

2024年10月18日 14:05-14:25

国立衛研 創立150周年記念シンポジウム



核酸医薬の安全性確保に向けた取り組み — 毒性の予測と回避 —

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子医薬部 第二室

吉田 徳幸

本日の話題

1. 核酸医薬の毒性予測
2. 核酸医薬の毒性低減

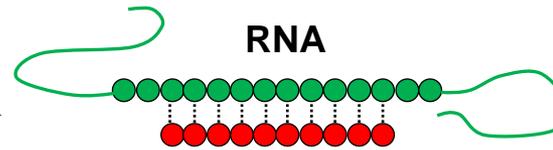
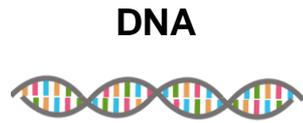
核酸医薬: RNAを標的とする新しいモダリティ

機能的な分子を
増やす

遺伝子治療用製品
(遺伝子導入)

アンチセンス(スプライシング制御型)
mRNA医薬

低分子医薬、抗体医薬



疾患の原因分子を
減らす

ゲノム編集製品
(遺伝子破壊)

アンチセンス(RNA分解型)
siRNA, miRNA

日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品 (2024年10月時点)

商品名	一般名	分類	化学修飾等	DDS等	承認国/年	標的	適応	投与
Vitravene	fomivirsen	アンチセンス	PS-oligo	Naked	US 1998 EU 1999	CMV IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	硝子体内
Macugen	pegaptanib	アプタマー	2'-OMe, 2'-F	Naked (PEG-conjugate)	US 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF165 (タンパク質)	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro	mipomersen	アンチセンス	PS-oligo 2'-MOE	Naked	US 2013	ApoB-100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51	eteplirsen	アンチセンス	モルフォリノ核酸	Naked	US 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza	nusinersen	アンチセンス	PS-oligo 2'-MOE	Naked	US 2016 EU 2017 JP 2017	SMN2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
Tegsedi	inotersen	アンチセンス	PS-oligo 2'-MOE	Naked	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpattro	patisiran	siRNA	2'-OMe	脂質ナノ粒子 (LNP)	US 2018 EU 2018 JP 2019	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	静脈内
Waylivra	volanesorsen	アンチセンス	PS-oligo 2'-MOE	Naked	EU 2019	ApoCIII mRNA	家族性 高カイロミクロン血症	皮下
Givlaari	givosiran	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	Naked (GalNAc-conjugate)	US 2019 EU 2020 JP 2021	ALAS1 mRNA	急性肝性 ボルフィリン症	皮下
Vyondys 53	golodirsen	アンチセンス	モルフォリノ核酸	Naked	US 2019	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Viltepso	viltolarsen	アンチセンス	モルフォリノ核酸	Naked	JP 2020 US 2020	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Oxlumo	lumasiran	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	Naked (GalNAc-conjugate)	US 2020 EU 2020	HAO1 mRNA	原発性 高シュウ酸尿症 I 型	皮下
Leqvio	inclisiran	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	Naked (GalNAc-conjugate)	EU 2020 US 2021 JP 2023	PCSK9 mRNA	高コレステロール血症 混合型脂質異常症	皮下
Amondys 45	casimersen	アンチセンス	モルフォリノ核酸	Naked	US 2021	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Amvuttra	vutrisiran	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	Naked (GalNAc-conjugate)	US 2022 EU 2022 JP 2022	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Qalsody	tofersen	アンチセンス	PS (partial) 2'-MOE	Naked	US 2023 EU 2024	SOD1 mRNA	筋萎縮性 側索硬化症	髄腔内
Izervay	avacincaptad pegol	アプタマー	2'-OMe, 2'-F	Naked (PEG-conjugated)	US 2023	補体因子C5 (タンパク質)	地図状萎縮を伴う 加齢黄斑変性	硝子体内
Rivfloza	nedosiran	siRNA	PS (partial) 2'-OMe, 2'-F	Naked (GalNAc-conjugate)	US 2023	LDHA mRNA	原発性 高シュウ酸尿症 I 型	皮下
Wainua	eplontersen	アンチセンス	PS (partial) 2'-MOE	Naked (GalNAc-conjugate)	US 2023	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Rytelo	imetelstat	アンチセンス	thio- phosphoramidate	Naked (C16-conjugate)	US 2024	テロメラーゼ に含まれるRNA鎖	輸血依存性貧血を伴う 骨髄異形成症候群	静脈内

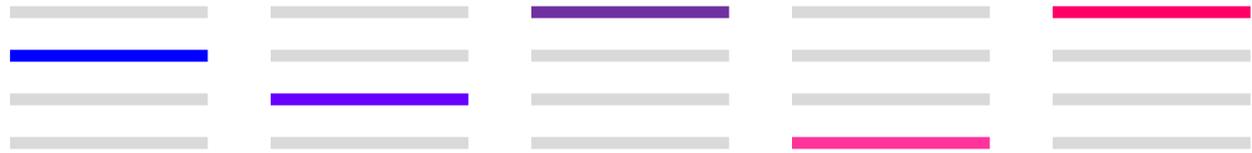
オリゴ核酸 (CpGオリゴ) がアジュバントとして添加されたワクチン (HEPLISAV-B および CYFENDUS) は、本表では除外している。

核酸医薬のオフターゲット毒性の分類と 安全性評価の考え方

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬
(色つき)



予測・評価法

【特定の遺伝子】
in silico 解析 (ヒトRNAデータベース)
in vitro 発現変動解析 (ヒト細胞株)

+

動物試験で評価可能
(げっ歯類 + 非げっ歯類)

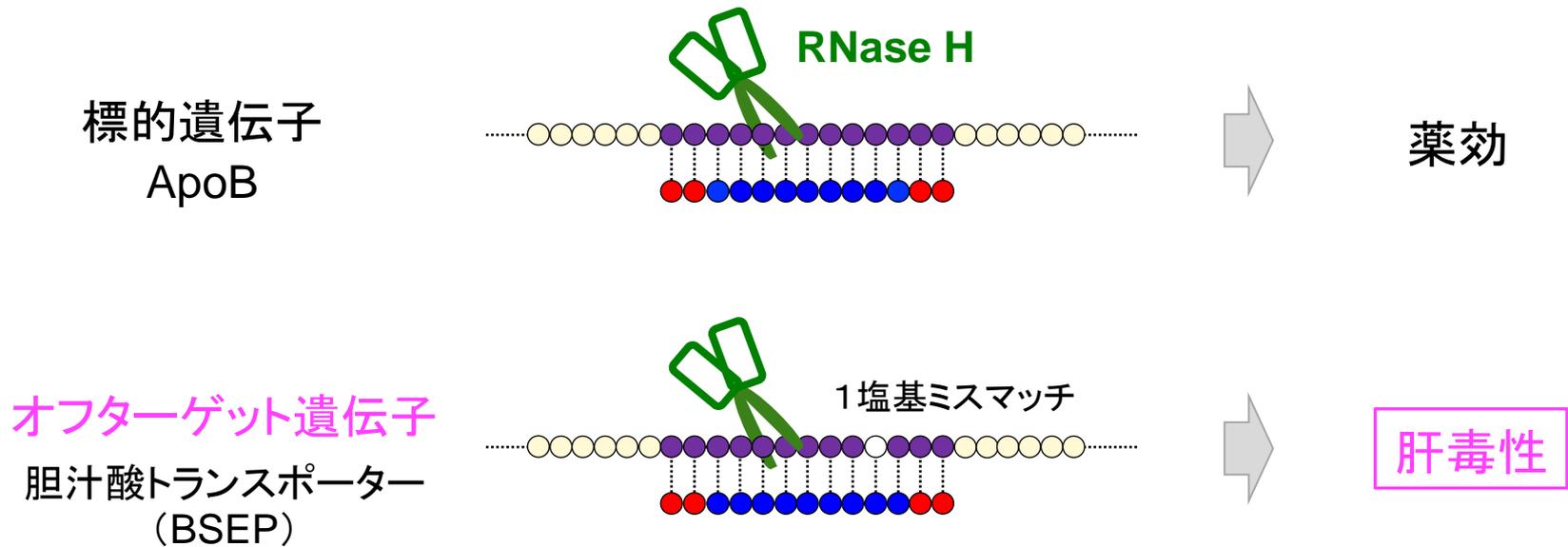
【複数の遺伝子】
ヒト肝キメラマウス

動物試験では
評価不可

核酸医薬品に特有
の安全性評価

低分子医薬品と同様
の安全性評価

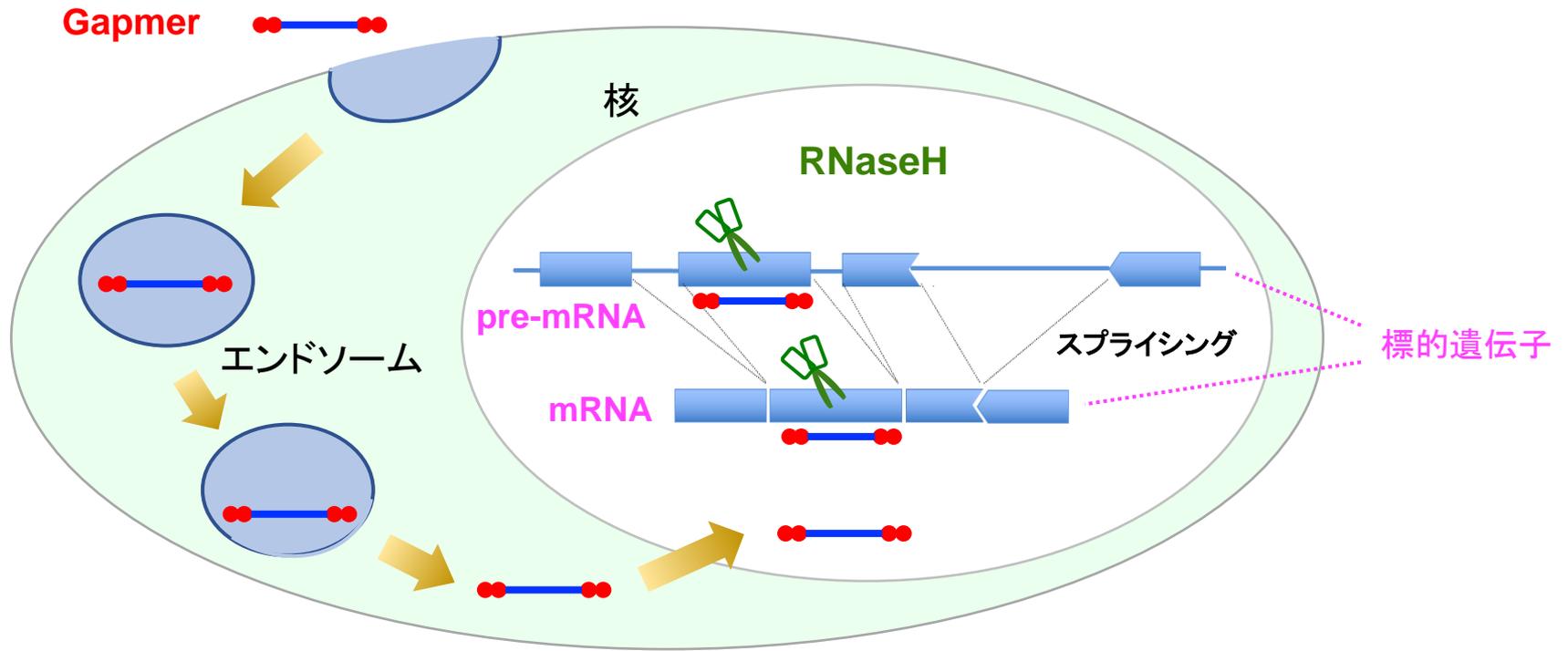
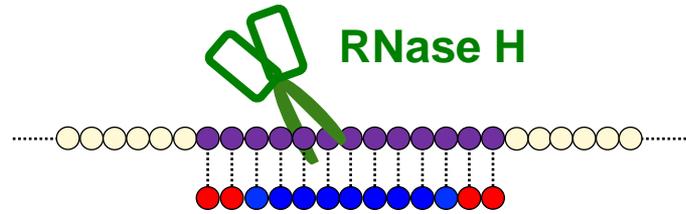
RNA分解型アンチセンス (gapmer) の ハイブリ依存オフターゲット毒性の予測・評価法



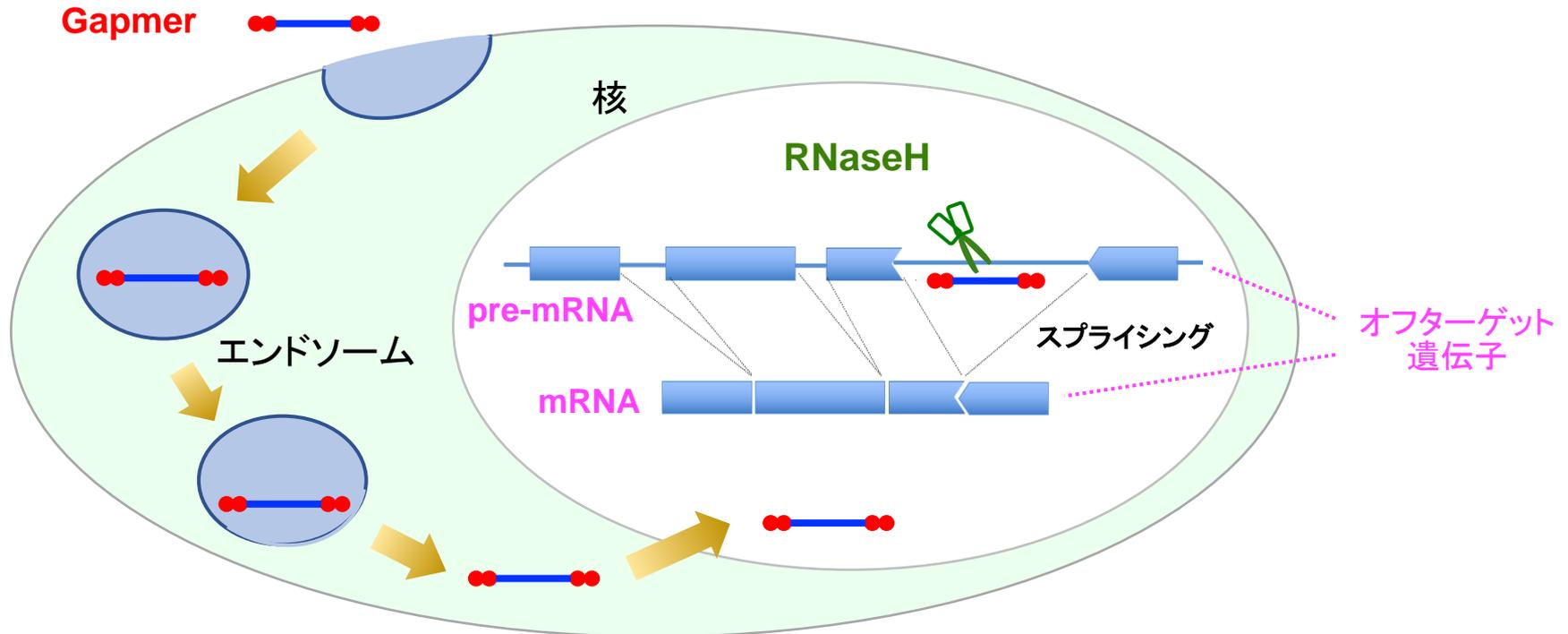
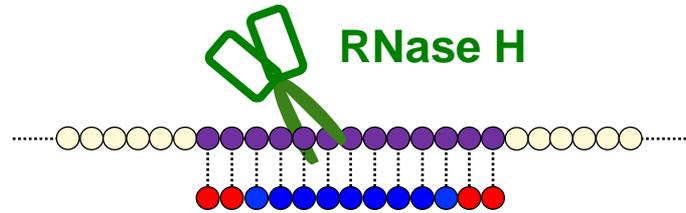
オフターゲット効果に起因する毒性(オフターゲット毒性)の予測・評価

オフターゲット遺伝子の特定&リスク評価

RNA分解型アンチセンス (gapmer) の ハイブリ依存オフターゲット毒性の予測・評価法



RNA分解型アンチセンス (gapmer) の ハイブリ依存オフターゲット毒性の予測・評価法



オフターゲット毒性の予測・評価法

(オフターゲット遺伝子を特定するための手順)

ヒトpre-mRNAデータベース



In silico 解析

相補性のあるRNA
(オフターゲット候補遺伝子)



In vitro 解析(ヒト細胞)

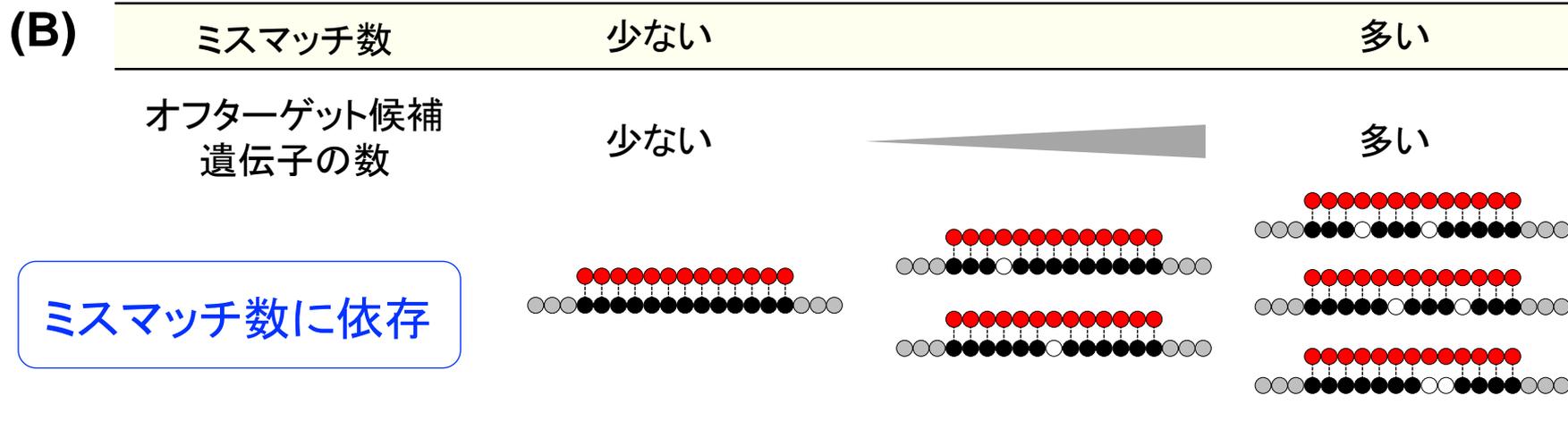
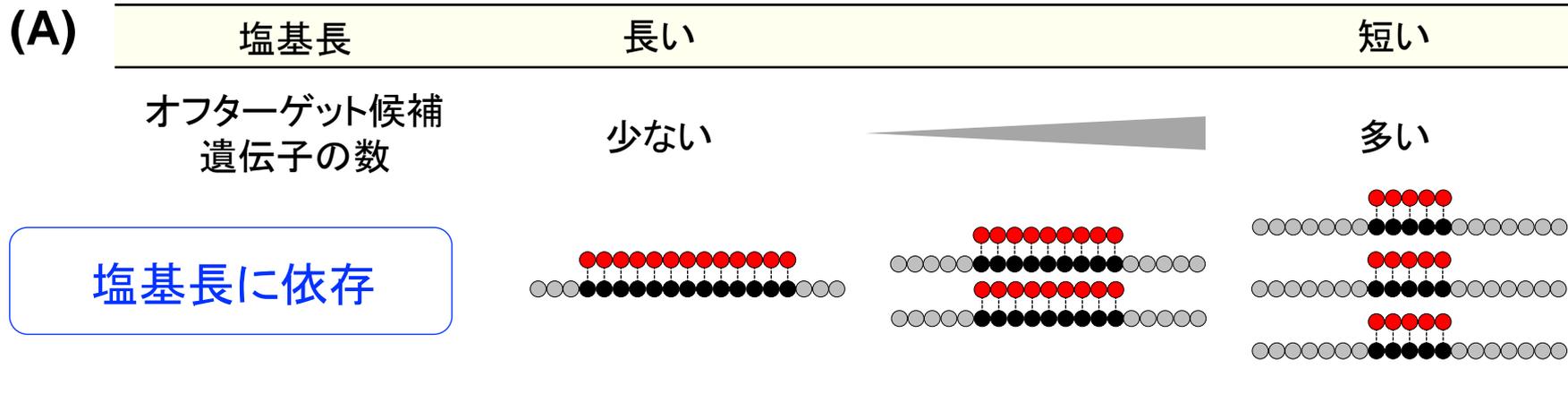
発現抑制されたRNA
(オフターゲット遺伝子)



リスク評価

そもそもどれくらいの遺伝子が
ヒットするのか？

オフターゲット候補遺伝子の数は アンチセンスの塩基長とミスマッチの数に依存する



ミスマッチを許容した場合、どれくらいの遺伝子がヒットするのか？

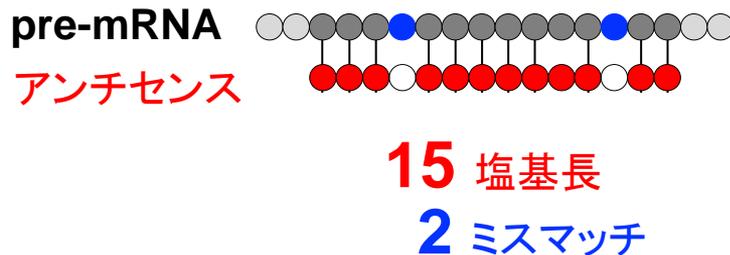
オフターゲット候補遺伝子の数の理論値

- ✓ ヒトゲノムは「 3×10^9 (30億)」の塩基対から構成されている
- ✓ 「A, T, G, C」がランダムに連結した配列とみなす
- ✓ pre-mRNAをコードする領域の割合はヒトゲノムの「39%」とする

相補結合部位の数の理論値

$$X = \frac{3 \times 10^9 \times 0.39}{4^n} \times n C_m \times 3^m$$

アンチセンスの塩基長 ミスマッチの数



1029 カ所の相補結合部位

オフターゲット候補遺伝子の数の理論値

MM: mismatch

塩基長	0 MM	1 MM	2 MM	3 MM	4 MM	5 MM
20	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	1.8	33	417	4005
19	<10 ⁻¹	0.24	6.5	111	1335	>10 ⁴
18	<10 ⁻¹	0.92	23	375	4216	>10 ⁴
17	<10 ⁻¹	3.5	83	1249	>10 ⁴	>10 ⁴
16	0.27	13	294	4115	>10 ⁴	>10 ⁴
15	1.1	49	1029	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
14	4.4	183	3566	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
13	17	679	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
12	70	2508	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴

Yoshida T *et al*, *Genes to Cells*, 23, 448-466 (2018)

Yoshida T *et al*, *Genes to Cells*, 24, 827-835 (2019)

オフターゲット毒性の予測・評価法

(オフターゲット遺伝子を特定するための手順)

ヒトpre-mRNAデータベース

D3G

Database for Drug Development
based on Genome & RNA sequences



In silico 解析

検索エンジン:

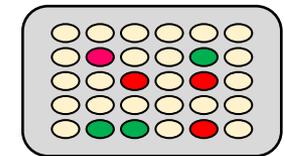
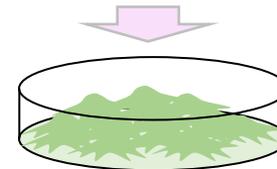


高速塩基配列検索
GGGenome

相補性のあるRNA
(オフターゲット候補遺伝子)



In vitro 解析 (ヒト細胞)



マイクロアレイ解析等

発現抑制されたRNA
(オフターゲット遺伝子)



リスク評価

オフターゲット毒性の予測・評価法

特定したオフターゲット遺伝子のリスクをどう解釈するか

ヒトpre-mRNAデータベース

D3G

Database for Drug Development
based on Genome & RNA sequences



In silico 解析

検索エンジン:



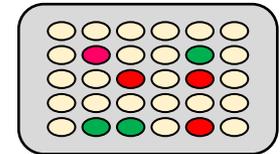
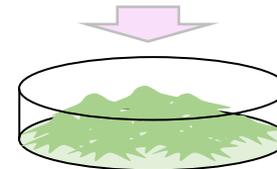
高速塩基配列検索

GGGenome

相補性のあるRNA
(オフターゲット候補遺伝子)

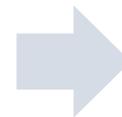


In vitro 解析 (ヒト細胞)



マイクロアレイ解析等

発現抑制されたRNA
(オフターゲット遺伝子)



リスク評価

オフターゲット毒性の予測・評価法

特定したオフターゲット遺伝子のリスクをどう解釈するか

ヒトpre-mRNAデータベース



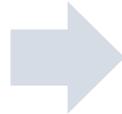
In silico 解析

相補性のあるRNA
(オフターゲット候補遺伝子)



In vitro 解析(ヒト細胞)

発現抑制されたRNA
(オフターゲット遺伝子)



リスク評価

オフターゲットによる発現抑制で毒性発現が懸念される 1,695のヒト遺伝子(リスク遺伝子)の情報一覧

ヒト遺伝子		遺伝子の情報														
Gene symbol	Gene ID	遺伝子の機能	ヒト遺伝子疾患情報					ノックアウトマウスの病態情報								
			ヒト遺伝子疾患情報の有無	ヒト遺伝子疾患の内容	遺伝子機能の変化内容	左記判断の根拠	表現型発症までの期間	病態の分類	病態判断の根拠	左記情報源(データベース等)	KO動物における病態情報の有無	ヒトマウスのタンパク質の相同性(%)	KOマウスの疾患の内容	表現型発症までの期間	病態の分類	病態判断の根拠
AAAS	8086	よくわかっていない。核膜の内部にある。位置的に分子の核内膜運動に關与すると考え	P	1.Triple A syndrome:	A	ほぼ全ての変異において核膜の適切な位置に到達できない。	B	D	アカラシア、副腎不全、無痰症	GHR	P	93	female infertility, abnormal behavior, hypoactivity	B	D	Aas-/-マウスは、予想外にも異常行動及び神経系異常は軽度で
AASS	10157	アミノアシンセミアルデヒドシンターゼ:哺乳類のリジン分解経路の最初の2段階における	P	1.Hyperlysinemia:	A	これらの変異は酵素の機能を低下又は排除すると考えられている	C	D	1.通常健康上の問題は無い。	GHR	p	87	enlarged lymph nodes and urinary bladder, abnormal preweaning lethality	B	D	impc
ABAT	18	γ-アミノ酪酸を異化する	P	1.GABA-transaminase deficiency:	A	正常なGABAトランスアミナーゼの欠乏	A	A/D	重症度はさまざまだが、ほとんどの患者は重篤な発達障害を有	GHR	P	91	abnormal preweaning lethality	B	A	impc
ABCA1	19	膜間コレステロール/リン脂質輸送体	P	1.Familial HDL deficiency: 2.Tangier disease:	A	これらの変異は細胞からのコレステロールとリン脂質の放出を防ぐ	A	D	1.低HDL症、2.低HDL症、神経機能障害、オレンジ色の肥大化した風船腫、魚	GHR	N/P	95	postnatal lethality, lethality throughout fetal growth	A/B	A/D	HDL-Cは ABCA1-/-マウスでは実質存在せず、さまざま組織
ABCA1	26154	2 脱水を防ぐために表皮で作られた脂質を輸送する。選択的アポリポタン	P	1.Harlequin ichthyosis: 2.Nonbullou	A	脂質を表面に分泌する。欠乏は病気につ	A	C/D	脱水を防ぎ、皮膚の正常な発達に必要。顕性at	GHR	P	89	Neonatal/preweaning lethality,	A	A/C/D	Abca12(-/-)マウスは出生直後にヒトH

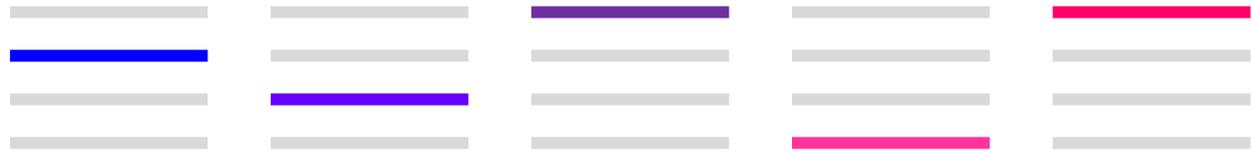
AMED医療研究開発革新基盤創成事業

核酸医薬のオフターゲット毒性の分類と 安全性評価の考え方

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬
(色つき)



予測・評価法

【特定の遺伝子】
in silico 解析 (ヒトRNAデータベース)
in vitro 発現変動解析 (ヒト細胞株)

+

動物試験で評価可能
(げっ歯類 + 非げっ歯類)

【複数の遺伝子】
ヒト肝キメラマウス

動物試験では
評価不可

核酸医薬品に特有
の安全性評価

低分子医薬品と同様
の安全性評価

RNAとの結合(ハイブリ依存オフターゲット作用)に起因する肝毒性

1. “特定の(1つの)”オフターゲット遺伝子が引き起こす肝毒性

【例】胆汁酸トランスポーター(BSEP)の発現抑制に起因する肝毒性

【予測・評価法】ヒトRNAデータベースを用いたin silico解析
+ ヒト細胞を用いたin vitro解析

2. “複数の”オフターゲット遺伝子が引き起こす肝毒性

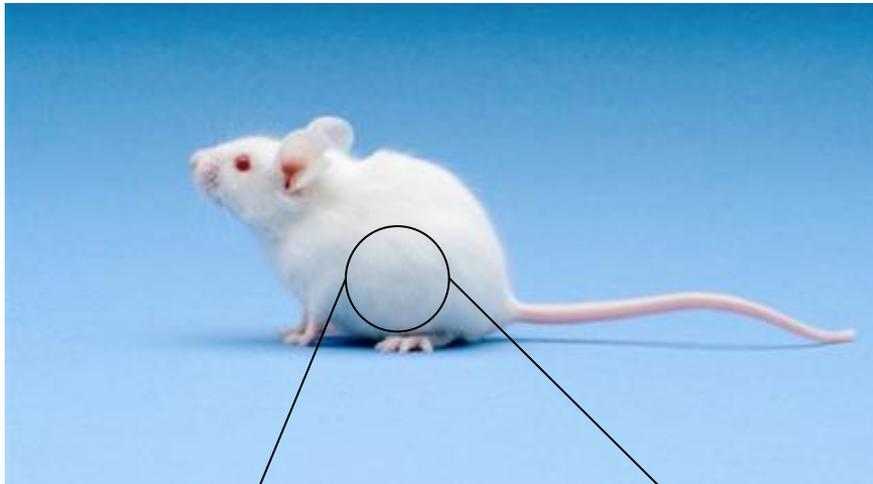
【例】 1. 複数の遺伝子の発現抑制による肝毒性

2. siRNAのmiRNA様オフターゲット作用による肝毒性発現

【予測・評価法】 ヒト肝キメラマウス

ヒト肝キメラマウス「PXBマウス®」

マウス肝細胞の「70%以上」がヒト肝細胞に置換されたマウス



ヒト肝臓



【PXBマウスの品質規格】

- 1) ヒトアルブミン値: 6mg/mL以上^{※1,2}
- 2) 体重: 18g以上^{※2}
- 3) 週齢: 12~18週齢^{※2}

※1: 推定置換率70%に相当

試験に供するマウスの平均推定置換率は82%
(2013年実績)

※2: 試験開始時の規格

ヒト肝細胞への置換率: 85-90%程度

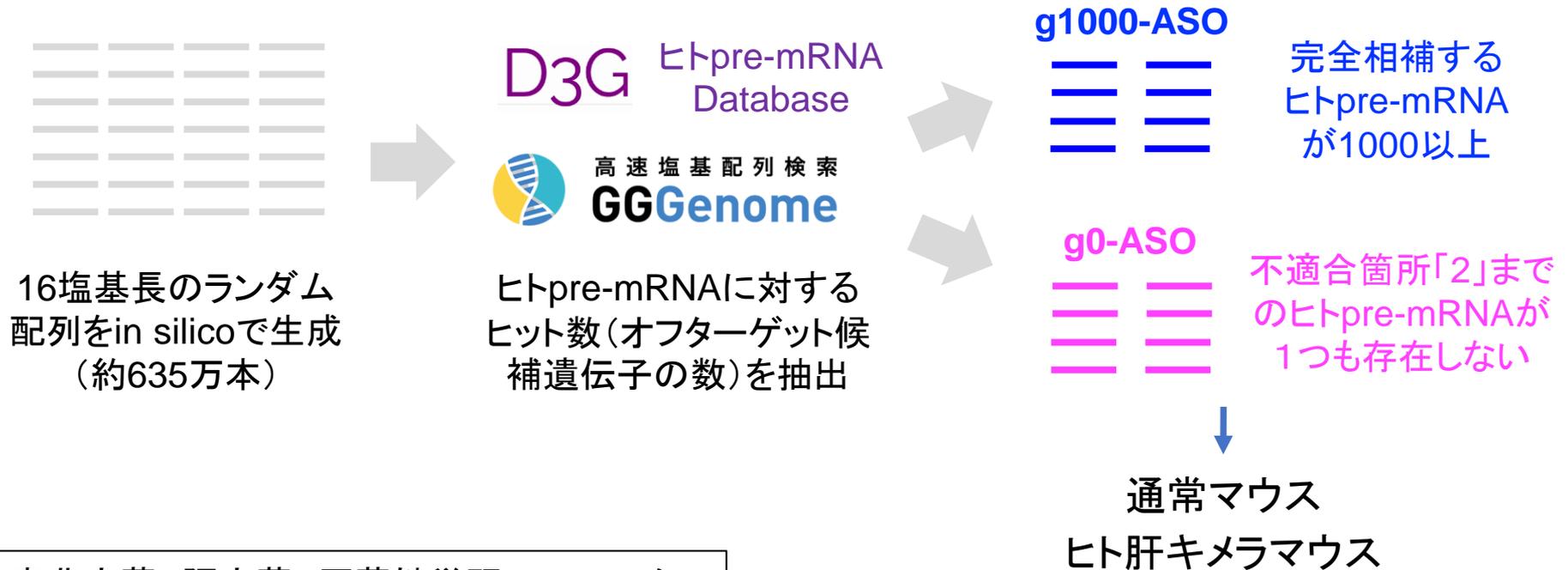
✓ ゲノム比率で評価

✓ 国立衛研による解析(2019年実績)

本研究の概要

【目的】「通常のマウス」と「ヒト肝キメラマウス」に種々のアンチセンス核酸を投与し、肝毒性発現プロファイルが異なることを示す。

ヒトpre-mRNAに対して、オフターゲット候補遺伝子の数が「可能な限り多いアンチセンス」および「可能な限り少ないアンチセンス」を設計。



東北大薬, 阪大薬, 医薬健栄研, フェニックス
バイオ, メディフォード, 日油との共同研究

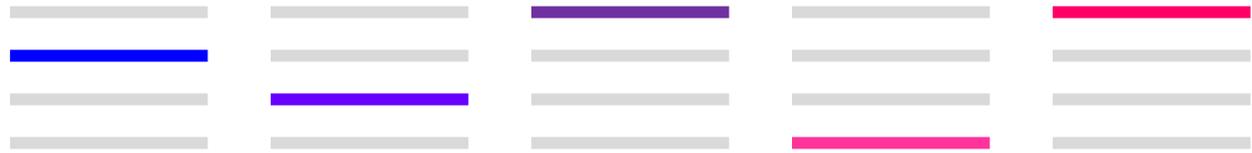
1. 「ハイブリ依存オフターゲット肝毒性」には明確な種差が存在.
通常の動物試験では検出不可.
2. ヒト肝キメラマウスを用いた試験により, ヒトで生じる「ハイブリ依存オフターゲット肝毒性」を一定程度, 検出可能.
3. ヒト肝キメラマウスは「ハイブリ非依存オフターゲット肝毒性」も合わせて検出可能.

核酸医薬のオフターゲット毒性の分類と 安全性評価の考え方

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬
(色つき)



予測・評価法

【特定の遺伝子】

in silico 解析 (ヒトRNAデータベース)

in vitro 発現変動解析 (ヒト細胞株)

【複数の遺伝子】

ヒト肝キメラマウス

+

動物試験で評価可能
(げっ歯類 + 非げっ歯類)

種差に注意

自然免疫活性化など

動物試験では
評価不可

核酸医薬品に特有
の安全性評価

低分子医薬品と同様
の安全性評価

本日の話題

1. 核酸医薬の毒性予測
2. 核酸医薬の毒性低減

核酸医薬に起因する毒性の低減法

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬

適切な配列設計



毒性の低減

修飾核酸の導入



毒性の低減

Yasuhara H*, [Yoshida T*](#) et al,
Mol Diagn Ther., 26, 117-127 (2022)

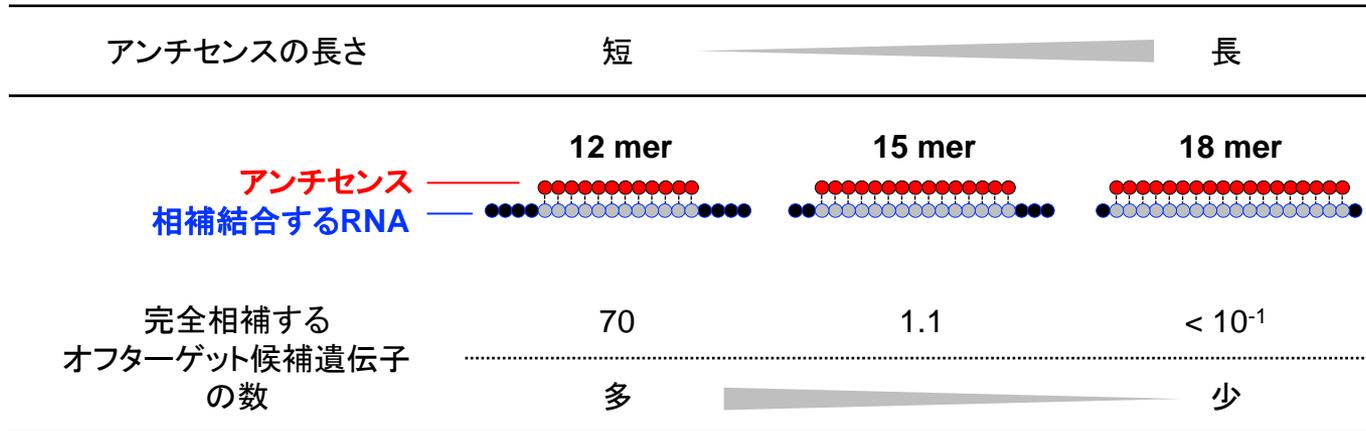
* Co-first author

[Yoshida T](#), et al,
Nucleic Acids Res., 50, 7224-7234 (2022)

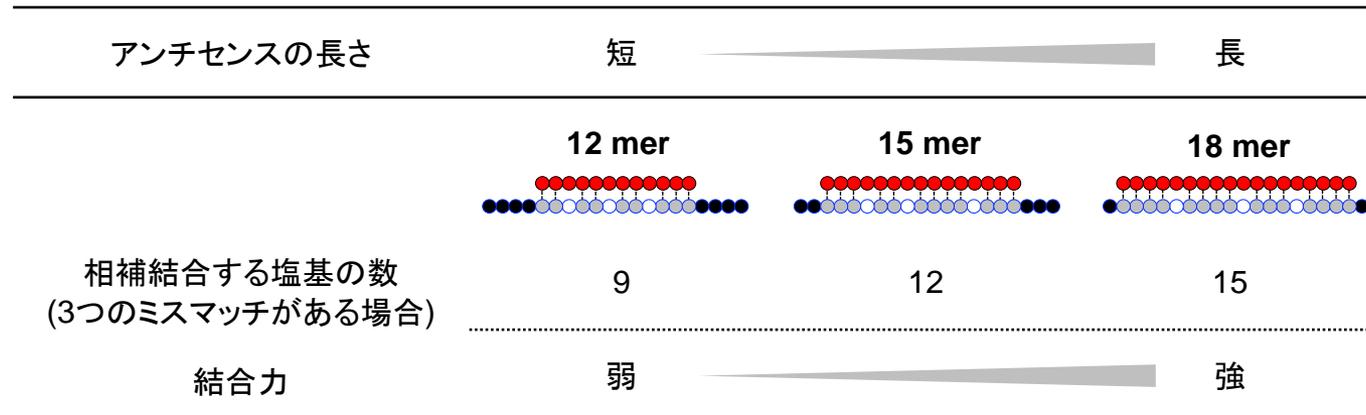
[Yoshida T](#), et al,
Sci Rep, 14, 11540 (2024)

塩基長とオフターゲット効果の二面性

塩基長が長いほどオフターゲット候補遺伝子の数は減少する。

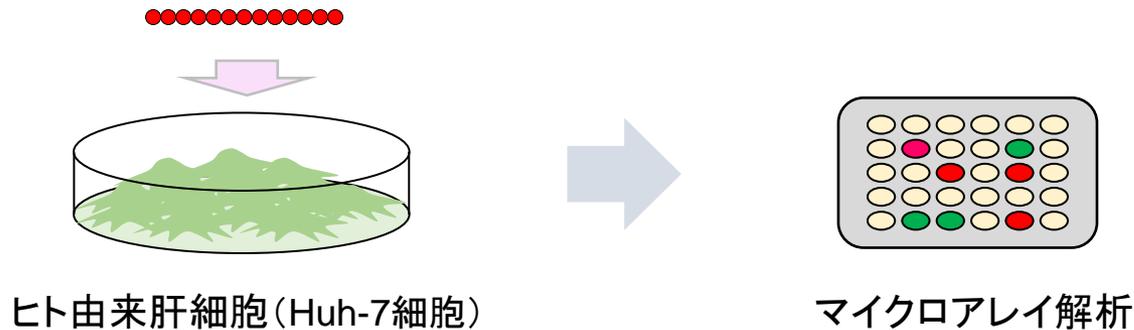
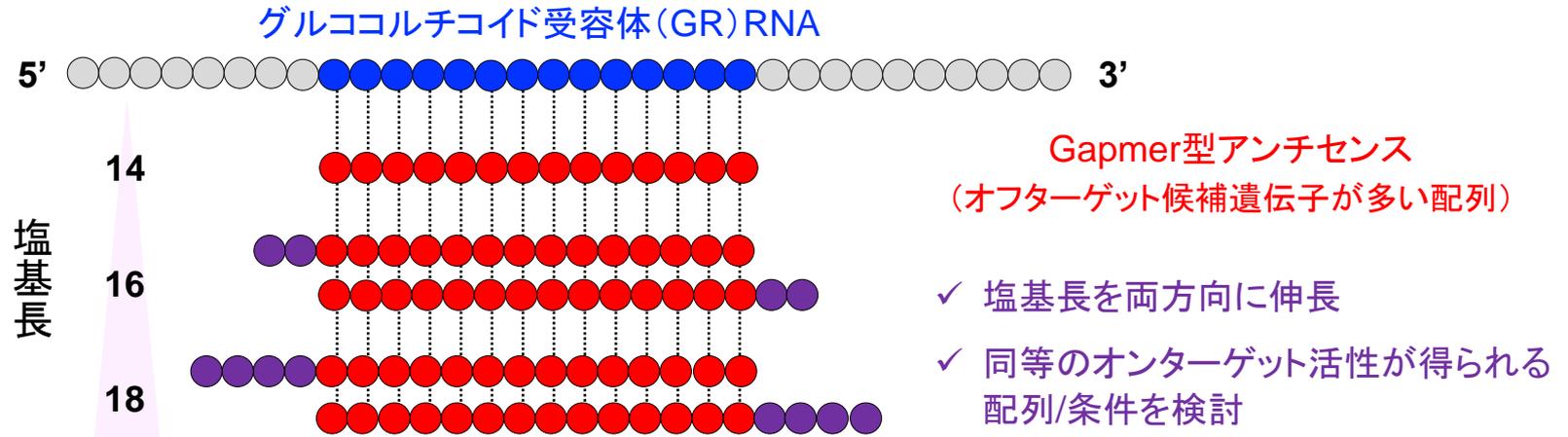


塩基長が長いほどミスマッチがあってもオフターゲット効果が起きやすい。



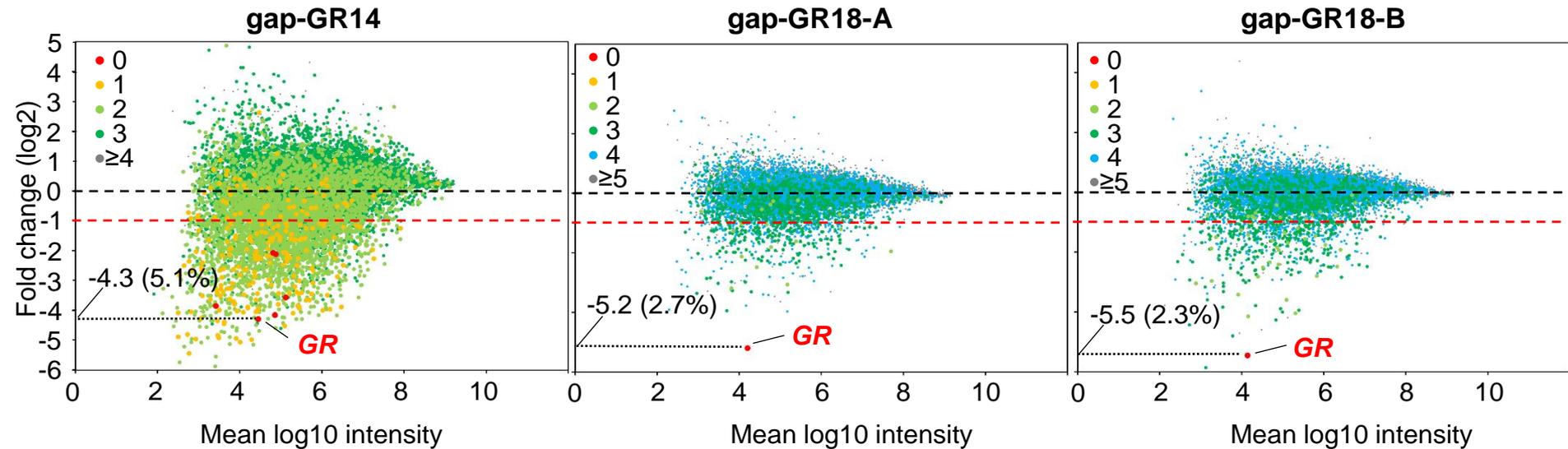
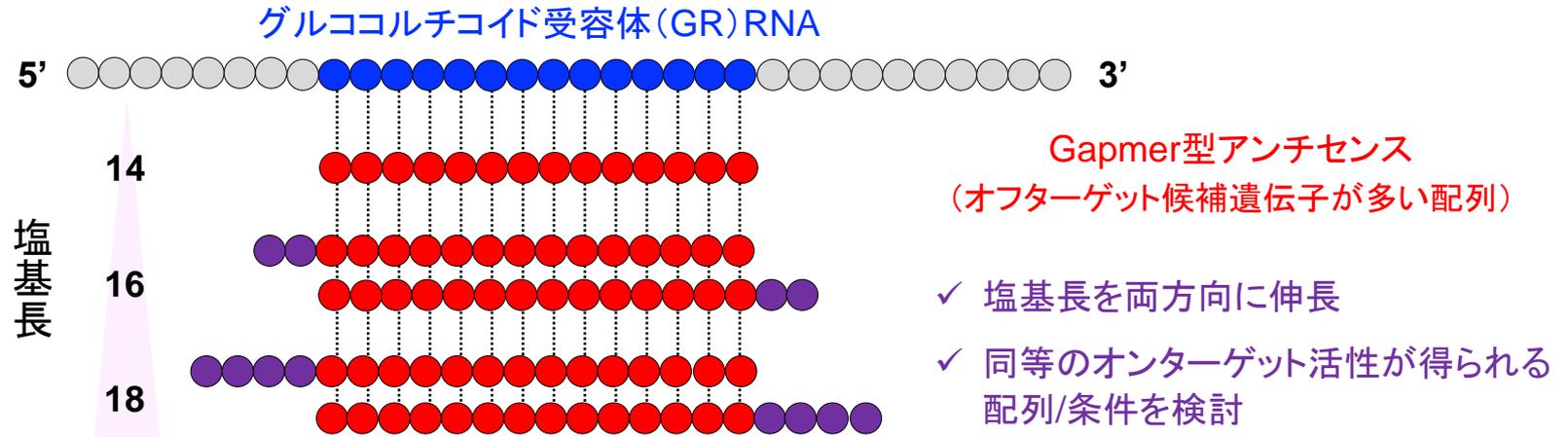
→ 塩基長を伸ばしたら、オフターゲット効果は低減されるか？

塩基長を伸ばしたら、オフターゲット効果は低減されるか？



オンターゲット活性を維持しつつ、塩基長伸長がオフターゲット効果に与える影響を評価

塩基長を伸ばしたら、オフターゲット効果は低減されるか？



核酸医薬に起因する毒性の低減法

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬

適切な配列設計



毒性の低減

修飾核酸の導入



毒性の低減

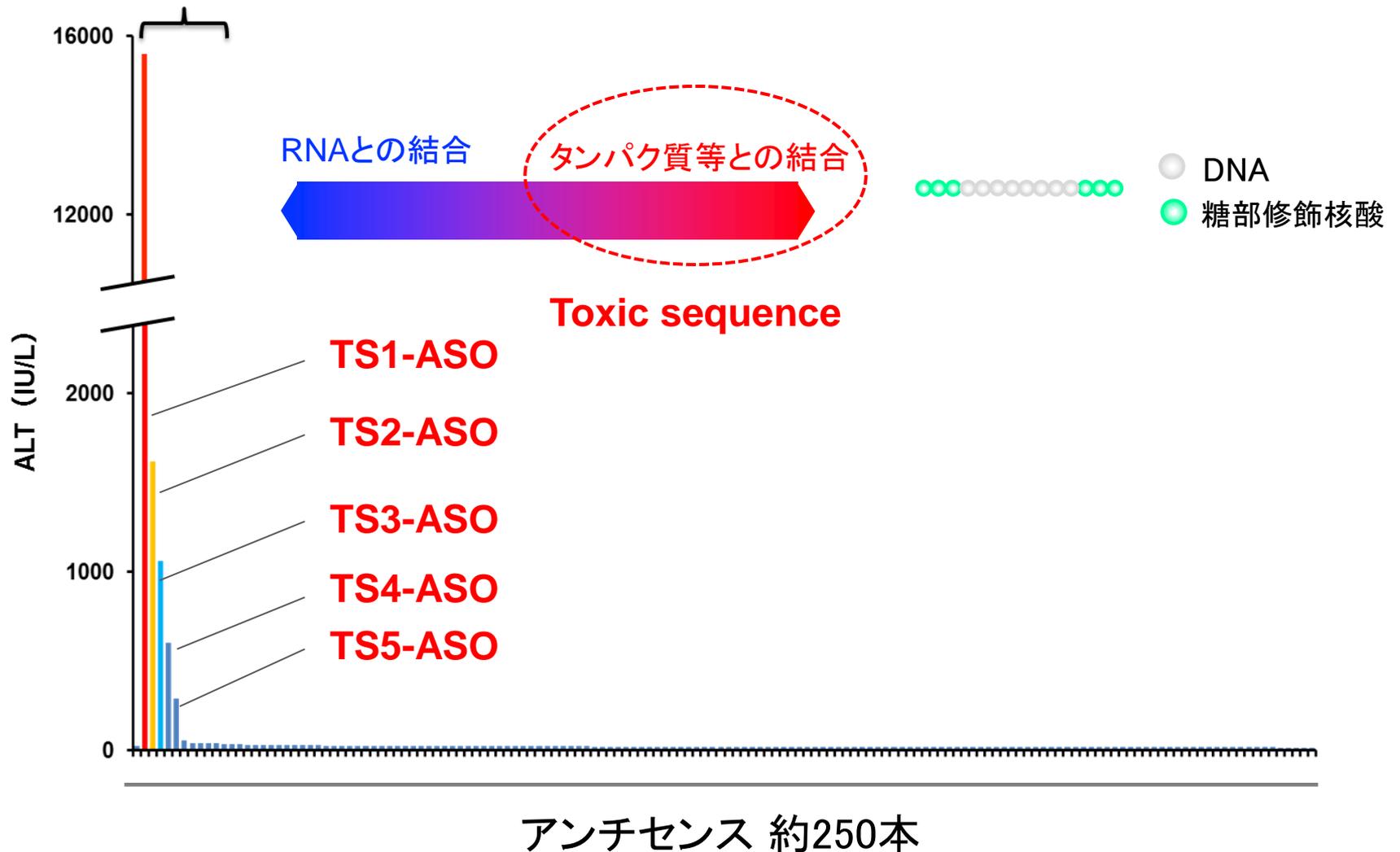
Yasuhara H*, [Yoshida T* et al,](#)
Mol Diagn Ther., 26, 117-127 (2022)

* Co-first author

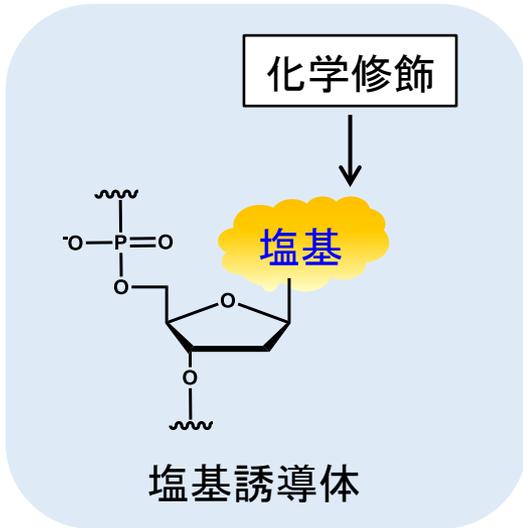
[Yoshida T, et al,](#)
Nucleic Acids Res., 50, 7224-7234 (2022)

[Yoshida T, et al,](#)
Sci Rep, 14, 11540 (2024)

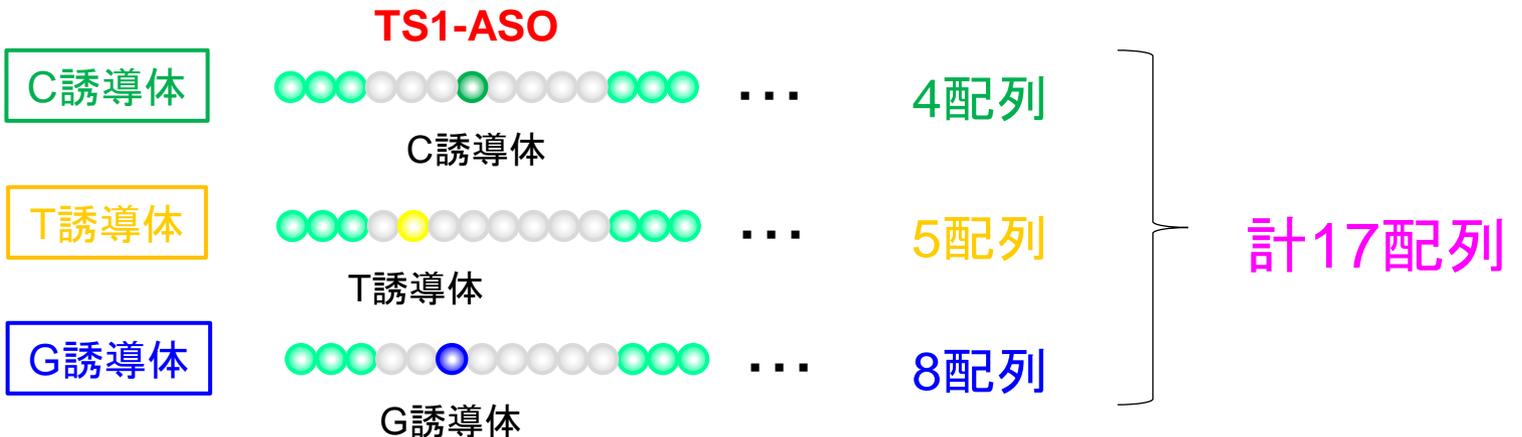
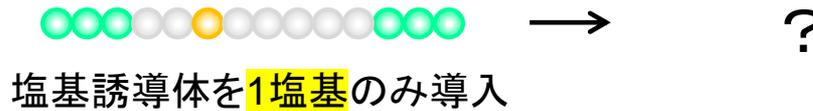
肝毒性を誘発するアンチセンスの同定



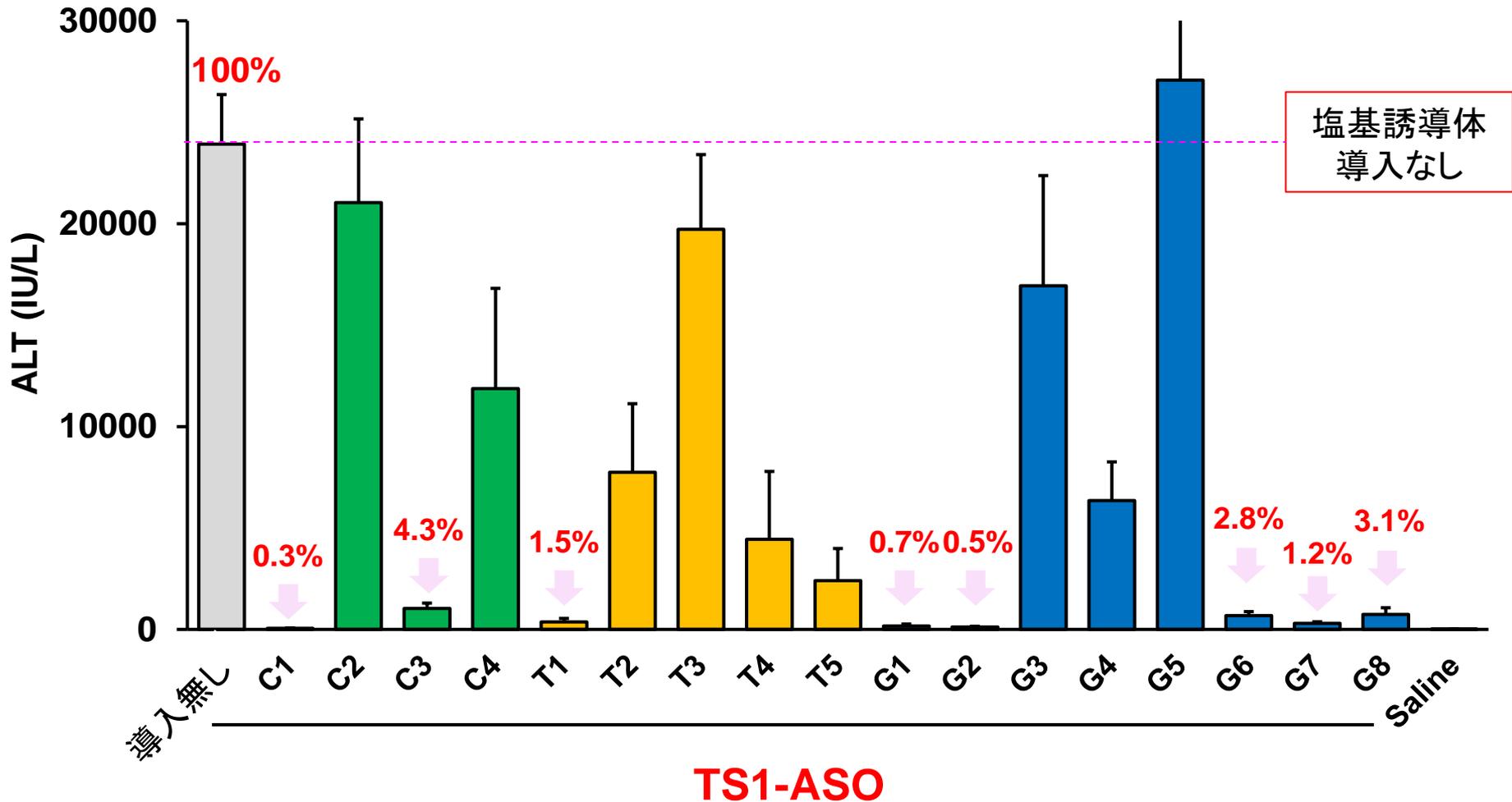
塩基誘導体のTS-ASOへの導入



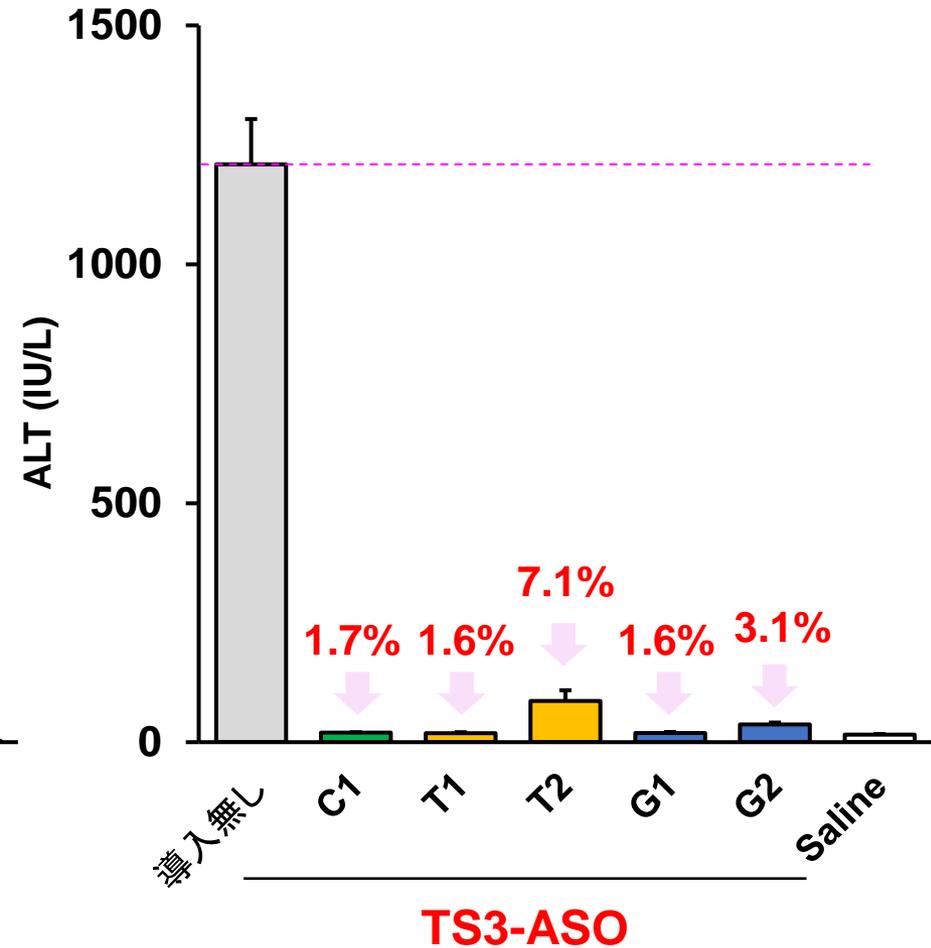
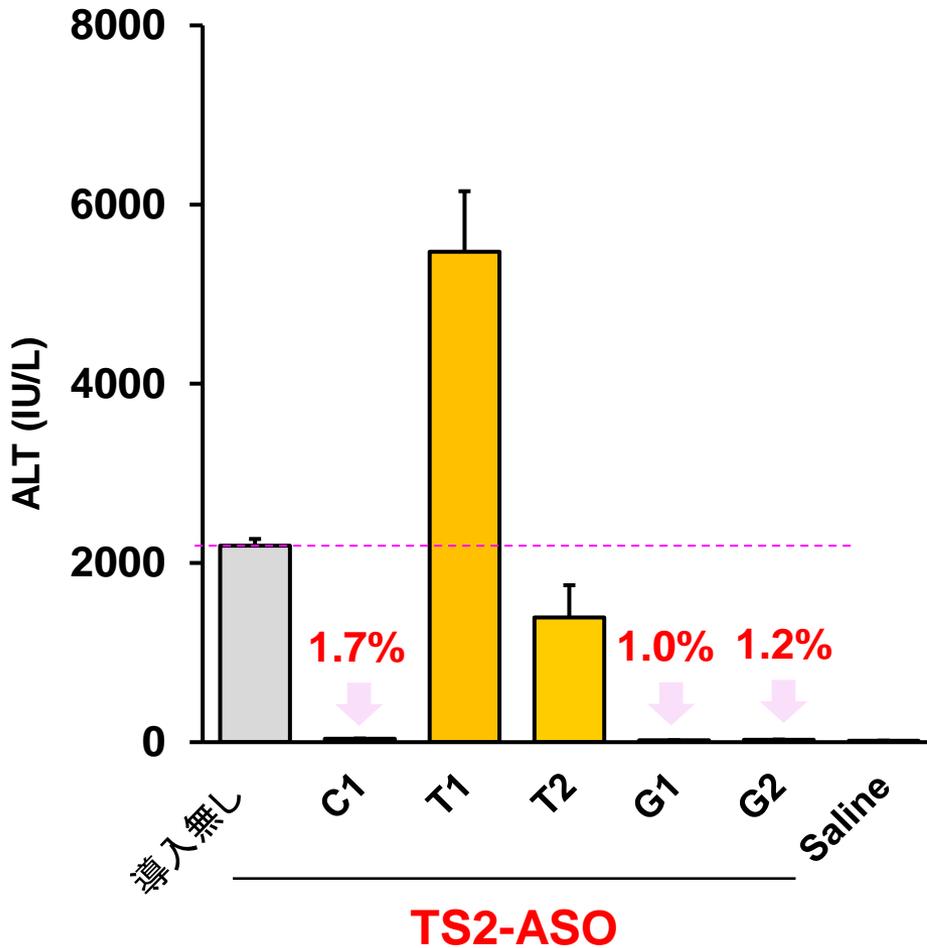
● DNA ● 糖部修飾核酸 ● 塩基誘導体



塩基誘導体のTS-ASOへの導入

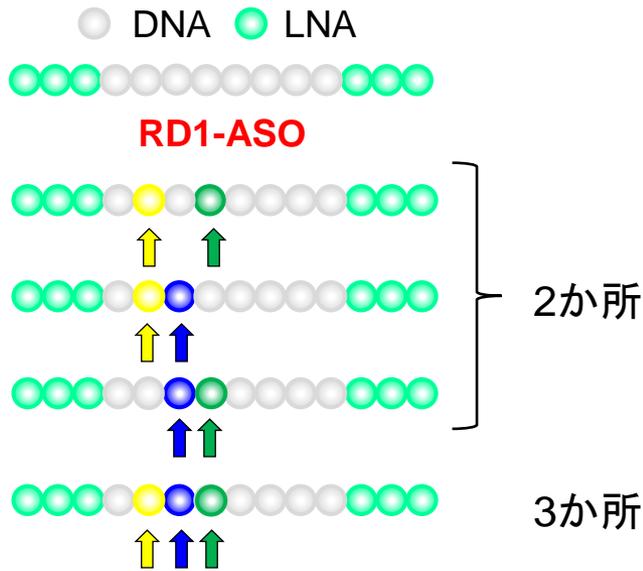
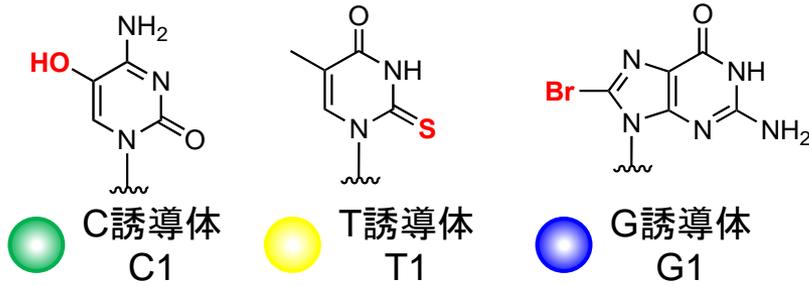


塩基誘導体のTS-ASOへの導入

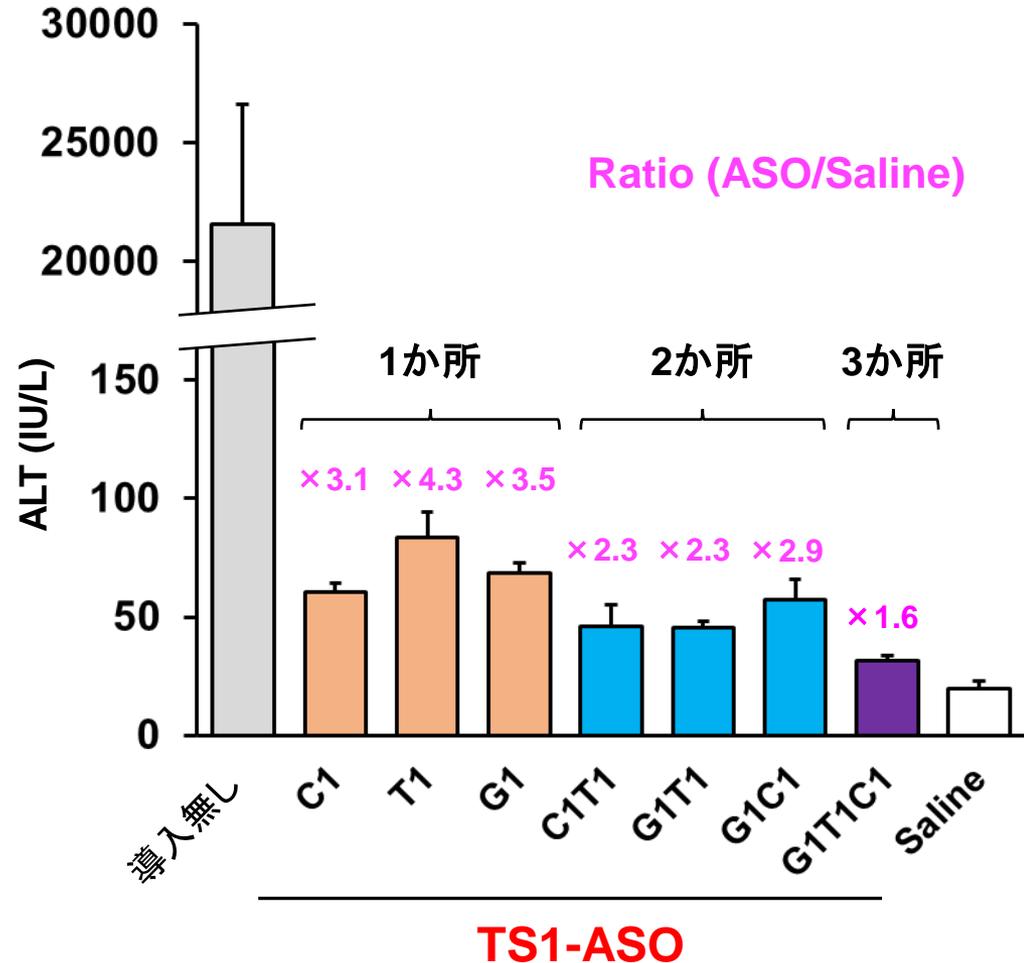


肝毒性を軽減する塩基誘導体を複数同定

塩基誘導体のTS-ASOへの導入



塩基誘導体(複数箇所)



塩基誘導体を複数導入することでさらなる毒性低減が可能

核酸医薬に起因する毒性の低減法

RNAとの結合
に起因する毒性

タンパク質等との結合
に起因する毒性

毒性を誘発する
核酸医薬

適切な配列設計



毒性の低減

修飾核酸の導入



毒性の低減

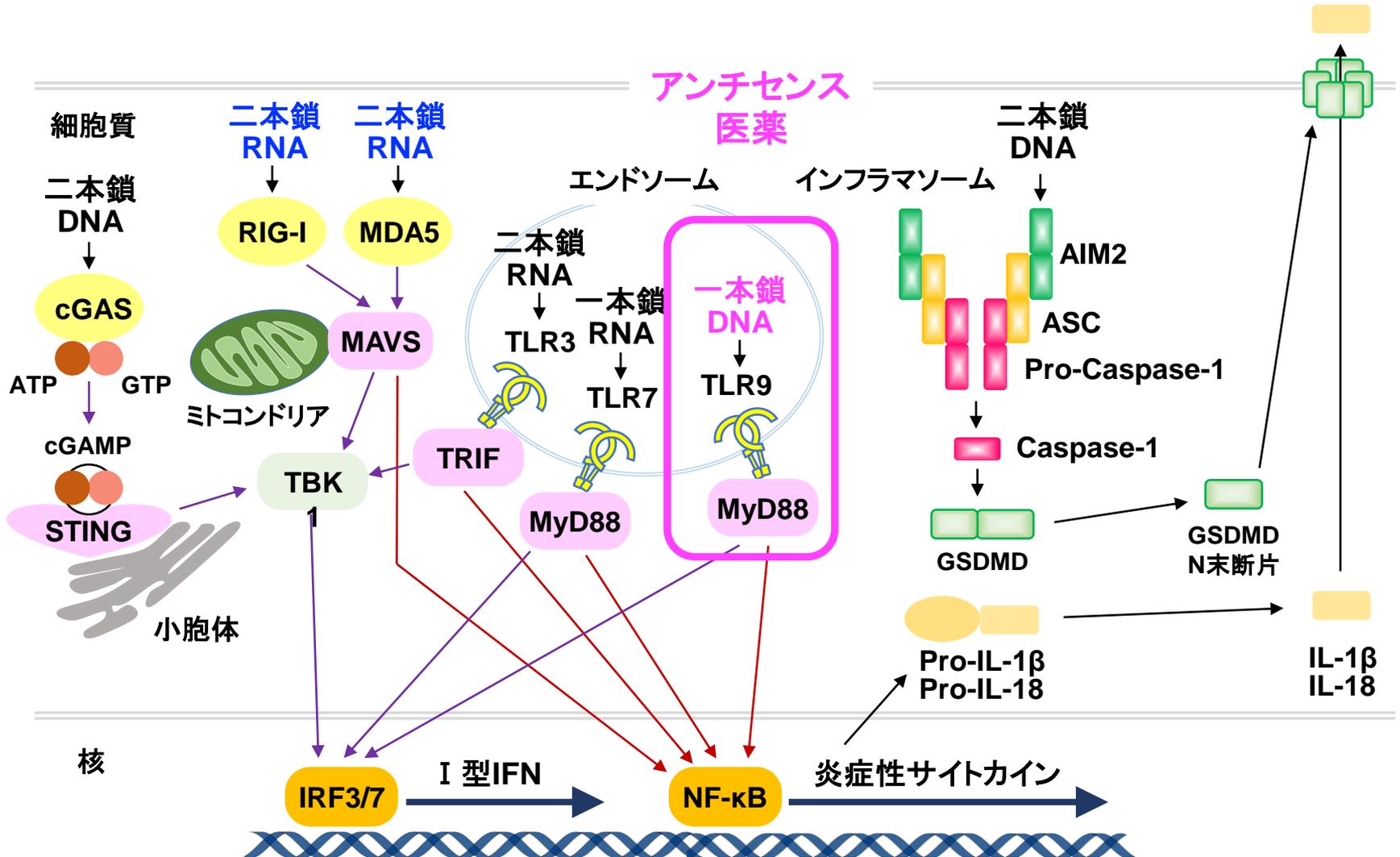
Yasuhara H*, Yoshida T* et al,
Mol Diagn Ther., 26, 117-127 (2022)

* Co-first author

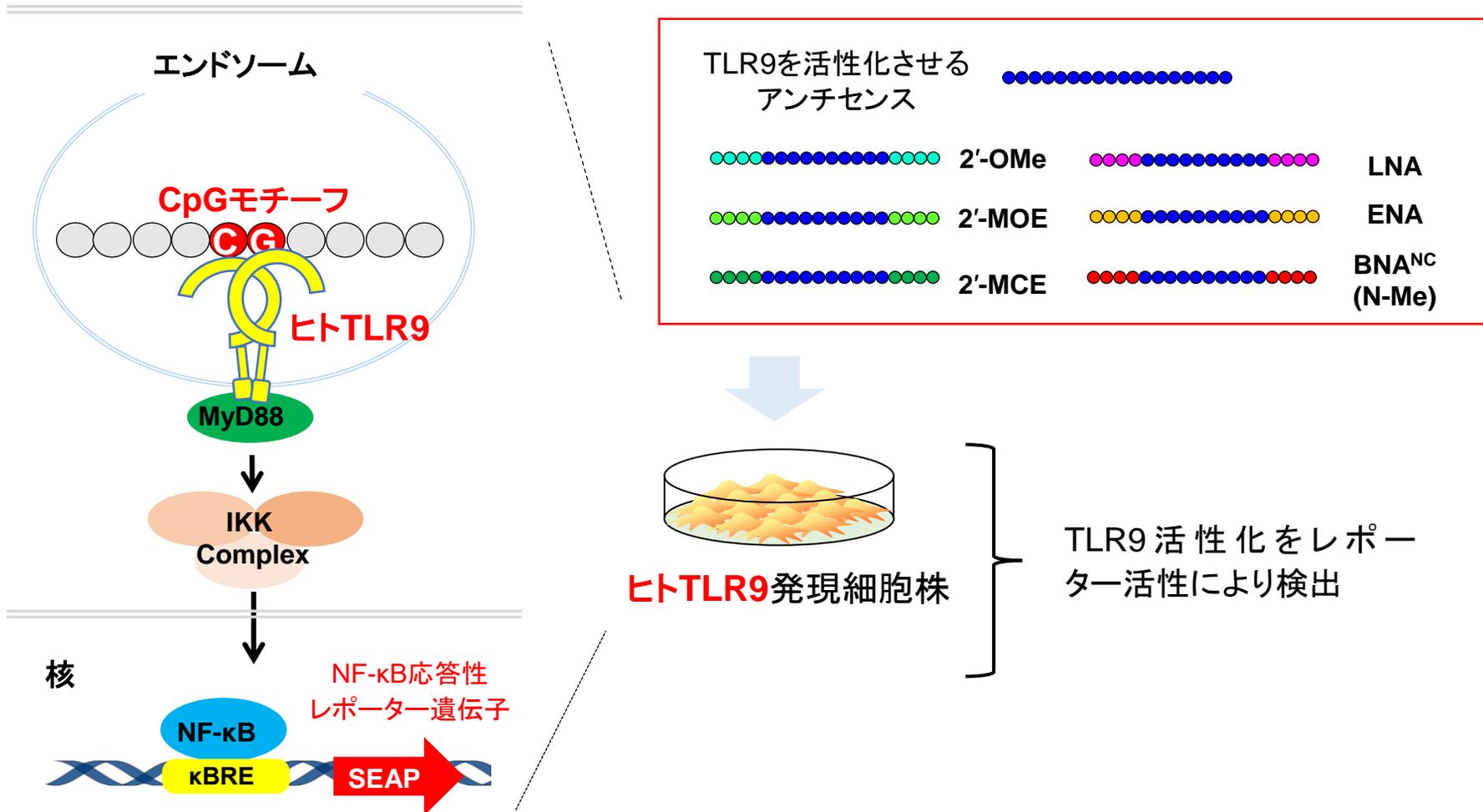
Yoshida T, et al,
Nucleic Acids Res., 50, 7224-7234 (2022)

Yoshida T, et al,
Sci Rep, 14, 11540 (2024)

核酸(DNA or RNA)によって惹起される 自然免疫活性化経路

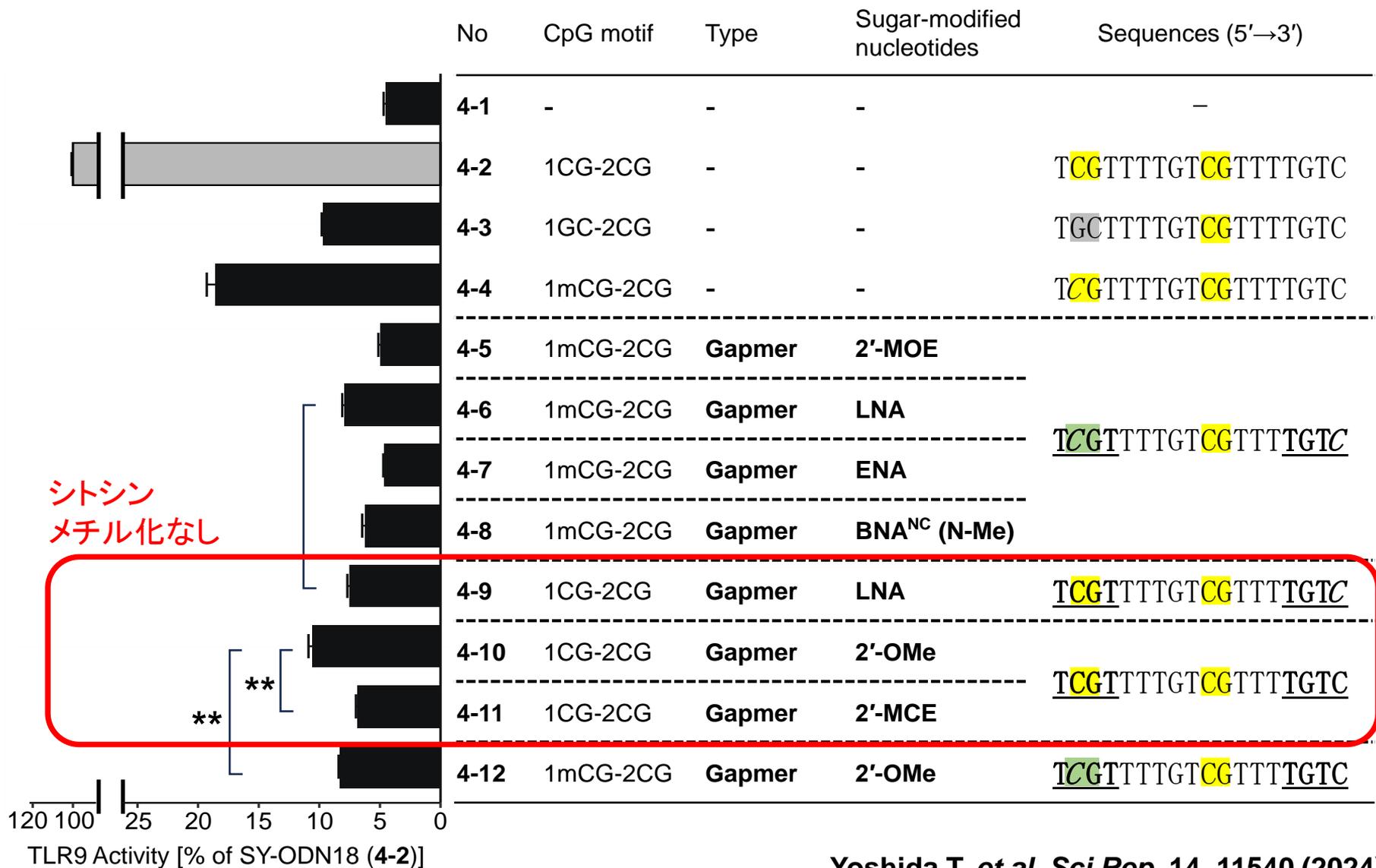


レポーター遺伝子搭載ヒト細胞株を用いた TLR9活性化の評価



糖部修飾核酸の導入はTLR9活性化能を大きく減弱させる

gapmerの様式で修飾核酸を導入



Contributors / Acknowledgments (敬称略)

国立医薬品食品衛生研究所

井上 貴雄, 佐々木 澄美, 栗田 英奈, 内藤 幹彦, 奥田 晴宏,
合田 幸広, 齋藤 嘉朗

大阪大学

小比賀 聡, 山口 卓男, 安原 秀典, 三上 敦士

東京大学

森廣 邦彦

東北大学

秋田 英万, 田中 浩揮

東京科学大学

内藤 雄樹

医薬基盤・健康・栄養研究所

笠原 勇矢

神奈川県立産業技術総合研究所

河合 純

東京都医学総合研究所

川路 英哉

協力企業

メディフォード, フェニックスバイオ, 扶桑薬品