

第15回 核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム

オフターゲット効果の評価と毒性発現機構

【日時】 2022年8月3日(水) 10:10から

【場所】 御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター

【主催】 日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス部会

- ・ 日本核酸医薬学会第7回年会「シンポジウム4 (レギュラトリーサイエンス)」にて開催。
- ・ 本シンポジウムを聴講するには、日本核酸医薬学会第7回年会に御参加頂く必要があります。
<https://procomu.jp/natsj7/jizen.html>

【プログラム】

座長： 木下 潔 (日本製薬工業協会/MSD株式会社)

井上 貴雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

「オフターゲット効果の評価と毒性発現機構～はじめに～」

木下 潔 (日本製薬工業協会/MSD株式会社)

「ノックダウン型核酸医薬のオフターゲット効果のリスク評価に資する遺伝子の分類」

太田 哲也 (日本製薬工業協会/田辺三菱製薬株式会社)

「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」

吉田 徳幸 (国立医薬品食品衛生研究所)

「多様化するモダリティのオフターゲット評価に関する考察」

井上 貴雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

「核酸医薬の毒性発現機構に関する知見」

三上 敦士 (大阪大学大学院薬学研究科)

オフターゲット効果の評価と毒性発現機構（趣旨説明）

木下 潔^{1,2}

¹ 日本製薬工業協会、² MSD 株式会社

Evaluation strategy of off-target effects and Mechanisms of toxicity

Kiyoshi Kinoshita^{1,2}

¹ Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, ² MSD K.K.

Oligonucleotide-based therapeutics (ONTs), such as antisense oligonucleotides and siRNAs, hybridize to target nucleotide sequences to exert their effects. Hybridization-dependent off-target toxicities are not able to detect in conventional animal toxicity testing, however it may be avoided to a certain extent by using *in silico* and/or *in vitro* analyses to exclude sequences that could potentially cause off-target effects. In this session, we would like to share the latest challenges avoiding the toxicity, and also discuss on the effort for development of ONTs with less toxicity.

RNA 分解型アンチセンスや siRNA などの核酸医薬は、標的配列と類似した核酸配列へクロスハイブリダイズすることにより意図しない効果（オフターゲット効果）を生じる可能性があるが、動物を用いた毒性試験ではこの効果を検出できない懸念がある。そこで、配列設計時にヒトの RNA データベースを用いた *in silico* 解析やヒト細胞を用いた *in vitro* 解析を行い、予めオフターゲット効果を排する配列を選択してヒトでのリスク最小化を図るプロセスがとられている。しかしながら、このオフターゲット評価のプロセスには試行錯誤を伴う膨大な労力が求められるため、さらなる課題の整理と解決、効率化のためのツール開発が、開発企業より求められていた。

以上の背景より、本シンポジウムでは、毒性リスク遺伝子のリスト化などオフターゲット評価に資する最近の取り組みやエクソンスキップ薬のオフターゲット評価、プロテオミクス技術を用いた新たな評価手法の試みなどを取り上げることとした。さらに、安全性評価を考える上での基盤的な核酸医薬の毒性発現機構についての最新の知見を共有し、毒性発現の懸念の少ない核酸医薬の創出に向けての議論を進めたい。

ノックダウン型核酸医薬のオフターゲット効果のリスク評価に資する遺伝子の分類

太田 哲也^{1,2}

¹ 日本製薬工業協会、² 田辺三菱製薬株式会社

Classification of human genes contributing to risk assessment of off-target genes of knockdown-type oligonucleotide therapeutics

Tetsuya Ohta^{1,2}

¹ Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, ² Mitsubishi Tanabe Pharma Co.

Evaluation of hybridization-dependent off-target toxicity of oligonucleotide therapeutics is generally performed by the risk assessment of off-target genes that are identified by the combination of *in silico* analysis to search off-target candidate genes and *in vitro* gene expression analysis using human cells. In this talk, we will introduce a human gene list that is expected to facilitate the risk assessment of off-target genes of knockdown-type oligonucleotide therapeutics, such as gapmer and siRNA.

核酸医薬品のハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット毒性の評価は、ヒトの RNA データベースを用いた *in silico* での類似配列検索にヒト細胞を用いた *in vitro* でのマイクロアレイ等による遺伝子発現解析を加え、ノックダウンが示唆される遺伝子（オフターゲット遺伝子）を特定し、ヒトでのリスクを推測する手順で行われる。

ノックダウンによるオフターゲット効果が示唆される核酸医薬（gapmer 型アンチセンス、siRNA 等）では、オフターゲット遺伝子を特定する手法は確立されつつあるが、適切且つ効率のよいリスク評価のスキームは整備されていなかった。特に新しいタイプの gapmer 型アンチセンスでは、親和性向上によって短い配列長で作用するため、塩基の不整合を考慮するとオフターゲット遺伝子が膨大となり、ヒトでのリスク評価には多大な労力が求められる。そこで、当該リスク評価を円滑にすることを目的として、AMED 革新基盤創成事業において、ヒトで発現抑制や機能低下が生じた際に毒性発現のリスクが高いと推測される遺伝子（遺伝子疾患と関連のある遺伝子、がんに関連した遺伝子、重要な生理機能に関連した遺伝子など）の抽出及びリスト化を試みた (https://www.amed.go.jp/program/list/17/01/yakuzai_kakusaniyakuhin.html)。

本講演では、今回の取り組みで抽出された 1,695 のリスク遺伝子の分類とその考え方、活用法及び留意点を紹介すると共に、医薬品開発の立場から現在の DNA/RNA データベース及び検索エンジンの整備状況についても併せて紹介する。

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

吉田 徳幸

国立医薬品食品衛生研究所

Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells

Tokuyuki Yoshida

National Institute of Health Sciences

Antisense oligonucleotide (ASO) has the potential to induce off-target effects due to complementary binding between the ASO and unintended RNA with a sequence similar to the target RNA. In our previous study, we proposed a scheme for assessment of off-target effects of gapmer ASOs with *in silico* analysis using a human RNA database and *in vitro* expression analysis using human cells. In this study, to further explore *in vitro* analysis methods, we compared the gene expression changes of off-target candidate genes among two types of microarrays and quantitative PCR. Related to this evaluation scheme, we also analyzed the off-target effects of oligonucleotide-related impurities (N-1 and N+1 oligonucleotides) by the combination of *in silico* and *in vitro* analysis. Based on these experimental data, we will discuss the points for evaluating off-target effects of ASOs and ASO-related impurities.

RNA を標的とする核酸医薬のオフターゲット効果に起因する毒性は、動物試験では原理的に評価できないことから、「ヒト」を対象とした評価が必要である。具体的には、ヒト RNA データベースを用いた *in silico* 解析により核酸医薬と相補性を有するオフターゲット候補遺伝子をまず抽出し、次に、ヒト細胞を用いた *in vitro* 解析（遺伝子発現変動解析）により遺伝子発現が 50%未満まで抑制されるオフターゲット遺伝子を特定し、そのリスク評価を行うスキームが考えられる。本研究では、この評価手法における *in vitro* 解析に関して、2 種のマイクロアレイ及び定量 PCR を用いて、オフターゲット遺伝子の遺伝子発現変動に関する比較検証を行った。また、RNA 分解型アンチセンスに含まれるオリゴヌクレオチド類縁物質（ヌクレオチド欠失体/付加体）のオフターゲット効果についても、評価手法の在り方を検討したので、合わせて発表する。

【謝辞】

本研究（不純物のオフターゲット評価）は、AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：小比賀聡）による支援の成果である。

多様化するモダリティのオフターゲット評価に関する考察

井上 貴雄

国立医薬品食品衛生研究所

Considerations for evaluation of off-target effects of diversified modalities

Takao Inoue

National Institute of Health Sciences

Off-target effects of gapmer ASOs and siRNAs are generally evaluated by methods to analyze the change in mRNA levels, such as microarray and quantitative PCR. On the other hand, the mechanism of action of oligonucleotide therapeutics is not limited to RNA cleavage but is becoming more diverse, including splicing control, miRNA control (anti-miR, miRNA mimic), and RNA editing. In addition, the development of next-generation small molecule drugs that could compete or coexist with oligonucleotide therapeutics, such as PROTAC (TPD therapeutics) and RNA-targeting small molecule drugs, is progressing as related modalities. In principle, methods to analyze mRNA levels cannot be applied to the off-target evaluation of such advanced modalities, and it is necessary to consider evaluation methods based on the characteristics of the mechanism of action of each modality. In this talk, we would like to introduce our attempts of off-target evaluation for diversified modalities.

RNA 分解型アンチセンスや siRNA のオフターゲット効果は、一般にはマイクロアレイや定量 PCR などの「mRNA 量の変動を解析する手法」で評価される。一方、オリゴ核酸で生体を制御する核酸医薬の作用機序は、RNA 分解に留まらず、スプライシング制御、miRNA 制御 (anti-miR、miRNA mimic)、RNA 編集 (塩基置換) など多様性を増している。さらには、関連するモダリティとして、タンパク質分解医薬や RNA 標的的低分子医薬など、将来的に核酸医薬と競合/共存しうる次世代低分子医薬の開発も進んでいる。このような先端的モダリティのオフターゲット評価については、上述の「mRNA 量の変動を解析する手法」では原理的に対応できないものも多く、各モダリティの作用機構の特性を踏まえた評価手法を考慮する必要がある。本発表では、我々が取り組んでいるエクソソアレイやプロテオミクスを用いたオフターゲット評価の試みについて紹介し、多様化するモダリティのオフターゲット評価の在り方について議論したい。

核酸医薬の毒性発現機構に関する知見

三上 敦士

大阪大学大学院薬学研究科

Insight about mechanism of toxicity in oligonucleotide therapeutics

Atsushi Mikami

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Off-target toxicity of oligonucleotide therapeutics is classified into hybridization-dependent and hybridization-independent toxicity. Especially, the off-target toxicity has been studied for gapmer-type antisense oligonucleotides (ASOs). Reports demonstrating that the number of off-target genes and T_m values of ASOs correlate with hepatotoxicity suggest the presence of hybridization-dependent off-target toxicity. These are due to the suppression of complementary (or partially complementary) non-target sequences. To suppress them, it is useful to adjust modification patterns and lengths of ASOs to provide appropriate T_m values. Alternatively, it was reported that PS (phosphorothioate)-modified ASO binds to RNase H1 and induces a conformational change, resulting in abnormal localization to the nucleoli along with nuclear paraspeckle proteins. This suggests RNaseH1-dependent but hybridization-independent off-target toxicity. Chemical modification of gap region of the gapmer-type ASOs is known to reduce hybridization-independent toxicity, and modification patterns are being investigated. In this presentation, I will discuss the mechanism of off-target toxicity.

核酸医薬のオフターゲット毒性は狭義（ハイブリダイゼーション依存）と広義（ハイブリダイゼーション非依存）のオフターゲット毒性に大別でき、実際の毒性はこれらが組み合わさったものである。特に、ギャップマー型アンチセンス核酸（ASO）についてオフターゲット毒性の研究が進んでいる。

ASOのオフターゲット遺伝子数や T_m 値が肝毒性の発現と相関するという報告などは狭義のオフターゲット毒性を示唆している。これらは特定遺伝子の抑制ではなく相補的な非標的配列群の抑制に起因すると考えられており、適切な T_m 値となるように修飾パターンを調節する手法などが毒性低減に有効な手段となる。

広範なタンパク質と非特異的に結合をするASOほど肝毒性を示すという報告などは広義のオフターゲット毒性を示唆している。興味深い例として、PS（ホスホロチオアート）修飾したASOがRNase H1と結合/構造変化を引き起こし核内パラスペックルタンパク質と共に核小体へと異常局在し肝毒性を誘起するという報告がある。すなわち切断に依らないRNase H1依存の広義のオフターゲット毒性である。また、Gap領域の化学修飾によりタンパク質との非特異的な結合を抑制する手法などが広義のオフターゲット毒性の低減法として知られており、修飾パターンの検討が進められている。

本発表では毒性発現のメカニズムについて広く議論していきたい。