

核酸医薬品のオフターゲット作用の評価

ICH S6 対応研究班^{*1}

Considerations on the Preclinical Safety Assessment of “off-target”

Effect of Oligonucleotide Therapeutics

Working Group for the ICH S6 & Related Issues^{*1}

1. はじめに

アプタマーなどを除き、多くのオリゴヌクレオチド製剤(核酸医薬品)は、標的とする塩基配列にハイブリダイズすることにより作用を発現します(オンターゲット作用)。転写や翻訳といった遺伝子発現過程に直接作用することから、核酸医薬品のオンターゲット作用は極めて特異性の高いものと期待されています。一方、こうしたオンターゲット作用以外の意図しない作用点もしくはメカニズムによる作用は、オフターゲット作用と総称されます。特に、標的

とする塩基配列と同一もしくは類似した他の配列に核酸医薬品がハイブリダイズする懸念もあり、その結果として想定外の影響をもたらす場合、これを「狭義のオフターゲット作用」と呼びます(Fig. 1)。

本稿では、核酸医薬品のオフターゲット作用による毒性に注目し、狭義のオフターゲット作用とその回避に向けた方策について考えておくべきポイントを整理しました。また、「狭義」以外のオフターゲット作用についても概説しました。

^{*1} 平成 27 年度日本医療研究開発機構研究費(医薬品等規制調和・評価研究事業)「医薬品の安全性および品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究」(研究代表者:西川秋佳)の分担研究「S6:バイオ/核酸医薬品の安全性に関する研究」研究班(ICH S6 対応研究班), 研究分担者:平林 容子(Yoko Hirabayashi)^{*2}, 協力研究者:真木 一茂(Kazushige Maki)^{*3}, 笹木 修(Osamu Fueki)^{*3}, 松本 峰男(Mineo Matsumoto)^{*3}, 渡部 一人(Kazuto Watanabe)^{*4}, 木下 潔(Kiyoshi Kinoshita)^{*5}, 中澤 隆弘(Takahiro Nakazawa)^{*6}, 小比賀 聡(Satoshi Obika)^{*7}, 荒戸 照世(Teruyo Arato)^{*8}, オブザーバー:小野寺 博志(Hiroshi Onodera)^{*3}, 篠田 和俊(Kazutoshi Shinoda)^{*3}

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*3} 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyodaku, Tokyo 100-0013, Japan

^{*4} 中外製薬株式会社 静岡県御殿場市駒門 1-135 (〒412-8513)

Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotenbashi, Shizuoka 412-8513, Japan

^{*5} MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)

MSD KK., Kitanomaru Square, 1-13-12, Kudan-Kita, Chiyodaku, Tokyo 102-8667, Japan

^{*6} アンジェス MG 株式会社 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15 彩都バイオインキュベータ 4 階 (〒567-0085)

AnGes MG, Inc., 4F, Saito Bio-Incubator, 7-7-15, Saito-asagi, Ibaraki, Osaka, 567-0085, Japan

^{*7} 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒565-0871)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suitashi, Osaka 565-0871, Japan

^{*8} 北海道大学大学院医学研究科 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 (〒060-8638)

Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8638, Japan

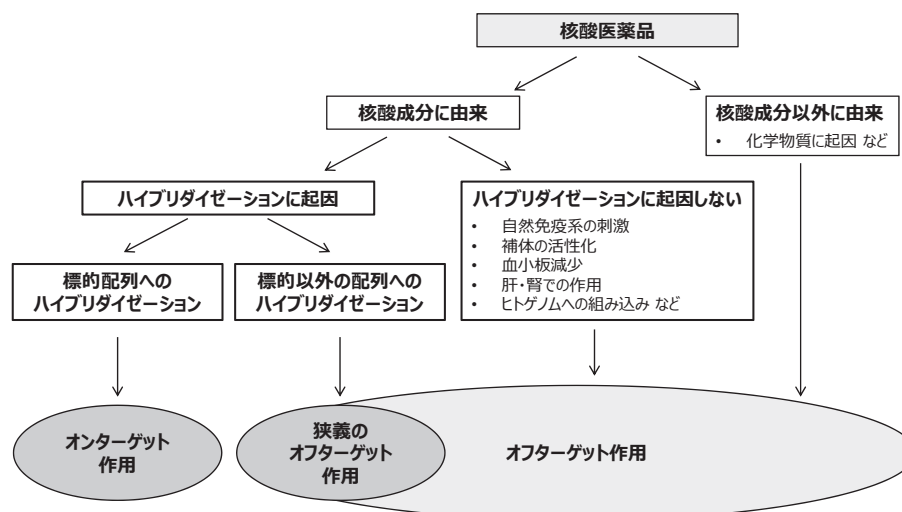


Fig.1 核酸医薬品による作用の分類

(医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 46 (8), p.524, Fig. 1 を一部改変)

2. 狭義のオフターゲット作用

まずハイブリダイゼーションに起因する作用を発現しうる塩基長の観点から考えてみます。

細胞や動物を用いた多くの試験成績より、狭義のオフターゲット作用は完全又はほぼ完全に一致する塩基配列に対して生じ、その発現に必要な塩基長は核酸医薬品の作用機序によって異なる、とされています。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドであれば、連続した12塩基程度の配列の一致により、RNaseHによる翻訳機能阻害作用が誘発されます¹⁾。実際、人工核酸を搭載したアンチセンス核酸では、13塩基長の配列で優れた効果を示すものもあります²⁾。塩基長にもよりますが、二つ以上のミスマッチはアンチセンス核酸の作用をほとんど、あるいは完全に消失する程度まで減弱させてしまいます³⁾。また、人工核酸を用いた splice-switching oligonucleotide においても13塩基程度の長さで効果を発揮しますが、一つもしくは二つの変異によりその効果は損なわれます⁴⁾。

他方、siRNA オリゴヌクレオチドについては、標的となる塩基配列にハイブリダイズする際にシード配列(5'末端から2-8塩基)の相同性が重要とされており、連続する11塩基を含む15塩基の相同性でも標的以外の遺伝子発現が有意に抑制されること⁵⁾、2塩基から4塩基のミスマッチは許容されることが報告されています⁶⁾。

次に、ヒトの体内で標的とする塩基配列と同じ配列が出現する確率について考えてみます。塩基配列に偏りが無いことを前提とすると、例えば上述したある特定の配列を有する13塩基長のアンチセンスについて、その相補的配列の出現する確率は $1/4^{13}$ (塩基4種類の13乗) となり、

約6700万回に1回出現することになります。ヒトゲノム(約30億塩基対)においてmRNAをコードする領域の割合を3%すなわち約9000万塩基対と仮定すると、ある特定の配列を有する13塩基のゲノム当たりの出現頻度は約 $9,000万 \times 1/6,700万$ となり、オンターゲットを含め約1.3回出現すると計算されます。つまり、13塩基長もしくはそれ以上の塩基長をもつ核酸医薬品のターゲット配列は、理論的には1ゲノムあたり標的遺伝子以外にオフターゲット遺伝子が一つあるかないかという頻度になると推測されます。ただし、1塩基又は2塩基程度のミスマッチによるハイブリダイゼーションも可能と仮定すると、同じ塩基長でもハイブリダイゼーション可能なmRNA配列の理論値は増加するものと考えられます。また、塩基長が1塩基短くなるごとに同じ配列が出現する確率は4倍ずつ増えるため、13塩基長より短いアンチセンスでは計算上、狭義のオフターゲットとなりうるハイブリダイゼーション可能なmRNA配列がより多く存在することになります。

このような潜在的な意図しないハイブリダイゼーションを回避する手段としては、*in silico* 解析や *in vitro* マイクロアレイ解析をもとに、核酸医薬品の配列設計時におけるスクリーニング過程で排除すること、あるいは、毒性の発現リスクをあらかじめ予測・評価することなどがあり、これらによって、ある程度回避することができるものと考えられます (Fig. 2)。以下に、*in silico* 解析や *in vitro* マイクロアレイ解析で考慮すべきポイントをまとめてみました。

2.1 *In silico* 解析

ハイブリダイゼーション可能な配列を有し、オフター

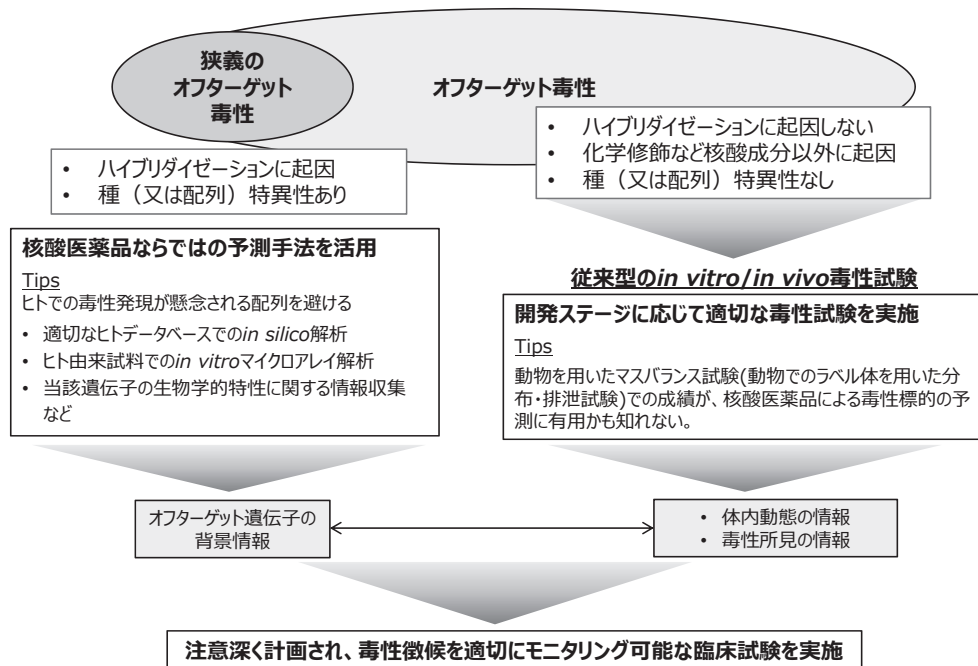


Fig.2 適切な臨床試験実施に向けた戦略：オフターゲット毒性の予測と従来型非臨床安全性評価

ゲット作用を引き起こす可能性のある遺伝子(オフターゲット候補遺伝子)を抽出するには、ヒト mRNA 情報をもとにした *in silico* 解析が有用です。すなわち、適切なアルゴリズムを用いてデータベース検索を行うことで、ハイブリダイズする可能性があるオフターゲット候補遺伝子がある程度予測・回避することが可能と考えられます。

具体的には、例えば National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic local alignment search tool (BLAST ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) などで検索することにより、標的配列を含む遺伝子(オンターゲット遺伝子)とともにクロスハイブリダイゼーションが可能なオフターゲット候補遺伝子を、網羅的に抽出することが考えられ、この他にも目的に応じたデータベースを活用することができます⁷⁾。このようなデータベースの検索時にヒットする遺伝子の数は、mRNA とハイブリダイズする塩基長やミスマッチ数の設定により大きく異なります。条件設定の選択基準は核酸医薬のタイプに依存し、例えば、選択基準が厳しすぎるとオフターゲット遺伝子を取りこぼすリスクがあることなどに留意する必要があります。

現時点では目的に合致したデータベースの選定と検索アルゴリズムの最適化を通して、細心の注意を払いながら解析を進める必要があると考えられます。

2.2 *In vitro* マイクロアレイ解析

In silico 解析と併せて有用なオフターゲット作用を予測

する手法の一つとして、*in vitro* マイクロアレイ解析があります。

In vitro マイクロアレイ解析では、被験対象の核酸医薬候補品が細胞内で実際にオフターゲット候補遺伝子にハイブリダイズして遺伝子発現を変化させるか確認することで、*in silico* 解析で抽出されたオフターゲット候補遺伝子群の中から、リスク評価が必要なオフターゲット候補遺伝子を絞り込むことができます¹⁾。具体的には、オンターゲット遺伝子及び *in silico* 解析で抽出されたオフターゲット候補遺伝子を発現しているヒト由来試料などに、核酸医薬候補品を作用させて、回収した mRNA をもとに網羅的な遺伝子発現解析を行います。また、*in vitro* マイクロアレイ解析では、このようなオフターゲット候補遺伝子の絞り込みの他にも、核酸医薬候補品に起因する下流の遺伝子の発現の変動もあわせて評価できる可能性もあることから、こうした情報をリスク評価に活用できることが期待されます。

2.3 リスク評価

In silico 解析及び *in vitro* マイクロアレイ解析を通じて選択されたオフターゲット候補遺伝子の生体内での発現変化が、ヒトでの毒性(狭義のオフターゲット毒性)発現に結びつく可能性については、綿密かつ総合的な検討が必要です。

まず、当該オフターゲット候補遺伝子の機能を文献検索などにより、可能な限り調査することが必要です。例えば、

イオンチャンネルに関連する遺伝子ならば、少しの発現変化でも生体に大きな影響を与える懸念があることから、オフターゲット作用に最大限の注意を払う必要があります。一方、生体機能にあまり重要と考えられないタンパクに関連する遺伝子ならば、多少の発現変化が起きても生体への影響は少ないと予想されます。この時点で、当該オフターゲット候補遺伝子と毒性との関連性が明らかになる場合もあると思いますが、文献調査などにおいてオフターゲット候補遺伝子に起因する毒性が明らかにできない場合には、ヒトでの当該遺伝子の発現パターンや遺伝子疾患に関する情報や、ヒト特異的ではない場合には遺伝子改変動物(トランスジェニック動物、ノックアウト動物)での解析結果に関する情報が、有用な判断材料になると考えられます。

以上の方策により、ヒトで狭義のオフターゲット毒性が生じる可能性が考えられた場合には、配列を最適化することにより当該オフターゲット候補遺伝子とのハイブリダイゼーションを回避することが可能と考えられます。このように核酸医薬品については、*in silico* 解析及び *in vitro* マイクロアレイ解析を活用し、様々な情報源から得られる情報も踏まえて綿密なリスク評価を行うことで、ヒトでのリスクを事前に予測・回避する戦略を取ることが可能になることから、開発を進める上では大きなメリットと考えられます。核酸医薬品の開発現場では、過去の開発経験をもとに、既知の毒性や副作用発現に繋がりがかねない意図しないハイブリダイゼーションを減じるための、配列設計ノウハウが蓄積されつつあるものと考えられます¹¹⁾。

3. ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット作用

ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット作用には、オリゴヌクレオチドの物性により惹起された効果や、様々な化学修飾に起因する効果が含まれます (Fig. 1)。これらのオフターゲット作用に起因する毒性は、通常の化学合成医薬品と同様に、実験動物を用いた従来型の毒性試験で評価することが可能です (Fig. 2)。

オリゴヌクレオチドの物性により引き起こされる生体内反応としては、まず自然免疫系への影響が考えられます。すなわち、ヒトを含む動物には外来病原体である細菌やウイルス等を認識して排除する生体防御機構として自然免疫が備わっており、自然免疫を司る分子として DNA や RNA を関知する Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) が存在しています。ヒトでは 10 種類の TLR が確認されており、そのうち TLR3 はウイルスの 2 本鎖 RNA を、また、TLR7/8 はウイルスの 1 本鎖 RNA を、更に TLR9 は細菌・ウイルス由来の DNA (非メチル化 CpG 配列) を認識することが

知られています⁸⁾。これらの受容体により免疫系の活性化が引き起こされることから、核酸医薬品にとって TLR による認識は回避すべきとされています⁹⁾。TLR による認識を回避する手段として化学修飾が有効とされており、また、認識されやすいモチーフ (塩基配列の特徴) を避けること (例えば TLR9 の認識を回避するため CpG rich な配列を避けたデザインにすることなど) も有効とされています。TLR7 もしくは TLR8 はリガンドを認識すると Type-1 の interferon ($-\alpha$, $-\beta$) の発現を引き起こすため¹⁰⁾、これを指標に *in vitro* で形質細胞様樹状細胞などを用いて核酸医薬品による TLR への影響を予測できると考えられます¹¹⁾。

また、TLR を介した自然免疫系への影響の他に、核酸医薬品でのハイブリダイゼーション非依存的オフターゲット作用として知られているものには、血漿蛋白の結合に起因する急性かつ一過性の変化 (aPTT 延長、補体活性化)、高濃度分布臓器 (肝臓、腎臓) への影響、血小板数減少などがあります^{12,13)}。ただし、肝毒性はヒト以外の霊長類 (non-human primate, NHP) よりげっ歯類で強く発現するなど種特異性が認められており¹⁴⁾、毒性の発現強度についてはヒトへの外挿性を考慮する必要があります。

なお、アンチセンス核酸の非臨床安全性評価では、NHP の有用性が高いとの報告もありますが³⁾、NHP の使用にあたっては、有用性と 3Rs とのバランスも考慮する必要があります。

4. オフターゲット毒性の事例

4.1 狭義のオフターゲット毒性について

核酸医薬品として、これまで硝子体内投与の Vitravene[®] (fomivirsen sodium; アンチセンス) 及び Macugen[®] (Pegaptanib sodium; アプタマー)、並びに皮下投与の Kynamro[®] (Mipomersen sodium; アンチセンス) が日本、米国又は EU で承認されています。例えば、全身投与剤である Kynamro[®] ではハイブリダイゼーションに起因したオフターゲット毒性と考えられる明らかな所見は検出されておらず¹⁵⁾、また、他に開発中の核酸医薬品においてもこうした所見の報告はありません¹⁾。これは、2 章でも述べたように、適切なデータベース検索によりハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット候補遺伝子が比較的容易に検出できることから、核酸医薬品の開発初期において、*in silico* 解析及び *in vitro* マイクロアレイ解析等を活用することで遺伝子配列の選別と最適化が図られ、ヒトでのリスクが回避された結果であろうと考えられています。

4.2 ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット毒性

全身投与剤である Kynamro[®] を例にあげると、その開発時におけるマウス、ラット及び NHP の長期反復投与毒性試験で観察された主要な所見は、免疫刺激性・炎症性反応(リンパ組織球性浸潤、ケモカイン・サイトカインの増加、IgG 増加など)、aPTT 延長及び血小板数の変動、肝臓及び腎臓への影響(Kynamro[®] の蓄積に起因する変化)、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット(赤血球系パラメータ)の減少であり、NHP では補体活性化及び血管傷害も認められました^{15,16)}。また、臨床試験での主な副作用として、炎症性反応及び免疫原性、血液凝固・血小板への影響、肝臓への影響、並びに投与部位での反応及びインフルエンザ様症状がみられました。

Kynamro[®] の非臨床試験では、これまでに開発が進められてきた第一世代(phosphorothioate oligonucleotide)及び第二世代(2'-MOE 修飾)オリゴヌクレオチドで共通してみられた変化、すなわち①血漿蛋白の結合に起因する一過的变化：aPTT 延長、補体活性化、②高濃度分布臓器(肝臓、腎臓)への影響：クッパー細胞の塩基性顆粒蓄積・肥大、尿細管上皮細胞塩基性顆粒蓄積・空胞化、③炎症性反応：免疫系細胞活性化、サイトカイン・ケモカイン放出、リンパ組織球性浸潤、④血小板数減少などと、ほぼ同質の変化が認められています^{12,15,16)}。これらの知見より、第二世代アンチセンス核酸である Kynamro[®] でみられた変化は、ハイブリダイゼーションとは関連しないアンチセンス核酸に特異的な作用(class effect^{注)})であると考えられています。

5. おわりに

ハイブリダイゼーションに起因しない毒性は、通常の化学合成医薬品と同様に、従来型の実験動物を用いた毒性試験で評価することが可能です。一方、ハイブリダイゼーションに起因した狭義のオフターゲット毒性についても、*in silico* 解析及びヒト由来試料を用いた *in vitro* マイクロアレイ解析により、特定した標的配列の種特異性が許容できれば実験動物で検出可能と考えられます。ただし、当該遺伝子の発現様式やそれが担う生物学的機能は、ヒトと動物で必ずしも同一ではなく、更に核酸医薬品の体内動態についても異なる可能性もあることから、非臨床安全性試験成績をヒトへ外挿する際には注意が必要です。他方、標的配列がヒト特異的であれば、狭義のオフターゲット毒性を捕

捉することは、従来型の実験動物を用いた毒性試験では極めて困難と考えられます。

これまで狭義のオフターゲット毒性については、臨床で明確に確認された例はありませんが、例えば、塩基配列に対する親和性や細胞内への導入効率を著しく向上させた新規核酸医薬品については、狭義のオフターゲット毒性が発現する可能性も否定できません。このような場合には、*in silico* 解析や *in vitro* マイクロアレイ解析結果に加え、生体内での薬物動態、毒性試験成績、文献情報なども考慮して、狭義のオフターゲット毒性発現の有無を注意深く評価した上で、臨床における初回投与時のリスクマネジメントに活用すべきと考えます。

化学合成医薬品や生物製剤での開発経験と比較すると、核酸医薬品の開発経験はまだ乏しく、その毒性や副作用に関する情報もごく限られています。しかし、核酸医薬品については、従来の化学合成医薬品と比べて特段の安全性上の懸念を有するものではなく、これまで述べてきましたように、むしろ現在の科学技術(*in silico* 解析及び *in vitro* マイクロアレイ解析等)を活用することで、ヒトへのリスクを確度よく軽減化できるものと考えられます。今後、このような核酸医薬品の開発を推進するためには、開発経験を積み重ね、ヒト及び実験動物でのオフターゲット作用の特徴、並びに非臨床及び臨床のオフターゲット作用のデータ相関性などについて、更に議論を深めることが有用と考えます。

文 献

- 1) Lindow, M.; Vornlocher, HP.; Riley, D.; Kornbrust, DJ.; Burchard, J.; Whiteley, LO.; Kamens, J.; Thompson, JD.; Nochur, S.; Younis, H.; Bartz, S.; Parry, J.; Ferrari, N.; Henry, SP.; Levin, AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2012, 30 (10), p. 920-923.
- 2) Straarup, EM.; Fisker, N.; Hedtjarn, M.; Lindholm, MW.; Rosenbohm, C.; Aarup, V.; Hansen, HF.; Orum, H.; Hansen, JB.; Koch, T. Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38 (20), p. 7100-7111.
- 3) Kornbrust, D.; Cavagnaro, J.; Levin, A.; Foy, J.; Pavco, P.; Gamba-Vitalo, C.; Guimond, A. Oligo safety working group exaggerated pharmacology subcommittee consensus document. *Nucleic Acid Ther.* 2013, 23 (1), p. 21-28.
- 4) Shimo, T.; Tachibana, K.; Saito, K.; Yoshida, T.; Tomita, E.; Waki, R.; Yamamoto, T.; Doi, T.; Inoue, T.; Kawakami, J.; Obika, S. Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42 (12), p. 8174-8187.
- 5) Jackson, AL.; Bartz, SR.; Schelter, J.; Kobayashi, SV.; Burchard, J.; Mao, M.; Li, B.; Cavet, G.; Linsley, PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003, 21 (6), p. 635-637.

注) class effect：あるカテゴリーの分子(薬剤)に共通してみられる副作用

- 6) Saxena, S.; Jonsson, ZO.; Dutta, A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003, **278** (45), p. 44312-44319.
- 7) Naito, Y.; Ui-Tei, K. Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods Mol Biol.* 2013, **942**, p. 57-68.
- 8) Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010, **11** (5), p. 373-384.
- 9) (公財)ヒューマンサイエンス振興財団. 2013. 平成25年度規制動向調査報告書 核酸医薬品の開発と規制の動向 HSレポート No.82. http://www.jhsf.or.jp/paper/report/report_no82.pdf, (accessed 2015-7-15).
- 10) Marques, JT.; Williams, BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2005, **23** (11), p. 1399-1405.
- 11) 大谷章雄, 池田孝則, 石川誠, 大信田系裕, 河合陸文, 里見嘉英, 高垣和史, 恒成一郎, 内藤真策, 花田貴宣, 藤田卓二, 堀川隆司, 渡部一人, 中澤隆弘, 佐神文郎, 三分一所厚司. 核酸医薬品の非臨床安全性評価の課題. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2010, **41** (2), p. 158-163.
- 12) Henry, SP.; Kim, T-W.; Kramer-Stickland, K.; Zanardi, TA.; Fey, RA.; Levin, AA. 2008. Toxicologic properties of 2'-O-Methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. In *Antisense drug technology : principles, strategies, and applications*, 2nd Ed., ed. Crooke, ST. 327-363. Boca Raton: CRC Press. Number of 327-363 pp.
- 13) 荒戸照世. 【核酸医薬の新潮流】核酸医薬をめぐる規制の動向. PHARM TECH JAPAN. 2013, **29** (13), p. 2637-2642.
- 14) 宮川伸. 核酸医薬の毒性と安全性. 医学のあゆみ. 2011, **238** (5), p. 519-523.
- 15) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2013. FDA Briefing Document NDA 203568 Mipomersen Sodium Injection. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM323927.pdf#search=%27FDA+Briefing+Document+NDA+203568+Mipomersen+Sodium+Injection%27>, (accessed 2015-7-24).
- 16) Crooke, ST.; Geary, RS. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br J Clin Pharmacol.* 2013, **76** (2), p. 269-276.