

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01352

研究課題名(和文)核酸医薬品による肝毒性評価手法の構築に向けた基盤研究

研究課題名(英文)Evaluation of hepatotoxicity of oligonucleotide therapeutics

研究代表者

吉田 徳幸 (Yoshida, Tokuyuki)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・研究員

研究者番号：00649387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、相補配列依存的オフターゲット効果(経路1)、および自然免疫の活性化(経路2)の影響を排除し、細胞内蛋白等の生体分子との結合(経路3)に起因する肝毒性を誘導するアンチセンスを同定した。これらのアンチセンスを用いて、経路3を介した肝毒性の誘導に寄与する可能性を示す候補分子を見出した。本成果は核酸医薬品による肝毒性誘導機序の解明、in vitro試験法の確立に繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We obtained experimental data for development of the methods for the evaluation of antisense oligonucleotides-induced hepatotoxicity. We identified antisense oligonucleotides that avoid hybridization-dependent off-target effects and activation of innate immunity as much as possible, and can induce hepatotoxicity in mice. We also performed microarray analysis using these antisense oligonucleotides to reveal the mechanism of antisense oligonucleotides-induced hepatotoxicity. We started to develop the methods for the evaluation of antisense oligonucleotides-induced hepatotoxicity.

研究分野：核酸医薬

キーワード：核酸医薬品 肝毒性 ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、アンチセンスや siRNA に代表される核酸医薬品は、抗体医薬に続く次世代医薬品として大きな注目を集めており、一方で、核酸医薬品の開発研究が進展するなかで、解決すべき新たな問題点が顕在化してきている。その中でも、最も懸念される問題点として、「核酸医薬品がもつヒトでの潜在的な毒性を予測する方法論が整備されていない」ことが挙げられる。

RNA を標的とする核酸医薬品により誘導される毒性は、配列依存的オプターゲット効果に起因する毒性、Toll 様受容体 (Toll like Receptor; TLR) の活性化 (自然免疫系の活性化) に起因する毒性、細胞内蛋白との結合に起因する毒性の 3 つに大別される (図 1; Bennett et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2010, 50, 259-93)。このうち、*in silico* 解析 (ゲノムデータベースサーチによるオプターゲット候補遺伝子の抽出) と *in vitro* 解析 (培養細胞を用いたアレイ解析) を組み合わせた評価法が適切と考えられている (Lindow et al., *Nat. Biotechnol.*, 2012, 10, 920-3)。*in vivo* に関しては、TLR 発現細胞を用いた評価法が知られており、オリゴ核酸に反応する TLR3, 7, 8, 9 をそれぞれ発現させた HEK293 細胞を用いることが可能である。この評価系は各 TLR 遺伝子のほか、TLR の活性化をモニターするレポーター遺伝子が導入されており、レポーターに特異的に反応する基質と反応させることで、TLR の活性化を評価することができる。

一方、「細胞内蛋白との結合による毒性」に関しては、毒性発現のメカニズムが不明であることなどから、*in vivo* の経路に特化した安全性評価法は確立されていない。特に、*in vivo* に由来する毒性の代例である肝毒性は、核酸医薬品による毒性発現の中で最も懸念が大きいとされている。肝毒性機序に関しては、TGC や TCC 配列を有するアンチセンスをマウスに投与すると高頻度で肝毒性が認められ、その要因の 1 つとして、これらの配列が細胞内において何らかのタンパク質を認識し結合することが報告されているが、詳細はわかっていない (Hollingshead et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 4882-91)。現状では、経路による肝毒性を可能な限り回避する試みとして、核酸医薬品の候補配列を選択する段階で、マウスにおける肝毒性の発現を指標としたスクリーニング試験が実施されている。しかし、この評価方法は「ヒトにおける肝毒性発現を予測できる保証がないこと」が最大の問題点として挙げられる。Kynamro がマウス肝毒性スクリーニングをクリアしたにも関わらず、ヒトで肝毒性を誘発する事実を考慮すると憂慮すべき問題であり、早急に「開発段階において、マウスではなく“ヒト”での肝毒性を評価する手法」を開発する必要がある。以上の観点から、経路の中でも最も懸念が大きい肝毒性について、核酸医薬品による肝毒性発現の誘導機序の解明とヒトでの肝毒性を予測可能な *in vitro* 試験法の確立が重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「核酸医薬品によるヒトでの肝毒性発現の誘導機序を明らかにし、肝毒性発現を予測可能な方法論を確立する。」ことである。具体的には、核酸医薬品による肝毒性の誘導における Key 分子を探索する。これら Key 分子を評価指標とし、肝毒性発現を予測可能な *in vitro* 評価法を確立する。本研究では、まず代表的な核酸医薬品の 1 つであるアンチセンスによる肝毒性誘導機序の解明を試みた。本研究は国内外において研究開発・承認審査のガイドラインが存在していない核酸医薬品の開発環境整備に大きく貢献できると考えられ、レギュラトリーサイエンス研究の分野においてその貢献度は極めて高いことが期待される。

3. 研究の方法

現在報告されている核酸医薬品の肝毒性は、核酸医薬品と細胞内蛋白との結合することが主要因と予測されている。しかし、実際には、配列依存的オプターゲット効果や Toll 様受容体 (Toll like Receptor; TLR) 等を介した自然免疫系の活性化など、最終的には他の様々な要因が重なり発症していると考えられる。そのため、特に肝毒性誘発のきっかけとなるような Key 分子を探索する場合、複合要因となりうる要素をできる限り回避した条件で検証をする必要があると考えられる。実際に、ここまでの肝毒性の研究において使用されているアンチセンスは、製薬企業の核酸医薬品開発でドロップアウトした候補品であり、相補配列依存的オプターゲット効果 (経路 1) および自然免疫系の活性化 (経路 2) に起因する毒性が排除されているわけではない。そこで本研究ではまず、細胞内蛋白との結合による毒性に特化した肝毒性評価方法を確立するため、「経路 1 および 2 による毒性発現を完全に排除したアンチセンス」を独自に抽出する。これらの“毒性アンチセンス”と誘発しない“無毒性アンチセンス”を用いて、マイクロアレイ解析等によりマウス肝臓における遺伝子発現変動を解析し、核酸医薬品による肝毒性の要因となる Key 分子の同定を進める。

4. 研究成果

(1) 相補配列依存的オプターゲット効果を回避したアンチセンスの選別

アンチセンス等の短い塩基配列と相補性を有する遺伝子を高速に漏れなく抽出する検索アル

ゴリズムを利用して、ヒト及びマウスゲノムとヒットしないアンチセンス配列をコンピュータ上で作成した。設計した各配列について塩基配列の相同性の検索ツールである「GGGenome」を用いて、ヒト・マウスの全ゲノムを対象としてヒットする領域の数を算出した。設計したアンチセンス配列の塩基長は、近年の核酸医薬品の開発動向も加味し、14塩基長とした。GGGenomeと最適化した抽出プログラムを併用することで、「少なくとも完全相補および1塩基ミスマッチするヒト・マウス mRNA が存在しないアンチセンス」を同定し、この中からさらに「ゲノムとの相同箇所ができるだけ少ないアンチセンス」を抽出した。その結果、少なくとも完全相補および1塩基ミスマッチするヒト・マウス mRNA が存在せず、かつ、含有するCG配列が1つ以下であるアンチセンスを数百本同定した。

(2) 自然免疫系の活性化を回避したアンチセンスの選別

相補配列依存的オフターゲット効果を回避したアンチセンスについて、自然免疫系の活性化能を評価した。その際、アンチセンスは1本鎖DNAを基本構造とするため、1本鎖DNAを認識するTLR9の活性を指標とした。約200本弱の相補配列依存的オフターゲット効果を回避したアンチセンスを合成し、TLR9発現細胞に作用させた際のTLR9活性を評価したところ、今回解析したアンチセンスではいずれもTLR9の活性化は認められなかった。

(3) 肝毒性誘導アンチセンスの選別

肝毒性を誘導する“毒性アンチセンス”と誘発しない“無毒性アンチセンス”を選別するため、経路1、経路2を回避した約200本弱のアンチセンスをマウスに投与し、肝毒性の誘導の有無を評価した。肝毒性については、肝毒性マーカーとして知られるALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ：主に肝臓に多く含まれる酵素で、肝毒性が起こると血中に漏出する）を指標に評価した。評価系を構築した後、順次「経路1、経路2を回避したアンチセンス」について肝毒性誘導の有無を評価し、最終的に3本の肝毒性アンチセンスの選別を完了した。

(4) 肝毒性誘導のKeyとなる分子の探索

(1)～(3)までの解析で選別した肝毒性を誘導する“毒性アンチセンス”と誘発しない“無毒性アンチセンス”をマウスに投与し、肝由来RNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。本解析では、研究目的が“アンチセンスオリゴ核酸本体による特定の肝毒性の誘導機序を解明すること”を踏まえ、実験条件を設定した。マイクロアレイ解析において、肝毒性が誘導した条件では、2次的な遺伝子発現の変動が起こってしまい、これらがノイズとなって誘導初期のKeyとなる分子の探索が困難となる可能性が高いと考えられる。そこで、アンチセンスを投与して6時間後におけるマウスの肝臓由来RNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。本条件では、いずれのアンチセンスにおいても6時間後に肝毒性の誘導は認められなかったことを確認している。各アンチセンスを投与したマウスにおいて、コントロール群（生理食塩水投与群）と比較して2倍以上発現変動した遺伝子が数百個単位で抽出できた（いずれかが肝毒性マーカーの候補分子となる可能性がある）と予想される。現在、肝毒性を誘導するアンチセンスと誘発しないアンチセンスの変動した遺伝子群を様々な観点から比較し、アンチセンスによる肝毒性の誘導においてKeyとなる分子の探索を実施している。

(5) まとめ

相補配列依存的オフターゲット効果（経路1）、および自然免疫の活性化（経路2）の影響を排除し、細胞内蛋白等の生体分子との結合（経路3）に起因する肝毒性を誘導するアンチセンスを同定した。

独自に見出したアンチセンスを用いて、経路3を介した肝毒性の誘導に寄与する可能性のある候補分子を見出した。

今後、統計学的な解析を実施することで候補分子の選別を進める。また、*in vitro*評価法を構築するため、誘導するアンチセンスをマウス肝細胞株に作用させた際に、本研究で実施したマイクロアレイ解析から見出した候補分子の変動を解析を進める。最終的にヒトでの肝毒性発現の誘導機序の解明、および肝毒性発現を予測可能な方法論を確立するため、ヒト肝細胞キメラマウスやヒト肝由来細胞等を用いて、これらの候補分子の変動がヒトでの肝毒性発現との相関性を検証し、ヒトでの肝毒性を予測する評価指標となるか判断する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

木下 潔, 真木 一茂, 荒戸 照世, 太田 哲也, 小野寺 博志, 佐藤 秀昭, 中澤 隆弘, 平林 容子, 笛木 修, 三井田 宏明, 吉田 徳幸, 渡部 一人, 小比賀 聡, 井上 貴雄: 核酸医薬品の安全性評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして - 第2回: 局所投与剤の毒性評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 査読無し, 3, 2018, 157-163

木下 潔, 真木 一茂, 荒戸 照世, 太田 哲也, 小野寺 博志, 佐藤 秀昭, 中澤 隆弘, 平林 容子, 笛木 修, 三井田 宏明, 吉田 徳幸, 渡部 一人, 小比賀 聡, 井上 貴雄: 核酸医薬品の安全性評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして - 第 1 回: オンターゲット毒性の評価, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 査読無し, 2, 2018, 105-111

吉田 徳幸, 井上 貴雄: 眼領域における核酸医薬品の開発動向, *眼薬理*, 査読無し, 31, 2017, 5-11

Yamamoto S, Hagiwara T, Horiuchi Y, Okui A, Wani S, Yoshida T, Inoue T, Tanaka A, Ito T, Hirose Y, and Ohkuma Y: Mediator Cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9, *Genes to Cells*, 査読有り, 3, 2017, 265-276, DOI: 10.1111/gtc.12475

吉田 徳幸, 井上 貴雄: 核酸医薬の国内外の規制動向, *PharmStage*, 査読無し, 16, 2016, 11-18

[学会発表](計 17 件)

吉田 徳幸, 核酸医薬の開発中止品目の整理と考察-毒性発現の観点から- : 革新的バイオ研究開発シンポジウム, 2018 年 2 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪・箕面市)

Tokuyuki Yoshida, Kiyomi Sasaki, Yuki Naito, Makoto Koizumi, Masakazu Tamura, Hiroaki Miida, Mitsuhiro Tagaya, Kazuchika Takagaki, Satoshi Obika, Mikihiro Naito, Takao Inoue: Evaluation of Off-target Effects of Splice-switching Oligonucleotides, 13th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2017 年 9 月 24 日 ~ 27 日, Bordeaux Palais de la Bourse (フランス・ボルドー)

吉田 徳幸: 核酸医薬開発の現状と今後の展望, 第 37 回日本眼薬理学会, 2017 年 9 月 1 日 ~ 9 日 2 日, 高山市民文化会館(岐阜・高山市)

吉田 徳幸, 佐々木澄美, 内藤 雄樹, 小泉 誠, 田村正和, 三井田 宏明, 多賀谷 光洋, 高垣 和史, 小比賀 聡, 内藤 幹彦, 井上貴雄: 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の評価法に関する検討, 第 9 回日本 RNAi 研究会, 2017 年 8 月 30 日 ~ 9 日 1 日, グランドプリンスホテル広島(広島・広島市)

吉田 徳幸: 修飾型人工核酸の肝毒性評価、革新的バイオ研究開発シンポジウム, 2017 年 1 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪・箕面市)

山本 誠司, 堀内 祥行, 萩原 衆子, 吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 小泉 誠, 内藤 幹彦, 小比賀 聡, 植村 英俊, 井上 貴雄: 修飾核酸搭載アンチセンスによる自然免疫活性化の評価に関する研究, 日本核酸医薬学会第 2 回年会, 2016 年 11 月 15 日 ~ 17 日, 東京理科大学(東京・葛飾区)

佐々木 澄美, 吉田 徳幸, 内田 恵理子, 内藤 幹彦, 佐藤 陽治, 小比賀 聡, 井上 貴雄: アンチセンス医薬品の細胞内動態に関連する分子の探索, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 7 日 ~ 9 日, 石川県立音楽堂(石川・金沢)

吉田 徳幸, 内藤 雄樹, 佐々木 澄美, 内田 恵理子, 小比賀 聡, 内藤 幹彦, 井上 貴雄: アンチセンス医薬品による相補配列依存的オフターゲット効果に関する研究, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016 年 8 月 31 日 ~ 9 日 2 日, グランドプリンスホテル広島(広島・広島市)

吉田 徳幸, 内藤 雄樹, 佐々木 澄美, 内田 恵理子, 小比賀 聡, 内藤 幹彦, 井上 貴雄: Gapmer 型アンチセンスの相補結合依存的オフターゲット効果に関する研究, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016 年 6 月 29 日 ~ 7 日 1 日, ウィンクあいち(愛知・名古屋市)

吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 内藤 雄樹, 飯村 信, 小泉 誠, 多賀谷 光洋, 高垣 和史, 小比賀 聡, 内藤 幹彦, 井上 貴雄: 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に関する研究. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日 ~ 3 日 29 日(神奈川・横浜市)

佐々木澄美, 吉田 徳幸, 内田 恵理子, 内藤 幹彦, 佐藤 陽治, 小比賀 聡, 井上 貴雄: アンチセンス核酸の細胞内動態に関連する分子の探索. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日 ~ 3 日 29 日(神奈川・横浜市)

萩原 衆子, 山本 誠司, 吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 飯村 信, 小泉 誠, 内藤 幹彦, 小比賀 聡, 植村 英俊, 井上 貴雄: Mixmer 型アンチセンスの Toll 様受容体を介した自然免疫活性化に関する研究. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日 ~ 3 日 29 日(神奈川・横浜市)

山本 誠司, 萩原 衆子, 吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 飯村 信, 小泉 誠, 内藤 幹彦, 小比賀 聡, 植村 英俊, 井上 貴雄: Gapmer 型アンチセンスによる TLR9 を介した自然免疫活性化の評価. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日 ~ 3 日 29 日(神奈川・横浜市)

吉田 徳幸, 内藤 雄樹, 佐々木 澄美, 内田 恵理子, 小比賀 聡, 佐藤 陽治, 内藤 幹彦, 井上 貴雄: Gapmer 型アンチセンスによる相補結合依存的オフターゲット効果の安全性評価手法構築に向けた基盤研究. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 2015 年 11 月 30 日 ~ 12 日 2 日 (京都・京都市)

佐々木 澄美, 吉田 徳幸, 内田 恵理子, 内藤 幹彦, 佐藤 陽治, 井上 貴雄: オリゴ核酸の細胞内動態に関する分子の探索. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 2015 年 11 月 30 日 ~ 12 日 2 日 (京都・京都市)

山本 誠司, 萩原 衆子, 吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 飯村 信, 小泉 誠, 内藤 幹彦, 小比賀 聡, 植村 英俊, 井上 貴雄: Gapmer 型アンチセンスによる自然免疫活性化の評価に関する研究. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 2015 年 11 月 30 日 ~ 12 日 2 日 (京都・京都市)

萩原 衆子, 山本 誠司, 吉田 徳幸, 佐々木 澄美, 飯村 信, 小泉 誠, 内藤 幹彦, 小比賀 聡, 植村 英俊, 井上 貴雄: 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. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 2015 年 11 月 30 日 ~ 12 日 2 日 (京都・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 徳幸 (YOSHIDA, Tokuyuki)
国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・研究員
研究者番号: 00649387

(2) 研究協力者

井上 貴雄 (INOUE, Taskao)
佐々木 澄美 (SASAKI, Kiyomi)
小比賀 聡 (OBIKA, Satoshi)