

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18419

研究課題名（和文）アンチセンス医薬の毒性回避を目指した新規自然免疫活性化経路の同定と評価法開発

研究課題名（英文）Evaluation of TLR9-independent innate immune activity of antisense oligonucleotides

研究代表者

吉田 徳幸 (yoshida, tokuyki)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：00649387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、核酸医薬品の1種であるアンチセンスによるTLR9非依存的経路を介した自然免疫活性化の機序を解明し、TLR9非依存的な自然免疫活性化の評価法を構築することを目的とする。これまで、TLR9非依存的経路を介したアンチセンスによる自然免疫の活性化の評価指標の候補となる分子、および本評価系で使用するヒト細胞株の候補を選別した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は動物試験あるいは既存のin vitro試験法（ヒトTLR9発現細胞）では評価できない自然免疫活性化経路を初めて提唱する重要な成果であると考えている。核酸医薬品を含め、核酸を用いた医療技術（mRNA関連医薬、遺伝子治療薬等）の自然免疫系の評価については、種差の観点から動物試験での予測が難しいとされるが、これに対して、本研究はヒト培養細胞を用いた新しい評価技術を創出するものであり、社会ニーズへの対応、医療分野での貢献という点でも極めて有用な成果であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the method to evaluate the TLR9-independent innate immune activation of antisense oligonucleotides. We selected the candidate cytokine for the evaluation of TLR9-independent innate immune activity, and candidate human cell lines used in this method.

研究分野：核酸医薬品の安全性評価

キーワード：アンチセンス医薬品 自然免疫活性化 TLR9非依存経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、核酸医薬品の1種であるアンチセンス医薬の開発が目覚ましい進展を遂げており、既に4品目が上市されるなど高い有用性が認められている。これは、修飾核酸技術の進展により、アンチセンスの体内安定性、標的への結合親和性等が大幅に改善されたことに起因する。このように有用性は改善された一方で、安全性に関しては、ヒトでの臨床試験で自然免疫活性化に起因した重篤な有害事象が認められ、開発中止となった品目が多数存在するなど、多くの問題点がある。これまで一般的に、アンチセンスによる自然免疫活性化はToII様受容体(TLR)ファミリーの1つであるTLR9を介すると考えられてきた。そのため、アンチセンスによる自然免疫活性化は、開発段階でヒトTLR9発現細胞等を用いた評価法で評価可能であるとされてきた。しかし、これら既存の評価法による試験をクリアしているにも関わらず、臨床試験で自然免疫活性化が認められ、多くの品目が開発中止となっている。この事実を踏まえ、既存の評価系のみではアンチセンスによる自然免疫活性化は適切に評価できないと考え、「アンチセンスを認識するTLR9非依存的な経路が存在し、自然免疫系の活性化に寄与している可能性がある」と作業仮説を立て、検証を行った。この仮説が正しければ、TLR9を全く活性化していなくても、自然免疫系の活性化を誘導するアンチセンスが存在することになる。アンチセンスによるTLR9の活性化は、アンチセンスの持つCpGモチーフをTLR9が認識することで誘導される。そこで、独自にCpGモチーフを持たないアンチセンスを100本以上設計し、まず、既存の評価系でTLR9を活性化させないことを確認した。これらのアンチセンスを様々な免疫系細胞から構成されるヒト末梢血単核細胞(PBMC)に作用させ、IL-6等の代表的な数種類の炎症性サイトカインを測定した。その結果、TLR9を活性化させないアンチセンスにも関わらず、数十本のアンチセンスで炎症性サイトカインの産生が認められた。本検討により、作業仮説通り、アンチセンスによる自然免疫活性化にTLR9非依存的な経路が寄与することが初めて実験的に明らかとなった。上述した修飾核酸技術の進展により、アンチセンスによるTLR9の活性化はCpGモチーフのC(シトシン)のメチル化により回避可能であることがわかっている。そこで、近年開発が進む糖部修飾型核酸を導入することで、TLR9非依存的な自然免疫活性化を回避可能か検証した。TLR9非依存的に自然免疫系を活性化させるアンチセンスに、代表的な糖部修飾型核酸であるLNAを導入し、PBMCに作用させ炎症性サイトカインの産生量を測定した。その結果、LNAを導入することで炎症性サイトカイン産生の顕著な軽減が認められた。本検討から、アンチセンスに適切な糖部修飾型核酸を導入することで、TLR9非依存的な自然免疫系の活性化を回避できることが初めて明らかとなった。以上の検証により、TLR9非依存的経路でアンチセンスを認識する機構を解明し、本経路に特化した評価法を構築することの必要性、糖部修飾型核酸の導入がTLR9非依存的経路を介した自然免疫活性化の回避法となり得ることを初めて実験的に明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、アンチセンスによるTLR9非依存的な自然免疫活性化の評価法を構築することを目的とし、本検証からTLR9非依存的経路を介した自然免疫活性化の機序を解明する。これにより、開発段階でヒトでのアンチセンスによる自然免疫活性化に起因した有害事象の予測確率が向上し、アンチセンス開発の迅速化・効率化の向上に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、下記の手順でTLR9非依存的な自然免疫活性化の評価法で用いる評価指標および細胞種を決定し、TLR9非依存経路で自然免疫を活性化する核酸認識受容体の絞り込みを行う。

1) 評価指標の同定

これまでに独自に見出したTLR9を活性化させず、TLR9非依存的経路を活性化させるアンチセンスをPBMCに作用させ、産生される自然免疫系関連のサイトカインを網羅的に解析する。このとき産生が認められるサイトカインはTLR9非依存的経路の活性化を介して産生されていると判断でき、TLR9非依存経路を介した自然免疫活性化の評価指標とできる。また、本検討で、産生が認められたサイトカインの上流分子を特定することで、アンチセンスを認識する核酸認識受容体を絞り込む。

2) 責任細胞種の同定

PBMCは単球、樹状細胞など様々な免疫系細胞で構成されている。そこで、で認められたサイトカイン産生の中心を担う責任細胞種を同定し、評価用細胞株の作成で用いる細胞種を決定する。同定した細胞種を用いて、項目で絞り込んだ核酸認識受容体の寄与を解析し、アンチセンスを認識する核酸認識受容体を同定する。

4. 研究成果

1) 評価指標の同定

アンチセンスによるTLR9非依存的な自然免疫活性化の評価指標となるサイトカインを選別するために、PBMCを用いた網羅的解析を行った。HEK-Blue hTLR9細胞を用いた評価系でTLR9の活性化を誘導しないことを確認したアンチセンスを数百本準備し、1次スクリーニングとして、こ

これらのアンチセンスを PBMC に作用させた際のサイトカイン産生を網羅的に解析した。本検討では全部で 18 種類のサイトカインの産生の測定を行った。作用させたアンチセンスのうち、20 数本で計 14 種類のアンチセンスの産生が認められた。産生が認められた 14 種類のサイトカインのうち、4 種類のサイトカインについては、20 数本のうち数本のアンチセンスで共通して特に高い産生が認められた。本結果から、14 種類のサイトカインのうち特に 4 種類を有力な候補として選別することができた。本検証で用いたアンチセンスは TLR9 の活性化を誘導しないことを確認しているため、これらのサイトカインは TLR9 非依存的な経路を介して産生されたと解釈できる。本検討で選別した 4 種類のサイトカインはいずれも代表的な炎症性サイトカインであり、TLR9 以外の核酸認識受容体の活性化を介して産生されることが報告されている (Desmet CJ et al. Nat. Rev. Immunol, 12, 479-491, 2012)。例えば、4 種類のうちの 1 つのサイトカインは細胞質に存在する AIM2 が核酸を認識することで産生が誘導されることが分かっている。評価指標となるサイトカインの産生において Key と分子の特定は、本研究の目的である評価系構築において重要な点であり、評価系で用いる細胞種を選択する段階でも重要な手がかりとなると考えられる。

2) 責任細胞種の同定

これまでの研究で PBMC を用いた解析により、アンチセンスは TLR9 非依存的経路を介して自然免疫を活性化させることを示した。PBMC は NK 細胞、B 細胞、単球、樹状細胞等の様々な免疫細胞で構成されていることから、アンチセンスがいずれの細胞に主に作用しているかを同定することは、本評価系で用いる適切な細胞種を同定することを意味する。そこで、複数種類の免疫系細胞由来のヒト細胞株を用いて、アンチセンスによる TLR9 非依存的な自然免疫活性化で用いる細胞の選択に資する基盤データの取得を行った。具体的には、4 種類の免疫系培養細胞に各アンチセンスを作用させ、上記で産生が認められた 14 種類の炎症性サイトカインの産生を遺伝子レベルで解析した。本検討の結果、4 種類のうち 1 種類のヒト細胞株 X を用いた解析において、TLR9 を活性化させるアンチセンスのみでなく、修飾型核酸を導入した TLR9 を活性化させないアンチセンスを作用させた場合でも、評価指標の候補としたサイトカインを含めた複数のサイトカインで発現上昇が認められた。一方で、他の 3 種の細胞ではサイトカインの発現上昇は認められなかった。このことは、ヒト細胞株 X は TLR9 非依存的経路の活性化を介してこれらのサイトカインを産生していること、アンチセンスを PBMC に作用させた際のサイトカイン産生は主にヒト細胞株 X の由来となる免疫系細胞によるものであることを示唆している。以上の解析から、アンチセンスによる TLR9 非依存的な自然免疫活性化で用いる責任細胞種を絞り込むことができた。

3) まとめ

TLR9 非依存的経路を介したアンチセンスによる自然免疫の活性化の評価指標の候補となるサイトカインを同定した。

TLR9 非依存的経路を介したアンチセンスによる自然免疫の活性化の評価で用いるヒト細胞株の候補を同定した。

今後は、上記の解析で同定したサイトカインの上流因子を探索し、で同定した細胞種における発現プロファイルを解析することで、アンチセンスを認識している核酸認識受容体の同定を進める。具体的には、アンチセンスを作用させた際の核酸認識受容体の発現プロファイルの解析や候補となる核酸認識受容体を発現したレポーター細胞等を用いたアッセイなどを行う。また、アンチセンスによる自然免疫活性化には種差が見られることから、ヒト細胞と動物細胞における自然免疫活性化の反応性の違いを検証し、本評価系の妥当性を示す。

本研究は動物試験あるいは既存の *in vitro* 試験法 (ヒト TLR9 発現細胞) では評価できない自然免疫活性化経路を初めて提唱する重要な成果であると考えている。核酸医薬品にはアンチセンス医薬品以外にも、siRNA など様々なモダリティが存在しており、本手法構築のプロセスは他のモダリティによる自然免疫活性化の評価手法にも応用できると考えられる。また、核酸を用いた医療技術 (核酸医薬品、mRNA 関連医薬、遺伝子治療薬等) の自然免疫系の評価については、種差の観点から動物試験での予測が難しいとされるが、これに対して、本研究はヒト培養細胞を用いた新しい評価技術を創出するものであり、社会ニーズへの対応、医療分野での貢献という点でも極めて有用な成果であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 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	4. 巻 4
2. 論文標題 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3回: 既存情報の有効活用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida T, Naito Y, Sasaki K, Uchida E, Sato Y, Naito M, Kawanishi T, Obika S, Inoue T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Estimated number of off-target candidate sites for antisense oligonucleotides in human mRNA sequences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 448-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 6
2. 論文標題 核酸医薬品の規制整備の現状	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 823-830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 2
2. 論文標題 核酸医薬の規制整備の現状と品質・安全性評価の考え方	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学ジャーナル	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井上貴雄, 佐々木澄美, 吉田徳幸	4. 巻 2
2. 論文標題 核酸医薬開発の現状と今後の展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 10-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒戸照世, 位高啓史, 秋永士朗, 佐藤秀昭, 山口照英, 真木一茂, 内田恵理子, 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 50
2. 論文標題 mRNA医薬品の品質・安全性評価の考え方	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 300-306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida T, Naito Y, Yasuhara H, Sasaki K, Kawaji H, Kawai J, Naito M, Okuda H, Obika S, Inoue T	4. 巻 24
2. 論文標題 Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene to Cells	6. 最初と最後の頁 827-835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12730.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 関口光明, 齊藤隼, 滝口直美, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 伊藤浩介, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄	4. 巻 51
2. 論文標題 核酸医薬品に含まれる不純物の考え方	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 11-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 19
2. 論文標題 核酸医薬開発の現状と安全性評価の考え方 - オフターゲット効果の評価法に関する考察 -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PharmStage	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木下潔, 中澤隆弘, 真木一茂, 三井田宏明, 荒戸照世, 平林容子, 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 51
2. 論文標題 既承認核酸医薬品の審査報告書を読み解く	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 70-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 滝口直美, 伊藤浩介, 小林夏季, 溝口潤一, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 南海浩一, 廣瀬賢治, 笹木 修, 佐藤秀昭, 吉田徳幸, 小比賀 聡, 井上貴雄	4. 巻 51
2. 論文標題 核酸医薬品の品質評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルとして -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 145-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本誠司, 堀内祥行, 吉田徳幸, 内藤幹彦, 小比賀 聡, 奥井文, 植村英俊, 井上貴雄
2. 発表標題 自然免疫活性化に対する糖部修飾核酸の影響
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 内藤幹彦, 小比賀 聡, 井上貴雄
2. 発表標題 ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の予測/評価法に関する研究
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内祥行, 山本誠司, 吉田徳幸, 内藤幹彦, 小比賀 聡, 奥井 文, 植村英俊, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬による自然免疫活性化の評価法に関する研究
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田徳幸, 内藤雄樹, 佐々木澄美, 内田恵理子, 内藤幹彦, 小比賀 聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬品のオフターゲット候補遺伝子数の解析
3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokuyuki Yoshida, Yuki Naito, Kiyomi Sasaki, Eriko Uchida, Mikihiko Naito, Satoshi Obika, Takao Inoue
2. 発表標題 Estimated number of off-target candidate sites for antisense oligonucleotides in human mRNA sequences
3. 学会等名 14th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 内藤幹彦, 小比賀 聡, 井上貴雄
2. 発表標題 ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の予測/評価法に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 アンチセンス医薬のオフターゲット効果の評価法
3. 学会等名 日本核酸医薬学会若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本誠司, 堀内祥行, 吉田徳幸, 内藤幹彦, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 1本鎖オリゴ核酸による自然免疫活性化に対するの種差に関するの検討
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 内藤幹彦, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬の不純物が遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 内藤幹彦, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬のオフターゲット効果の評価法に関する研究
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 内藤幹彦, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬のオフターゲット効果の評価法に関する研究
3. 学会等名 第9回レギュラトリーサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 206(8)
3. 書名 医薬品開発における中分子領域(核酸医薬・ペプチド医薬品)における開発戦略(第2章 核酸医薬品の創薬開発におけるポイント 第4節 核酸医薬品の規制整備に向けた取り組み)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 貴雄 (Inoue Takao)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐々木 澄美 (Sasaki Kiyomi)		