

# 核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について

JPMA 課題対応チーム\*<sup>1</sup>, ICH S6対応研究班\*<sup>2</sup>

## 1 はじめに

オリゴヌクレオチド製剤（核酸医薬品）の非臨床安全性評価の考え方について、日本では令和2年3月30日、世界に先駆けて「核酸医薬品の非臨床安全

性評価に関するガイドライン」(核酸医薬品ガイドライン)<sup>1)</sup>が発出され、併せて「当該ガイドライン(案)に対する意見の概要と対応について」<sup>2)</sup>も公開された。しかしながら、核酸医薬品の開発現場では、これらに記載された基本的原則では実際の判断に迷う

- \* 1 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 革新的医薬品・医療技術課題対応チーム  
 Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Non-clinical safety working team on innovative pharmaceutical and medical technology  
 太田 哲也 (Tetsuya Ohta)\*<sup>3</sup>, 木下 潔 (Kiyoshi Kinoshita)\*<sup>4</sup>, 三井田 宏明 (Hiroaki Miida)\*<sup>5</sup>, 花田 智彦 (Tomohiko Hanada)\*<sup>6</sup>, 高井 有一 (Yuuichi Takai)\*<sup>7</sup>, 吉岡 智子 (Satoko Yoshioka)\*<sup>7</sup>, 近藤 聡志 (Satoshi Kondo)\*<sup>8</sup>, 熊田 幸平 (Kouhei Kumada)\*<sup>9</sup>, 鶴川 徹 (Tohru Ugawa)\*<sup>10</sup>, 鳥塚 尚樹 (Naoki Toritsuka)\*<sup>11</sup>, 本山 径子 (Keiko Motoyama)\*<sup>12</sup>, 齊藤 理央 (Rio Saito)\*<sup>13</sup>, 渡部 一人 (Kazuto Watanabe)\*<sup>14</sup>
- \* 2 令和3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）「医薬品の品質及び安全性確保のための評価手法等にかかる国内基盤整備と国際調和の推進に資する研究」（研究代表者：平林容子）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）  
 Working Group for the ICH S6 & Related Issues  
 研究分担者：平林 容子 (Yoko Hirabayashi)\*<sup>15</sup>, 協力研究者：真木 一茂 (Kazushige Maki)\*<sup>16</sup>, 笛木 修 (Osamu Fueki)\*<sup>16</sup>, 木下 潔 (Kiyoshi Kinoshita)\*<sup>4</sup>, 渡部 一人 (Kazuto Watanabe)\*<sup>14</sup>
- \* 3 田辺三菱製薬株式会社 神奈川県藤沢市村岡東2-26-1 湘南ヘルスイノベーションパーク（〒251-8555）  
 Mitsubishi Tanabe Pharma Co., Shonan Health Innovation Park, 2-26-1, Muraoka-Higashi, Fujisawa-shi, Kanagawa 251-8555, Japan
- \* 4 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 K.K., Kitanomaru Square, 1-13-12 Kudan-kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan
- \* 5 第一三共株式会社 東京都江戸川区北葛西1-16-13（〒134-8630）  
 Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13, Kita-kasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan
- \* 6 日本新薬株式会社 京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14（〒601-8550）  
 Nippon Shinyaku Co., Ltd., 14, Nishinosho-monguchi-cho, Kissshoin, Minami-ku, Kyoto 601-8550, Japan
- \* 7 武田薬品工業株式会社 神奈川県藤沢市村岡東2-26-1 湘南ヘルスイノベーションパーク（〒251-8555）  
 Takeda Pharmaceutical Company Ltd., Shonan Health Innovation Park, 2-26-1, Muraoka-Higashi, Fujisawa-shi, Kanagawa 251-8555, Japan
- \* 8 大塚製薬株式会社 徳島県徳島市川内町加賀須野463-10（〒771-0192）  
 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 463-10, Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0192, Japan
- \* 9 トーアエイヨー株式会社 福島県福島市飯坂町湯野字田中1（〒960-0280）  
 Toa Eiyo Ltd., 1, Yuno-tanaka, Iizaka-machi, Fukushima-shi, Fukushima 960-0280, Japan
- \* 10 アステラス製薬株式会社 茨城県つくば市御幸が丘21（〒305-8585）  
 Astellas Pharma Inc., 21, Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan
- \* 11 ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 東京都新宿区西新宿6-5-1 新宿アイランドタワー27F（〒163-1327）  
 Bristol-Myers Squibb K.K., Shinjuku i-Land Tower, 6-5-1, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1327, Japan
- \* 12 ヤンセンファーマ株式会社 東京都千代田区西神田3-5-2（〒101-0065）  
 Janssen Pharmaceutical K.K. 5-2, Nishi-kanda 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0065, Japan
- \* 13 富士フイルム富山化学株式会社 東京都中央区京橋2-14-1 兼松ビルディング（〒104-0031）  
 FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd, 14-1, Kyobashi 2-Chome, Chuo-Ku, Tokyo 104-0031, Japan
- \* 14 日本製薬工業協会 東京都中央区日本橋本町2-3-11（〒103-023）  
 Japan Pharmaceutical Manufacturing Association (JPMA), 2-3-1 Nihonbashi-Honcho, Chuo-Ku, Tokyo 103-0023, Japan
- \* 15 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26（〒210-9501）  
 National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonoma-cho Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210-9501, Japan
- \* 16 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 新霞が関ビル（〒100-0013）  
 Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

場合も多い。そこで、JPMA 課題対応チーム\*1では、非臨床安全性評価の判断に迷う事例を収集し、その解決に向けての考え方を ICH S6 対応研究班\*2とともに検討した。

本稿では、核酸医薬品の開発現場から抽出された疑問を、毒性発現機序を基に「オンターゲット毒性」、標的外の遺伝子へのハイブリダイゼーションに起因する「狭義のオフターゲット毒性」及び「その他毒性」の三つに分類し、各疑問の解決に向けての考え方を整理し、その背景や留意点を纏めた。

## 2 オンターゲット毒性の評価について

核酸医薬品はバイオ医薬品と同様に標的特異性が高く、動物ではオンターゲット毒性の評価が困難なケースも想定される。オンターゲット毒性の評価には、核酸医薬品ガイドラインにも記載されているとおり、バイオ医薬品の非臨床安全性評価にかかる ICH S6 (R1) ガイドライン<sup>3)</sup>も参考になると考えられる。Table 1 に疑問と考え方を、以下にその背景や留意点を述べた。

### 2.1 試験を実施しない事例（疑問1）

ヒトでの安全性に特段の懸念がないことを科学的に説明できる場合には、オンターゲット毒性の検出を企図した試験は不要である。試験動物種にオルソログがなく、サロゲートによるハザード評価ができない場合には、当該遺伝子の機能を踏まえた適切なリスク軽減策を講じた上で慎重に臨床試験を進めることになるが、適宜、製造販売承認後も引き続き安全性調査を実施することになると考えられる。

### 2.2 動物種を選択と留意点（疑問2~5）

オンターゲット毒性の評価には、オルソログが発現し、かつ開発候補品の薬理作用が認められる動物種を選択する必要がある。ただし、毒性学的な背景データの乏しい動物種を選択せざるを得ない場合には試験実施意義も含めて検討すべきであり、あらかじめ規制当局と相談することが重要と考えられる。

### 2.3 用量設定（疑問6~8）

薬理作用の観点から用量設定する場合には、適切な指標を基に、試験動物種での薬理作用が最大とな

る用量を選択すべきである。指標として、既承認品目では標的組織における標的遺伝子のノックダウン (KD) (例; inotersen<sup>4)</sup>) や標的遺伝子下流の変化を検出可能なバイオマーカーの変動 (例; patisiran<sup>5)</sup>) などが利用されている。

### 2.4 その他（疑問9~11）

開発候補品と同一の化学修飾及び塩基配列を有するサロゲートを得られない場合でも、試験動物種における当該サロゲートの薬理作用が最大となる用量を設定できれば、オンターゲット毒性の定性的な評価は可能である。

## 3 狭義のオフターゲット毒性の評価について

ヒトと動物ではゲノム配列が異なるため、ヒトゲノム DNA や RNA 情報を用いた *in silico* 解析や、それに加え、ヒト細胞を用いた *in vitro* 遺伝子発現解析などにより、初回治験届前までに狭義のオフターゲット毒性を評価することが推奨<sup>1)</sup>されている。

しかし、その試験方法については議論すべき点が多い。Table 2 に疑問と考え方を、以下にその背景や留意点を述べた。

### 3.1 試験を実施しない又は省略できる事例（疑問1~2）

標的ではない遺伝子の KD が狭義のオフターゲット毒性のリスクを示唆しない、あるいは開発候補品が当該遺伝子の発現部位に移行しない等の場合には、ヒト細胞を用いた *in vitro* 解析で KD を確認する意義は低い。一方、*in silico* 解析及び *in vitro* 解析での KD により、生殖発生毒性やがん原性への懸念が強く示唆された場合には、塩基配列を変更して懸念の回避に努める。不可避の場合は、当該リスクがヒトで生じうると考え、リスク&ベネフィットを踏まえた開発意義を検討する。開発意義があると判断される場合は、管理（ラベル、対象患者集団の選定等）によりリスクが回避できるかを考える。

なお、KD された機能と病態発症の関連が不明な遺伝子あるいは機能不明な遺伝子がオフターゲット候補に含まれる場合は、ヒトで未知の毒性を生じる可能性を否定できないことから、通常の医薬品と同

Table 1 オンターゲット毒性についての疑問と考え方

No.	疑問	考え方
1	オンターゲット毒性を評価する試験を「実施するに及ばない」と考えられるのはどのような場合か？	事例を以下に示す。 例1. 特定のタンパクの発現量が低いことで発症する疾患において、産生促進作用を有する薬剤（スプライシング制御薬等）により、当該タンパクの発現量（又は総活性）が健康成人と同等以上に増加しない場合。 例2. 標的がウイルスや細菌などの外来遺伝子である場合や、病態でのみ発現する遺伝子をKDする薬剤の場合。 例3. 標的遺伝子の機能欠損が健康成人でも存在する場合。 例4. 動物にはオルソログがない場合。この場合、ハザード評価もできないため、その機能情報からヒトでのリスクを考察し、リスク&ベネフィットを検討することになる。
2	NHPとイスで標的遺伝子のオルソログが存在し、標的配列の相同性が同一、かつ開発候補品がいずれの動物種でも同様な薬理作用を示す場合、毒性評価において優先すべき動物種は何か？	毒性試験の種類により、適切な指標（ヒトとの薬理学的・代謝プロファイルの類似性、毒性検出の容易さ、ヒトへの外挿性、臨床投与経路での試験の実施可能性など）を考慮し、優先すべき理由を基にcase by caseで動物種を選択することでよい。また、生殖発生毒性試験ではNHPによる試験に囚われず、3Rsの観点からサロゲートを用いた試験も考慮する必要がある。
3	毒性試験で汎用される動物種（又は系統）では標的配列の相同性がない場合、毒性学的背景データの少ない動物種（モルモット等）や薬効モデル（ヒト標的遺伝子導入したTg動物等）を用いてオンターゲット毒性を評価することは適切か？	文献情報あるいは背景データ等から当該動物種を用いる妥当性を示せば、オンターゲット毒性の評価を行うことが可能と考えられる。なお、オンターゲット毒性の評価のみを目的とする場合は、評価項目を絞って実施しても良い。ただし、毒性の解釈や長期投与の忍容性などを考察できるよう留意すべきである。
4	毒性学的背景データの少ない動物種でサロゲートによるオンターゲット毒性を評価する場合、当該動物種で薬理作用を示さない開発候補品も併せて評価する必要があるか？	必ずしも開発候補品も併せて評価する必要はない。ただし、サロゲートで検出された毒性を、オンターゲット毒性とオフターゲット毒性のいずれに由来するかを考察するために有用な場合もある。
5	毒性学的背景データが少ない動物種や薬効モデルを用いてオンターゲット毒性を評価する際に、併せてオフターゲット毒性も評価する場合に注意すべき点はなにか？	オフターゲット毒性の評価は、原則としてICH M3(R2) <sup>19)</sup> に準拠する必要がある。そのため毒性学的背景データに乏しくオフターゲット毒性の評価が不十分になる場合には、別途、汎用される動物種2種での評価を考慮する必要がある。
6	オンターゲット毒性を検討する動物種では、意図する薬理作用が最大となる用量をどのように設定すればよいか？	標的遺伝子のKDなど適切な指標をもとに薬理学的な機能変化が最大となる用量を設定することが適切と考える。ただし、KDによる薬理学的な機能変化（病態の改善等）の評価が困難な場合は、KDに基づくバイオマーカーの変動等から、薬理作用が最大となる用量を判断できればよいと考える。
7	過剰な薬理作用による影響が確認できるサロゲートの用量とは、標的組織で最大薬効を発現する用量と考えてよいか？	原則、毒性試験動物種で最大薬効を発現する用量に設定することでよく、標的組織におけるKD作用はその一つの説明材料になる。このとき、標的外の組織における標的遺伝子の薬効に結びつかないKDを追求することは必須ではない。
8	薬理作用を示す動物種でオンターゲット毒性のみを評価する場合の用量には、薬理作用が最大となる用量と臨床での最大曝露量の10倍を超える用量のいずれを用いてもよいか？	オンターゲット毒性の評価には薬理作用が最大となる用量を設定すべきであり、単に曝露情報だけでは不十分である。薬理作用が最大であることを示すことが困難であり、代わりに臨床曝露の10倍を指標に用いる場合は、試験動物種のオルソログの標的部位の相補配列がヒトと等しく、 <i>in vitro</i> 活性もヒトと同等である等、それに代わる科学的な妥当性を示す必要がある。
9	試験動物種において開発候補品と同様な構成（化学修飾の種類、配列長、配列パターン等）のサロゲートが得られなかった場合でも、オンターゲット毒性の評価は可能か？	利用できるサロゲートの薬理作用が最大となる用量が設定できれば、オンターゲット毒性のハザード評価に使用しうると考える。
10	病態で欠損したタンパク合成を促すスプライシング制御型ASOの場合、生体内で産生される当該タンパクに対する免疫原性を考慮した評価が必要か？	ASOの作用機序から通常ではみられない短鎖や変異タンパクが合成されることが示唆され、非臨床試験成績で当該タンパクの合成が明らかとなった場合には、ヒトでの免疫原性が問題となる可能性を否定できない。ただし、免疫原性については動物試験成績のヒトへの外挿には限界があるため、その影響は臨床試験で評価することが適切と考えられる。
11	マウス、ラット共に開発候補品のオンターゲット毒性を評価できない場合、オフターゲット作用のみを目的とした通常の開発候補品を用いたがん原性試験時にサロゲート群（動物種1種）を加えた評価が必要か？	サロゲートは開発候補品と化学構造が異なるため、これを用いたがん原性試験の実施は推奨されない。多くの核酸医薬品のオンターゲット作用は生体内で発現されるタンパク質を介して惹起されることから、開発候補品のがん原性リスクについてはICH S6(R1)に準じてWeight of Evidenceアプローチで評価すべきと考えられる。また、標的遺伝子のKO動物で発がん性に関する情報（陽性又は陰性）が得られている場合には、がん原性リスクの考察に有用と考えられる。

KD : knock down, NHP : non-human primate, Tg : transgenic, ASO : antisense oligonucleotide, KO : knockout

Table 2 狭義のオフターゲット毒性についての疑問と考え方

No.	疑問	考え方
1	<i>In silico</i> 解析で同定されたオフターゲット候補遺伝子の機能を基に、 <i>in vitro</i> 解析を行わずにリスクアセスメントすることは可能か？	<p>ヒト細胞を用いた<i>in vitro</i>での遺伝子発現解析はリスク評価の一環として可能な限り実施することが望ましいが、以下のような例では必ずしも必須ではないと考えられる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ある遺伝子の発現増強又は減弱のいずれかが病態発症に関与するのに対し、開発候補品がいずれも逆方向に作用を促進する場合</li> <li>2) 健康成人において機能を代替しうる遺伝子が存在しており、KDによる作用がカバーされることが明らかな場合</li> <li>3) 既存情報（遺伝子の機能、KOマウスの情報等）からヒトでのリスクが生じないと考えられる場合、もしくはリスクを早期にモニタリング可能である場合</li> <li>4) 試験動物で当該遺伝子のオルソログへの作用が認められ、<i>in vivo</i>の毒性試験でリスクの評価が可能な場合</li> <li>5) 正常細胞では機能しておらず、病態時にのみ発現・機能する遺伝子</li> <li>6) 健康成人で機能していない例がみられる遺伝子</li> <li>7) 臨床投与経路では分布し得ない組織・部位でのみ発現する遺伝子</li> <li>8) 胎児発生期の機能低下による先天異常に関与するが、後天的機能低下がリスクに繋がらない遺伝子（ただし、胎盤移行する場合は妊娠可能な女性は適用外とする）</li> </ol>
2	生殖発生毒性試験やがん原性試験を実施せずリスクコミュニケーションへ進めるには、以下のいずれまでの情報を取得して判断すべきか？ 1) <i>In silico</i> 解析及び文献情報のみ 2) 1) + <i>in vitro</i> 解析のKD情報 3) 2) + ヒトで遺伝子KDによるマーカー変動	<p>2) までの情報により判断すべきと考える。 <i>In silico</i>解析により抽出されたオフターゲット候補遺伝子について、文献情報より生殖発生毒性やがん原性との関連が明らかであり（一遺伝子疾患）、<i>in vitro</i>解析で強いKD活性が認められ、かつ標的組織への曝露が想定される場合には、リスクがあると判断してリスクコミュニケーションに進むことが可能と考えられる。ただし、<i>in vitro</i>での活性が認められたとしても実臨床では<i>in vivo</i>で活性が認められない場合もあるため、適切なマーカーを用いた当該遺伝子のKDによる影響の評価が、リスクの判断に有用な場合もある。</p>
3	ASOの場合、どの程度のミスマッチ数まで <i>in silico</i> 解析でオフターゲットの評価が必要と考えられるか？	<p>ASOのハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果は、塩基長や修飾による影響を加味して評価すべきミスマッチ数を決定すべきである。20mer程度のASOの場合では概ね2ミスマッチまでの評価が必要と考えられる<sup>6-8)</sup>。配列長が20merを超える長鎖ASOの場合は、その相補配列とどこまで類似した配列まで影響しうるかも考慮の上、評価するミスマッチ数を決める必要がある<sup>20)</sup>。</p>
4	siRNAの場合、どの程度のミスマッチ数まで <i>in silico</i> 解析でオフターゲットの評価が必要と考えられるか？	<p>siRNAではシード領域の7merの完全一致により、miRNA様作用からオフターゲット効果を生ずる。このシード領域の相補鎖との<math>T_m</math>値が高い (&gt; 21.5°C) と結合力が強くなり、その他の領域のミスマッチを許容して影響が出やすくなるとの報告<sup>21)</sup>もある。また、siRNAではアンチセンス鎖に加えてセンス鎖も同様の作用を有する。したがって、siRNAでは単純にミスマッチ数ではなく、シード領域の相補性を加味した評価が求められる。全長のRNAi作用については3ミスマッチ程度まで解析している報告がある<sup>20)</sup>。なお、siRNAではシード領域を考慮した<i>in silico</i>解析を行うと多数の遺伝子がヒットするため、特に注意すべき対象遺伝子を抽出する手段が必要となる。その一つとしてsiDirectのようなアルゴリズムを利用する方法<sup>22)</sup>がある。</p>
5	ヒト細胞を用いた <i>in vitro</i> でのオフターゲット解析の際、開発候補品の曝露濃度はどのように設定すればよいか？	<p>オンターゲット遺伝子の薬理作用が目標とする薬効を十分に超える濃度に設定する。例えば薬効の目標とするKD率が60%の場合はそれを超えるKD率を示す濃度を用いる。ただし、薬効が最大KD率を示す濃度である場合は、細胞毒性の生じない濃度かつ血漿中の<math>C_{max}</math>値を十分に超える濃度などを参考に濃度設定する。トランスフェクション試薬などにより細胞に被験物質を強制導入する場合には血漿中の<math>C_{max}</math>値が適切な指標とは必ずしもならないが、この場合も前述と同様な考え方で濃度設定するのが適切と考えられる。</p>
6	<i>In silico</i> 解析で見出されたオフターゲット候補遺伝子が、 <i>in vitro</i> 解析で使用可能なヒト細胞に発現していない場合、どのように評価すべきか？	<p>当該遺伝子の機能や病態との関連、組織発現分布の情報、オルソログで同一性が認められる動物での<i>in vivo</i>毒性試験の情報などを総合的に活用して、評価することになる。例えば、Gapmer型ASOの場合は以下の手順が考えられる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ヒトでの遺伝子発現分布及び臨床投与経路におけるASOの組織分布予想から、臨床でのKDの可能性を考察する。</li> <li>2) 当該遺伝子に関する文献調査（KO動物のフェノタイプ、疾患関連遺伝子情報等）を行い、ヒト遺伝子がKDされた際の毒性発現リスクを評価する。</li> <li>3) 動物でヒトと標的配列が相同なオルソログの発現があるか確認し、非臨床毒性試験で評価する（評価可能な場合に限る）。</li> <li>4) 上記1)～3)でリスクを払拭できない場合、当該オフターゲット候補遺伝子の<i>in vitro</i>発現系を構築してKD確認を行うことも考えられるが、結果のヒトへの外挿性を考慮して試験の実施を判断すべきである。</li> </ol>

KD : knock down, ASO : antisense oligonucleotide,  $T_m$  : melting temperature,  $C_{max}$  : maximum plasma concentration, KO : knock out

Table 3 その他の毒性についての疑問と考え方

No.	疑問	考え方
1	既存の化学修飾を用いた核酸医薬品のクラスエフェクトとして免疫毒性が報告されている。その検出には追補的な検査（例えばサイトカイン類の測定やサルの補体測定など）が必要だが、これらを一律に実施する必要はあるか？	毒性試験結果の解釈に必要と判断される場合に補助的に実施するのでよい。特に、クラスエフェクトが認められる既存薬剤と構造や物理化学的性質が類似している場合は、毒性所見のヒトへの外挿性を考察するために、これまでの報告を参考にサイトカイン・ケモカイン或いは補体の評価が有用な場合がある。
2	ヒトへの外挿性に乏しいとされる既知のクラスエフェクトと同様の所見が、新規化学修飾を用いた核酸医薬品で認められた場合、治験でのリスクは低いとして臨床計画を立てることは可能か？	原則として、開発候補品ごとの安全性をクラスエフェクト込みで評価する必要があり、検出された毒性の外挿性を考慮してヒトでの安全性を確保した上で、臨床試験を進めることが求められる。 なお、PS結合を有する核酸医薬品でみられる補体活性化に伴う循環系の毒性（血圧低下、血管炎等）のように、ヒトでは感受性が低いとされるクラスエフェクト <sup>14-16</sup> については、ヒトでのリスクは低いと考えられている。そのため、PS結合を有する新規の化学修飾を用いた核酸医薬品で検出された同様な変化については、先行化合物との動態の差異、毒性の重篤性や回復性、臨床でのモニタリングの要否等を考慮し、適切なリスクマネジメントプランを立てた上で、臨床試験を進めることが可能であろう。
3	臨床での維持用量での投与間隔が3か月以上となるような化合物の非臨床毒性評価では、ICH M3 (R2)で推奨された期間に臨床より短い投与間隔の反復投与で曝露を維持することでよいか？ また、臨床とは異なる投与間隔で実施された毒性評価の安全域はどのように考えるのがよいか？	ICH M3 (R2)で推奨された非臨床安全性試験の期間は、化合物が反復投与された時の生体反応を十分に評価できる標準的な試験期間として定められたものである。このため、臨床で投与間隔の広い薬剤においても投薬期間中に十分な曝露を維持できる頻度で複数回の反復投与を設定することでよい。また、投与期間（例：6か月、9か月等）当りの総曝露量や総投与量などをもとに、安全域を算定することが可能と考えられる。
4	ICH M3 (R2)に関する質疑応答集 (Q&A) <sup>23</sup> では類薬で誘発される毒性と同等であり、従前の類薬での臨床試験に基づいてリスク管理が可能と考えられる場合は回復性試験の実施は必ずしも必要ないとされている。例えば、核酸医薬品（新規化学修飾も含む）では化合物の化学的な性質が類似しているため、類薬に認められる毒性と同様の毒性しか検出されない場合もあるが、そのような場合は回復性の評価は不要と考えて良いか？	当該毒性が類似構造を有する複数の薬剤でも認められること、ヒトへの外挿性に乏しいか、ヒトでの発現が早期にモニタリング可能であり、リスク管理が可能と考えられる場合には不要である。ただし、毒性プロファイルは動物種によって異なること、また、特定のコンセンサス配列によって惹起される肝毒性なども報告 <sup>24</sup> されていることなどから、新規化学修飾を用いた核酸医薬品については、その毒性が既存の毒性と同一と考えて良いかどうか慎重に考察の上、要否を判断する必要がある。
5	毒性試験で免疫原性を疑わせる所見（血中イムノグロブリン量の変化 [IgM, IgG等]、脾重量の増加、脾臓での胚中心の増加、形質細胞の増加など）が認められ、ADAが産生されても中和活性やオンターゲット作用の減弱が見られていない事例 <sup>4, 25, 26</sup> が多いが、TKで曝露低下が認められなければ、ADAの測定は不要か？	TKで曝露の低下及びオンターゲット作用の減弱（ただし、当該作用が認められる場合のみ）がみられない場合には、仮に毒性試験で免疫原性を示唆する重篤な所見が得られていたとしても、当該所見で毒性試験の解釈が可能のため、ADAの測定は必須ではない。なお、核酸医薬品による免疫原性はヒトへの外挿性が不明のため、臨床試験時にADAを指標にこれを評価することも考えられる。
6	核酸医薬品では、投与部位や所属リンパ節での炎症性細胞浸潤など免疫系への影響が認められた場合でも、必ずしも独立した免疫毒性試験は実施されていないが、試験を必要と判断するのはどのような場合か？	Mipomersen及びinotersenで認められた免疫系の変化は、宿主抵抗性試験結果と臨床試験で既に独立した試験の実施意義がないことが示されている <sup>4, 25</sup> 。そのため、同様の機序で発症していると考えられる免疫系の変化については、核酸医薬品の種類にかかわらず、改めて独立した免疫毒性試験の実施は不要と考えられる。ただし、新たなあるいはより重篤なICH S8 <sup>27</sup> に示された免疫系への影響がみられた場合、当該ガイドラインに従った免疫毒性評価が必要と考えられる。
7	プリン及びピリミジンを有する核酸医薬品は、約260 nmに極大吸収がある。このため、MECを基準とするとモルフォリノ核酸等を除く核酸医薬品の多くが光毒性を評価すべき基準内に含まれる（290から700 nmの波長におけるMEC $\geq 1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）。一方、既承認薬では皮膚や眼への分布が低水準であることを理由に、光毒性評価は実施されていない。光安全性を懸念しなければならぬのはどのような場合か？	核酸医薬品はプリン及びピリミジン骨格を有する 경우가多く、太陽光の波長（290-700 nm）にも吸収を有する。このため、ICH S10 <sup>28</sup> に記載された以下の二つの要素のいずれも満たした場合は光毒性の懸念があると考え、光毒性の評価を考慮すべきと考えられる。 1) 光に曝露される組織に十分な量が分布すること（DDS製剤化等により当該組織への分布を高める工夫をなされた場合を含む） 2) UVあるいは可視光の吸収により、反応性に富んだ分子種を形成する可能性のある構造を有していること（天然のプリン及びピリミジン骨格には光毒性の懸念はないが、リンカーや担体などに反応性に富んだ分子種を形成する可能性のある構造を含む場合、これら骨格への化学修飾が反応性に富んだ分子種を形成する可能性がある場合など）。 なお、反応性に乏しいリンカーや担体（吸収がない、あるいは光毒性陰性の場合等）を用いる場合や、糖部の架橋構造等に光吸収や反応性が無い場合は、光毒性の非臨床での評価の実施意義は低いと考えられる（多くの化学修飾は糖部になされているが、その場合は構成する糖部分或いは修飾構造部分だけでMECが基準以下であれば、その糖部の化学修飾を用いた核酸医薬品に反応性は無いと解釈できるため）。

PS : phosphorothioate, ADA : anti-drug antibody, TK : toxicokinetics, MEC : molecular extinction coefficient, DDS : drug delivery system

様に臨床試験を慎重に進める必要がある。

### 3.2 評価方法 (疑問3~6)

狭義のオフターゲット毒性の評価時には、核酸医薬品の種類に合わせて最適なヒトDNA/RNAデータベースを選択する必要がある (pre-spliced RNAに作用：イントロンを含むRNAデータベース, spliced RNAに作用：成熟RNAのデータベース, など)。また、製剤の配列長及び化学修飾による結合親和性や塩基選択性などをもとに、相補配列との不整合数 (ミスマッチ, インサーション, デリションなど) を適切に定める必要がある<sup>6-8)</sup>。

なお、開発候補品のヒト細胞を用いた *in vitro* 解析では、KDなどを指標に薬効発現濃度を超える濃度まで曝露して評価することになる。この考えは、標的遺伝子を導入・発現させたヒト細胞を用いて評価する場合にも適用しうる。

## 4 その他の毒性について

Table 3にその他毒性に関する疑問と考え方を、以下にその背景や留意点を纏めた。

### 4.1 クラスエフェクト毒性 (疑問1~2)

核酸医薬品で認められる免疫系の刺激作用や補体活性化などのクラスエフェクト毒性は、発現機序を基にヒトへの外挿性を考慮することで、臨床試験での適切なリスクマネジメントプランの立案が可能である。ただし、上記作用の認められないGalNAc-siRNA<sup>9)</sup> やモルフォリノオリゴ核酸<sup>10-12)</sup> の例もあるので、評価時には化学修飾の種類やその構成及び検出されうる既知の毒性等を考慮し、適切な検査項目を選択すればよい<sup>13)</sup>。

一方、既知のクラスエフェクト毒性のうち補体活性化は、ヒトでの感受性が低くそれに伴う心循環系の変化のヒトへの外挿性も乏しい<sup>14-16)</sup> と報告されている。

### 4.2 反復投与毒性試験のデザイン及びその他 (疑問3~7)

臨床で投与間隔や用量が変動する薬剤 (導入では週1回の高用量, 維持では3か月に1回の低用量投与する場合など) については、臨床と同等もしくは

より短い投与間隔で評価を行い、安全域を単位期間当りの曝露量 (例：投与開始から6か月あるいは9か月までの曝露量) から見積もることが妥当である。これは局所投与においても当てはまる。Nusinersen (髄腔内投与) では、臨床での用法・用量を踏まえて適切なリスク評価を行えるように非臨床の投与レジメが設定され、脳脊髄液量換算や脳重量換算の投与量が安全域の指標に使用された<sup>17, 18)</sup>。

## 5 終わりに

核酸医薬品に限らず医薬品の非臨床安全性評価については、既存のガイドラインを参考にケースバイケースの基本理念に沿って実施する必要がある。核酸医薬品開発の技術は日々進歩しており知識や経験も急速に蓄積されつつあるため、その非臨床安全性評価についての考え方を最新の状態に維持し、常に最適化していく必要がある。

本稿では、核酸医薬品の開発企業から非臨床安全性評価を巡る疑問を収集し、その解決に向けての現時点での考え方を示した。これらの考え方が、核酸医薬品開発の一助となれば幸いである。

### 利益相反

その他、開示すべき利益相反はない。

### 文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長。核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドラインについて。薬生薬審発0330第1号, 令和2年3月30日。
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長。「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン (案)」に対するご意見の概要と対応について。令和2年3月30日。
- 3) 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。
- 4) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2017. Tegsedi (Inotersen). Non-clinical Review(s) FDA Briefing Document NDA 211172. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf), (accessed 2021-11-18)。
- 5) 医薬・生活衛生局審査管理課。オンパットロ点滴静注 2mg/mL。審議結果報告書。令和元年6月3日。 <https://>

- www.pmda.go.jp/drugs/2019/P20190717001/112773000\_30100AMX00012\_A100\_2.pdf, (accessed 2021-11-18).
- 6) 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 Therapeutics*. 2013, **23** (1), p.21-28.
  - 7) Yoshida, T.; Naito, Y.; Yasuhara, H.; Sasaki, K.; Kawaji, H.; Kawai, J.; Naito, M.; Okuda, H.; Obika, S.; Inoue, T. Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells, *Genes to Cells*. 2019, **24** (12), p.827-835.
  - 8) Wild, J.; Spring, S. Regulatory Aspects Involved in Developing INDs for Novel Oligonucleotides and Strategies for Product Development, SOT Annual meeting & ToxExpo. 2021.
  - 9) Janas, MM.; Harbison, CE.; Perry, VK.; Carito, B.; Sutherland, JE.; Vaishnav, AK.; Keirstead, ND.; Warner, G. The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies. *Toxicol Pathol*. 2018, **46** (7), p.735-745.
  - 10) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2016. Exondys 51 (Eteplirsen). Pharmacology review(s) FDA Briefing Document NDA 206488. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/206488Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/206488Orig1s000PharmR.pdf), (accessed 2021-11-18).
  - 11) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2018. Vondys 53 (Golodirsen). Non-clinical Review(s), FDA Briefing Document NDA 211970. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2019/211970Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211970Orig1s000PharmR.pdf), (accessed 2021-11-18).
  - 12) 医薬・生活衛生局審査管理課. ビルテブソ点滴静注250 mg. 審議結果報告書. 令和2年3月6日. [https://www.pmda.go.jp/drugs/2020/P20200408002/530263000\\_30200AMX00428\\_A100\\_1.pdf](https://www.pmda.go.jp/drugs/2020/P20200408002/530263000_30200AMX00428_A100_1.pdf), (accessed 2021-11-18).
  - 13) Marlowe, J.L.; Akopian, V.; Karmali, P.; Kornbrust, D.; Lockridge, J.; Semple, S. Recommendations of the Oligonucleotide Safety Working Group's Formulated Oligonucleotide Subcommittee for the Safety Assessment of Formulated Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2017, **27** (4), p.183-196.
  - 14) 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.
  - 15) Galbraith, W.M.; Hobson, W.C.; Giclas, P.C.; Schechter, P.J.; Agrawal, S. Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res Dev Fall*. 1994, **4** (3), p.201-206.
  - 16) Engelhardt, J.A.; Guionaud, S.; Henry, SP.; Leach, MW.; Loudon, C.; Scicchitano, MS.; Weaver, J.L.; Zabka, T.S.; Frazier, K.S. Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider Paper: Drug-induced Vascular Injury Associated with Nonsmall Molecule Therapeutics in Preclinical Development: Part 2. Antisense Oligonucleotides. *Toxicologic Pathology*. 2015, **43**, p.935-944.
  - 17) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2016. Spinraza (Nusinersen). Pharmacology review(s), FDA Briefing Document NDA 209531. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/209531Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/209531Orig1s000PharmR.pdf), (accessed 2021-11-18).
  - 18) 医薬・生活衛生局審査管理課. スピンラザ髄注12 mg. 審議結果報告書. 平成29年6月13日. [https://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/630499000\\_22900AMX00587\\_A100\\_2.pdf](https://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/630499000_22900AMX00587_A100_2.pdf), (accessed 2021-11-18).
  - 19) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 「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.
  - 20) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2018. Chronic Hepatitis B Virus Infection: Developing Drugs for Treatment Guidance for Industry. Draft Guidance. <https://www.fda.gov/media/117977/download>, (accessed 2021-11-18).
  - 21) Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Nishi, K.; Juni, A.; Saigo, K. Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res*. 2008, **36** (22), p.7100-7109.
  - 22) Naito, Y.; Yoshimura, J.; Morishita, S.; Ui-Tei, K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009, **10**, p.392-399.
  - 23) 厚生労働省厚生労働省医薬食品局審査管理課. ICHM3 (R2) Q&As: 「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」に関する質疑応答集 (Q&A). 事務連絡, 平成24年8月16日.
  - 24) Burdick, AD.; Sciabola, S.; Mantena, SR.; Hollingshead,

- BD.; Stanton, R.; Warneke, JA.; Zeng, M.; Martsen, E.; Medvedev, A.; Makarov, SS.; Reed, LA.; Davis 2nd, JW.; Whiteley, LO. Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2014, **42** (8). p.4882-4891.
- 25) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2012. Kynamro Injection (Mipomersen sodium). Pharmacology review(s), FDA Briefing Document NDA 203568. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf), (accessed 2021-11-18).
- 26) European Medicines Agency. 2019. Waylivra (Volanesorsen) Public Assessment report. Procedure No. EMEA/H/C/004538/0000. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/waylivra-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/waylivra-epar-public-assessment-report_en.pdf), (accessed 2022-03-04).
- 27) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて. 薬食審査発第0418001号, 平成18年4月18日.
- 28) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて. 薬食審査発0521第1号, 平成26年5月21日.