

核酸医薬品のオフターゲット作用の 評価に適したマイクロアレイの検討

発 表 者：石田 和也 （安全性評価技術研究所）
 共同研究者：大野 文子 （安全性評価技術研究所）
 鈴木 康之 （安全性評価技術研究所）
 赤堀 有美 （安全性評価技術研究所）

1. 背景及び目的

近年、開発が盛んになっている核酸医薬品は、従来の低分子医薬品、抗体医薬品では標的にできないリボ核酸 (RNA) 等も標的にすることが可能である (図 1)。そのため、従来は治療が困難であった遺伝性疾患や難治性疾患等の疾病に対する新たな医薬品と

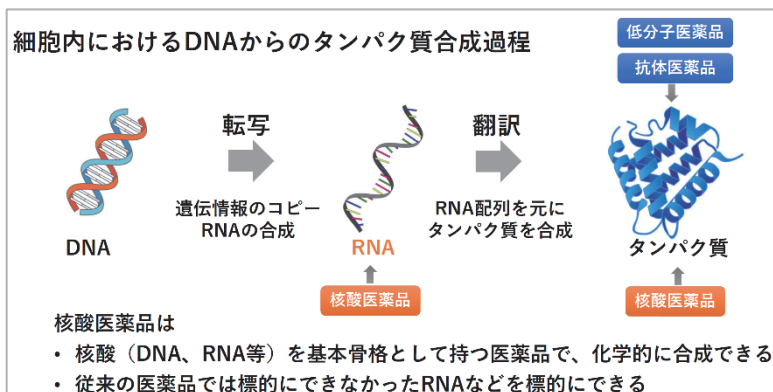


図 1 核酸医薬品の特徴

して期待されている。核酸医薬品には複数の種類があり、その中で代表的なアンチセンスオリゴ Gapmer 型核酸医薬品 (以降、ASO) について、今回の発表で報告する。

ASO は標的遺伝子の RNA (mRNA 及び/又は mRNA 前駆体) に相補的に結合し、DNA/RNA の 2 本鎖を認識する RNaseH 酵素の働きによって RNA を分解することで標的遺伝子の発現を抑制する。その結果、疾患の原因となるタンパク質の産生が抑制され、薬効を発揮する。一方、医薬品には本来の標的以外の意図しないメカニズムによる作用の可能性があるが、核酸医薬品の場合、生体内の標的遺伝子以外の RNA と相補結合することで生じる核酸医薬品特有のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用 (以降、オフターゲット作用) の可能性もあり、それら进行评估することが求められている¹⁾。ASO のオフターゲット作用の評価は、転写産物の配列情報等を含むデータベースに対して ASO の相補配列を有するヒトの遺伝子 (オフターゲット候補遺伝子) を探索し (*in silico* 解析)、ASO をばく露したヒト由来細胞における遺伝子発現変動解析 (*in vitro* 解析) を行い、発現抑制 (指標として発現比 0.5 倍未満) されたオフターゲット候補遺伝子をオフターゲット遺伝子として評価する²⁾。ASO は相補配列間で部分的な塩基違い、挿入又は欠失がある遺伝子にも結合するため、ASO の配列長によっては *in silico* 解析で得ら

れるオフターゲット候補遺伝子の数は数百以上になることから、*in vitro* 解析におけるオフターゲット候補遺伝子の定量評価を遺伝子ごとに実施することは現実的ではなく、マイクロアレイ等の網羅的遺伝子発現手法が使用される。

ここで、AS0 のオフターゲット作用の評価におけるマイクロアレイの使用では、以下の 3 点が重要となる。

Point 1 : 評価したいオフターゲット候補遺伝子が搭載されていること

Point 2 : 使用するヒト細胞で発現している遺伝子を低発現遺伝子も含め再現よく検出可能なこと

Point 3 : オフターゲット遺伝子としての発現抑制を捉えられること

以上を踏まえ、「核酸医薬品のオフターゲット作用の評価におけるマイクロアレイの有用性を評価すること」及び「モデル AS0 を使用して核酸医薬品のオフターゲット作用の評価に適したマイクロアレイを選定すること」を目的に、先に挙げた各 Point に対してそれぞれ下記の解析・評価を行った。

Point 1 : マイクロアレイ搭載遺伝子数の確認

Point 2-1 : 同一群内の測定再現性の確認

Point 2-2 : 検出遺伝子数及びダイナミックレンジの確認

Point 3 : オフターゲット候補遺伝子を対象とした定量 PCR とのデータ比較

2. 方法

モデル AS0 として 13 塩基からなる AS0 を使用した。

in silico 解析では、検索が正確で漏れがないとされる塩基配列検索アルゴリズムを搭載した GGGenome と呼ばれるツールを用いて、ヒトのタンパク質に翻訳される遺伝子のデータベースを検索し、モデル AS0 のオフターゲット候補遺伝子を特定した。

in vitro 解析では、ヒト肝癌由来細胞株 (Huh-7) を用いて、対照群 (VC 群) 及びばく露群 (モデル AS0 : 50 nmol/L) を設定し、各群 4 検体を設定し、24 時間ばく露した。ばく露後に抽出した各 RNA をサンプルとしてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイは世界的にユーザー数が多い 2 社のマイクロアレイ (アレイ A 及びアレイ B) を使用した。

「Point 1 : マイクロアレイ搭載遺伝子数の確認」には各メーカーから公開されているプローブごとの遺伝子情報を使用し、1 プローブに 1 遺伝子の情報が付与されているプローブのみを解析対象とした。「Point 2-1 : 同一群内の測定再現性の確認」では VC 群の測定データを使用して総当たりでの相関性解析を行い、 r 値 (相関係数) から測定再現性を評価した。「Point 2-2 : 検出遺伝子数及びダイナミックレンジの確認」では VC 群の測定データを使用して、4 検体中 3 検体以上が「検出」と判定された遺伝子を「検出遺伝子」として計数し、平均シグナル強度のヒストグラムからダイナミックレンジを

算出した。

「Point 3: オフターゲット候補遺伝子を対象とした定量 PCR とのデータ比較」においては、まず各マイクロアレイで得られた遺伝子発現解析の結果に基づき、オフターゲット遺伝子の数をマイクロアレイ間で比較した。次いで、アレイ A でのみオフターゲット遺伝子とされた 24 遺伝子のうち、サンプル量が確保でき、定量 PCR で検出できた 19 遺伝子について定量 PCR を行い、マイクロアレイの発現比と定量 PCR の発現比が共に 0.5 倍未満であるか否か比較した。

3. 結果

3.1 マイクロアレイ搭載遺伝子数の確認 (Point 1)

ヒトのタンパク質に翻訳される遺伝子は一般に 20,000 遺伝子程度あるが、アレイ A 及びアレイ B に搭載されているタンパク質に翻訳される遺伝子の数はそれぞれ 18,884 遺伝子及び 17,355 遺伝子であり、約 91%の遺伝子 (17,253 遺伝子) が両マイクロアレイで共通していた。なお、アレイ A 及びアレイ B 共にいずれかのマイクロアレイにしか搭載されていない遺伝子が複数あったが、それらはプローブを個別に設計・搭載させるカスタムアレイを作成することでカバー可能である。

3.2 同一群内の測定再現性の確認 (Point 2-1)

VC 群のマイクロアレイデータの散布図及び r 値により同一群内の測定再現性を比較した結果、アレイ A のいずれのサンプル間の r 値も 0.998 であり、アレイ B の r 値でも 0.990-0.993 といずれのマイクロアレイも 0.99 を超える値であった。このことから、両マイクロアレイ共に同一群内サンプルの測定再現性が高いことが示された。

3.3 検出遺伝子数及びダイナミックレンジの確認 (Point 2-2)

VC 群をサンプルとした際、アレイ A では 14,073 遺伝子 (ダイナミックレンジ約 4.6 桁)、アレイ B では 10,786 遺伝子 (ダイナミックレンジ約 3.5 桁) が検出された。両マイクロアレイで検出された遺伝子のうち、約 74%が重複しており、異なるマイクロアレイであっても再現よく検出できることが示された。アレイ A の検出遺伝子数が多かった理由として、アレイ A のダイナミックレンジがアレイ B より広いことが挙げられ、アレイ A ではより低発現の遺伝子も含め測定可能であったと考えられた。

3.4 オフターゲット候補遺伝子を対象とした定量 PCR とのデータ比較 (Point 3)

in silico 解析で特定したモデル ASO のオフターゲット候補遺伝子 143 遺伝子のうち、オフターゲット遺伝子は、アレイ A 及びアレイ B でそれぞれ 75 遺伝子及び 51 遺伝子であった。また、これらの遺伝子のうち、アレイ B の 51 遺伝子は全て、アレイ A の 75 遺伝子に包含されており、両マイクロアレイにおいて同一のオフターゲット遺伝子

が特定されていた（図 2）。

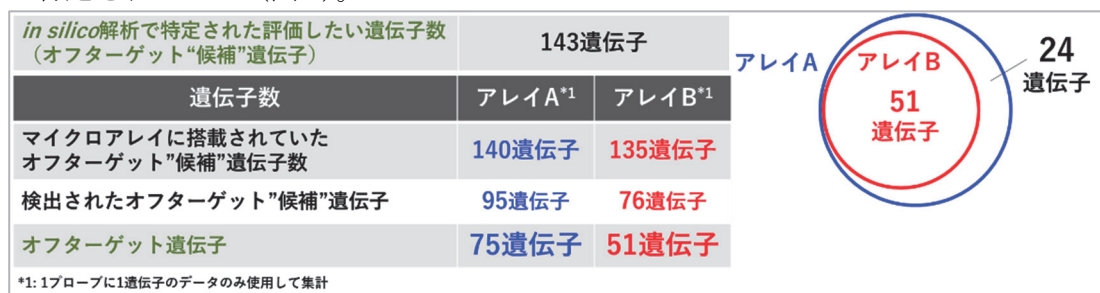


図 2 モデル ASO を使用したアレイ A 及びアレイ B での
オフターゲット遺伝子数の比較

アレイ A ではさらに多くのオフターゲット遺伝子が特定されており、アレイ A においてのみオフターゲット遺伝子の定義と合致した 24 遺伝子のうち、19 遺伝子についてアレイ A と定量 PCR の発現比を比較した結果、18 遺伝子（95%）はアレイ A 及び定量 PCR のいずれも、発現比が共に 0.5 倍未満であり、オフターゲット遺伝子としての結果が一致していた。

4. まとめ

今回の結果から、核酸医薬品のオフターゲット作用の網羅的評価にマイクロアレイが有用であることが示された。また、モデル ASO を用いた評価により、核酸医薬品のオフターゲット作用の評価においては、アレイ A の方がより多くのオフターゲット遺伝子进行评估でき、優れていた。

なお、評価したいオフターゲット候補遺伝子と使用細胞、マイクロアレイの選択・組合せによりオフターゲット作用を過小評価することがないように試験設計することが重要である。

5. 謝辞

本研究は 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：大阪大学・小比賀聡教授）による支援の成果です。

また、本研究の実施に当たりモデル核酸の設計、解析等に関して、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部の井上貴雄先生、吉田徳幸先生及び内田安則先生から多くのご支援・ご助言をいただきましたことに、深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 厚生労働省（2020）. 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) Yoshida, T. et al. Genes Cells. 2019, 24(12), 827-835.