

核酸医薬の非臨床安全性試験における動物種選択

ICH S6 対応研究班^{*1}

Considerations on the Species Selection for the Preclinical Safety

Assessment of Oligonucleotide Therapeutics

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

1. はじめに

このシリーズでこれまで紹介してきましたように、核酸医薬品の毒性変化には、オンターゲット作用による毒性、狭義のオフターゲット作用による毒性、狭義のオフターゲット作用による毒性変化を除くオフターゲット作用による毒性が想定されます。

オンターゲット作用による毒性を調べる毒性試験には、その核酸医薬品の薬理作用を発現する動物種を用いる必要があり、バイオ医薬品のガイドライン ICH S6 (R1)¹⁾ が役

に立ちますが、そのまま適用できるかあるいは特別な留意が必要かを本稿において考察します。狭義のオフターゲット毒性とは、核酸医薬品が目的とする遺伝子配列とは別の遺伝子配列に、たまたまハイブリダイゼーションすることで起こる毒性です。ヒトと動物とのゲノム中の遺伝子配列が異なっていることから、ヒトで発生する可能性のある狭義のオフターゲット毒性を動物の毒性試験で調べることはできません²⁾。それゆえ、今回の論点からは外れますので、狭義のオフターゲット作用は本稿では取り扱わないこととします。したがって本稿で「オフターゲット作用」とい

^{*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}, 笛木 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}, 藤坂 朱紀 (Aki Fujisaka)^{*3,7}, 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

た場合、狭義のオフターゲット作用による毒性変化を除くオフターゲット作用を指すとご理解ください。また、核酸医薬品のクラスエフェクト³⁾や薬物動態¹⁾には種差があることが想定されますが、こうした情報を安全性評価時の動物種選択の際にどのように利用できるかについても考察します。

なお、適応疾患の特性に応じた有効性や安全性の改善を目的として、多種多様な drug delivery system (DDS) が考案され適用されていますが、各 DDS に関して網羅的に考察を加えることは非常に困難です。本稿では核酸医薬品の一般的な特徴を基に原則的な考えを示します。

2. 動物種数

核酸医薬品の毒性試験に用いる動物種は、原則、二種用いるべきです。これは、核酸医薬品では低分子化学合成医薬品と同様にオフターゲット作用による毒性がしばしば発現し、動物種によりその感受性に差があること、多くの核酸医薬品に用いられている化学修飾を施した人工核酸の薬物動態は動物種により異なる可能性があることから、二種の動物種で毒性試験を行った方が毒性を検出する可能性が高くなるためです。それゆえ、低分子化学合成医薬品のためのガイドライン ICH M3 (R2)⁵⁾に準拠し、げっ歯類と非げっ歯類の二種の動物種を用いることが適切と考えられます。

次に ICH S6 (R1) における動物種選択に関する記載と比較し考察します。バイオ医薬品でも適切な動物種が二種以上存在する場合は、げっ歯類と非げっ歯類の二種で毒性試験を行うことが原則です。ただし、短期の毒性試験で二種間に毒性の質や強度に差がない場合は、長期の毒性試験ではいずれか一種で試験することで評価が可能とされています¹⁾。バイオ医薬品では、ほとんどの毒性変化は既知の作用機序による過剰な薬理作用、いわゆる「オンターゲット作用」によるものであることが示されており、また、多くのバイオ医薬品の代謝物(分解物)は天然型アミノ酸であることが知られています。そのため、ICH S6 (R1) では毒性プロファイルが類似していることが短期毒性試験で示されれば長期毒性試験には一種の動物種でよいとされました。核酸医薬品ではオンターゲット毒性だけでなくオフターゲット毒性も発現し、分解物として人工核酸が生成される可能性がありますので、たとえ短期の毒性試験において二種間で同じような毒性プロファイルを示したとしても、長期の毒性試験でも二種の動物種を用いるべきでしょう。

現在の核酸医薬品の主流は人工核酸を用いたものですが、天然型核酸のみで構成される核酸医薬品のケースでは

ICH S6 (R1) を適用できるかどうかを考察してみましょう。例としては、miRNA 補充^{3b)}などとして使われる核酸医薬品が考えられます。これらの核酸医薬品の代謝物(分解物)は天然型核酸であり、分解後は内在性核酸と同じように通常の DNA/RNA 合成に使用され、あるいは体外に排泄されます。したがって非天然の代謝物が産生される可能性はなく、当然、代謝過程における種差を気にする必要はありません。一方、これらの天然型核酸で構成される核酸医薬品は速やかに代謝(分解)されると考えられますが、どのような毒性プロファイルを示すか、ほとんど報告がありません。今後事例が蓄積し、天然型核酸で構成される核酸医薬品ではオンターゲット毒性(及び狭義のオフターゲット毒性)しか発現し得ないということが示されれば、理論的には、バイオ医薬品と同じアプローチが取れるかもしれません。

3. オンターゲット毒性の検出のための動物種選択

オンターゲット毒性とは、核酸医薬品の過剰な薬理作用(いい換えると、薬効の延長線上の作用)による毒性変化のことです。このような毒性を評価するためには、バイオ医薬品の場合と同様に、核酸医薬品の薬理作用が発現する動物種を用いる必要があります。薬理作用を示す動物種が二種以上いる場合はその中からげっ歯類と非げっ歯類の二種を選びます。

もし薬理作用を示す動物種が一種しかいない場合、オンターゲット毒性を調べるためには、バイオ医薬品と同様に¹⁾、その動物種、一種のみを用いた毒性試験で評価することになります。なお、二種目の動物種として、サロゲートを用いた検討も考慮の対象と考えられます。ただし、このような毒性試験には、得られた結果の解釈に影響する

^{3b)} miRNA は比較的新しいカテゴリーの核酸医薬品で、現時点では以下のことが知られています⁶⁾。miRNA は多数の遺伝子を制御して多様な生理作用を発現します。miRNA 自体は種を超えて比較的良く保存されていますが、ターゲットとなる遺伝子の種類、量、分布はヒト及び動物種間で同一とはいえないため、オンターゲット作用や狭義のオフターゲット作用が動物種間で異なった生体変化をもたらす可能性があります。

また miRNA を制御する核酸医薬品としては、病態で減少する miRNA を補充する miRNA ミミックと過剰な miRNA の作用に拮抗する miRNA アンタゴニストがあります。miRNA ミミックは内在性 miRNA と同じ作用を発揮するようにデザインした核酸医薬品であり、天然型核酸だけで構成されることもありますが、標的細胞への取り込みを向上させるためにコレステロールとの結合による修飾や AAV ベクターを用いることもあります。miRNA アンタゴニストは人工核酸を用いたアンチセンス構造をとることが一般的です。

様々な問題が付随する危険性があることから、サロゲートを用いた毒性試験を追加しても、有用な情報が得られる可能性はあまり高いとはいえないと考えられます⁷⁾。

もし薬理作用を示す動物種が一般的な毒性試験に用いる動物種の中に存在しない場合は、サロゲートを用いて動物試験を実施するか慎重に検討する必要があります⁷⁾。オンターゲット作用による過剰な薬理作用が生体機能に重大な影響を及ぼす懸念があり、類薬の情報もない場合、かつ特性が十分に判明している利用可能なサロゲートが存在する場合など、いくつかの条件が整っていれば、サロゲート一用量だけのサテライト群を加えることにより、臨床で用いられる予定の化合物(臨床候補品)の過剰な薬理作用による毒性について役に立つ情報が得られる可能性があります。ただし、サロゲートと臨床候補品とは異なる毒性変化が現れる可能性に留意して、得られた試験結果の解釈においては、サロゲートで認められた(過剰な薬理作用によると考えられる)毒性変化がターゲットの生理作用から考えて妥当かどうか十分に考察することをお勧めします。なお、この場合でも、オフターゲット毒性を評価するために、別途、臨床候補品によるげっ歯類と非げっ歯類の毒性試験を計画する必要があります。

上記の保守的なアプローチとは対照的に、オンターゲット毒性により生体への重大な影響が想定される場合であれば、むしろ、サロゲートの毒性試験は行わずに臨床に進むべきだという意見もあります。企業は、開発しようとする核酸医薬品の臨床における適用疾患、患者群、予想される生体への影響が既知であるか未知であるか、及びその生体への影響のレベルなどを考慮して、サロゲートを用いた毒性試験を行わずに開発を進められるという論拠を構築し、当局と相談しながら、ケースバイケースの原則に基づき判断することになります。

なお、オンターゲット作用による過剰な薬理作用が発現しても生体機能に重大な影響を及ぼすことが懸念されない場合、サロゲートでの毒性試験は実施せずに、臨床候補品のげっ歯類と非げっ歯類の毒性試験だけを実施するという選択肢もあると思われます。その場合、非臨床毒性試験ではオンターゲット毒性が評価されていないこと、ただしオンターゲット作用による過剰な薬理作用が発現しても生体機能に重大な影響を及ぼす可能性は低いと理論的に考えられることを、正しく臨床計画に反映させることが大切です。その上で慎重な臨床試験によりヒトでの安全性を評価するのが、現実的に適切なアプローチだと思います。

4. オフターゲット毒性の検出のための動物種選択

オフターゲット毒性は核酸医薬品の物理化学的性質に

基づき発現しますので、臨床候補品で毒性試験をしなければ意味がありません。また、オフターゲット作用による毒性の検出の可能性を高めるためには二種の動物種での試験が必要ですので、臨床候補品の毒性試験がげっ歯類と非げっ歯類の動物種で行われるように計画します。なお、薬理作用を示す動物種の毒性試験では併せてオフターゲット毒性も評価できますので、それを考慮して毒性試験全体を計画することになります。すなわち、薬理作用を示す動物種がげっ歯類と非げっ歯類にそれぞれある場合は、それらを用いた毒性試験でオンターゲット毒性もオフターゲット毒性も評価できます。一方、薬理作用を示す動物種が一種のみの場合、オフターゲット毒性評価のためには二種の動物種での試験が必要ですので、薬理作用を示さない(したがってオンターゲット作用の評価はできない)二種目の動物種を選択することになります。

開発しようとする核酸医薬品と構造的に類似の先行品がある場合、動物種選択の際に、そのカテゴリーの核酸医薬品に共通して発現するクラスエフェクトについての情報³⁾を考慮することは有用かもしれません。例えば、phosphorothioate 修飾人工核酸を含む初期のアンチセンスで補体の活性化が認められ、この毒性はげっ歯類よりも NHP (non-human primate, ヒト以外の霊長類) で強く発現することがわかりました。その後の検討で、NHP で認められた補体活性化はヒトではそれほど強くないこと⁸⁾、NHP の補体活性化はヒトやげっ歯類と異なった機序で発生する可能性があること⁹⁾、が判明しました。極めて限られた構造上の類似性(例えば、作用メカニズム、バックボーン、鎖長、人工核酸、電荷などが同一)が認められる核酸医薬品カテゴリーであれば、このようなクラスエフェクト毒性に関する情報が動物種選択の際に役に立ちます。また、クラスエフェクトの情報は、得られた所見の解釈の際にも有用でしょう。

人工核酸を含むフラグメント部分の代謝物プロファイルが動物種間で異なる可能性についても考慮する必要があります。核酸医薬品のヌクレアーゼ耐性や代謝物の類似性は *in vitro* あるいは *in vivo* 試験により確認できますので⁴⁾、もし代謝物に種差が認められた場合は、ヒトと類似の代謝物プロファイルを示す動物種を選択することが適切です。

PK プロファイルがヒトと類似しているかどうか、構造上の類似性がある先行品の情報があれば役立ちます。例えば、phosphorothioate 修飾人工核酸を含むあるカテゴリーのアンチセンスでは、マウスを除く実験動物の PK プロファイルはヒトの PK プロファイルとよく相関し、動物試験の毒性所見からヒトでの副作用発現を外挿する際に役立つと報告されています¹⁰⁾。条件が当てはまる場合は、このような PK プロファイル情報も動物種選択の際に参考

Table 1 核酸医薬品と既存の医薬品との類似点と相違点

	化学合成医薬品	核酸医薬品	バイオ医薬品
生産方法	化学合成	化学合成	バイオテクノロジー技術
種特異性	非特異的	時に種特異的	種特異的
代謝／分解	代謝による活性化, あるいは不活化	核酸への分解及び代謝	(生体内)アミノ酸への分解
毒性予測	予測不能	オンターゲット作用については予測可能 オフターゲット作用については予測不能	予測可能
毒性機序	オフターゲット作用 (代謝物に関連した毒性及び作用機序に無関係な非特異的な毒性)	過剰な薬理作用及びオフターゲット作用 (標的依存的／非依存的)	過剰な薬理作用 (既知の作用機序)
毒性試験の動物種数	げっ歯類と非げっ歯類の二種(長期毒性試験にも二種必要)	げっ歯類と非げっ歯類の二種(長期毒性試験にも二種必要)	原則, げっ歯類と非げっ歯類の二種(短期毒性試験で二種間の毒性プロファイルが同等の場合, 長期毒性試験は一種)
毒性試験の動物種選択基準	特に規定なし	核酸医薬品の薬理作用を示す動物種が一種しかない場合でも, オフターゲット毒性を調べるために二種必要	バイオ医薬品の薬理作用を示す動物種が一種しかない場合は, 一種だけでよい

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol.46 (5) p.287 の Table 1 を拡充

にするのが良いでしょう。

5. おわりに

核酸医薬品の毒性試験を計画する際は、オンターゲット作用による毒性と、オフターゲットによる毒性の双方を評価する必要があります。オンターゲット作用による毒性を評価するという点では ICH S6 (R1) の動物種選択の項¹⁾が参考になりますが、オフターゲットの毒性評価のためには低分子化学合成医薬品の従来の毒性ガイドライン²⁾を参考にすべきです (Table 1)。

ヒト特異的な配列を標的にする場合には、オンターゲットの毒性評価のための動物種選択が困難となる場合がありますので、あらかじめヒトと動物に共通する遺伝子配列をターゲットとして核酸医薬品を設計しておき、通常の毒性試験に用いられる動物種でオンターゲット作用も調べられるようにしておくというアプローチがあります。これは核酸医薬品が理論的に分子設計できるという特長を利用したものです。今後、このような新規なアイデアにより核酸医薬品の毒性が更に確実に評価できるようになることを期待しています。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長。「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について。薬食審査発 0323 第 1 号, 平成 24 年 3 月 23 日。
- 2) ICH S6 対応研究班。核酸医薬品のオフターゲット作用の

- 評価。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (10), p.681-686.
- 3) ICH S6 対応研究班。核酸医薬品のクラスエフェクトの評価。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (12), p.846-851.
 - 4) ICH S6 対応研究班。核酸医薬品に由来する代謝物の評価。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (8), p.523-527.
 - 5) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長。「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について。薬食審査発 0219 第 4 号, 平成 22 年 2 月 19 日。
 - 6) van Rooij, E.; Purcell, AL.; Levin, AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res.* 2012, 110 (3), p.496-507
 - 7) ICH S6 対応研究班。サロゲートを用いた毒性試験。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (6), p.374-379.
 - 8) Henry, SP.; Beattie, G.; Yeh, G.; Chappel, A.; Giclas, P.; Mortari, A.; Jagels, MA.; Kornbrust, DJ.; Levin, AA. Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Int Immunopharmacol.* 2002, 2 (12), p.1657-1666.
 - 9) Henry, SP.; Jagels, MA.; Hugli, TE.; Manalili, S.; Geary, RS.; Giclas, PC.; Levin, AA. Mechanism of alternative complement pathway dysregulation by a phosphorothioate oligonucleotide in monkey and human serum. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (5), p.326-335.
 - 10) Levin, AA.; Henry, SP. "Toxicology of oligonucleotide therapeutics and understanding the relevance of the toxicities." *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals.* JA Cavagnaro ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008, p.537-574.