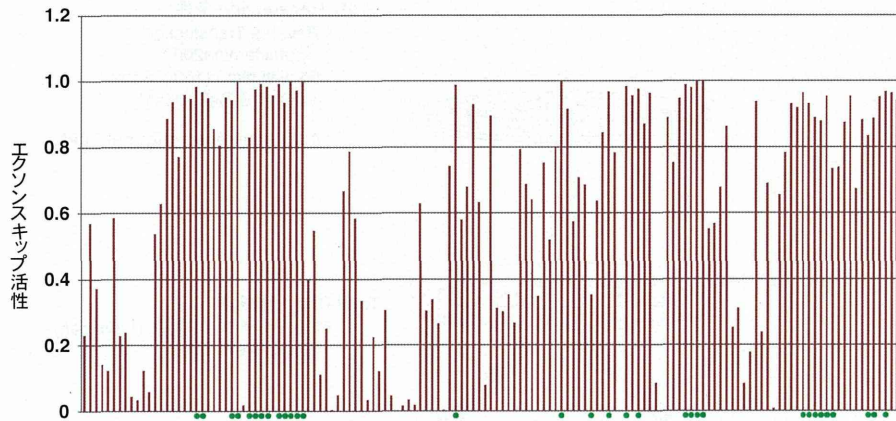
【図表17】 DMD遺伝子エクソン58のスキップを誘導するアンチセンスのスクリーニング(解析条件)



【図表18】 エクソンスキップ活性の検出系

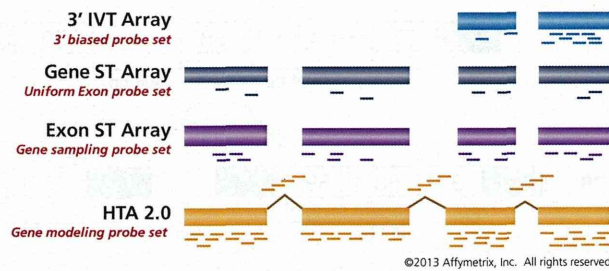


【図表19】 DMD遺伝子エクソン58のスキップを誘導するアンチセンスのスクリーニング(結果)



- 緑で示したアンチセンスについては、ヒトゲノムデータベースに対してin silico解析を行い、オフターゲット候補遺伝子の数を算出した。
- 原著論文として未発表であるため、アンチセンスIDとの対応は掲載しない。

【図表20】 高密度エクソンアレイ(HTA2.0)の特徴



©2013 Affymetrix, Inc. All rights reserved

- 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。

【図表21】

HTA2.0では1つのエクソンに対し、
複数のプローブセットが用意されているケースがある

1つのエクソンに対する プローブセット数	左列のプローブセット数が 設定されたエクソンの数
0	2562
1	267791
2	55022
3	23275
4	10613
5	5539
6	3249
7	1930
8	1046
9	735
10	431
11	295
12	185
13	63
14	89
15	46
16以上	56

*1プローブセットは10個のプローブから構成されている

【図表22】

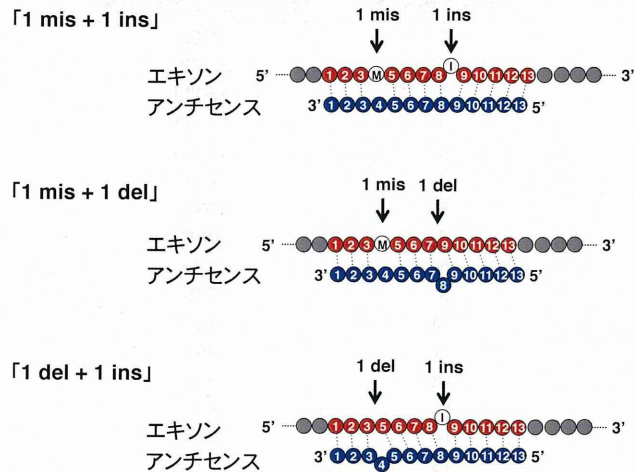
アンチセンスとエクソン間の
「相補の不完全性」の分類

「相補の不完全性」 の分類	概念図	優先順位
ミスマッチ (mis)	エクソン 5' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 3' アンチセンス 3' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 5'	
インサージョン (ins)	エクソン 5' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 3' アンチセンス 3' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 5'	
デリーション (del)	エクソン 5' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 3' アンチセンス 3' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 5'	
上記3種の混合 (mix)	エクソン 5' ●●●●●●●●●●●●●●●●●●●● 3' アンチセンス 3' ●●● 5'	

「優先順位」に関しては図表23に解説を記載した

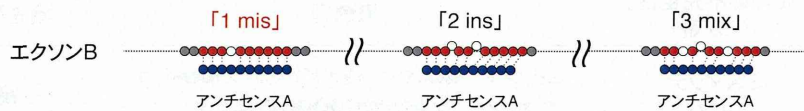
【図表23】

結合様式「2 mix」と表現する相補結合パターン(例)



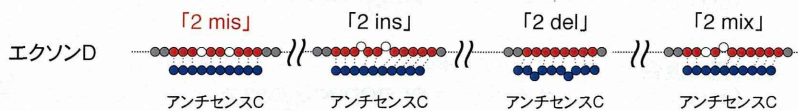
【図表24】 アンチセンスとエクソンの結合様式の分類ルール (version.1)

・1エクソン上に「1 mis」、 「2 ins」、 「3 mix」の結合様式が混在する場合



- 不適合箇所が最も少ない「1 mis」が最も影響が大きいと判断
- 「1 mis」に分類

・1エクソン上に「2 mis」、 「2 ins」、 「2 del」、 「2 mix」の結合様式が混在する場合



- 優先順位として「mis > ins > del > mix」を適応
- 「2 mis」に分類

【図表25】

高密度エクソンアレイの解析結果
- 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 -

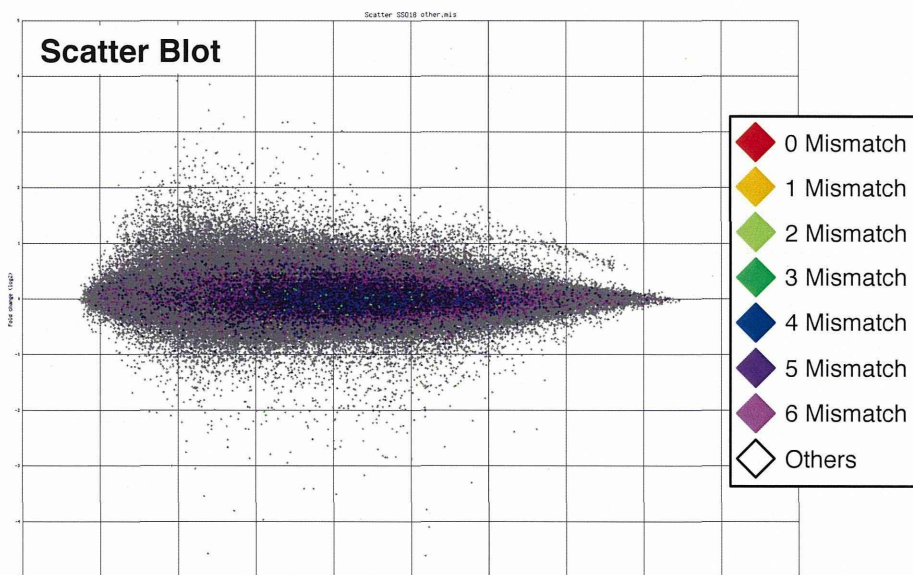
SSO18	Mismatch							Other	Total
	0	1	2	3	4	5	6		
1. In Silico Analysis	13	3	14	98	960	5661	14249	185191	408485
2. On Array	0	0	21	142	1333	6778	12854	386033	574251
3. Present	0	0	17	83	975	4886	9093	222378	356345
4. Varied	0	0	7	25	159	689	1226	26671	44697
5. Down Regulated	0	0	1	4	8	9	5	194	396
6. Percentage	N.A.	N.A.	5.88	4.82	0.82	0.18	0.05	0.09	0.11

SSO18-2:DMD遺伝子エクソン58のスキップ活性を有する18塩基長のアンチセンス

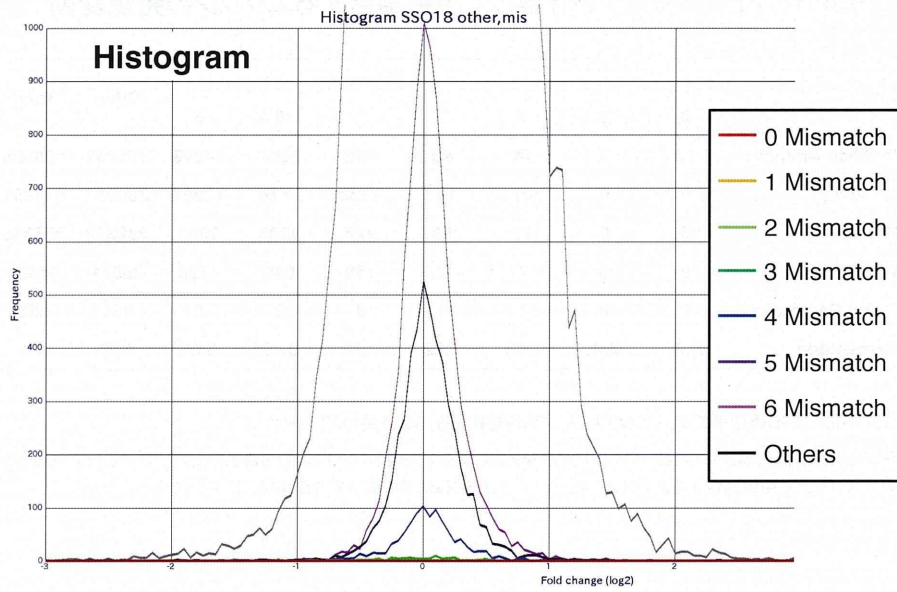
SSO18と相補性のないエクソン(Other)が50%未満に減少する確率は「0.09%」であるのに対して、例えば、4塩基ミスマッチで相補結合するエクソン(Mismatch 4)が50%未満に減少する確率は「0.82%」である。

【図表26】

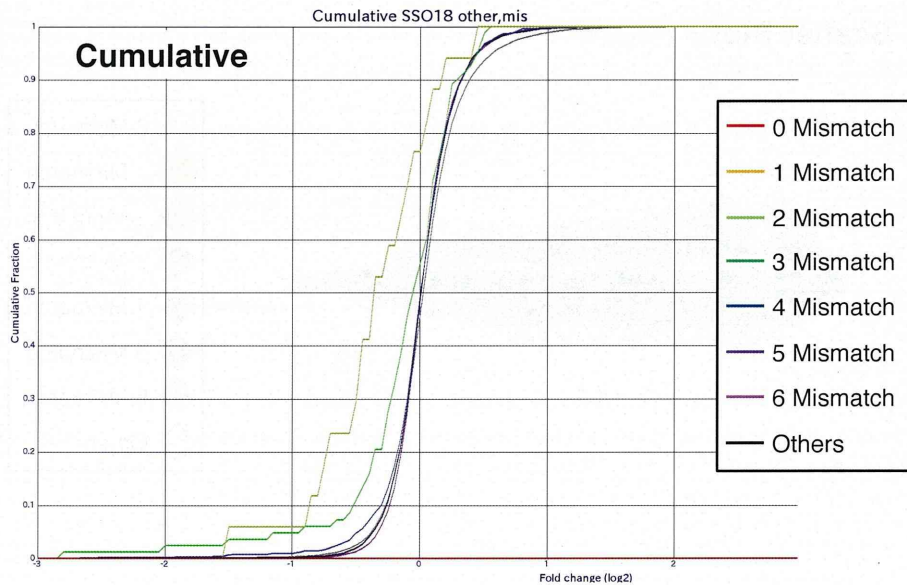
高密度エクソンアレイの解析結果
- SSO18-2とミスマッチを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



【図表27】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - 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28】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - 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29】

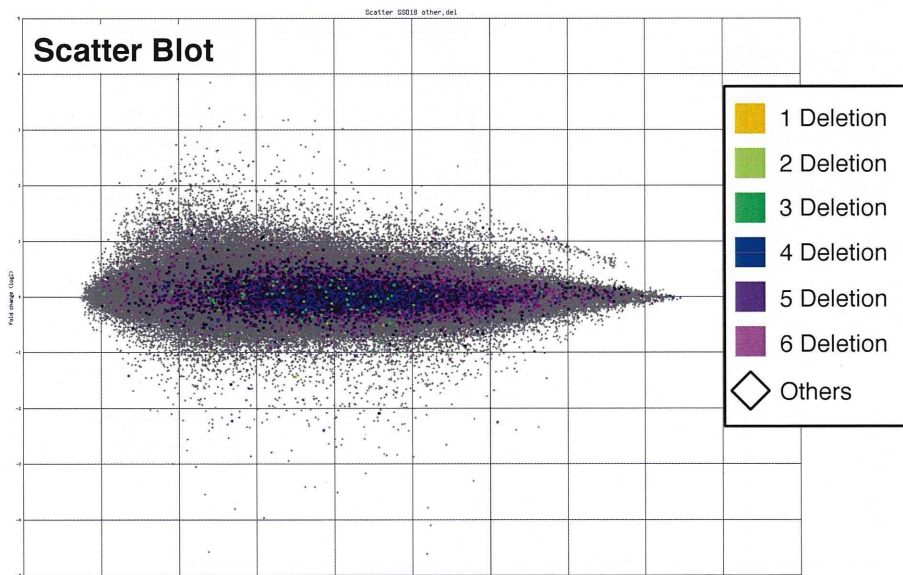
高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2と~~デリション~~を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

SSO18	Deletion						Other	Total
	1	2	3	4	5	6		
1. In Silico Analysis	0	10	68	768	2676	8388	185191	408485
2. On Array	0	10	92	874	3149	6632	386033	574251
3. Present	0	9	66	629	2262	4798	222378	356345
4. Varied	0	5	15	110	274	621	26671	44697
5. Down Regulated	0	1	1	4	1	3	194	396
6. Percentage	N.A.	11.11	1.52	0.64	0.04	0.06	0.09	0.11

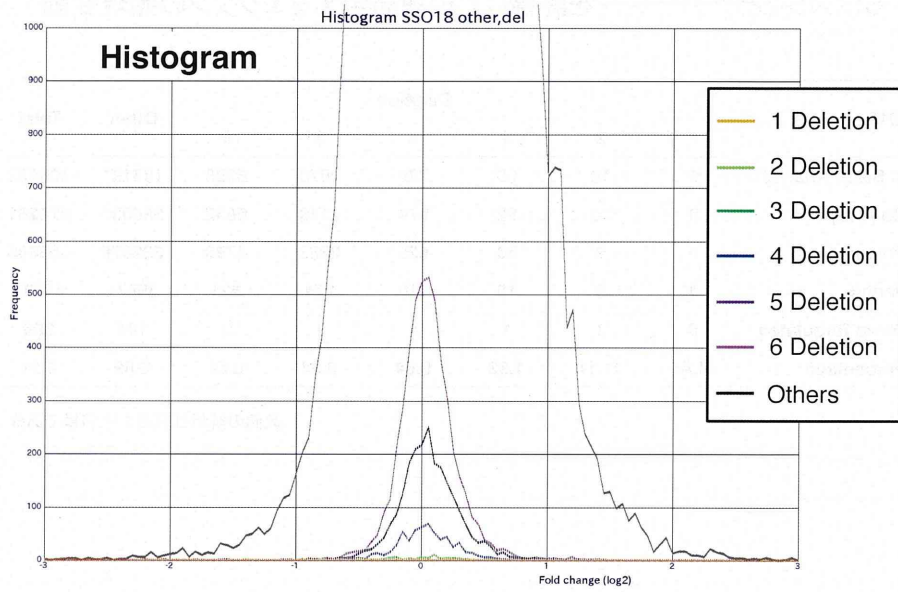
数値の解釈は図表24と同様である

【図表30】

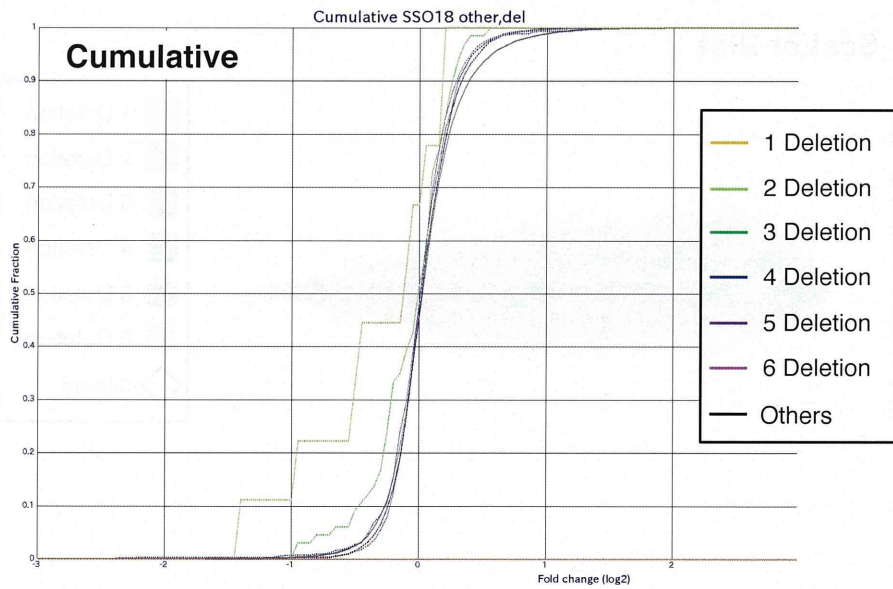
高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2と~~デリション~~を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



【図表31】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とデリ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32】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とデリ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】

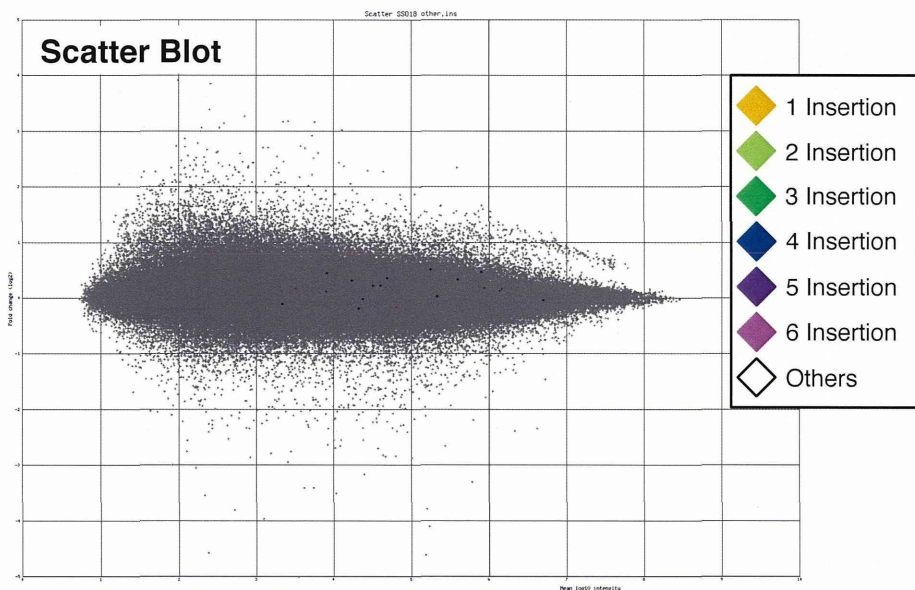
高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とインサクションを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

SSO18	Insertion						Other	Total
	1	2	3	4	5	6		
1. In Silico Analysis	0	0	1	12	18	4	185191	408485
2. On Array	0	0	0	4	22	5	386033	574251
3. Present	0	0	0	4	13	2	222378	356345
4. Varied	0	0	0	1	1	0	26671	44697
5. Down Regulated	0	0	0	0	0	0	194	396
6. Percentage	N.A.	N.A.	N.A.	0	0	0	0.09	0.11

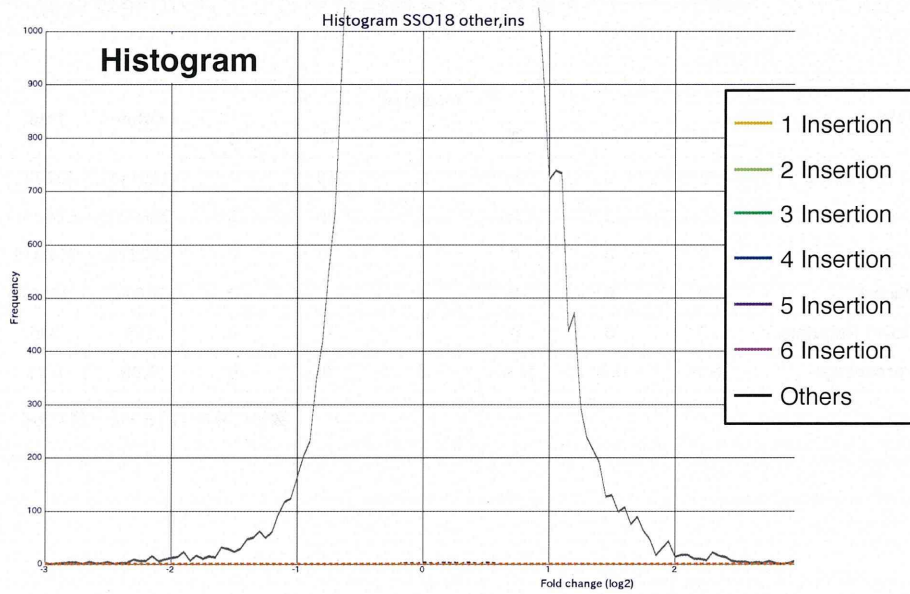
数値の解釈は図表24と同様である

【図表34】

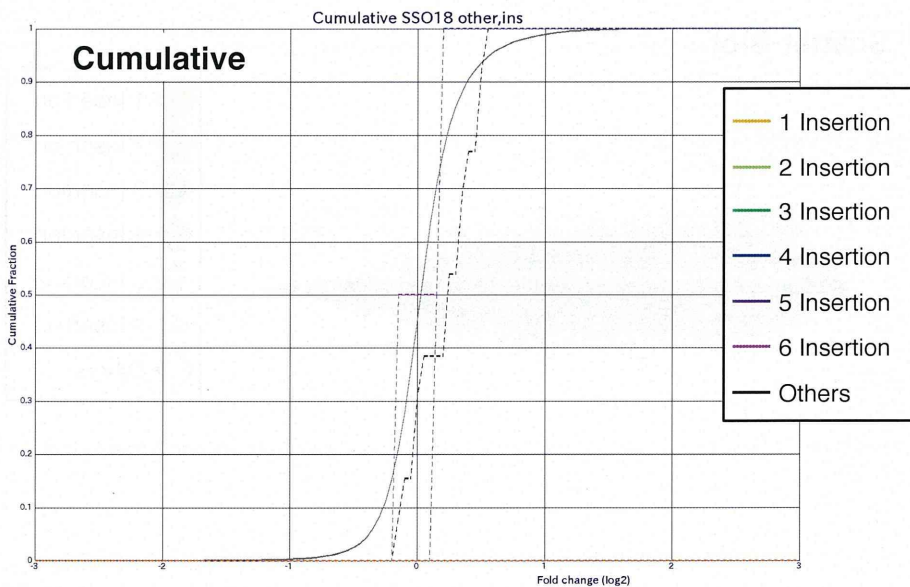
高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とインサクションを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



【図表35】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とインサク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36】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とインサク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37】

高密度エクソンアレイの解析結果

- SSO18-2とmis, del, Insの混合を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

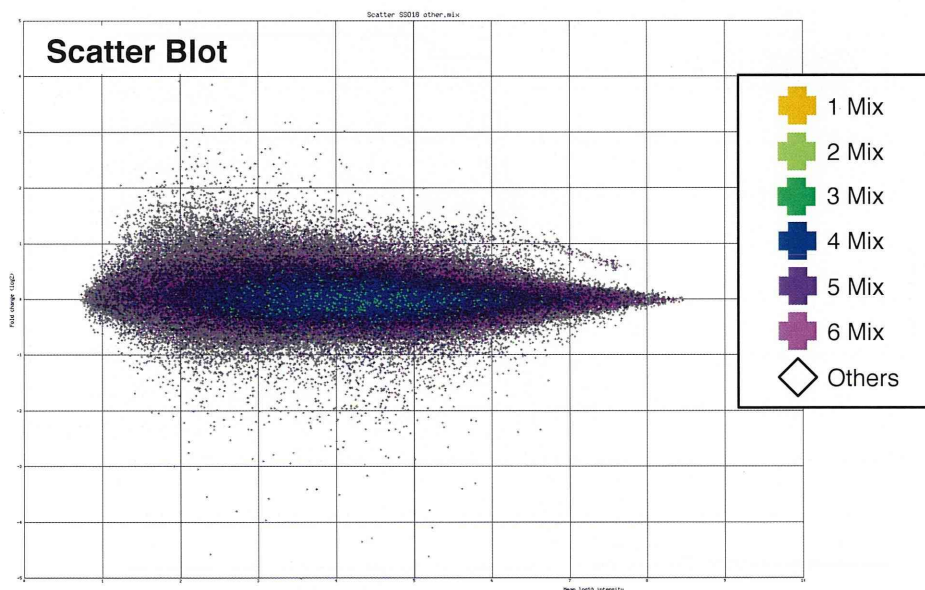
SSO18	Mix					Other	Total
	2	3	4	5	6		
1. In Silico Analysis	44	595	8092	50710	130910	185191	408485
2. On Array	36	733	10194	50924	94415	386033	574251
3. Present	24	505	7350	36188	67063	222378	356345
4. Varied	11	136	1207	4875	8664	26671	44697
5. Down Regulated	3	13	34	35	80	194	396
6. Percentage	12.5	2.57	0.46	0.1	0.12	0.09	0.11

数値の解釈は図表24と同様である

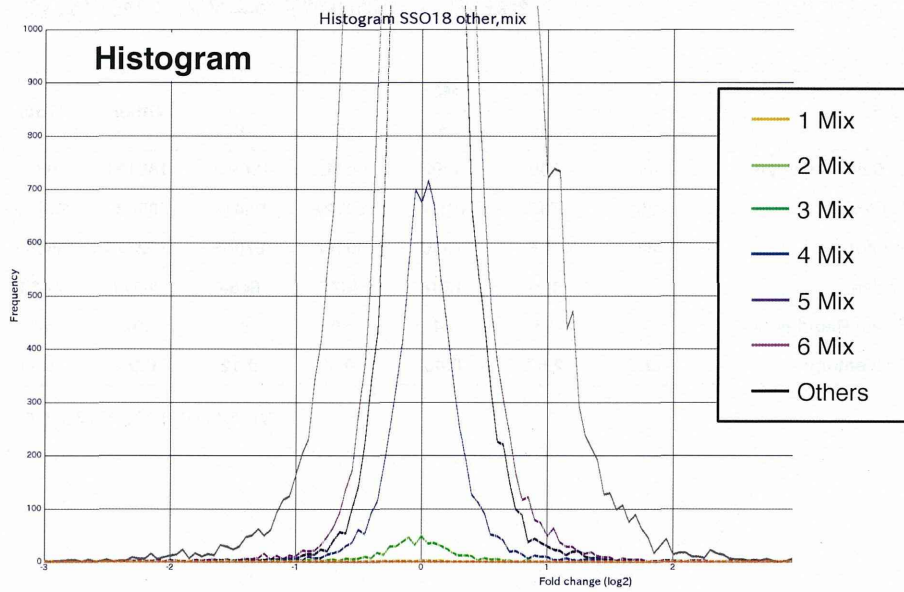
【図表38】

高密度エクソンアレイの解析結果

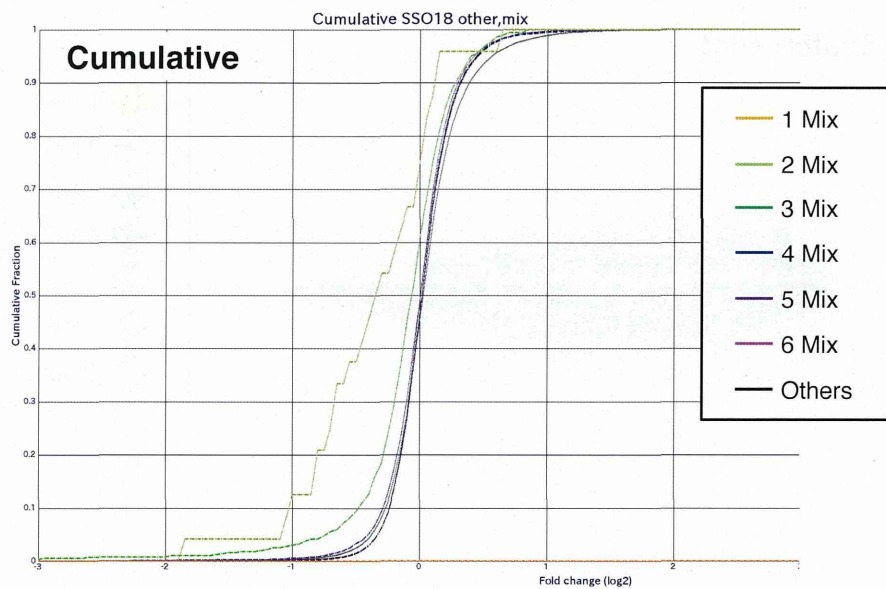
- SSO18-2とmis, del, Insの混合を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



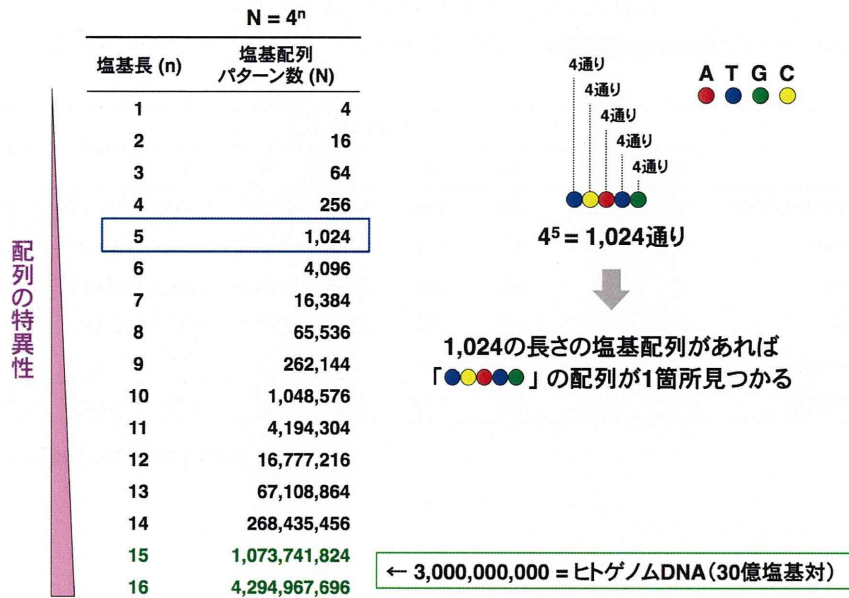
【図表39】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とmis, del, Insの混合を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



【図表40】 高密度エクソンアレイの解析結果
 - SSO18-2とmis, del, Insの混合を許容して相補結合するエクソンの発現変動 -



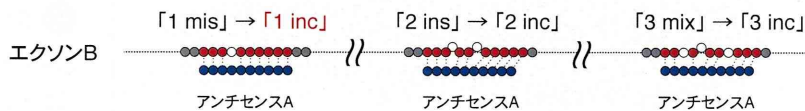
【図表41】 塩基長と塩基配列パターン数の理論値



【図表42】 アンチセンスとエクソンの結合様式の分類ルール (version.2)

「mis」、「ins」、「del」を区別せず、3種の総数で分類。
「inc (= incompatibility)」の記号で表記。

・1エクソン上に「1 mis」、「2 ins」、「3 mix」の結合様式が混在する場合



- 不適合箇所が最も少ない「1 inc」が最も影響が大きいと判断
- 「1 inc」に分類

【図表43】

高密度エクソンアレイの解析結果

- SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

SSO18	Incompatibility						Other	Total	
	0	1	2	3	4	5			6
1. In Silico Analysis	13	3	68	762	9832	59065	153551	185191	408485
2. On Array	0	0	67	967	12405	60873	113906	386033	574251
3. Present	0	0	50	654	8958	43349	80956	222378	356345
4. Varied	0	0	23	176	1477	5839	10511	26671	44697
5. Down Regulated	0	0	5	18	46	45	88	194	396
6. Percentage	N.A.	N.A.	10	2.75	0.51	0.1	0.11	0.09	0.11

数値の解釈は図表24と同様である

【図表44】

高密度エクソンアレイの解析結果

- SSO18-2とincompatibilityを許容して相補結合するエクソンの発現変動 -

