

A. 研究目的

一般に核酸医薬の原薬となるオリゴヌクレオチドは、DNA 自動合成装置を用いた固相合成により調製される。従来の低分子医薬品で主に用いられている液相合成とは異なり、固相合成では厳密に制御された化学反応を繰り返し行うことでオリゴヌクレオチドやペプチドのようにモノマー（オリゴヌクレオチドの場合はヌクレオチドモノマー、ペプチドの場合はアミノ酸モノマー）を決められた配列通り合成することが可能であり、自動化に対応しやすく、比較的簡便に目的とする中～長鎖の生成物を得ることができるという利点を有する。特に、オリゴヌクレオチドの固相合成においては、ホスホロアミダイト法と呼ばれる成熟した化学合成法が利用でき、比較的純度の高いオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。一方で、繰り返し行われる化学反応サイクルの過程においては基本的に精製工程が含まれないことから、医薬品の原薬としてオリゴヌクレオチドを捉えた場合に、その品質担保は極めて重要であり、とりわけ、DNA 自動合成に用いる原料(アミダイト体)の品質には一定の注意を払う必要が有ることとは言うまでもない。

そこで、今年度は原薬製造における重要な検討項目の一つであるアミダイト体の品質評価に関して、各種の分析手法を利用して精査を行うこととした。

B. 研究方法

今回、原薬製造の原料となるアミダイト体の品質を評価するために、1) 逆相 HPLC、2) ^{31}P -NMR、3) ^1H -NMR の各手法を用い分析を実施した。対象とした原料は原薬となるオリゴヌクレオチドに搭載されている人工核酸 AmNA アミダイトであり、これらは国内化学メーカーにより受託合成されたものである。また、AmNA アミダイトの分析は株式会社ジーンデザインの協力のもと実施した。

1) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

今回のオリゴヌクレオチド原薬には、AmNA と呼ばれる架橋型人工核酸が搭載される。核酸のアミダイト体には紫外吸収のクロモフォアとなる核酸塩基が含まれるため、一般に 260 nm の紫外吸収を測定することでその検出が可能である。そこで、これら AmNA のアミダイト体(A, G, C, T の 4 種)について、紫外吸収 (260 nm) を指標とした逆相 HPLC による分析を実施し、その純度を評価した。

2) 人工核酸AmNAアミダイト体の ^{31}P -NMR 分析

アミダイト体合成の最終段階では、基質となるヌクレオシド体の3'位水酸基への亜リン酸化が施され、その後クロマト等による精製が行われる。そのため、アミダイト

体に含まれる不純物として各種のリン誘導体が想定される。またアミダイト体自身には3個のリン原子が含まれること、そのリン原子の立体化学は制御されないことから、一般に ^{31}P -NMR測定により、その構造の特定、純度の評価が可能となる。そこで、各AmNAアミダイト体について ^{31}P -NMR測定を実施し、その構造並びに純度情報を収集した。

3) 人工核酸AmNAアミダイト体の ^1H -NMR分析

上述の通り、アミダイト体には3個のリン原子が含まれることから ^{31}P -NMR分析は非常に強力な分析手法である。しかし、リン原子を含まない不純物の確認に ^{31}P -NMRは非力である。そこで、一般的な有機化合物の分析に広く用いられている ^1H -NMR測定を行い、リン原子を含まない夾雑物の検出の可否について検討を行った。

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 研究結果

1) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

AmNA アミダイト体の純度を精査するために、逆相 HPLC による分析を実施した(図 1-a~h)。アミダイト体はその化学構造上、リン原子の立体化学が異なる2種のジアステレオマー混合物として存在するが、今回これらジアステレオマーは一般的な

逆相 HPLC 条件下で分離可能であった。

HPLC 分析では、立体化学の同定は困難であるが、その比率は AmNA-T アミダイトの場合 $a:b = 70:30$ (ここで、 a は逆相 HPLC において保持時間の短い異性体を、 b は保持時間の長い異性体の割合を示す)、AmNA-mC においては、 $a:b = 74:26$ 、また AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a:b = 56:44$ 及び $a:b = 59:41$ であった。なお、ここでそれぞれの割合については、260 nm の紫外吸収を指標とした面積百分率より算出している。一方、今回分析を行った AmNA アミダイト体は、いずれも比較的純度が高く今回の逆相 HPLC 分析では、いずれも 96%以上の純度(両ジアステレオマーを合算して算出)を示した。上述の通り、本分析においては 260 nm における紫外吸収を指標とした際の各ピーク面積を基準に異性体の生成比並びに純度の算出を行っている。異性体比については両異性体間でモル吸光係数に違いがないと考えられることから、正確な比率を算出できているものと判断できるが、一方で純度評価に関しては、260 nm における紫外吸収を示す化合物(目的化合物であるアミダイト体及びその他不純物)のみが検出対象となる。すなわち、クロモフォアを含まない不純物については評価対象外となる点には留意が必要である。

2) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分析

次に、AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分

析を実施した (図 2-a~d)。逆相 HPLC 分析において確認されたリン原子の立体化学が異なる 2 種のジアステレオマーの存在については、今回の ^{31}P -NMR 分析においても明確に検出された。すなわち、各アミダイト体は 150 ppm 付近にジアステレオマー由来の 2 本のシングレットシグナルを与えた。 ^{31}P -NMR のシグナル強度 (シグナルの積分値) からその存在比を決定することは一般的ではないが、今回測定を行った 4 種の AmNA アミダイト体について、 ^{31}P -NMR のシグナル積分値から両ジアステレオマーの存在比を算出したところ、AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 71 : 29$ (HPLC では $70 : 30$)、AmNA-mC では $a : b = 73 : 27$ (HPLC では $74 : 26$)、AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ (HPLC では $56 : 44$) 及び $a : b = 59 : 41$ (HPLC では $58 : 42$) という結果を与え、いずれも逆相 HPLC 分析での結果と良い一致を示した。

また、今回の ^{31}P -NMR 測定において、各アミダイト体に由来する 150 ppm 付近のシグナル以外に、高磁場側に複数のシグナルが観測されている (図 2-e,f)。これらシグナルがどのような構造の不純物に由来するものかは現時点で同定できていないが、いずれのシグナルもそのケミカルシフト値が目的とするアミダイト体と大きくずれていることから、リン原子近傍の化学構造に比較的大きな変化があるものと推察される。

3) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^1H -NMR

分析

ほぼ全ての有機化合物にはプロトンが存在するため、 ^1H -NMR は対象とする化合物の構造同定、特性解析に有力な手法である。しかしながら定量下限の問題から、医薬品並びにその原料の不純物分析には用いられることが少ない。ここでは、AmNA アミダイト体の ^1H -NMR 測定を行い、その特性解析並びに不純物分析の可否について検証を行った (図 3-a~d)。

今回測定を行った各アミダイト体は、高磁場側から低磁場側の比較的広い領域に特徴的なシグナルを与えた。特に、3.8 ppm 付近に見られる DMTr 基由来の強いシングレットシグナルや 5.5 ppm 付近の 1' 位水素原子に由来するシングレットシグナル等が特徴的である。またその他にも、アミド窒素原子上のメチル基や T 又は mC 塩基の 5 位メチル基など、特徴的なシングレットシグナルが観測されている。先述の通り、アミダイト体はジアステレオマー混合物であるため、各シグナルはそれぞれのジアステレオマー存在比に応じた強度で観測されており、比較的複雑なチャートを与えるが、今回の試料のように比較的純度が高い場合には、ほぼ全てのシグナルを帰属することが可能であり、構造同定、特製解析には十分利用可能であると言える。一方で、純度分析という観点からこのチャートを検証した場合、 ^1H -NMR 測定はアミダイト体の純度を正確に判断する分析法であるとは言い難いことがあらためて確認された。

D. 考案

I. 各AmNAアミダイト体の品質管理に向けた分析手法について

今回、核酸医薬の製造原料となるAmNAアミダイト体を、逆相HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMRにより分析した。アミダイト体には、クロモフォアとして核酸塩基や5'位の保護基であるDMTr基等が存在するため、紫外吸収により高感度検出が可能である。そのため、逆相HPLCによる分析は高い検出力をもって行うことができ、純度確認においても高い有効性を示すことが確認された。一方で、紫外吸収を示さない不純物の検出には他の分析手法の利用が必要となる。今回は検証を行っていないが、例えばLC-MSのように質量分析を併用する手法はその候補の一つであろう。また、アミダイト体の化学合成過程を鑑みて、リン原子を含む不純物の混入にも注意を払う必要がある。

今回、³¹P-NMR分析により、逆相HPLC分析に匹敵する精度で、各アミダイト体のジアステレオマー比を算出可能であることが示された。今回は、³¹P-NMRの定量下限を精査するには至らなかったため、本法がアミダイト体の純度試験にどの程度利用可能かは十分に検証できていないが、今後純度試験への利用の可否について検討する価値があると考えられる。また、³¹P-NMRでは化合物に含まれるリン原子の環境の違い（リンの酸化状態、リン原子に結合した原子種等）を検出できることから、構造解析において強力な分析手法であることが確認された。

一方で、今回の検討から¹H-NMR分析は比較的純度の高いアミダイト体の構造同定、特性解析には有効であるものの、純度試験には適さないことがあらためて確認された。これは、アミダイト体自身に数多くのプロトンが存在することに加えて、アミダイト体がジアステレオマー混合物であることに起因する。

今回の結果から、高度に官能基化され、その構造中にクロモフォアやリン原子を含むアミダイト体の品質管理においては、その構造特性に応じた分析手法を単独あるいは複数組み合わせる事が重要であることがわかる。また、今回は詳細な検証に至らなかったが、高純度に精製されたアミダイト体にも含まれる不純物の構造同定を進めることで、核酸医薬の製造における課題を原料の純度という観点から議論することが望まれる。

E. 結論

本研究では、我々が検討を進めているPCSK9をターゲットとした核酸医薬の原薬となる人工核酸AmNA搭載型オリゴヌクレオチドの製造原料（アミダイト体）の品質を検証するために、逆相HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMRによる分析を実施し、それぞれの分析手法の有効性、適用範囲等について検証を行った。今回得られた知見に加えて、アミダイト体に含まれる不純物の構造同定が今後進むことによって、核酸医薬製造における

種々の課題を原料の純度という観点から議論することが可能になるものと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

論文

1. Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S, Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides *in vivo*, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, *in revision*.
2. Mori K, Kodama T, Obika S, Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, *23*, 33-37.
3. Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S, Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance, *Org. Lett.*, 2014, *16*, 5640-5643.
4. Mori S, Morihiro K, Obika S, C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability, *Molecules*, 2014, *19*, 5109-5118.
5. Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S, Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, *12*, 2468-2473.
6. Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, Obika S, Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides *in Vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, *42*, 8174-8187.
7. Yamamoto T, Wada S, Wada F, Shigesada H, Harada-Shiba M, Obika S, Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice, *Nucleic Acid Therapeutics*, 2014, *24*, 283-290.

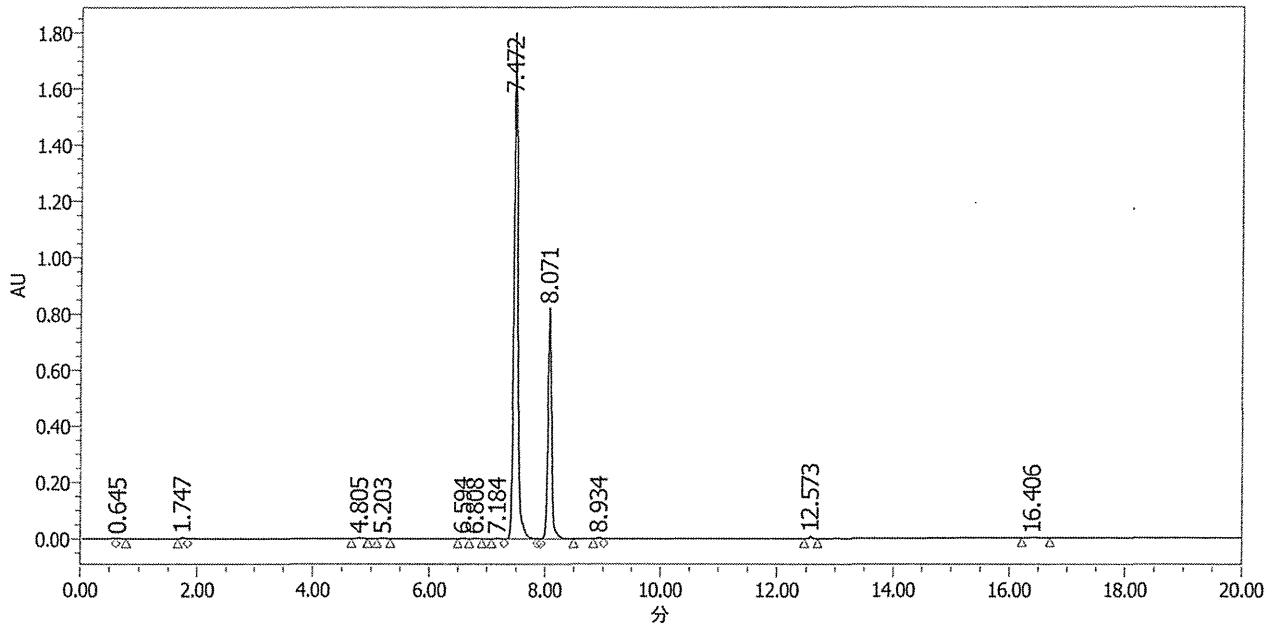


図 1-a. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析

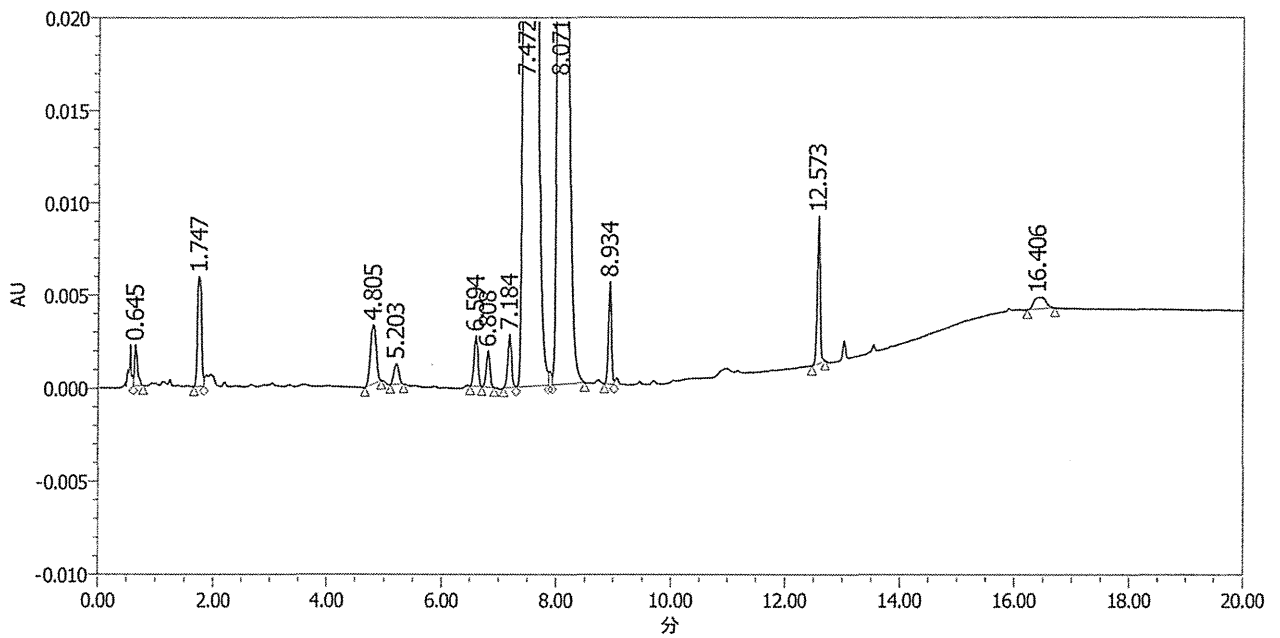


図 1-b. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

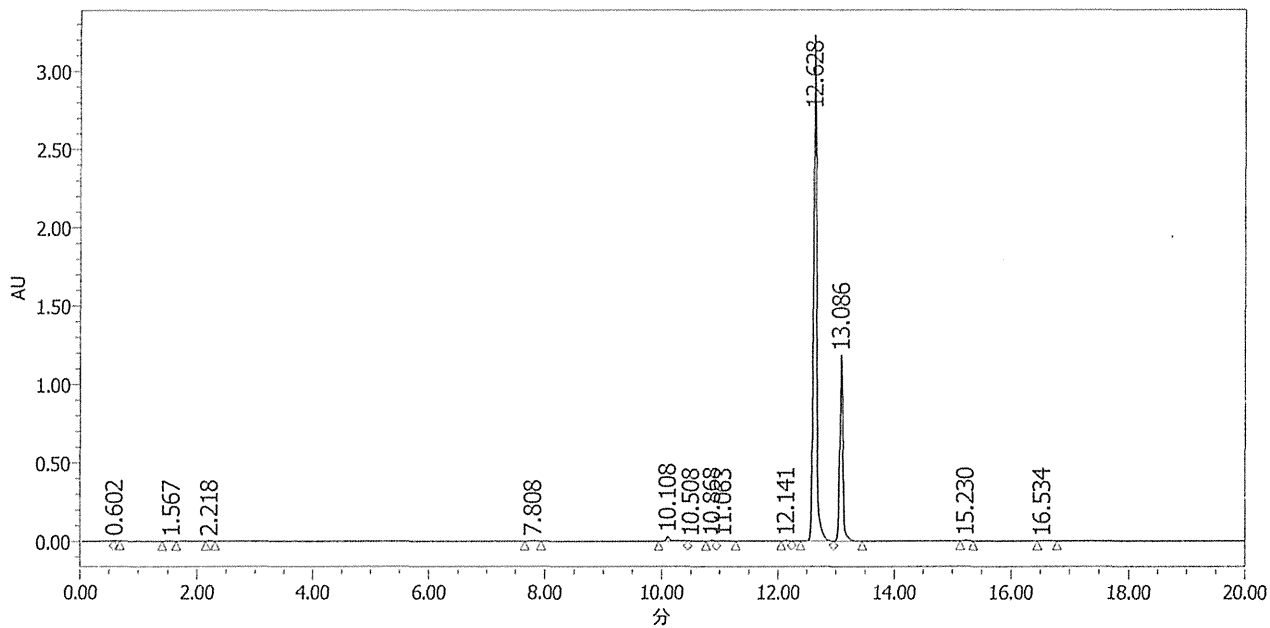


図 1-c. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析

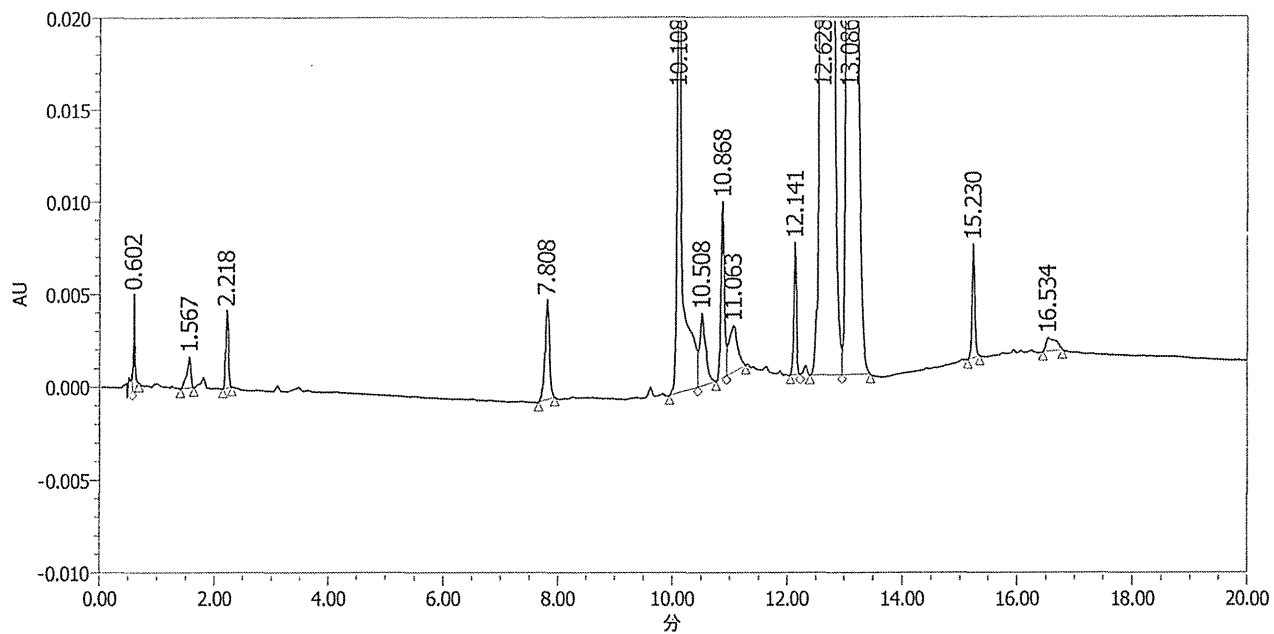


図 1-d. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

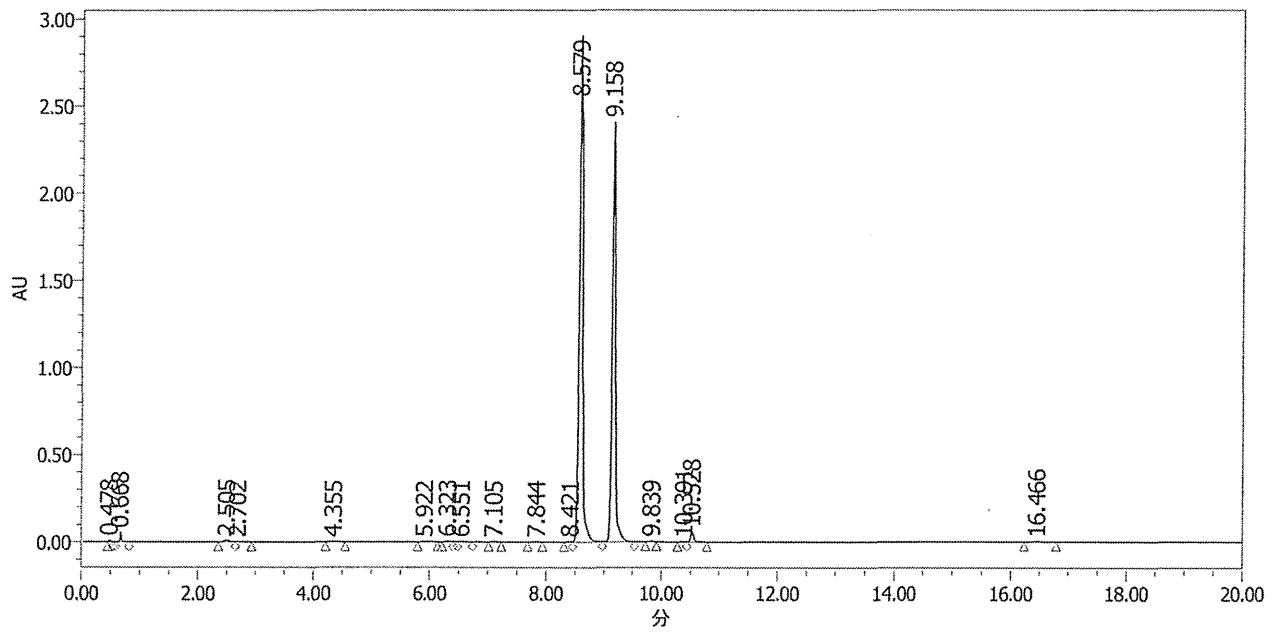


図 1-e. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析

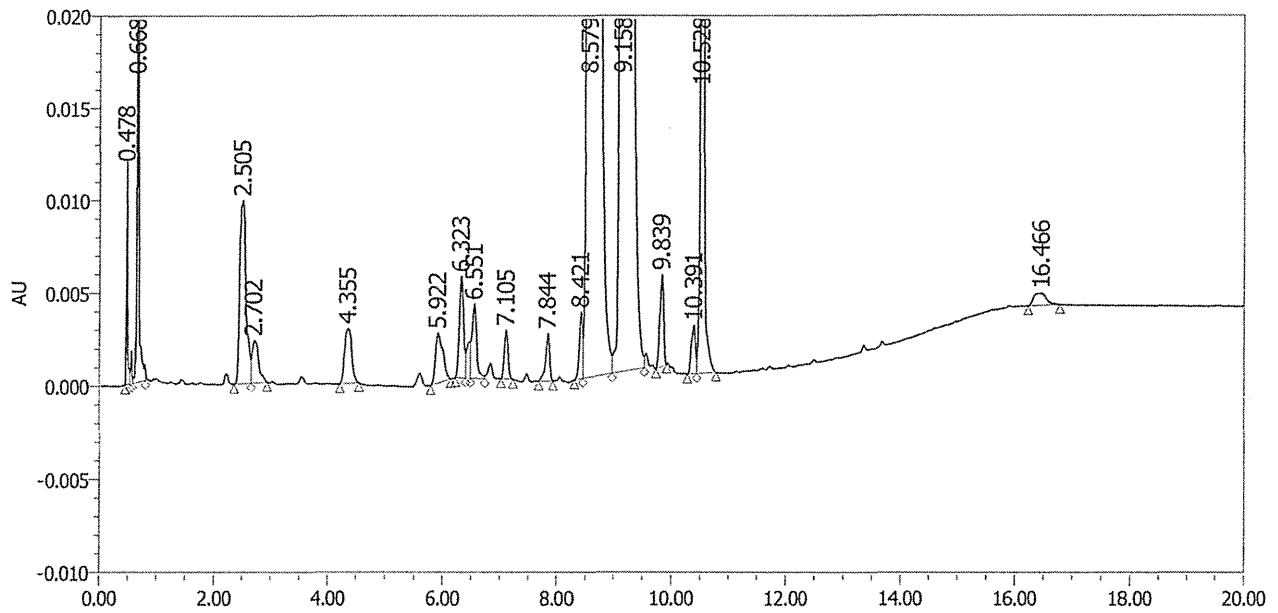


図 1-f. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

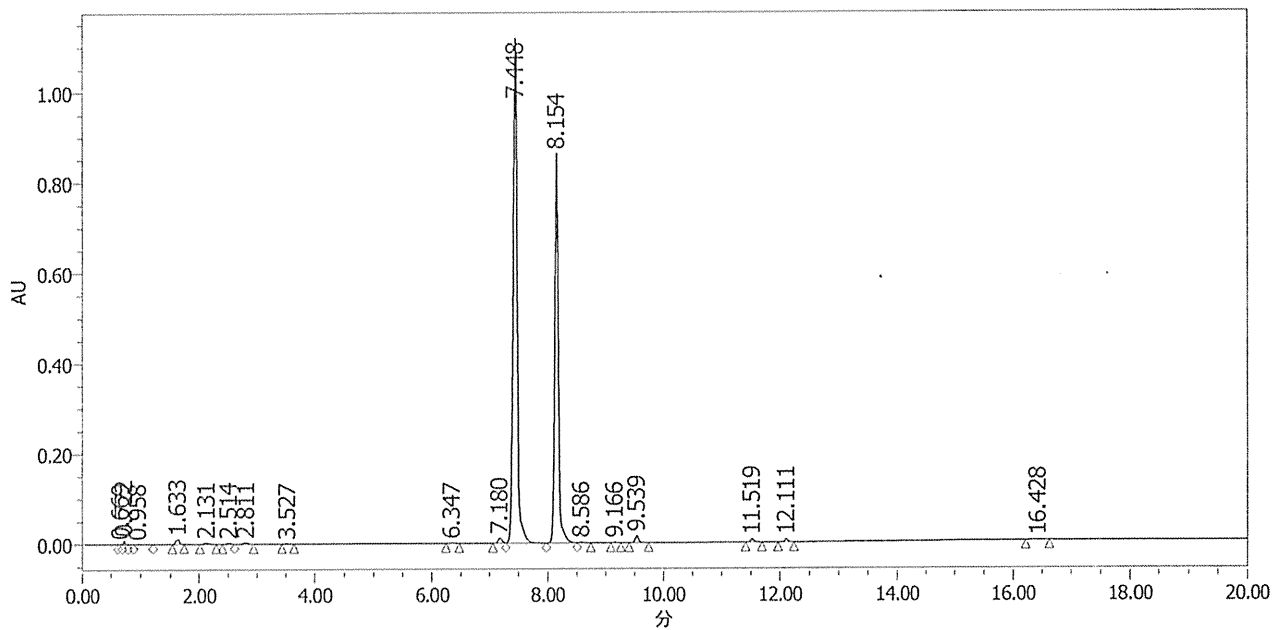


図 1-g. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析

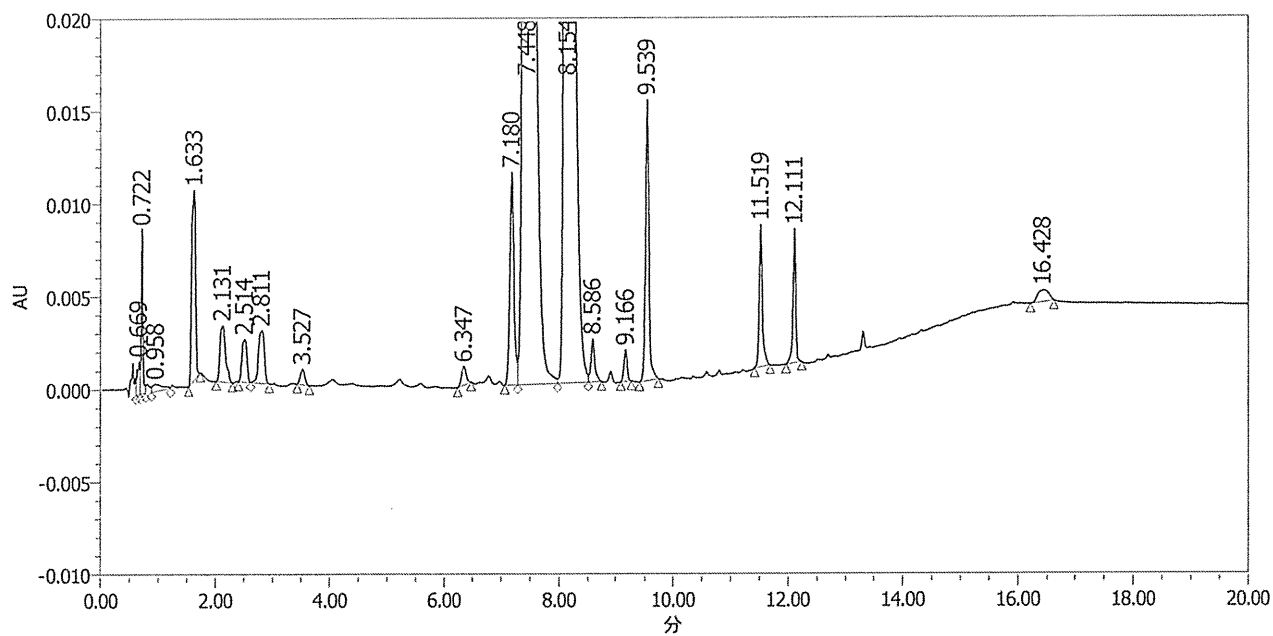


図 1-h. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

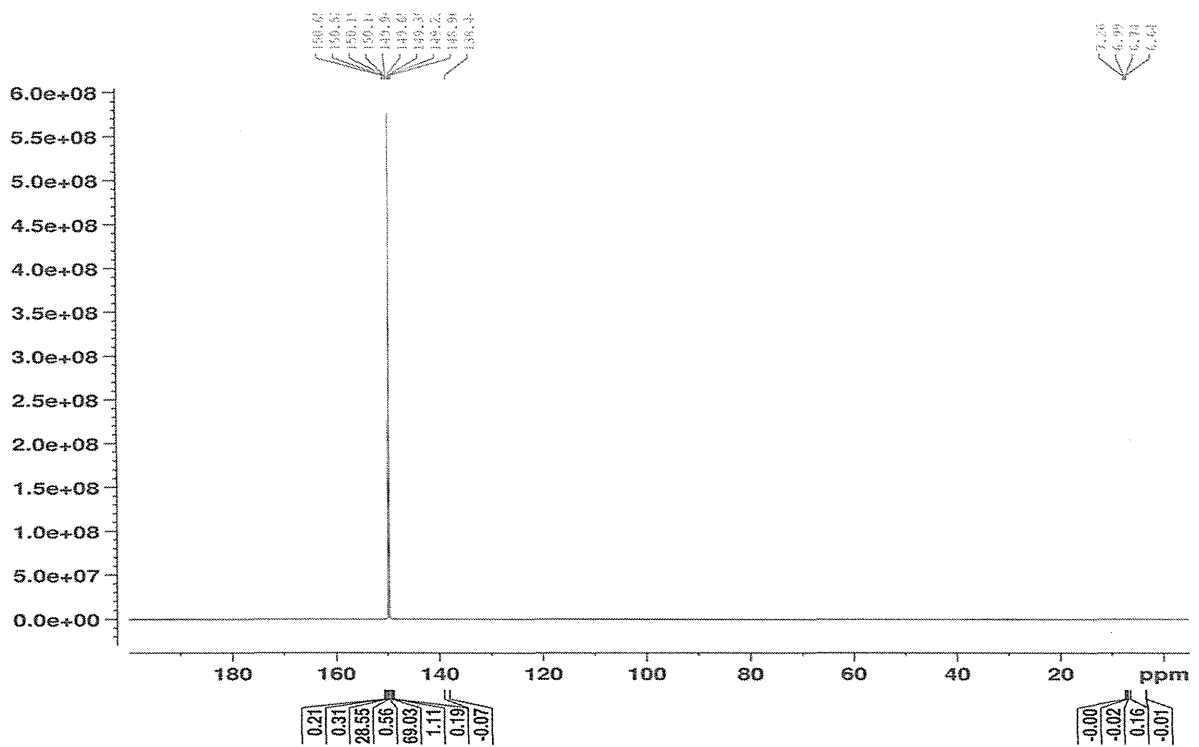


図 2-a. AmNA-T アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

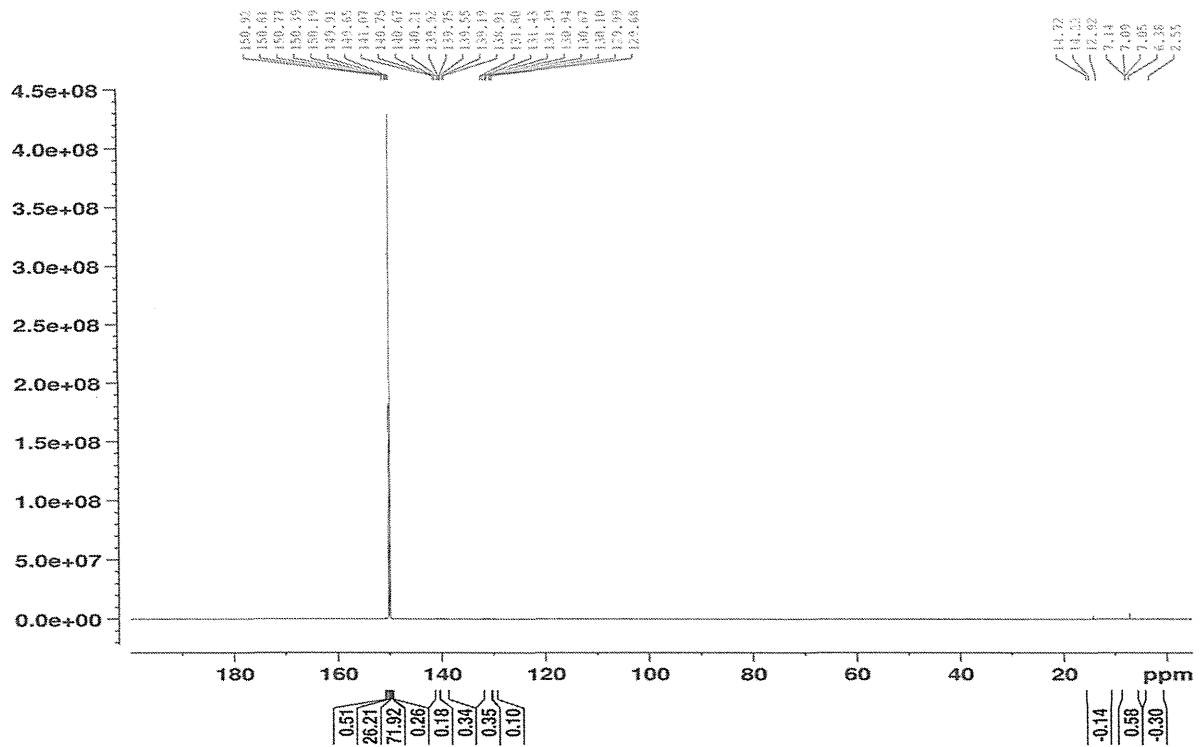


図 2-b. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

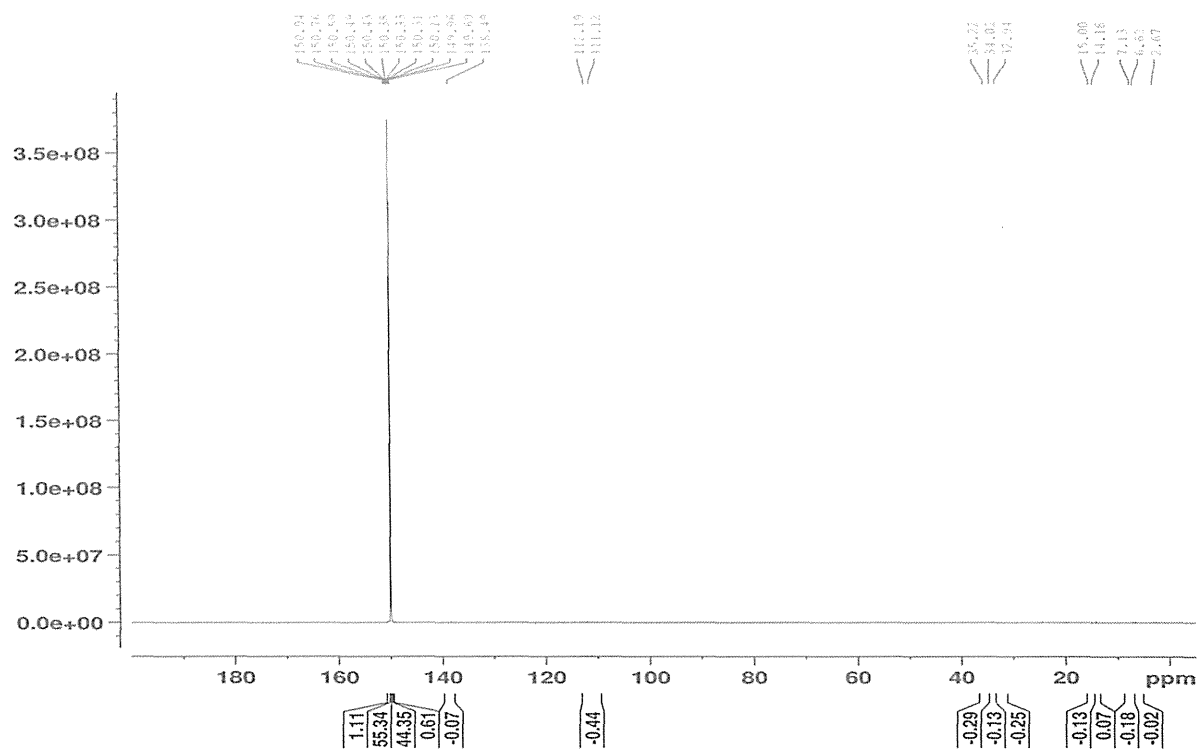


図 2-c. AmNA-A アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

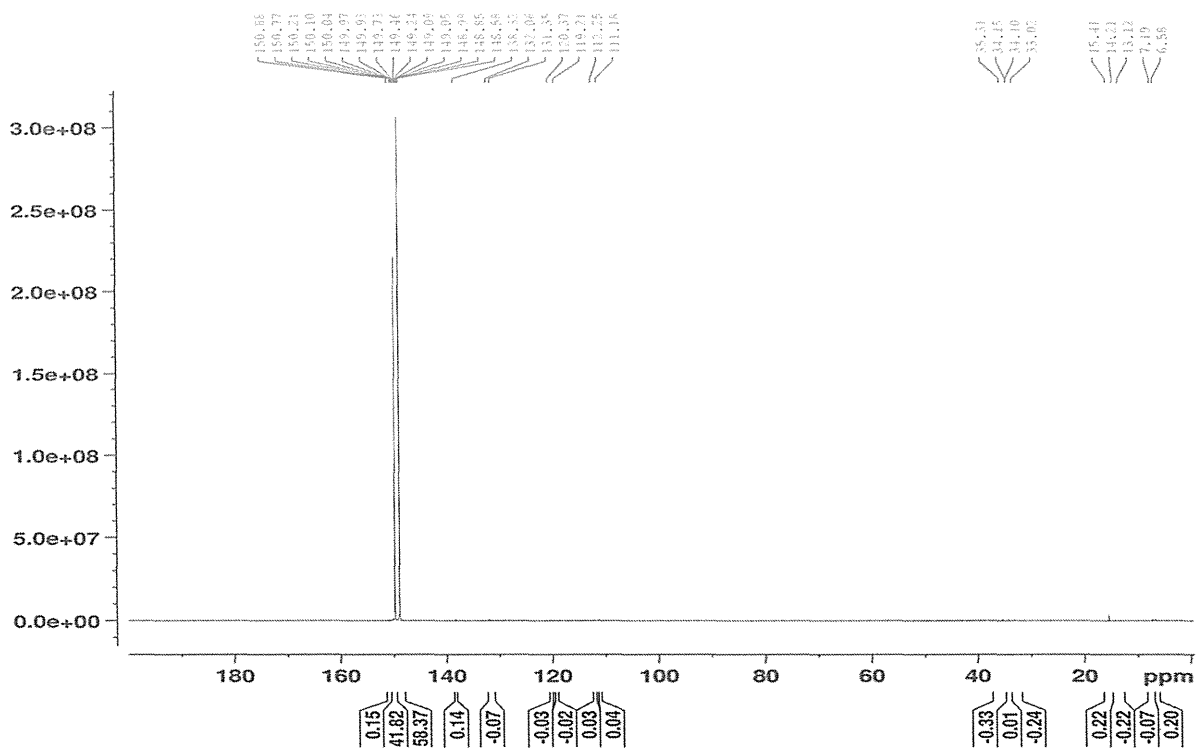


図 2-d. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

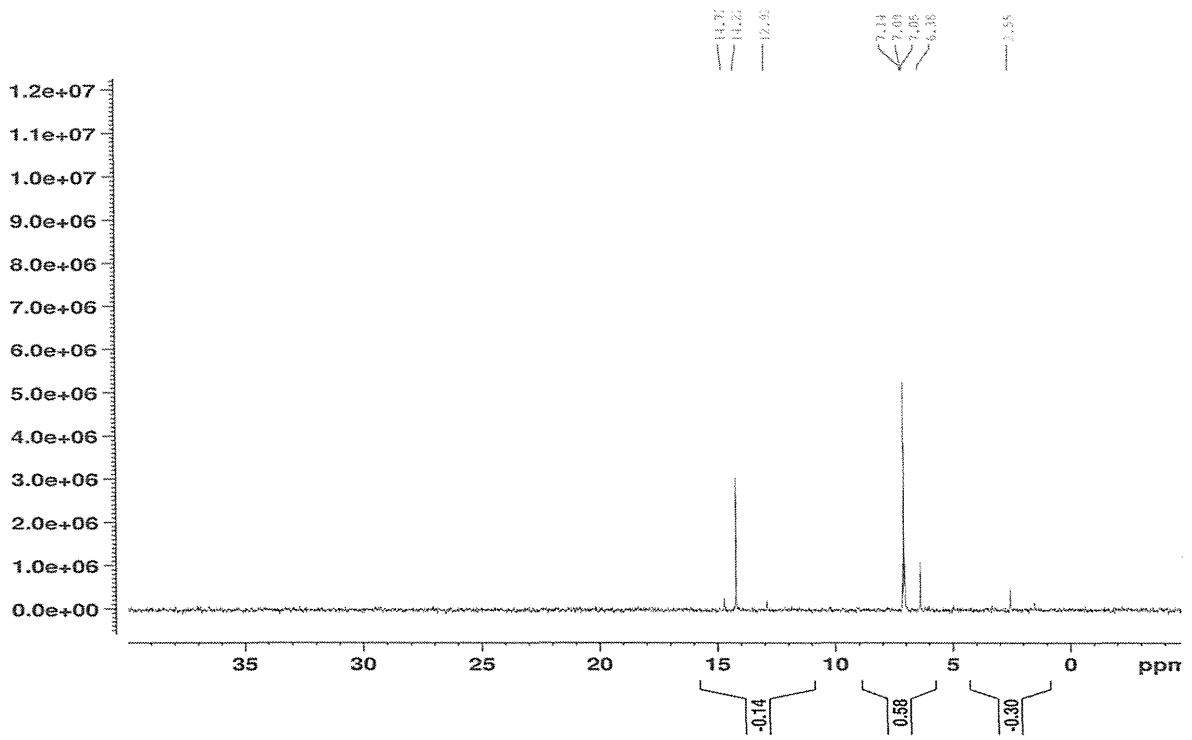


図 2-e. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

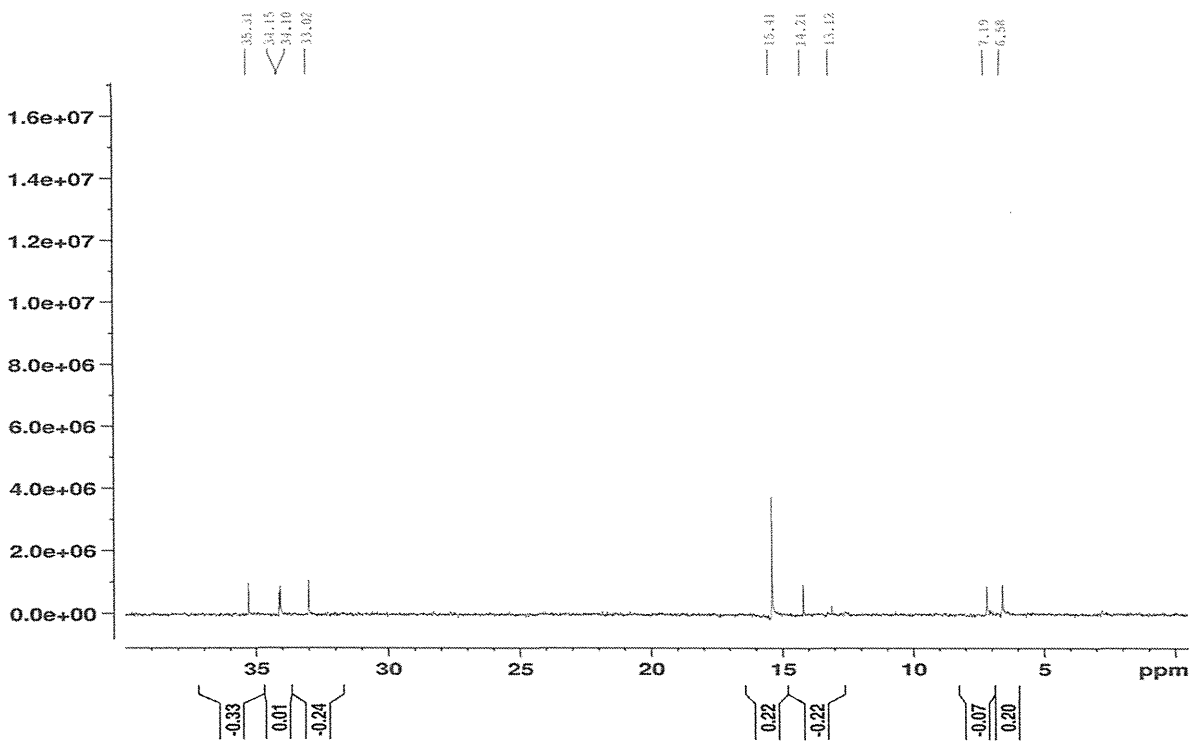


図 2-f. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

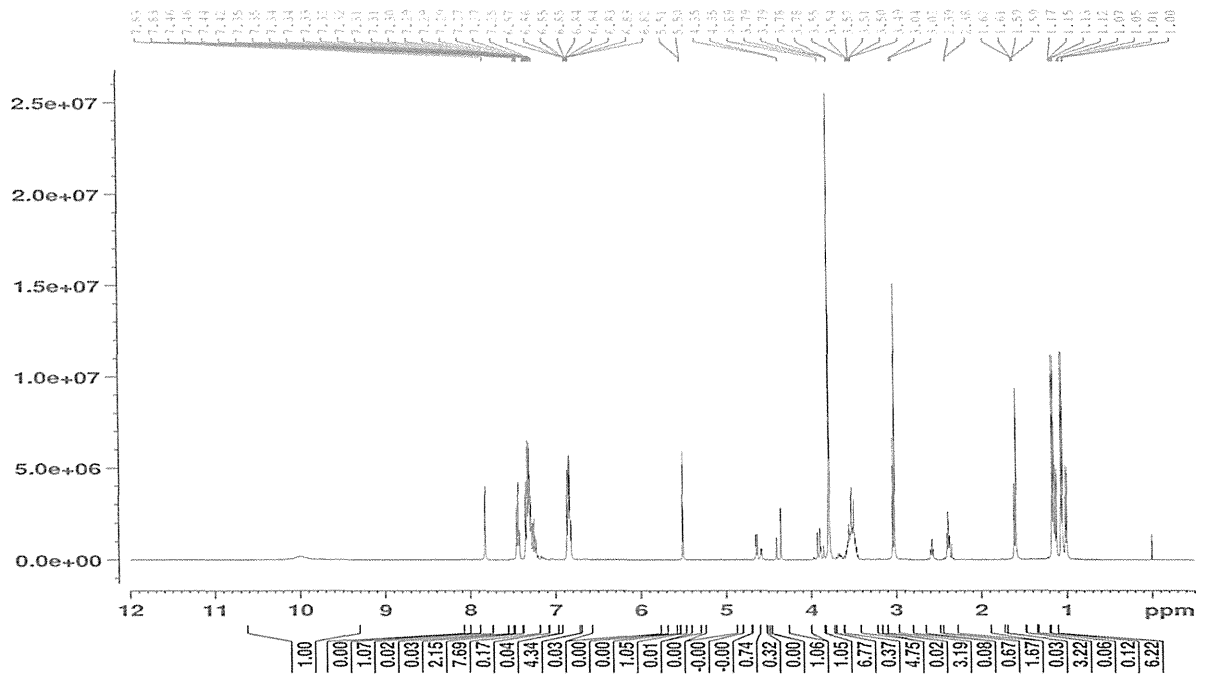


図 3-a. AmNA-T アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

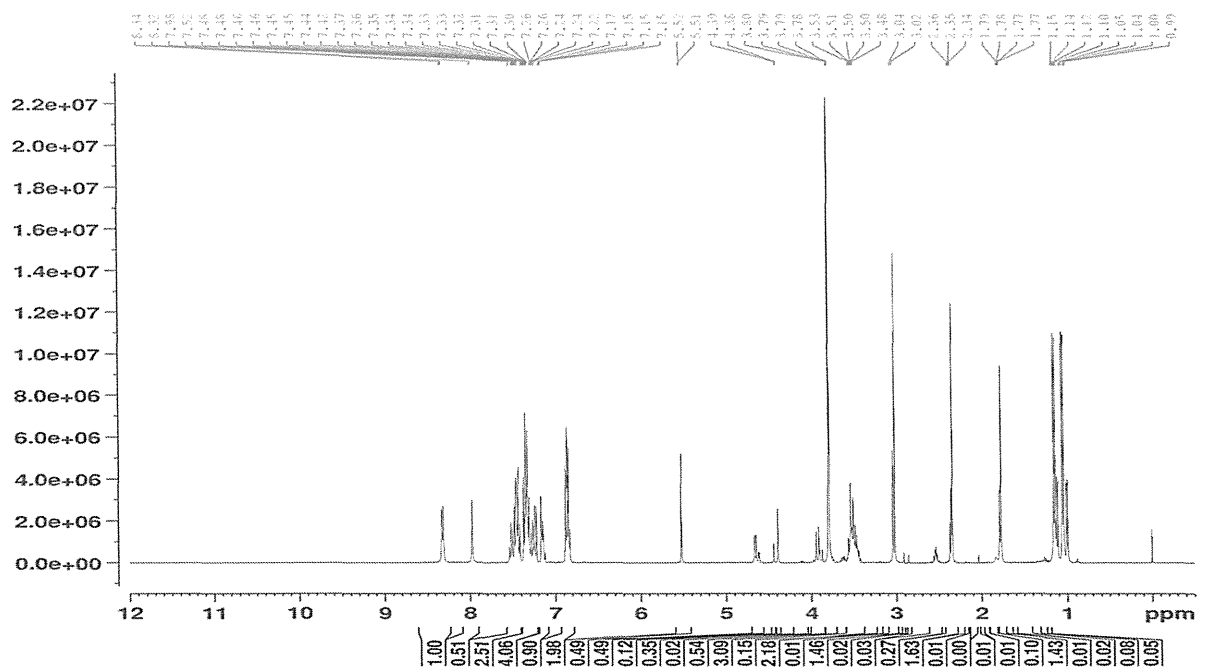


図 3-b. AmNA-mC アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

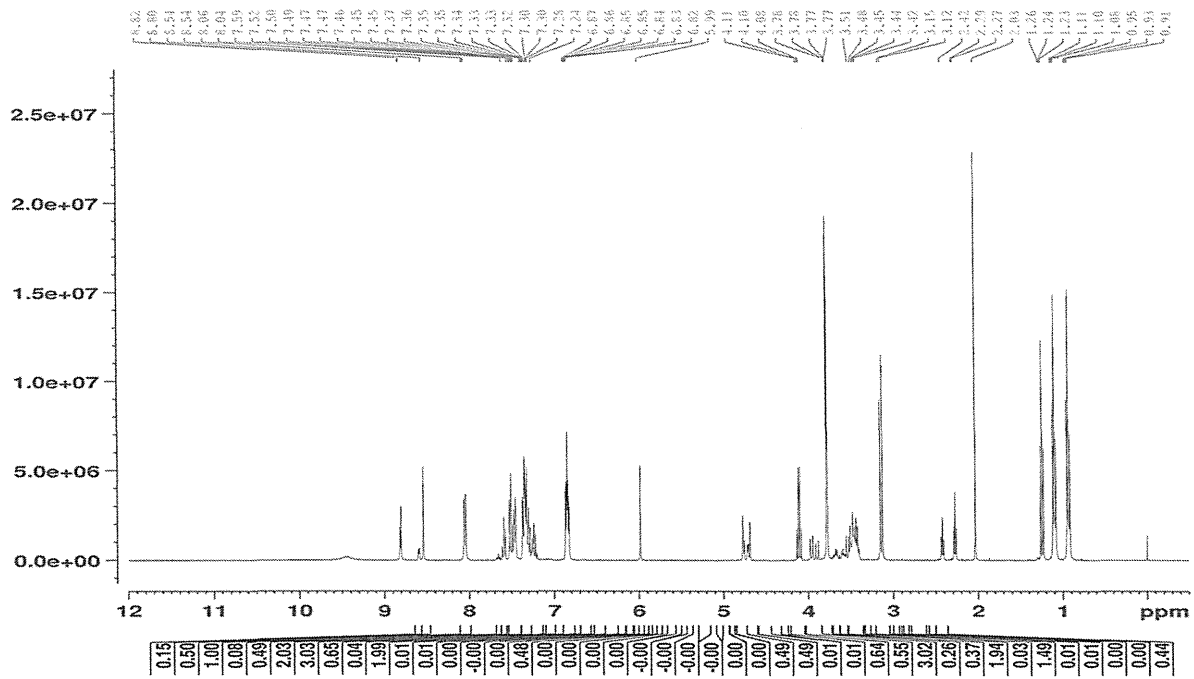


図 3-c. AmNA-A アミダイト体の ¹H-NMR チャート

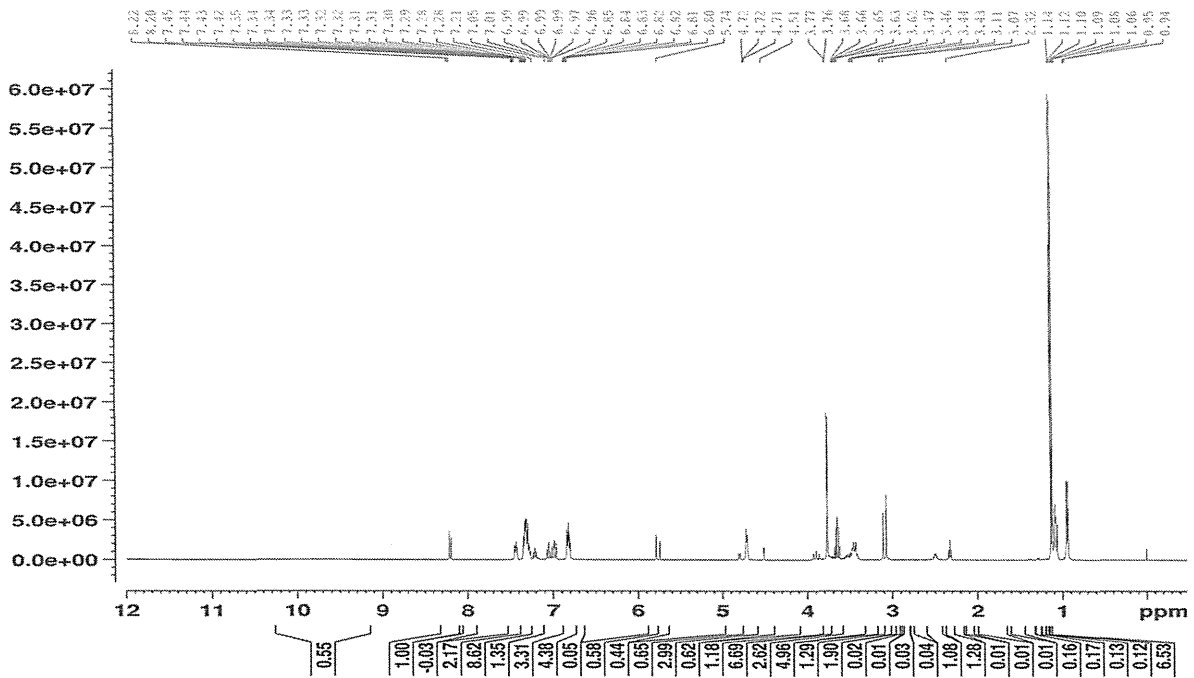


図 3-d. AmNA-G アミダイト体の ¹H-NMR チャート

PCSK9 標的型アンチセンスの臨床試験へ向けたヒト初回投与量の検討

- げっ歯類における毒性検討試験および分析法のバリデーション -

担当責任者 斯波真理子 国立循環器病研究センター研究所・部長

研究要旨

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)は LDL 受容体の分解活性を有し、この遺伝子の機能獲得型変異は血中 LDL-C 値が高値を示し、家族性高コレステロール血症 (FH) の原因の一つであることが明らかとなっている。また、FH 患者などの重症高コレステロール血症では若年性冠動脈疾患 (CAD) の予防のためにスタチン等の脂質低下薬により LDL-C をコントロールしているが、これらの薬剤は LDL-C を一定程度低下させる一方で、PCSK9 の発現を上昇させるために薬剤効果が十分ではなく、イベントを何度も引き起こす例が少なくない。これまでに我々は、PCSK9 を標的としたアンチセンス医薬の開発を進めてきており、PCSK9 阻害薬の概念の実証およびアンチセンス分子の最適化において成果をあげている。本研究では、得られた PCSK9 標的型アンチセンス分子の臨床化に向けて非臨床試験を行うことを目的としている。初年度である本年度は、計画通り、げっ歯類による毒性検討試験および分析法のバリデーションを実施した。臨床試験の投与量を 1 mg/kg と想定し、中間用量に 10 mg/kg、高用量には 50 倍量の 50 mg/kg としてマウスに対して単回尾静脈投与をした。アンチセンス医薬で最も懸念されている肝毒性についての評価を行い、細胞実験から算出された IC50 と高用量における ALT の値から、三種の候補のうち 1 種の開発候補および 1 種のバックアップを選定した。また、分析法に関しては、開発候補を高感度で検出可能なハイブリダイゼーション ELISA 法の構築を構築し、バリデーションを実施した。現在、GLP 施設への試験法移管を行っている。

次年度では、本年度得られたデータをもとに試験計画を立案し、一般毒性試験の急性毒性試験を 2 種の動物種を用いて実施する。

研究協力者

国立循環器病研究センター研究所

病態代謝部

和田 郁人
堀 美香
小倉 正恒
和田 俊輔
柴田 映子
高藤 義正
澤村 元気
森本 めぐむ
駒井 仁美
吉田 晶子

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀 聡
山本 剛史

A. 研究目的

本邦において動脈硬化が原因となる脳心血管疾患死は、悪性新生物に続いて多く、全体の4分の1を占める。動脈硬化の予防には、そのリスクをコントロールすることに主眼が置かれている。スタチンの登場は、冠動脈疾患の予防において革命的なものであり、世界中の公衆衛生に貢献してきた。ストロングスタチンの開発により、特に動脈硬化のリスクが高いことで知られている家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体に対しても、冠動脈疾患の予防に効果を示す報告がなされている。一方、家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体はスタチンやその他の脂質低下薬を併用しても、ターゲットとされているLDL-C値に到達で

きない例も少なくない。また、スタチンはその主な作用は細胞内でコレステロール合成を抑制し、転写因子であるSREBP2を活性化して最終的にLDL受容体を活性化することによりLDL-Cの低下活性を示す一方で、LDL受容体の分解活性を有するProprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)の発現を上昇させてしまうため、FHホモ接合体に対する効果は極めて少ない。PCSK9の機能獲得型変異は、家族性高コレステロール血症(FH)の原因となる遺伝子変異のなかでLDLRやAPOBに次いで3番目に同定された変異である。LDL受容体はLDL-Cを代謝するために肝臓へと取り込む受容体であるが、PCSK9にはLDLRと結合し分解へと誘導する働きがあるため、機能獲得型変異を保有する患者では血中LDL-C値は高値を示す。また、PCSK9に機能欠失型変異を有すると健常人と比較し、血中LDL-C値は約40%低く、心血管イベントの発症率も88%低いということが臨床調査より示されている。このような背景から、PCSK9は創薬ターゲットとして非常に注目を集めているが、PCSK9は活性中心を持たないために小分子薬の開発が困難とされており、現在上市している薬剤はない。このような背景のもと、我々は標的を厳密に制御できるアンチセンス分子を用いたPCSK9阻害薬の開発に着手した。アンチセンス医薬は従来、*in vitro*では有効でも、*in vivo*での効果を得るのが困難であると考えられていた。アンチセンスが体内で分解されやすいこと、標的mRNAとの結合親和性が低いことなどが

問題であった。これまでに我々は、アンチセンスに糖部架橋型人工核酸 2',4'-BNA 修飾を施すことにより、これらの欠点を改善し、体内で著効を示すことを見出し、既に高脂血症モデル動物に対する治療実験に成功しており、また、PCSK9 を標的としたアンチセンス分子の最適化を行ってきた。本研究においては、これまでに得てきた知見や BNA 類縁体である AmNA 修飾を導入した候補化合物をベースとして PCSK9 を標的とした新規核酸医薬の臨床化に向けて非臨床試験を行うことを目的としている。

初年度である本年度は、研究計画通りに *in vitro* スクリーニングから選択された 3 種の候補化合物の *in vivo* 毒性検討試験と定量法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 投与実験

被験動物とし 8 週齢のマウス C57BL6/J (♂: 日本 SLC) を購入し、1 週間馴化させた。各投与群で例数 4 匹となるように準備した。各アンチセンス核酸 (10, 50 mg/kg/回)あるいは生理食塩水 (Saline:コントロール) を尾静脈より単回投与を行なった。投与開始より 7 日後に、採血および、肝臓、腎臓の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、 -80°C 保存した。

2. 血清パラメータの測定

マウスの下大静脈より採血した血液を 5000 rpm、 4°C にて 20 分間遠心して血清を分離した。それぞれの血清について富士ド

ライケム 7000 を用いて各パラメータの測定を行った。以下に示す専用スライド一枚につき、血清 10 μL を用いて測定した。

GOT/AST-PIII, GPT/ALT-PIII, BUN-PIII, CRE-PIII

3. 相同遺伝子検索

3 種の候補化合物の塩基配列と相補的な遺伝子もしくは non-coding RNA を BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いてヒトおよびマウスを対象に検索を行った。

4. Hybridization-ELISA によるアンチセンス分子の定量

アンチセンス分子に相補的な 3'ビオチン化した templateDNA、5'位および 3'位をそれぞれジゴキシゲニン化した DNA を probe DNA とした。これらの修飾 DNA は株式会社 ジーンデザインから購入した。Reacti-Bind Strept Avidine Coated 96well black plates をサーモフィッシャーより購入した。TemplateDNA をバッファー (60 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4), 0.9 M NaCl, and 0.24% Tween 20) に溶解し、100 nM とした。Probe DNA と 1.5 unit/well の T4 DNA ligase (TaKaRa, Cat#2011A) をバッファー (66 mM Tris-HCl (pH7.6), 6.6 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0.1 mM ATP) に溶解し、200 nM に調製した。洗浄バッファー (25 mM Tris-HCl (pH7.2), 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20) を準備した。抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ抗体を 1:5000 の割合で Superblock

blocking buffer を用いて希釈した。アルカリフォスファターゼの基質として AttoPhos[®] Fluorescent AP Substrate System を使用した。

C. 研究結果

1. マウスにおける毒性検討試験

ヒト肝臓癌由来細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* スクローニングから得られた候補化合物の一般毒性試験のための予備検討として、マウスを用いた毒性検討試験を行うこととした。ただし、ヒト PCSK9 を標的として最適化された配列であるため、今回の試験では、アンチセンス分子のオンターゲット効果による毒性は考慮されていない。用量設定については、臨床試験の投与量を 1 mg/kg と想定し、中間用量に 10 mg/kg、高用量には 50 倍量の 50 mg/kg として単回尾静脈投与を行い、7 日後の血液生化学値の測定を行った (表 1)。候補 3 種のうち HsPCSK9-1771-AM(14) は重度の肝毒性を示し、50 mg/kg は致死量であることが分かった。また、マウスおよびヒトの遺伝子および non-coding RNA (ncRNA) を対象に BLAST を用いてホモロジー検索を行ったところ、マウスにおいて HsPCSK9-1771-AM(14) は細胞内の種々の機能調節に関与する ADP-ribosylation factor に属する ADP-ribosylation factor-like 4C (Arl4c) などのような重要な遺伝子の一部と完全一致する塩基配列を有していた (表 2, 3)。重度の肝毒性が配列依存的な現象であった場合、HsPCSK9-1771-AM(14) はヒトや

本研究の被験動物であるアカゲザルにおいても同遺伝子に一致する配列が含まれていることから、多少の肝毒性が懸念される。また、50 mg/kg の用量で投与した際の ALT 値と細胞実験から得られた IC50 の積をとり、もっとも低い値をとる分子が総合的に優れていると考え、この値から HsPCSK9-1131-AM(14) を開発候補とし、HsPCSK9-1091-AM(14) をバックアップとした (表 4)。なお、HsPCSK9-1131-AM(14) は標的である PCSK9 以外のヒト遺伝子との相同性をもっとも低いことから配列依存的な肝毒性の可能性は低いと考えられる。

2. 定量法の構築

核酸医薬は、現在の医薬品で多くを占めている小分子薬と異なり、塩基配列の確認が重要であるため簡便な LC/MS などといった質量分析計による検出が困難である。従って、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay を改良した配列特異的かつ定量的なアンチセンス分子の定量法を構築した (図 1)。本ハイブリダイゼーション ELISA (HELISA) 法の同時再現性を検証すべく、表 5 に示す各種オリゴ DNA を用意した。アンチセンス分子 (P20B) を段階希釈し、マウス肝臓由来のタンパク質を一定量加え、HELISA 法を用いて、蛍光強度を測定した。サンプル濃度と蛍光強度をそれぞれ対数化し、直線性の高い濃度領域における検量線を作成した (図 2)。また、同じ理論値のサンプル (n=8) を用いて測定を行い、その結果から真度と精度を求めた (表 6)。分析測定

法において検量線サンプルの真度が 80～120% (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの真度は 75～125%)、検量線サンプルの精度が 20%以下 (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの精度が 25%以下) であることが望ましいとされており、本検討結果は良好であったと言える。

また、HELISA 法の選択性について検証すべく、16 塩基長のアンチセンス分子を基準として 20 および 10 塩基長のものを用意し (表 5)、検出を行った (図 3)。結果、濃度の高い領域においてより選択的に 16 塩基長の検出が可能であることが示された。

D. 考案

本研究は、PCSK9 を標的とした新規核酸医薬の臨床化に向けて、非臨床試験を行うことを目的として研究を進めている。初年度は、研究計画に沿って候補化合物の毒性検討試験およびその定量法の構築を行った。アンチセンス医薬は、その副作用として肝毒性が問題視されているが、その詳細は明らかになっていない。しかしながら、近年、バイオインフォマティクスを駆使した手法で、アンチセンス分子中の塩基配列で肝毒性を惹起する可能性の高いモチーフが見出されている [Nucleic Acids Res, 42, 8, 2014]。今回の毒性検討試験において、HsPCSK9-1771-AM(14)が重度の肝毒性を示したが、結果で示した配列由来のオフターゲット効果の他に、この配列中には毒性惹起モチーフの一つとされる TCC の配列を含

んでいることも一つの原因と考えられる。また、毒性惹起モチーフには TCC の他にも TGC が挙げられているが、開発候補にはこのようなモチーフは含まれていない。

また、現在、核酸医薬は上市している薬剤が極めて少ないため、定量法については様々な方法が試みられている。小分子薬の定量においては検出が簡便である質量分析計を用いるのが一般的であるが、核酸医薬などのような活性が配列に依存するような薬剤の定量は困難である。一方で、同じように配列依存的な活性が特徴であるペプチド製剤などについては、現在、質量分析計を用いた手法が最適化されつつあり、核酸医薬も将来的には質量分析計を用いた簡便な定量法が開発されるかもしれない。本研究では、検出過程が多少煩雑である一方で、検出下限が小さく、選択性が高い ELISA 法を改良した HELISA 法を構築し、真度および精度ともに良好な結果が得られている。この結果から、開発候補の定量法にも本手法を採用するとして、開発候補を選択的に検出 DNA プローブの作成している (表 7)。

E. 結論

初年度である本年度は、研究計画通りに毒性検討試験および定量法の構築を行った。多方面から安全性の担保できる開発候補を選定し、現在は、HsPCSK9-1131-AM(14)のアカゲザルへの投与実験を遂行している。また、定量法に関しては HELISA 法の構築と定量法としての評価を行い、良好な結果が

得られたことから、GLP施設への技術移管を実施している。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

論文

- 1) Yamamoto Y, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S: Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo, *Organic & Bionolecular Chemistry*, in press
- 2) Pang J, Sullivan D R, Harada-Shiba M, YA Ding P, Selvey S, Ail S, Watts G F, Significant Gaps in Awareness of Familial Hypercholesterolaemia among Physicians in selected Asia-Pacific Countries: a Pilot Study, *Journal of Clinical Lipidology*, in press
- 3) Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, Harada-Shiba M. Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (pcsk9) by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for pcsk9. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;jc20143066
- 4) Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Dev.* 2014
- 5) Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada N, Harada-Shiba M, Obika S. Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free RNase h-mediated antisense reaction and in mice. *Nucleic acid therapeutics.* 24: 283-290, 2014.
- 6) Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 9:e88319, 2014.
- 7) Tachibana Y, Munisso MC, Kamata W, Kitagawa M, Harada-Shiba M,