

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12726

研究課題名（和文）アンチセンス医薬の新規自然免疫活性化機序の解明と評価法構築に関する研究

研究課題名（英文）Evaluation of the innate immune activity of antisense oligonucleotides using human cells

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・室長

研究者番号：00649387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近年最も開発が進んでいる核酸医薬の1つであるアンチセンス医薬について、TLR9非依存的経路を介した自然免疫活性化の評価法を構築することを目的とする。本研究において、アンチセンスによる自然免疫活性化についてヒトとマウスの種差を明確化し、ヒト細胞を用いた評価系の必要性を示した。本評価系で用いる評価用細胞株の候補細胞に転写因子応答性レポーター遺伝子の導入し、自然免疫活性化をレポーター活性で評価可能な細胞株の作製を検討し、作成した評価用細胞株の有用性を示した。

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 a method to evaluate the TLR9-independent innate immune activation of antisense oligonucleotides. We showed the need for evaluation methods using human cells, and generated reporter cell lines to evaluate innate immune activation.

研究分野：レギュラトリーサイエンス

キーワード：アンチセンス 自然免疫活性化 TLR9非依存的経路

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、2019年10月時点で既に6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よる。一方で、安全性に関しては、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、1本鎖DNAから構成されるアンチセンスにより誘導される自然免疫活性化は、Toll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ヒトTLR9発現細胞等を用いて評価可能であるとされてきた。しかし、上述したように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、既存の評価法のみではアンチセンスによる自然免疫活性化の評価は不十分であり、適切な評価法、および回避法の構築が必要であると考えた。先行研究において「TLR9以外にアンチセンスを認識する経路が存在し、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。その結果、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を初めて実験的に明らかとし、本経路に特化した評価法を構築することの必要性を示した。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ本研究では、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*in vitro*評価法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

先行研究において、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、および評価で用いるヒト細胞株の候補を同定している。本研究では、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*in vitro*評価法について、モデルアンチセンスを用いて評価法の妥当性、および当該経路の活性を簡便・簡潔に評価可能な評価用細胞株の作製を検討する。

4. 研究成果

1) 妥当性の検証

近年開発されているアンチセンス医薬品の塩基長を考慮し、20塩基長以下のアンチセンスモデルを設計した。これらのモデルアンチセンスについて、構築を進めている本評価系を用いて自然免疫活性化を評価した。その結果、当該経路を活性化するアンチセンスを複数見出すことに成功し、本評価系の妥当性を示した。また、ヒト由来細胞とマウス由来細胞ではアンチセンスに対する自然免疫活性化の反応性を比較したところ、反応性が明らかに異なるアンチセンスを複数見出した。以上より、自然免疫活性化についてヒトとマウスの種差を明確化し、ヒト細胞を用いた評価系の必要性を示した。

2) 評価用細胞株の作製

これまでの検証で同定した評価用細胞の候補細胞株に転写因子応答性レポーター遺伝子の導入し、自然免疫活性化をレポーター活性で評価可能な細胞株の作製を検討したところ、複数のクローンを取得することに成功した。また、これまでの検討で自然免疫活性化能を示すアンチセンスを用いて、作製したレポーター細胞株における自然免疫活性化に関する基盤データの取得を進めた。具体的には、同一のアンチセンスモデルの自然免疫活性化について、先行研究で評価指標の候補として見出した決定したサイトカイン、あるいはレポーター活性を指標とした場合について比較検討を行った。その結果、レポーター活性を指標とするほうがより高感度に自然免疫活性化を検出できる可能性を示した。

3) まとめ

本評価系の妥当性の検証を行い、TLR9非依存的経路を活性化するアンチセンスを複数見出した。また、ヒトとマウスの種差を明確化し、ヒト細胞を用いた評価系の必要性を示した。

評価用細胞の候補細胞株に転写因子応答性レポーター遺伝子の導入し、自然免疫活性化をレポーター活性で評価可能な細胞株の作製を検討し、作成した評価用細胞株の有用性を示した。

本研究は、動物試験あるいは既存の*in vitro*試験法(ヒトTLR9発現細胞等を用いた評価法)では評価できない自然免疫活性化経路を評価できる手法を提唱する重要な成果であると考えている。核酸医薬には、アンチセンス医薬以外にも2018年以降承認品目が増えているsiRNA医薬など様々なモダリティが存在しており、本研究における手法構築のプロセスは他のモダリティの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、mRNA 関連医薬、遺伝子治療用製品等）の自然免疫系の評価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る。このことから、本研究成果は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であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5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 吉田徳幸, 井上貴雄	4. 巻 36
2. 論文標題 RNAを標的とする核酸医薬品のオフターゲット効果の予測・評価法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PHARM TECH JAPAN	6. 最初と最後の頁 75 ~ 83
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 Sun Yuchen, Nitta Shin-ichiro, Saito Kosuke, Hosogai Ryuta, Nakai Keiko, Goda Ryoya, Kakehi Masaaki, Murata Kazuyuki, Yamaguchi Takeru, Okuzono Takeshi, Yamane Shinichi, Enoki Yoshimasa, Kawabata Mitsuhiro, Takahara Kentaro, Sato Shimpei, Yoshida Tokuyuki, Inoue Takao, Saito Yoshiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a bioanalytical method for an antisense therapeutic using high-resolution mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioanalysis	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4155/bio-2020-0225	査読の有無 有
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 高草英生, 岩崎紀彦, 西川元也, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄.	4. 巻 52
2. 論文標題 核酸医薬品の薬物動態特性とその評価	5. 発行年 2021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 76 ~ 84
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 岩崎紀彦, 小平浩史, 後藤昭彦, 山中陽介, 佐藤正延, 宮澤憲浩, 庭山裕孝, 設楽悦久, 関口裕太郎, 田直美, 高草英生, 角辻賢太, 今井峻司, 深野泰史, 福原慶, 蓼原吉輝, 吉田徳幸, 小比賀聡, 西川元也, 井上貴雄	4. 巻 52
2. 論文標題 アンチセンス核酸医薬品の薬物動態評価の現状	5. 発行年 2021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 150 ~ 163
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 Tanaka Hiroki, Takata Nae, Sakurai Yu, Yoshida Tokuyuki, Inoue Takao, Tamagawa Shinya, Nakai Yuta, Tange Kota, Yoshioka Hiroki, Maeki Masatoshi, Tokeshi Manabu, Akita Hidetaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Delivery of Oligonucleotides Using a Self-Degradable Lipid-Like Material	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 544 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13040544	査読の有無 有
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 39
2. 論文標題 国内における核酸医薬の規制整備の現状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 170 ~ 177
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 Yasuhara Hidenori, Yoshida Tokuyuki, Sasaki Kiyomi, Obika Satoshi, Inoue Takao	4. 巻 26
2. 論文標題 Reduction of Off-Target Effects of Gapmer Antisense Oligonucleotides by Oligonucleotide Extension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Diagnosis Therapy	6. 最初と最後の頁 117 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40291-021-00573-z	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 Yoshida Tokuyuki, Morihiko Kunihiro, Naito Yuki, Mikami Atsushi, Kasahara Yuuya, Inoue Takao, Obika Satoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Identification of nucleobase chemical modifications that reduce the hepatotoxicity of gapmer antisense oligonucleotides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7224 ~ 7234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac562	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 Sakurai Yota, Yamaguchi Takao, Yoshida Tokuyuki, Horiba Masahiko, Inoue Takao, Obika Satoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Synthesis and Properties of Nucleobase-Sugar Dual Modified Nucleic Acids: 2'-O-Me-RNA and scpBNA Bearing a 5-Hydroxycytosine Nucleobase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 154 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c02038	査読の有無 有
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17件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 孫雨晨, 新田真一郎, 細貝龍太, 中井恵子, 合田竜弥, 掛樋真彰, 村田和之, 山口建, 奥園剛, 山根真一, 榎木啓真, 川端光彦, 高原健太郎, 佐藤心平, 吉田徳幸, 齊藤公亮, 井上貴雄, 斎藤嘉朗
2. 発表標題 LC/MSを用いたアンチセンス医薬品のバイオアナリシス手法に関する多施設分析法バリデーション
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 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43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田徳幸, 森廣邦彦, 内藤雄樹, 三上敦士, 笠原勇矢, 井上貴雄, 小比賀聡
2. 発表標題 塩基誘導体がアンチセンスの肝毒性の誘導に及ぼす影響
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原秀典, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス核酸のオフターゲット効果に対する塩基長の影響
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田徳幸, 森廣邦彦, 内藤雄樹, 三上敦士, 笠原勇矢, 小比賀 聡, 井上貴雄,
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンスによる肝毒性の低減手法に関する研究
3. 学会等名 第11回レギュラトリーサイエンス学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田徳幸, 佐々木澄美, 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58回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田徳幸, 森廣邦彦, 内藤雄樹, 三上敦士, 笠原勇矢, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンスによる肝毒性の低減手法に関する研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田徳幸、森廣邦彦、内藤雄樹、三上敦士、笠原勇矢、小比賀聡、井上貴雄
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンスによる肝毒性の低減手法に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木澄美、吉田徳幸、奥平桂一郎、小比賀 聡、井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス医薬品の細胞内取り込みに関与する分子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 核酸医薬の規制整備に向けた取り組み
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンスのオフターゲット評価に関する基盤研究
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 核酸医薬のオフターゲット効果に関する研究
3. 学会等名 第12回レギュラトリーサイエンス学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸, 森廣邦彦, 内藤雄樹, 三上敦士, 笠原勇矢, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 RNA分解型アンチセンスによる肝毒性の低減手法に関する研究
3. 学会等名 第59回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 アンチセンス医薬による毒性の低減手法に関する研究
3. 学会等名 核酸化学若手フォーラム2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸, 安原秀典, 佐々木澄美, 小比賀聡, 井上貴雄
2. 発表標題 アンチセンス核酸のオフターゲット効果に対する塩基長の影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田徳幸
2. 発表標題 mRNA医薬の炎症原性評価に関する取り組み
3. 学会等名 第19回 医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム/第16回 核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楠本高志, 佐々木澄美, 立花洗季, 橋本蒼太, 山口絢香, 小川真奈加, 石原理沙, 吉田徳幸, 井上貴雄, 奥平桂一郎
2. 発表標題 線虫における核酸トランスポーターSID-1のヒト相同分子の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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)		
研究協力者	佐々木 澄美 (Sasaki Kiyomi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------