

核酸医薬品の遺伝毒性評価

ICH S6 対応研究班^{*1}Consideration on the Preclinical Safety Assessment of Genotoxicity of
Oligonucleotide TherapeuticsWorking Group for the ICH S6 & Related Issues^{*1}

1. はじめに

ICH S6 (R1) ガイドライン「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」¹⁾の適用範囲の項には、「本ガイドラインに示される原則はオリゴヌクレオチド製剤にも適用されうる。」との記載があり、当該ガイドラインは核酸医薬の安全性評価を考える上で、重要な指針となっています。従来から行っている遺伝毒性試験は、薬理作用の如何に関わらず DNA の突然変異や染色体異常誘発能について検出する試験系です。化成品とバイオ医薬品の

違いを解説した ICH S6 (R1) ガイドラインの遺伝毒性の項には、「従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく必要とされない。」と記載されています。これは生体に対する影響が化成品とは異なることがその理由となっています。即ち、バイオ医薬品の構成成分であるタンパク質が、細胞内に取り込まれず、DNA や他の染色体成分に直接作用する可能性が極めて低いため、遺伝子変異が生じにくいに基づいています。

一方、核酸医薬を構成するオリゴヌクレオチドは、細胞

^{*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}, 藤阪 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

Table 1 既承認の核酸医薬品で実施された遺伝毒性試験

名称	種類	投与経路	適応	実施された遺伝毒性試験
Fomivirsen sodium	アンチセンス	眼内	CMV 性網膜炎	Ames, CHO 細胞染色体異常, マウスリンフォーマ細胞突然変異, マウス骨髄小核
Pegaptanib sodium	アプタマー	眼内	加齢黄斑変性	Ames, マウスリンフォーマ TK, SHE 細胞形質転換, マウス骨髄小核
Mipomersen sodium	アンチセンス	皮下	家族性高コレステロール血症	Ames, マウスリンフォーマ細胞突然変異, マウス骨髄小核

内あるいは核内に入り込んで作用することを目的として設計されるものが多く、その構造上の特性から、DNA 等へ直接作用し、意図する標的以外の DNA や染色体に影響を与える可能性が否定できません。また、化学物質による修飾や代謝物・分解物、類縁物質 (n-1 mer 等) による遺伝毒性への懸念も想定されます。

したがって、核酸医薬品の遺伝毒性評価については、ICH S6 (R1) ガイドラインの原則を適用することは困難であり、核酸医薬品の特性を考慮した遺伝毒性評価を行う必要があります。

2. 既承認の核酸医薬品における検討

日米 EU の三極のいずれかで承認実績のある核酸医薬品は、現時点では Table 1 に示す三品目のみです。そのうち、Fomivirsen と Pegaptanib は眼局所における適用ですが、Mipomersen については、全身曝露される点が大きく異なります。

これらの核酸医薬品の承認申請のために実施された遺伝毒性試験を審査報告書等から調査したところ、いずれの品目でも ICH S2 (R1) ガイドラインに沿った通常の低分子医薬品で実施されているのと同様の遺伝毒性試験が実施されております。その評価の範囲では遺伝毒性に特段の懸念は認められておらず、臨床試験及び市販後の安全性調査においても遺伝毒性から危惧される発がん性等について、現在まで問題となる報告はありません。

3. 核酸医薬品によって生じる可能性のある遺伝毒性

核酸医薬品については、遺伝毒性が生じる可能性は低いとする報告^{2,3)}がある一方で、核酸医薬品やその代謝物・分解物に起因する突然変異誘発も報告されており⁴⁾、遺伝毒性に関する何らかの評価は必要と考えられます。

EMA が 2005 年に発出したリフレクションペーパー²⁾では、(1) 分解物であるホスホロチオエート・モノヌクレオチドが DNA に取り込まれて突然変異を誘発する可能

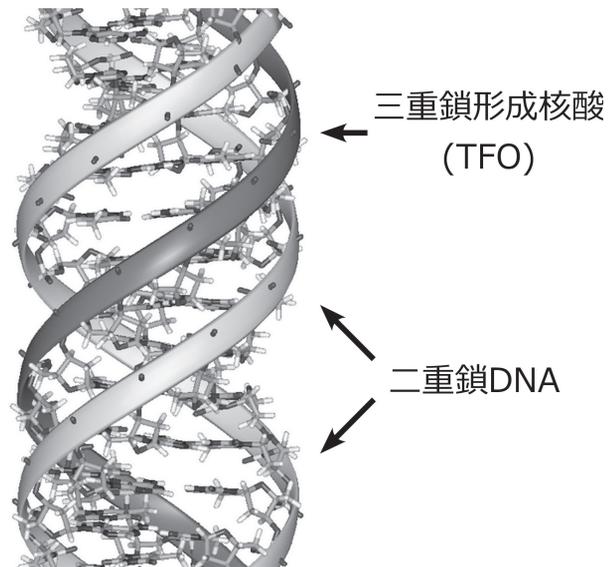


Fig.1 Triplex

性、及び (2) オリゴヌクレオチドが DNA と Fig. 1 に示すような Triplex (三重鎖)^{注)}を形成し、それに起因する突然変異を誘発する可能性の二つの懸念について検討されています。

まず、(1) の可能性について、21mer のホスホロチオエートについて行われた試験結果では、細胞内への取り込みを確認した上で、全ての結果が陰性を示したことから突然変異を生じないと結論されています。ただし、他の論文では、突然変異を生じたとする報告⁴⁾もあり、今後の解析に注目する必要があるものと考えられます。なお、何らかの修飾核酸を用いる場合には、そのものがモノヌクレオチドを生成し、DNA に取り込まれて突然変異を惹き起こす可能性

注) Triplex (三重鎖) について：

本稿では二重鎖 DNA の major groove (主溝) に配列特異的に結合するように設計された一本鎖の核酸 (三重鎖形成核酸、しばしば TFO と呼ばれる) により形成される三重鎖構造を指しますが、自然界でも DNA 配列中にプリン塩基が連続する領域が存在する場合には形成しうる構造です。遺伝子の働きを転写レベルで阻害したり、DNA 修復の機能を有することが示されています。

について考慮する必要が生じるものと考えられます。一方、バイオ医薬品と同様、天然型の核酸成分のみから構成される場合には、このような DNA 中への取り込みに伴う突然変異の誘発の可能性を考慮する必要はありません。

次に (2) の可能性について、DNA と Triplex を形成する 30mer のオリゴヌクレオチドが標的遺伝子に対して 13 倍の頻度で突然変異を惹き起こしたことが、これらの変異は従来の試験バッテリーでは検出できず、標的遺伝子特異的な遺伝子変異の検出法 (RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型] など) の適用が考慮されるべきであることなどが記載されています。他にも、Triplex を形成するように設計されたオリゴヌクレオチドによって誘発される突然変異に関する報告がなされており⁵⁻⁷⁾、このような性質を持つオリゴヌクレオチドについては、評価法を含めた検討が必要と考えられます。

以上 2 点の懸念点以外に、核酸医薬品の投与によって生じる可能性のある遺伝毒性の原因物質としては、核酸成分以外の不純物等が考慮されます。ただし、不純物に起因する遺伝毒性については、ICH S2 (R1) ガイドラインに準拠した従来型の遺伝毒性試験で検出可能であると考えられることから、特別な考慮をする必要性は低いものと思われる。

4. 遺伝毒性評価の実施時期

核酸医薬品の遺伝毒性に関する評価時期については、ICH M3 (R2) ガイドライン⁸⁾に準拠すること、即ち、初回の臨床試験前に遺伝子突然変異に関する検討とほ乳類の試験系を用いた染色体異常誘発性の検討を行うのが適切で、標準的な組み合わせの遺伝毒性試験を第 II 相試験の開始前に完了すべきでしょう。ただし、核酸医薬品の遺伝毒性については、まだ知見が不足しており、懸念がある場合には、試験の種類とその実施のタイミングは、適宜、検討する必要があります。

なお、ICH S9 ガイドライン⁹⁾に適応する疾患を対象とする場合は、ICH S9 ガイドラインに準じ、遺伝毒性評価は承認販売申請時まで実施することで差し支えありません。

5. 遺伝毒性の評価手法に関する考察

核酸医薬品の多くは細胞内や核内に移行して作用することを目的としており、効率よく膜を透過する性質が求められますが、オリゴヌクレオチドは負の電荷を帯びた高分子化合物であるという物質的特性から、膜透過性に乏しい

という特徴を有しています。そのため、核酸医薬品の開発においてはこの点を改善するために様々な試みが行われています。その一つは核酸の修飾であり、脂溶性を高くし、膜透過性を向上させるという開発も行われています。また、リポソーム等のナノ技術を活用したドラッグデリバリーシステム (DDS) による膜透過の技術も多方面で開発されています。このような DDS 技術によって膜透過性を向上させた品目の場合、核酸医薬単体 (原薬) で遺伝毒性評価を行ったとしても、臨床使用条件下における細胞内・核内への曝露を下回る場合があるものと考えられ、むしろ DDS 製剤や、何らかの導入試薬を用いる等、適切な遺伝毒性評価のための工夫が必要と考えられます。また、このような DDS に用いられるキャリア自体に遺伝毒性を誘発するポテンシャルを有するものもあることが報告されてきており¹⁰⁾、その点に関する注意も必要です。

また、核酸医薬品はヒトの遺伝情報を元にデザインされており、実験動物とはその標的配列が異なることの方がむしろ多いことが想定されます。当該核酸医薬品が核内へ移行し、配列特異的な遺伝毒性を引き起こす懸念があるのであれば、ほ乳類培養細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験において、ヒト細胞を用いることによって適切に遺伝毒性の評価ができる可能性もあります。

核酸医薬品に用いられる核酸成分には、生体内における分解や免疫系における認識を避ける等の目的で様々な修飾が行われた修飾核酸が用いられることが多くなっています。抗がん剤として活用されている核酸アナログはその薬効として、DNA に取り込まれ、遺伝子構造の変化や機能修飾等の遺伝毒性を介して細胞死を引き起こしますが、核酸医薬品に用いられている修飾核酸がモノマー (モノヌクレオチド) まで分解された後に、一部が核酸プールに移行し、ホストの DNA に取り込まれ、同様の作用を引き起こす可能性も否定できないものと考えられます。このような作用は、核酸医薬品の塩基配列に起因するものではなく、修飾核酸の構造によるものと考えられますので、修飾核酸のタイプごとに一度詳細な検討が行われ、リスク予測が可能と判断されれば、以後、同一の修飾核酸に関する検討の必要性はないものと考えられます。また、このような代謝・分解産物の評価を行うにあたって、*in vitro* 評価を行う際の代謝活性化や分解物の生成のために、従来から用いられている S9mix は利用可能か、あるいはそれだけで十分なのか、又はヌクレアーゼ等を用いた系を考慮すべきか、モノヌクレオチド等を強制添加した系で評価すべきかなどということも、今後更なる知見を収集し、総合的な判断を行う必要があります。

6. まとめ

核酸医薬品の遺伝毒性評価については、ガイドラインが存在しないことに加え、細胞内への移行性が低いという性質や、配列特異的な遺伝子への影響を生じうる等の他の医薬品には見られない特性を有しており、従来の遺伝毒性評価法を用いること自体についても検討すべき課題を有しているものと考えられます。核酸医薬品の開発経験は現状ではまだまだ少ないとはいえ、世界的には既に100件ほどの臨床試験が行われています。全身曝露を前提とした承認薬も今後加速的に増えていくでしょう。これらの経験を蓄積・活用し、遺伝毒性評価の本来の目的である造腫瘍性評価や後世代への遺伝的影響の評価に資する、核酸医薬品に適切な遺伝毒性評価を行うための新規試験法の開発を含め、考え方を整理していくことが必要と考えられます。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局. 厚生労働省医薬食品局. 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) EMEA. 2005. CHMP SWP Reflection paper on the assessment of the genotoxic potential of antisense oligodeoxynucleotides. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003149.pdf, (accessed 2016-01-29).
- 3) Levin, AA.; Henry, SP. 2008. Toxicology of oligonucleotide therapeutics and understanding the relevance of the toxicities. In *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals*, ed. Cavagnaro, JA: p.537-574. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- 4) Reshat, R.; Priestley, CC.; Gooderham, NJ. Mutagenesis by an antisense oligonucleotide and its degradation product. *Toxicol Sci*. 2012, **130** (2), p.319-327.
- 5) Vasquez, KM.; Narayanan, L.; Glazer, PM. Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science*. 2000, **290** (5491), p.530-533.
- 6) Knauert, MP.; Glazer, PM. Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet*. 2001, **10** (20), p.2243-2251.
- 7) Mukherjee, A.; Vasquez, KM. Triplex technology in studies of DNA damage, DNA repair, and mutagenesis. *Biochimie*. 2011, **93** (8), p.1197-1208.
- 8) 厚生労働省医薬食品局. 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. 薬食審査発 0219 第4号, 平成22年2月19日.
- 9) 厚生労働省医薬食品局. 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて. 薬食審査発 0604 第1号, 平成22年6月4日.
- 10) Shah, V.; Taratula, O.; Garbuzenko, OB.; Patil, ML.; Savla, R.; Zhang, M.; Minko, T. Genotoxicity of different nanocarriers: possible modifications for the delivery of nucleic acids. *Curr Drug Discov Technol*. 2013, **10** (1), p.8-15.