The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アンチセンス核酸のオフターゲット効果に対する塩基長の影響
Author(s)	安原, 秀典
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87982
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　安原　秀典　）	
論文題名	アンチセンス核酸のオフターゲット効果に対する塩基長の影響

論文内容の要旨

アンチセンス核酸（ASO）を始めとした核酸医薬は，pre-mRNA，mRNA，miRNAなどのRNA分子やウイルスゲノムなど，これまで標的にできなかったターゲットを創薬候補にできることから，難治性疾患に対する治療手段として注目を集めている．核酸医薬は新しい機序で作用するモダリティであることから，従来の医薬品にはない新たな安全性課題が存在する．RNAを標的とするASOについては，特有の懸念点として，標的とする塩基配列と類似した配列にASOが相補的に結合し，想定外の影響をもたらす「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果（以降，オフターゲット効果と記載）」を引き起こしうる．近年ではASOによる肝毒性発症にオフターゲット効果が寄与する可能性が示されており，実際に状況証拠として，肝毒性発現の原因であろうと推定される事例も報告されている．そのようなオフターゲット効果に由来する毒性は動物モデルでは評価できないため，医薬品開発段階では，ヒトRNAを対象とした*in silico*解析でオフターゲット効果が起こる可能性がある遺伝子を識別し，ヒト細胞を用いた*in vitro*解析を行うことでオフターゲット効果が起こる遺伝子を絞り込むという評価体系が提案されている．*In silico*解析および*in vitro*解析を通じて絞り込んだオフターゲット候補遺伝子について，毒性との関連情報が取得され，リスク評価が行われる．しかしながら，抽出した遺伝子のオフターゲット毒性のリスク評価には多大な労力がかかり，毒性との関連性を明確に示せない場合も考えられるため，オフターゲット効果をより低減したものを配列選択の段階で選抜することが，医薬品創製の効率化，ならびに開発確度向上につながると考えられる．

ASOの塩基長とオフターゲット効果の発現には二面性があると考えられる．すなわち，塩基長が短いほど完全相補するRNA数は増大するため，オフターゲット候補遺伝子は増加するが，一方で，塩基長が長いほど，ASO-RNA間の結合力は増大するため，ミスマッチがあってもオフターゲット効果が起こりやすい．つまり，塩基長を長くしてもミスマッチ等が許容されることにより，結果的にオフターゲット遺伝子が増加する可能性も考えられる．本研究では，この二面性を実験的に検証するため，同じ遺伝子を標的とする塩基長の異なるASOを設計し，ターゲットに対する遺伝子発現（オンターゲット活性）を厳密に合わせた条件のもと，オフターゲット効果を解析した．具体的には，ヒトのグルチコイド受容体のmRNAを標的として，強力な遺伝子発現抑制効果が報告されている14塩基長のgapmer型ASOをコア配列にして， 5’あるいは3’側に伸長した18塩基長のASOを設計した．設計した配列に対し，短鎖配列の検索に適したGGGenomeを活用し *in silico*解析を行い，ASO-RNA間の相補性に基づき，オフターゲット候補遺伝子を分類した．これらの14塩基長と18塩基長のASOをヒト細胞にトランスフェクションし，オンターゲット活性を厳密に合わせた条件のもと，オフターゲット効果をマイクロアレイ解析により網羅的に評価した．その結果，18塩基長のASOでは，同程度のオンターゲット活性を維持した条件において，オフターゲット効果が大きく低減されることが明らかになった．また，14塩基長で検出されたオフターゲット遺伝子は18塩基長では約70%ヒットしており，重複が認められており，塩基長を伸長することで，配列由来のオフターゲットを引き起こす確率が下がる傾向を見出した．すなわち，上記の二面性のうち，塩基長が短いほど相補的RNAの数が増大することの影響の方が大きいことが示された．

一方で，ヒト細胞を用いた検証は，倫理面の観点から個体での検証にスケールアップすることは困難であり，細胞実験の結果を個体に外挿することが難しい．コアとして使用した14塩基長のASOはヒトだけでなくマウスにも相補的な配列であり，マウスに投与した場合，肝毒性を惹起することが報告されている．そこで次に検証内容の種間での再現性および個体レベルでの影響を精査する目的で，マウスを用いた実験を実施した．先行研究と同様に，*in silico*解析と*in vitro*評価，更に*in vivo*毒性評価を実施し，塩基長伸長が遺伝子発現に与える影響と肝毒性への影響について検証した，マウス細胞を用いた*in vitro*配列長スクリーニングの結果から，活性を維持しつつ，塩基長を伸長した18塩基長のASOを見出した．また，*in silico*解析とマイクロアレイによる網羅解析から，ヒト細胞での検討と同様に，塩基長伸長に伴うオフターゲット効果の低減が示され，オフターゲットによる毒性惹起のリスクを抑えることができた．さらにマウスを用いた*in vivo*毒性評価試験の結果，同程度のオンターゲット活性を維持しつつ，肝毒性の生化学指標が改善された．すなわち，塩基長伸長が，個体レベルでの毒性回避につながることが実験的に示された．

最後に，別のオフターゲット効果回避策として，塩基長の変更以外の手法も試みた．グアニン-チミン（ウラシル）間の塩基対は揺らぎ塩基対（Wobble base pair）と呼ばれ，Watson-Crick型の相補的な塩基対と同様，水素結合が形成されることが知られている．グアニン-チミンの認識性については，2-thiothymine（2^{s}T）を導入することで，アデニン-チミンのWatson-Crick型塩基対は維持しつつ，グアニン-チミンの揺らぎ塩基対の認識性を下げることができる．そこで，2^{s}Tを導入し，化学修飾によるオフターゲット効果の影響を検証した．2^{s}T導入率を変えた複数のASOを設計し，塩基長伸長時と同様に，ヒト細胞でのマイクロアレイによる網羅解析を実施したところ，期待に反して，今回検証した条件ではオフターゲット効果の低減は観測されなかった．

本研究では，ASOの塩基長伸長がオフターゲット効果を低減し，毒性惹起のリスクを低減することを実験的に示すことができた．今回得られた知見をもとに，ASOの配列設計を行うことで，より安全性の高いASO医薬の開発に繋がることが期待される．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　安原　秀典　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	小比賀　聡
	副 査	招へい教授	井上　貴雄
	副 査	准教授	櫻井　文教

論文審査の結果の要旨

核酸医薬は新たな創薬モダリティとして注目を集めているが、その中でもアンチセンス核酸は、細胞内のpre-mRNAやmRNAなどと配列特異的に結合し、その機能を制御することで薬効を示す。対象とする疾患の原因遺伝子が特定され、その遺伝子配列情報を得ることさえできれば、その遺伝子から産生されるタンパク質の構造や機能の特徴によらずアンチセンス核酸による創薬が可能になるという点で、従来の創薬手法とは一線を画している。また、細胞内のRNAを標的とすることから、安全性評価についても従来に比べてより進んだ考え方を導入することができる。すなわち、副作用の主因の一つとして、医薬品と生体内分子との予期せぬ相互作用があげられるが、アンチセンス核酸においてはその一部を事前の*in silico*解析及び*in vitro*解析により予測することができる。これが「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」であり、標的RNAの塩基配列と類似した配列を持つ生体内RNAにアンチセンス核酸が作用することで生じる毒性である。申請者は、*in silico*解析及び*in vitro*解析によるオフターゲット効果の「予測」をさらに発展させ、その「低減・回避」を目指した基盤的研究に取り組み、以下に示す優れた成果を得た。

1）　同じ遺伝子を標的とする塩基長の異なるアンチセンス核酸を設計し、ヒト細胞でのオフターゲット効果を*in silico*解析及びマイクロアレイ解析により網羅的に評価した。その結果、塩基長が長いアンチセンス核酸においてオフターゲット効果が大きく低減されることを見出した。

2）　続いて対象をヒト細胞からマウス細胞、マウス個体へと展開し同様の実験を行うことで、塩基長伸長に伴うオフターゲット効果の低減を確認するとともに、このオフターゲット効果の低減がマウス個体レベルでの毒性回避につながることを実証した。

3）　さらに、塩基長伸長とは別のアプローチとして、核酸塩基部分への化学修飾導入によるオフターゲット効果の低減の可能性について探究した。今回用いた化学修飾である2-thiothymineにおいては、当初の予想に反してヒト細胞でのオフターゲット効果の低減は確認されなかったが、*in silico*解析と*in vitro*解析を適切に組み合わせることにより、核酸の化学修飾がオフターゲット効果に与える影響を評価可能であることを明らかにした。

以上の通り、本論文はアンチセンス核酸の塩基長伸長がオフターゲット効果を低減し、さらに毒性惹起のリスク回避に有効であることを実験的に示すとともに、アンチセンス核酸の安全性評価における*in silico*解析及び*in vitro*解析の有用性を明示したものある。これらの成果は、今後の創薬科学領域の発展に大いに貢献するものであることから、本論文は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。