

博士論文

Gapmer 型アンチセンスの肝毒性発現に関する研究

釘宮 啓

略語一覧

本論文中では以下に示す略語を用いた。

A	:adenine
T	:thymine
G	:guanine
C	:cytosine
Acs11	:acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
AGO	:argonaute
ALT	:alanine transaminase
ApoB-100	:apolipoprotein B-100
ApoCIII	:apolipoprotein CIII
ASO	:antisense oligonucleotide
AST	:aspartate aminotransferase
BCA	:bichinchonic acid
BNA	:bridged nucleic acid
cEt	:constrained ethyl
CpG	:cytosine-phosphate-guanosine
DDS	:drug delivery system
DNA	:deoxyribonucleic acid
EMA	:european medicines agency
Exoc4	:exocyst complex component 4
FDA	:food and drug administration
GalNAc3	:triantennary n-acetyl galactosamine
Gapdh	:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GR	:glucocorticoid receptor
Hprt1	:hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IFN	:interferon
IL	:interleukin
KIF11	:kinesin family member 11

LDL	:low density lipoprotein
LNA	:locked nucleic acid
Lrp11	:low density lipoprotein-related protein 11
Malat1	:metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1
2'-MOE	:2'- <i>O</i> -methoxyethyl
mRNA	:messenger RNA
Msi2	:musashi rna binding protein 2
2'-OMe	:2'- <i>O</i> -methyl
pre-mRNA	:precursor messenger RNA
PAGE	:polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	:phosphate buffered saline
PS	:phosphorothioate
PVDF	:polyvinylidene difluoride
QoL	:norfolk quality of life-diabetic neuropathy
qRT-PCR	:quantitative real-time polymerase chain reaction
RISC	:RNA-induced silencing complex
RNA	:ribonucleic acid
RNAi	:RNA interference
RNase H	:ribonuclease H
RSV	:roux sarcoma virus
SDS	:sodium dodecyl sulfate
shRNA	:small/short hairpin interfering RNA
siRNA	:small interfering RNA
TLR	:toll-like receptor
TNF	:tumor necrosis factor
TTR	:transthyretin
TUNEL	:TdT-mediated dUTP nick end labeling
UTP	:uridine triphosphate

目次

序論	4
本論	
第1章 Gapmer の生物化学的/生物物理的性質が肝毒性発現に与える影響	9
第2章 Gapmer による肝毒性発現の要因検討	17
第1節 siRNA を用いた RNase H 発現抑制とその肝毒性発現への影響	18
第2節 RNase H 発現抑制と Gapmer による肝毒性発現との関連	23
第3章 siRNA を用いたオンターゲット作用の検討	35
第4章 Gapmer の作用部位の同定	41
第5章 Gapmer によるオフターゲット作用の検討	46
第1節 肝毒性を示す Gapmer のオフターゲット作用の検討	47
第2節 肝毒性を示さない Gapmer のオフターゲット作用の検討	62
総括	69
謝辞	71
参考文献	72

序論

アンチセンス核酸や siRNA (small interfering RNA) などに代表される核酸医薬品は、従来からの低分子医薬品やペプチド医薬品、抗体医薬品などがアクセスすることが困難な遺伝子転写産物 (RNA) を創薬ターゲットにできる特徴を有しており、次世代の創薬モダリティ (治療手段) として期待されている。これらの核酸医薬品は、標的とする塩基配列に対して配列特異的に作用することから遺伝子情報に基づく迅速な分子設計が可能である。加えて、それらの基本骨格や化学修飾が薬理活性や体内動態、安全性に及ぼす影響を事前に把握することが可能となれば、開発期間が短縮された効率の良い創薬研究ができると期待される。

2019 年 12 月末現在、多くの核酸医薬品が臨床応用されているが、承認数 (6 品目) および臨床開発品数で先行しているのがアンチセンス核酸である [1,2]。このアンチセンス核酸の研究の歴史は他の核酸医薬品と比べて長く、1978 年に Zamecnik らによってラウス肉腫ウイルス (rou sarcoma virus : RSV) に対して 13 塩基長の一本鎖 DNA を作用させることにより RSV の増殖抑制に成功したことが、最初の報告とされている [3,4]。アンチセンス核酸は、全長 13 塩基から 30 塩基程度の一本鎖の DNA であり、細胞内において標的 RNA (mRNA、pre-mRNA、non-coding RNA など) の塩基配列に対して配列特異的にハイブリダイズすることにより、リボヌクレアーゼ H1 (ribonuclease H1 : RNase H1) を介した RNA の切断誘導や立体障害的な作用による RNA の機能阻害、あるいは pre-mRNA のスプライシング制御など、標的 RNA の機能を様々に制御できることが報告されている [5-7]。

このようなアンチセンス核酸を医薬品として開発するためには、生体内での安定性 (ヌクレアーゼ分解耐性) や標的となる相補鎖 RNA に対する結合親和性など、優れた生物化学的/生物物理的特性を持つオリゴヌクレオチドを創製することが求められている [5]。それらの特性を付与または増強するために、これまでに数多くの修飾核酸技術が開発されてきた。中でも、リン酸ジエステル結合部位の修飾法として、酸素原子を硫黄原子に置換したホスホロチオエート (phosphorothioate : PS) 結合が広く使用されている (図 1.)。この PS 修飾されたオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解耐性が向上することにより生体内での安定性が著しく改善することが明らかとなっている [8]。また、2'-MOE (2'-O-methoxyethyl) や糖部架橋型ヌクレオチドである 2',4'-LNA [locked nucleic acid、別名 BNA (bridged nucleic acid)] および cEt (constrained ethyl) LNA など糖部位が化学修飾されたヌクレオチドが導入されたアンチセンス核酸は、ヌクレアーゼ分解耐性や相補鎖 RNA に対する結合親和性が増強することが報告されている [8-11]。以上に代表される修飾核酸技術の進展によって、アンチセンス核酸は全身投与が可能となり、加えて薬

理作用が大きく向上した。

様々な作用機序を有するアンチセンス核酸の中で、Gapmer 型アンチセンス（以下、Gapmer と呼ぶ）は RNA 分解型に分類される[5,6]。この Gapmer は、PS 修飾オリゴヌクレオチドの 5'および 3'末端（Wing 領域）に 2'-MOE や LNA などの化学修飾ヌクレオチドが導入され、“Gap” 領域と呼ばれる中央部位に 7 塩基以上の DNA 鎖が配置された構造を有する（図 1.）。また、Gapmer は細胞内において標的に対して配列特異的にハイブリダイズした後に、この部分的に形成された DNA/RNA ヘテロ二重鎖に対して RNase H1 がリクルートされることにより、相補鎖 RNA 側を RNase H1 が有するエンドヌクレアーゼ活性により切断する[5,12-14]。加えて、RNase H1 の過剰発現は Gapmer のノックダウン効果を *in vitro* および *in vivo* で高めることが報告されている[15]。このように Gapmer は、RNase H1 依存的に RNA 切断/分解を誘導することにより標的タンパク質が翻訳される過程を抑制し、薬理作用を示す[5]。

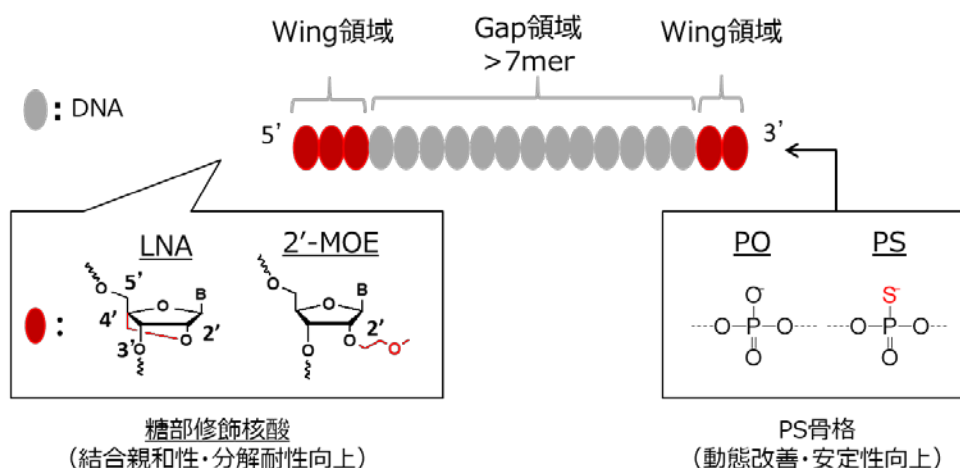


図 1. Gapmer 型アンチセンスの構造

近年、Wing 領域に 2'-MOE が導入された第 2 世代とよばれる Gapmer が 3 品目開発に成功した。まず 2013 年に、肝臓中のアポリポタンパク質 B-100 (apolipoprotein B-100 : ApoB-100) の mRNA を標的とする mipomersen (商品名 : Kynamro[®]) がホモ接合型家族性高コレステロール血症を対象として FDA (food and drug administration) から承認された[16-18]。また 2018 年には、肝臓中のトランスサイレチン (transthyretin : TTR) の mRNA を標的とする inotersen (商品名 : Tegsedi[®]) がトランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーを対象として FDA お

よびEMA (european medicines agency) から承認された[19]。さらに 2019 年にも肝臓中のアポリポタンパク質 CIII (apolipoprotein CIII : ApoCIII) の mRNA を標的とする volanesorsen (商品名 : Wayliva®) が、家族性高カイロミクロン血症を対象として EMA から承認された[20]。このように Gapmer は全身投与可能な核酸医薬品として、特定の遺伝子発現を制御することで明確な臨床効果を得られることが明らかとなり、市場への投入が続いている。さらに、より高い臨床効果を求めて Wing 領域に 2'-MOE の代わりに糖部架橋型ヌクレオチドが導入された Gapmer が使用され始めている[21,22]。これらの Gapmer は第 2.5 世代と呼ばれ、標的 RNA との結合親和性が飛躍的に向上すると共にヌクレアーゼ耐性も大幅に改善していることから、高い期待がもたれている。

上述のように Gapmer の開発が大きく進展する中で、一方において解決すべき課題点の一つとして安全性懸念が顕在化している[23]。一般的にアンチセンス核酸や siRNA などに代表される核酸医薬品の副作用は、オリゴヌクレオチド自体やその代謝物などが何らかの生体内タンパク質と非特異的に相互作用することで生じる毒性 (広義のオフターゲット作用) や、核酸医薬品に特有とされる塩基配列へのハイブリダイゼーションに起因する毒性により引き起こされると考えられている[24]。さらに、このハイブリダイゼーションに起因する毒性は、標的に作用することで生じるオンターゲット作用と、標的とする塩基配列と同一もしくは類似配列を有する他の配列に作用することで引き起こされる狭義のオフターゲット作用に分類される (図 2.)。

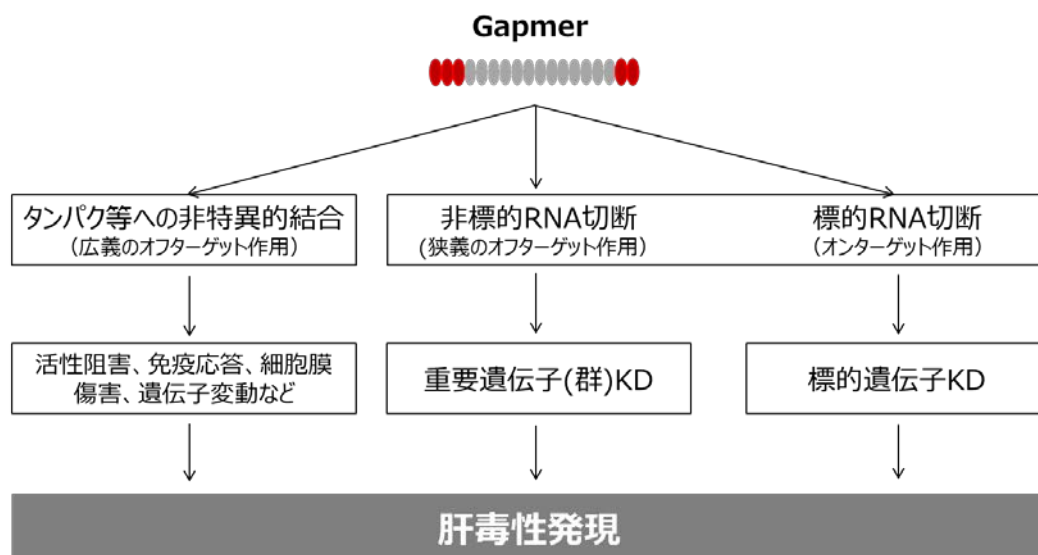


図 2. Gapmer 型アンチセンスの毒性メカニズム

Gapmer においても、臨床や非臨床モデルで肝毒性や腎毒性、血小板減少症、炎症などの副作用が確認されている[23]。この血小板減少症や炎症などは、核酸医薬品全般に通じる広義のオフターゲット作用と推察される。一方、肝毒性は Gapmer 投与でのみ臨床および非臨床モデルにおいて高頻度に認められていることから、Gapmer それ自身に潜在的な肝毒性懸念があると考えられる。実際に、mipomersen は投与患者に対して 10~20%の割合で肝障害が認められ、欧州においては不可逆的な肝障害リスクが理由の一つとして承認が拒絶されている[25,26]。Inotersen も投与患者の約 10%で肝障害マーカーである ALT (alanine transaminase) が上昇することが報告されている[27]。さらに、Gapmer は非臨床モデルにおいても肝毒性を惹起することが報告されている。まず、Wing 領域に LNA が導入された Gapmer はマウス単回投与において標的遺伝子に対して強力なノックダウン活性を示すものの、同時に肝障害マーカーである ALT および AST (aspartate aminotransferase) が大幅に上昇することが確認されている[28-30]。加えて、LNA 以外にも多様な化学修飾ヌクレオチドが導入された Gapmer が開発されているが、LNA を導入した場合と同様にノックダウン効果が強い修飾ヌクレオチドは肝毒性が強く、ノックダウン効果が弱い修飾ヌクレオチドは肝毒性も弱い傾向が示されている [11,21,31-33]。これらの報告から、Gapmer の化学構造を変化させることにより標的 RNA に対するノックダウン活性を制御することができるが、潜在的な肝毒性発現が完全に排除できないことが示唆されている。このように Wing 領域が化学修飾された Gapmer について、薬理活性と肝毒性を評価した報告は多い。

一方、毒性を高める可能性のある Gapmer の配列パターンおよび/または修飾モチーフ分析やマイクロアレイを用いた転写プロファイル解析なども報告されている[34-36]。さらに、最近、Burel らによって毒性を示す Gapmer をマウスに投与すると標的ではない転写産物、特に長鎖の pre-mRNA がノックダウンされる傾向があるとの報告がなされている[37]。別のグループも毒性を示す Gapmer が、pre-mRNA のイントロンとエキソン両方に対して非特異的に切断したことを *in vitro* において見出している [38]。これらの先行文献を考慮すると、Gapmer による狭義のオフターゲット作用が肝毒性発現の要因となる可能性も示唆される。しかしながらその毒性発現メカニズムについては、未だ詳細に解明されていないのが現状である。

以上のような背景から、今後、有効性および安全性の高い Gapmer を継続的に創製していくためには、臨床上課題となっている肝毒性を回避することが不可欠となっている。そこで本研究では「Gapmer 型アンチセンスによる肝毒性発現の要因」について、主に毒性発現メカニズム解明に焦点をあてた。具体的には、薬理活性および肝毒性の双方が強力な LNA 修飾 Gapmer をモデルとして用いて、生体内タンパク質との相互作用に起因する広義のオフターゲット作用や、標的

RNA に作用することで引き起こされるオンターゲット作用、また非特異的な RNA 切断に起因する狭義のオフターゲット作用について調査した (図 2.)。

第 1 章では、Gapmer の中央部、標的 mRNA の切断に重要な部分を化学修飾した Non-Gapmer (Mixmer ともいう) について薬理活性と肝毒性を評価した。第 2 章では、Gapmer の活性に必須な RNase H1 に対する siRNA を用いてマウス肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した場合に、Gapmer の薬理活性と肝毒性がどのように変動するかを検討した。第 3 章では、Gapmer と同一の mRNA 領域を標的とした siRNA を設計・合成して、Gapmer と siRNA について薬理活性と肝毒性を比較検討した。第 4 章では、Gapmer の作用部位を調査した。第 5 章では、ゲノム情報やマイクロアレイ解析を用いて、毒性を示す Gapmer と毒性を示さない Gapmer について標的 RNA 以外の完全一致配列もしくは類似した配列を有する RNA を切断することで生じると考えられる狭義のオフターゲット作用について検討した。これらの検討を通じて、Gapmer 型アンチセンスによる肝毒性発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。以下に、詳細を述べる。

本論

第1章 Gapmer の生物化学的/生物物理的特性が肝毒性発現に与える影響

【緒言】

核酸医薬品による毒性発現の要因の一つに、オリゴヌクレオチド構造やその代謝物などに由来する生物化学的/生物物理的特性が挙げられる[8]。それらの特性の中で、特定の塩基配列により引き起こされる Toll 様受容体 (toll-like receptor : TLR) を介した自然免疫応答が広く知られている[39]。特に、非メチル化 CpG (cytosine-phosphate-guanosine) モチーフと一部の非 CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチドは、TLR9 に認識されることで炎症反応を惹起し ALT および AST が上昇するとの報告がある[40,41]。一方、一部のオリゴヌクレオチドは TLR9 非依存性、おそらく他の TLR 依存性の免疫反応を惹起させる場合がある。アンチセンス核酸においても自然免疫応答を誘発させる場合があるが、化学修飾や配列設計により TLR 依存性の免疫応答を抑制できることが知られている[42-44]。

また、TCC や TGC などの塩基配列を有するアンチセンス核酸は、マウスへの投与により肝毒性を惹起するとの報告がある[34]。この肝毒性は、細胞内において何らかのタンパク質との相互作用により発現すると想定されているが、詳細は明らかとなっていない。加えて、核酸医薬品の体内動態も毒性発現に影響すると考えられている。PS 修飾オリゴヌクレオチドは、全身投与によりアルブミンなどの生体内分子に結合してデリバリーされることで肝臓や腎臓、脾臓などに集積する傾向があることが知られている[45]。実際に、マウスに mipomersen を投与すると肝臓や腎臓などに移行し、投与量によっては肝臓において Kupffer 細胞の肥大化や好塩基性顆粒への蓄積などが生じ ALT や AST、ビリルビンなどが上昇することが報告されている[46]。

さらに、核酸医薬品は各種ヌクレアーゼ分解耐性を考慮したオリゴヌクレオチドへの化学修飾が積極的に行われてはいるものの、その代謝物であるヌクレオシドの毒性も考慮に入れる必要がある。現在、多くのヌクレオシド類似体が抗ウイルス剤や抗癌剤などを目的に開発されているが、これらの化合物の多くは宿主の酵素やトランスポーターなどの必須分子の阻害に関連し、細胞毒性を引き起こすことが知られている [47]。

以上のような背景から、Gapmer は標的 RNA に対するハイブリダイゼーションに依存しない広義のオフターゲット作用により肝毒性を引き起こすリスクがある (図 2)。

【目的】

本章では、Gapmer および Non-Gapmer を用いて、オリゴヌクレオチド構造やその代謝物に起因する広義のオフターゲット作用について調査した。Gapmer は、標的 RNA の塩基配列に対して配列特異的にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションにより部分的に形成された DNA/RNA ヘテロ二重鎖に対して RNase H1 がリクルートされ、相補鎖 RNA 側が RNase H1 のエンドヌクレアーゼ活性により切断される[5,12-14]。Gapmer は、RNase H1 を介した RNA 切断を誘導するためには "Gap" 領域に少なくとも 7 塩基以上の DNA 鎖が必要とされる(図 1。)[5,6]。一方、Non-Gapmer は RNA 切断誘導に必須な "Gap" 領域に LNA を 2 塩基連続して配置するように設計した(図 3。)。この Non-Gapmer は、標的 RNA に対して配列特異的にハイブリダイズできるが "Gap" 領域への化学修飾により RNase H1 のリクルートもしくはエンドヌクレアーゼ活性が阻害され、標的 RNA に対する切断活性が消失すると考えられた [5]。また、今回用いた Gapmer および Non-Gapmer は同一塩基配列を有し、かつオリゴヌクレオチドとして構造類似性が高いために体内および細胞内動態はほぼ同様の挙動を示すと想定された(表 1。)

以上のことを踏まえ、Gapmer および Non-Gapmer をマウスに投与しそれぞれの薬理活性と肝毒性発現を比較検討することにより、オリゴヌクレオチド構造やその代謝物に由来する生物化学的/生物物理的特性が肝毒性に与える影響について調査できると考えた。

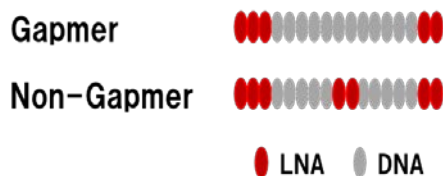


図3. GapmerとNon-Gapmer (Mixer) の構造

【方法】

1. 使用化合物

1-1. 標的遺伝子

本検討では、グルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor : GR) およびアシル CoA 合成酵素 1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 : Acs11) をモデル遺伝子として選定した。GR は、核内受容体スーパーファミリーに属する分子でありヒドロコルチゾンに対する受容体として、さらにはリガンド依存的に核内へ移行し転写調節因子としても作用することが知られて

いる[48]。また、GR を標的にした Gapmer は *in vivo* でノックダウン活性を示し、かつ肝障害マーカーである ALT および AST が上昇するとの報告がある[29]。一方、Acs11 は肝臓や脂肪組織などで発現し長鎖脂肪酸を CoA 化する酵素として知られ、主に小胞体 (ER) に局在してトリグリセリド (TG) の合成に関与することが報告されている[49]。

1-2. アンチセンス核酸

株式会社ジーンデザインで合成、精製された化合物を使用した。本章で使用したアンチセンス核酸の ID と塩基配列を以下に示す (表 1.)。

表 1. 本章で使用した化合物リスト

ID	Target	Type of ASO	Sequence*	ref
GR-Gapmer	GR	Gapmer	5'-GTCtctttaccTGG-3'	29
GR-NonGapmer		Non-Gapmer	5'-GTCtctTTaccTGG-3'	-
Acs11-Gapmer	Acs11	Gapmer	5'-CTCcatgacacagcaTTa-3'	-
Acs11-NonGapmer		Non-Gapmer	5'-CTCcatgaCAcagcaTTa-3'	-

*All of oligonucleotides were fully modified with phosphorothioate. Upper case; LNA, Lower case: DNA

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与、採血、および臓器採取

7 週齢の雄性 C57BL6/J マウス (日本クレア) に、生理食塩水に溶解した GR-Gapmer および GR-NonGapmer はそれぞれ 10mg/kg、Acs11-Gapmer および Acs11-NonGapmer はそれぞれ 20mg/kg の投与量にて、さらにコントロールとして生理食塩水を皮下投与した。化合物を投与後、4 および 7 日目に尾静脈から採血した。10 日目に sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取後、肝臓を摘出した。肝臓は PBS で洗浄し重量を測定後、qRT-PCR 解析のために一部 (約 40mg) を RNAlater (QIAGEN) に浸し 4°C で一晚インキュベートした後に、解析まで -80°C で保存した。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で RNA を精製し、Superscript III First Strand Synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を SYBR Premix Ex

Taq II (Takara Bio) 、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーセットは以下に示した (表 2.)。

表 2. 本章で使用したプライマーリスト

Gene		Primer Sequence
Acsl1	Forward	GCAGCGGCATCATCAGAAAC
	Reverse	TGTCACCATCAGCCGGACTC
GR	Forward	GTGAAATGGGCAAAGGCGATAC
	Reverse	CAGGGCAAATGCCATGAGAA
IFN α	Forward	CTGTGCTTCTGATGGTCCTG
	Reverse	GGAATCCAAAGTCCTTCTGTCCT
IFN γ	Forward	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA
	Reverse	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
IL6	Forward	CAACGATGATGCACTTGACAGA
	Reverse	CTCCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

5. ALT および AST の測定

ALT および AST は Transaminase CII-test Wako (和光純薬工業) を使用し添付のマニュアルに従って測定した。

6. 統計解析

解析結果の統計比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。特に記載がない限り、データは平均 \pm 標準偏差 (SD) で表記し、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

実験 1 : GR を標的とした Gapmer および Non-Gapmer の肝毒性とノックダウン活性比較

1-1. Gapmer および Non-Gapmer 投与による肝毒性比較

GR-Gapmer 投与群では、ALT および AST は 4 日目にそれぞれ 238 U/L、208 U/L と生理食塩水投与群と比較して有意に上昇し、その上昇は 10 日目まで持続した。一方、GR-NonGapmer 投与群では、ALT および AST の有意な上昇は認められなかった (図 4.a,b)。次に、肝臓重量を測定した[28]。GR-Gapmer 投与群から単離された肝臓の重量は生理食塩水投与群と比較して 1.16 倍増加したが、GR-NonGapmer 投与群では有意な増加は認められなかった (図 4.c)。さらに、マウ

ス肝臓中の炎症性サイトカインを測定した。GR-Gapmer 投与群では、IFN- γ (interferon- γ) および TNF- α (tumor necrosis factor- α) の mRNA 発現量が生理食塩水投与群と比較して有意に増加したが、GR-NonGapmer 投与群では有意な増加は確認されなかった (図 4.e)。

1-2. マウス肝臓中 GR のノックダウン活性評価

マウス肝臓中 GR の mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した結果、GR-Gapmer 投与群では生理食塩水投与群と比較して 77%減少したが、GR-NonGapmer 投与群では生理食塩水投与群と比較して変化がなかった (図 4.d)。

実験 2 : Acs11 を標的とした Gapmer および Non-Gapmer の肝毒性とノックダウン活性比較

2-1. Gapmer および Non-Gapmer 投与による肝毒性比較

Acs11-Gapmer 投与群では、ALT および AST は 4 日目には生理食塩水投与群と比較して有意に上昇 (652 U/L および 646 U/L) し、それ以降 10 日目まで持続した。一方、Acs11-NonGapmer 投与群では有意な上昇は認められなかった (図 5.a,b)。また、肝臓重量は Acs11-Gapmer 投与群においては生理食塩水投与群と比較して 1.23 倍増加したが、Acs11-NonGapmer 投与群では有意な増加は認められなかった (図 5.c)。さらに、マウス肝臓中の炎症性サイトカインを測定したところ、Acs11-Gapmer 投与群では IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 (interleukin-6) の mRNA 発現量が生理食塩水投与群と比較してそれぞれ有意に増加したが、Acs11-NonGapmer 投与群では増加しなかった (図 5.e)。

2-2. マウス肝臓中 Acs11 のノックダウン活性評価

マウス肝臓中 Acs11 の mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した結果、Acs11-Gapmer 投与群では生理食塩水投与群と比較して 81%減少したが、Acs11-NonGapmer 投与群では生理食塩水投与群と比較して変化がなかった (図 5.d)。

以上の結果から、GR-Gapmer および Acs11-Gapmer をマウスに投与すると、肝臓における遺伝子ノックダウンと肝毒性発現が同時に認められた。一方、” Gap ” 領域の DNA 2 塩基を LNA 2 塩基に置換した GR-NonGapmer および Acs11-NonGapmer を投与すると、それぞれのノックダウン活性と肝毒性が同時に消失することが確認された。

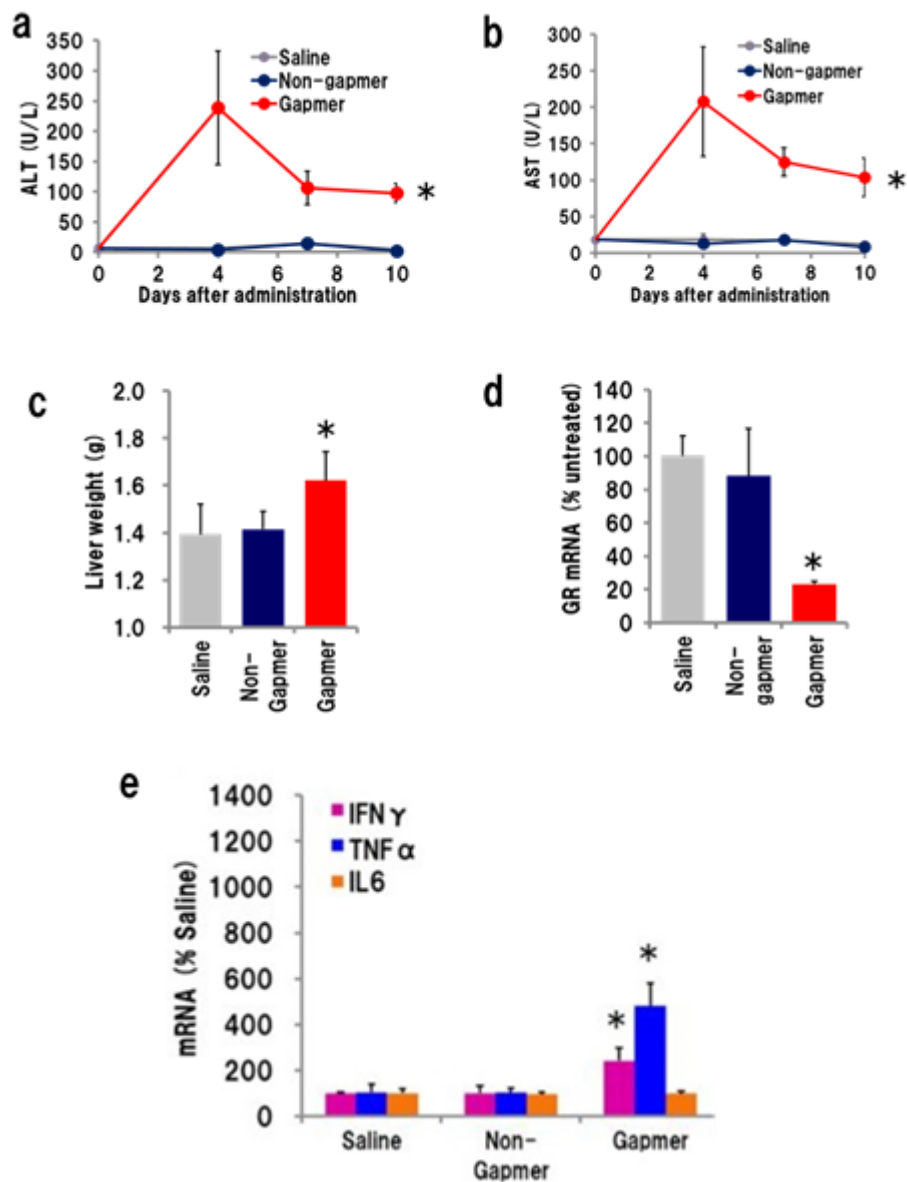


図4. GR-Gapmer は肝毒性を示したが、GR-NonGapmer は肝毒性を示さなかった。

(a-c) Gapmer 投与群では ALT および AST の上昇や肝臓重量の増加が認められたが、Non-Gapmer 投与群では確認されなかった。(d) Gapmer 投与群でのみノックダウン活性が認められた。(e)

Gapmer 投与群でのみマウス肝臓中の IFN- γ , TNF- α mRNA 発現量が増加した。(n=4, mean \pm S.D.

*P<0.05, Mann-Whitney U test, vs saline)

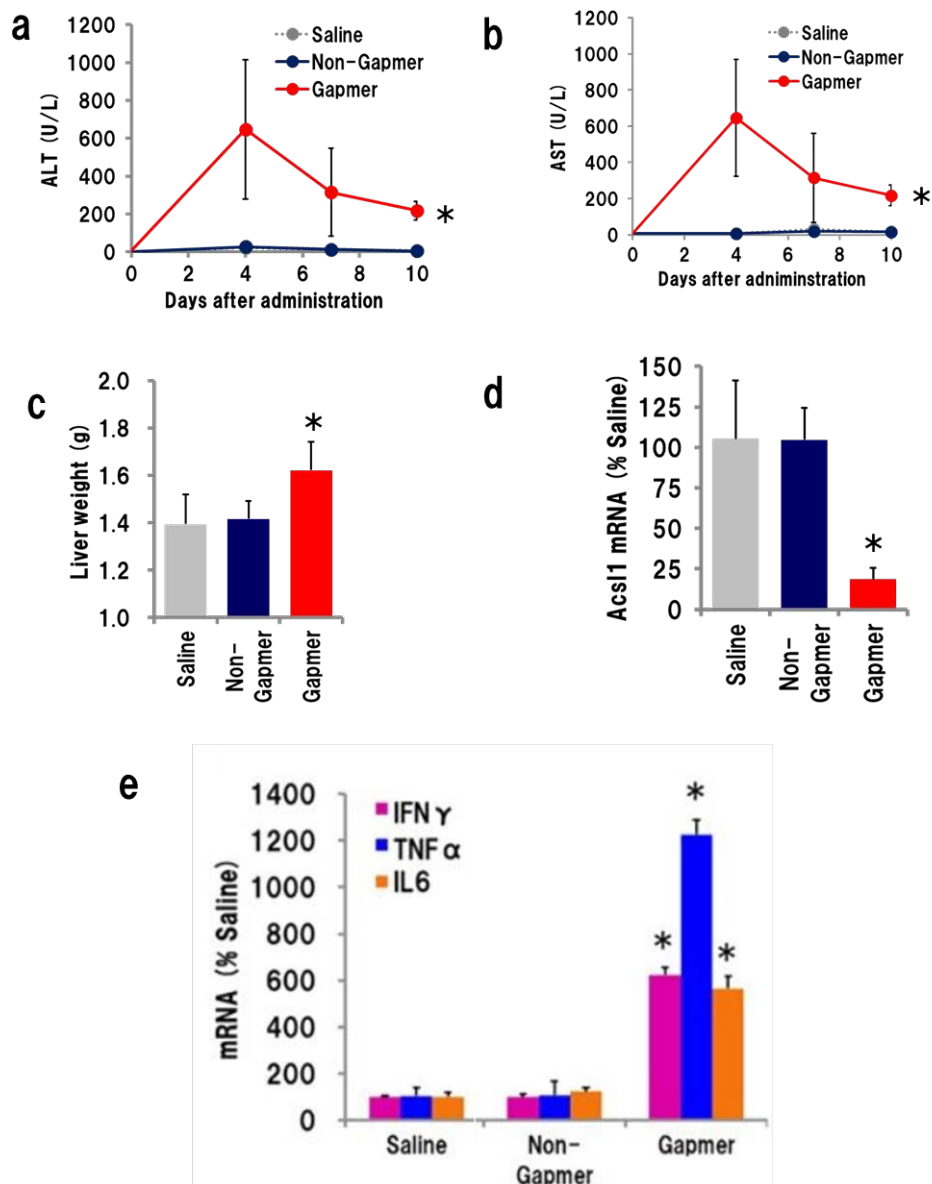


図5. Acs1-Gapmer は肝毒性を示したが、Acs1-NonGapmer は肝毒性を示さなかった。

(a-c) Gapmer 投与群では ALT および AST の上昇や肝臓重量の増加が認められたが、Non-Gapmer 投与群では確認されなかった。(d) Gapmer 投与群でのみノックダウン活性が認められた。(e) Gapmer 投与群でのみマウス肝臓中の IFN- γ , TNF- α , IL-6 mRNA 発現量が増加した。(n=4, mean \pm S.D. *P<0.05, Mann-Whitney U test, vs saline)

【考察】

GR を標的にした Gapmer をマウスに投与すると、標的のノックダウンとともに重篤な肝毒性を惹起することが既に報告されている[29]。本章においても、既報と同じ配列を持つ 14 塩基長の GR-Gapmer をマウスに投与した結果、肝臓中 GR mRNA のノックダウンとともに肝毒性が惹起されることが確認された。一方、GR-Gapmer と同一の塩基配列ではあるが ” Gap ” 領域を化学修飾した GR-NonGapmer を投与すると、ノックダウン活性と肝毒性が同時に消失することが認められた。さらに同様の現象が、標的遺伝子や塩基配列、塩基長（18 塩基）が異なる Acs11-Gapmer および Acs11-NonGapmer においても確認された。

以上、Gapmer 投与による肝毒性は、Non-Gapmer 投与の場合には惹起されなかったことから、” Gap “ 構造に起因すると考えられた。つまり、この肝毒性は PS 修飾や LNA 修飾など化学修飾されたオリゴヌクレオチド構造やその代謝物に起因する広義のオフターゲット作用により惹起されるのではなく、RNA 切断に依存する可能性が示唆された。

第2章 Gapmer による肝毒性発現の要因検討

【緒言】

Gapmer は、細胞内において標的の塩基配列に対して配列特異的にハイブリダイズすることにより、RNase H 依存的に標的 RNA を切断する[5]。特に mRNA や pre-mRNA の切断は翻訳過程の抑制に繋がるため、標的タンパク質の生成を抑えることが可能となる。

この Gapmer の活性発現に重要な役割を果たす RNase H は、DNA と RNA がハイブリダイズした DNA/RNA ヘテロ二重鎖の RNA 側のリン酸ジエステル結合を、切断部位の 3'-末端側を水酸基に、そして 5'-末端側をモノリン酸基に特異的に加水分解するエンドヌクレアーゼとして報告されている[15]。この RNase H は生物種を問わず普遍的に存在しており、基質選択性の違いにより進化的に関連したグループとして RNase H1 と RNase H2 に大別される[50]。

それらの中で RNase H1 は、基質の切断に少なくとも 4 つの連続したリボヌクレオチドを必要とする酵素として核内およびミトコンドリアに局在することが報告されている[15,51]。また、RNase H1 は DNA 複製の際の RNA プライマーの除去や転写に関連した R ループ構造のプロセッシングなどゲノムの維持作業への関与が示唆されている[52,53]。

一方、RNase H2 は DNA/RNA ヘテロ二重鎖の RNA 側の切断活性だけでなく、二本鎖 DNA に一つだけ埋め込まれた RNA の 5'-末端側を切断する活性も有する。この RNase H2 は 3 つのサブユニットから構成されるが、それらの中でも RNase H2a に RNA の切断に必要なコアドメインが存在していることが明らかとなっている [54-57]。近年、DNA 複製時に DNA ポリメラーゼによりゲノムに一部 RNA が取り込まれること、そして RNase H2 がそれを除去しゲノム安定性維持に寄与していることが報告された[54]。

以上のように生体内において RNase H は、DNA の複製と修復に極めて重要な役割を果たしていることが示唆されている。Gapmer は、この自然界の RNase H を介した RNA 切断機構を概念的に上手く利用しているとも言えるが、一方において臨床や非臨床モデルにおいて高頻度で肝毒性を惹起することも報告されている[23]。

第1節 siRNA を用いた RNase H 発現抑制とその肝毒性発現への影響

【目的】

第1章において Gapmer による肝毒性は、オリゴヌクレオチド構造やその代謝物に起因する広義のオフターゲット作用により引き起こされるのではなく、“Gap”構造に起因する RNA 切断が発現要因の一つであることが示唆された。この Gapmer は、RNase H を介して RNA の切断を誘導する[5]。そこで本章では、Gapmer による RNase H 依存的な RNA 切断と肝毒性発現には何らかの関連性があるとの仮説を立て、マウス肝臓中の RNase H 発現抑制が Gapmer 投与による肝毒性惹起にどのような影響を与えるかを調査した。

遺伝子発現を抑制する手法として、アンチセンス法以外に RNA 干渉作用 (RNA interference : RNAi) が広く知られている[58,59]。この RNAi は、小分子 RNA により相補的な配列をもつ遺伝子の発現が抑制される現象として、1998 年に線虫についてはじめて報告され、2001 年には真核生物に特異的な遺伝子発現の制御機構として広く保存されていることが判明した。さらに、哺乳類細胞では 21-23 塩基の短い二本鎖 RNA (siRNA) によって RNAi 効果が得られることが明らかとなった。以上のことから siRNA は、遺伝子機能解析などの研究用ツールとしての活用のみならず、核酸医薬品への積極的な応用が進められている。一方、siRNA は生体内において分解されやすいという欠点があるため、何らかの薬物送達システム (drug delivery system : DDS) により標的臓器および細胞に送達させる必要がある。

本節では、まず RNase H に対する siRNA を用いてマウス肝臓中の RNase H の発現抑制が可能かどうかを検討した。具体的には、オリゴヌクレオチドを肝臓に効率的に送達できる DDS キャリアとして知られている invivofectamine® 2.0 を用いて siRNA との複合体 (siRNA-invivofectamine) を調製し、マウスにその複合体を尾静脈内投与することにより肝臓中の RNase H1 および RNase H2a の発現が抑制可能かどうかを調査した。また、siRNA-invivofectamine 複合体をマウスに投与すること自体が、肝毒性を惹起するかどうか併せて調査した。

【方法】

1. 使用化合物

1-1. siRNA

RNase H1、RNase H2a、およびネガティブコントロールの siRNA (それぞれ si-RNaseH1、si-RNaseH2a、および si-N.C.) は、Life Technologies から Stealth™ RNAi を購入した。また、RNase

H2 は 3 量体として知られているが、RNase H2a に RNA 切断に必須な活性中心があるため si-RNaseH2a を購入した[54,55]。

1-2. siRNA-invivofectamine 複合体

siRNA-invivofectamine 複合体は、以下のように調製したものを使用した。250 μ l の 3 mg/ml siRNA 水溶液と 250 μ l の complexation buffer を混合して siRNA 溶液を調製した後に、500 μ l の invivofectamine[®] 2.0 (Life Technologies) 試薬を加えた混合物を 50°C で 30 分間インキュベートした。さらに混合溶液を Float-A-Lyzer G2 (Spectrum Laboratories) を用いて 1000 倍量の PBS に対して 1 時間透析することで、siRNA 換算で最終濃度 7mg siRNA/kg の siRNA-invivofectamine 複合体とした。

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与、採血、および臓器採取

7 週齢の雄性 C57BL/6/J マウス (日本クレア) に対して、siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) をそれぞれ 7mg siRNA/kg、またコントロールとして生理食塩水を尾静脈から投与した。siRNA-invivofectamine 複合体を投与後、6、9、12 日目にそれぞれ sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取後、肝臓を摘出した。肝臓は PBS で洗浄後、ウエスタンブロッティング解析のために約 100mg を液体窒素で瞬間凍結し解析まで -80°C にて保存した。また qRT-PCR 解析のために約 40mg を RNeasy (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後、解析まで -80°C で保存した。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で RNA を精製し、Superscript III First Strand Synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) 、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーセットは以下に示した (表 3)。

表 3. 使用したプライマーリスト

Gene		Primer Sequence
RnaseH1	Forward	ACGAGCAGGAATTGGCGTTTAC
	Reverse	CTGAGCCTTGGCTTGCATGA
RnaseH2a	Forward	CCCGAGACAAGGCTGTGAAGA
	Reverse	TGTGCTCCAACCTGAACCGTACAA
IFN α	Forward	CTGTGCTTTCCTGATGGTCCTG
	Reverse	GGAATCCAAAGTCCTCCTGTCCT
IFN γ	Forward	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA
	Reverse	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

5. ALT および AST の測定

ALT および AST は Transaminase CII-test Wako (和光純薬工業) を使用し添付のマニュアルに従って測定した。

6. ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質の検出

肝臓組織は、TissueLyzer (Qiagen) により 7mm ステンレススチールビーズを用いて 5 倍量の放射免疫沈降アッセイ緩衝液 (Sigma-Aldrich) 存在下でホモジナイズした。ホモジネートしたタンパク質濃度は、BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。12.5 μ g のホモジネートを SDS-PAGE にかき PVDF 膜に電氣的に転写し、一次抗体として抗 RNaseH1 抗体 (Proteintech ; 抗体希釈率 1 : 1200) や抗 β -アクチン抗体 (Sigma-Aldrich ; 抗体希釈率 1 : 1000) を反応させ、さらに HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 結合二次抗体 (GE Healthcare) を反応させた。その後、ECL システム (GE healthcare) を用いて化学発光させメンブレン上のバンドを検出した。

7. 統計解析

解析結果の統計比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。特に記載がない限り、データは平均 \pm 標準偏差 (SD) で表記し、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

1. siRNA-invivofectamine 複合体を用いた RNase H 発現抑制評価

まず初めに、RNase H に対する siRNA と invivofectamine[®] 2.0 の複合体を投与することにより、マウス肝臓中 RNase H1 および RNase H2a の発現抑制を検討した。調製した siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) または生理食塩水をそれぞれ尾静脈投与し、6、9、12 日目のマウス肝臓中 RNase H1 および RNase H2a の mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した。その結果、投与 6 日目には生理食塩水投与群と比較してそれぞれ 63% および 74% 減少し、有意なノックダウン効果は 12 日目まで続いた (図 6.a,b)。一方、ネガティブコントロール投与群は生理食塩水投与群と比較して有意なノックダウン効果は示さなかった。さらにウエスタンブロッティング法により RNaseH1 タンパクの発現を確認すると、siRNA-invivofectamine 複合体投与後 6 日目から 12 日目まで 50% 未満に減少した (図 6.e)。

2. siRNA-invivofectamine 複合体投与による肝毒性評価

siRNA (si-RNaseH1、si-RNaseH2a) と invivofectamine[®] 2.0 の複合体を投与することで、マウス肝臓中 RNase H1 および RNase H2a の発現抑制が可能となった。そこで次に、siRNA-invivofectamine 複合体を投与すること自体が肝毒性を引き起こすかどうかを検討した。まず ALT および AST を測定した結果、生理食塩水投与群と比較して有意な上昇を示さなかった (図 6.c,d)。さらに、マウス肝臓における IFN- α および IFN- γ mRNA の発現レベルを調査した。その結果、IFN- α mRNA の発現レベルは変化がなかった。一方、すべての siRNA-invivofectamine 複合体投与群において IFN- γ mRNA の発現レベルがわずかに増加傾向を示したものの、生理食塩水投与群と比較して有意差はなかった (図 6.f)。

以上の結果から、マウス肝臓中 RNase H1 および RNase H2a の発現を抑制できるツール化合物として siRNA-invivofectamine 複合体が利用できることが確認された。

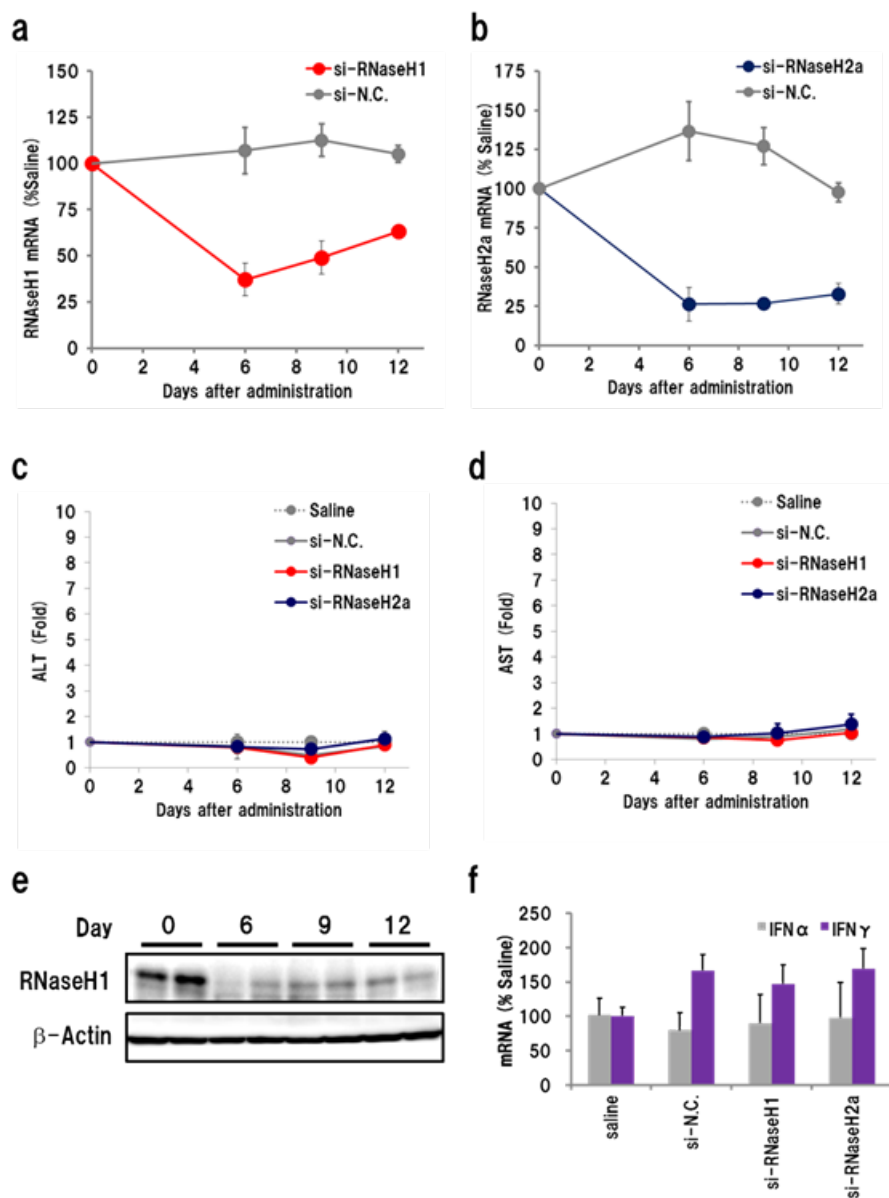


図 6. siRNA-invivofectamine 複合体投与によりマウス肝臓中 RNase H の発現抑制が可能であった。(a,b)複合体投与 6 日後に RNase H1 は 63%、RNase H2a は 74%ノックダウンされ、有意な効果は 12 日目まで続いた。(c,d)ALT および AST は、有意な上昇を示さなかった。(e)si-RNaseH1 を投与することにより、RNaseH1 はタンパクレベルで 50%未満に減少した。(f)複合体投与により肝臓中 IFN- γ mRNA 発現量はわずかに増加傾向を示したが有意差はなかった。(n=3, mean \pm S.D.)

第2節 RNase H 発現抑制と Gapmer による肝毒性発現との関連

【目的】

前節において、肝臓中の標的遺伝子を効率的に抑制できる siRNA-invivofectamine 複合体を用いることにより、毒性を惹起させることなくマウス肝臓中 RNase H1 および RNase H2a の発現抑制が可能となった。そこで次に Gapmer による RNase H 依存的な RNA 切断と肝毒性発現との関連性を調査するために、以下の2段階で化合物投与を実施した。

step1 : siRNA (si-RNaseH1 および si-RNaseH2a) -invivofectamine 複合体を尾静脈投与することにより、マウス肝臓中の RNase H1 および RNase H2a をノックダウンする。

step2 : RNase H1 および RNase H2a の発現抑制後 (siRNA 投与から2日後) に、Gapmer を投与する。

上記による化合物投与を行うことにより、マウス肝臓中 RNase H の発現を抑制した場合に、Gapmer 投与により惹起される肝毒性がどのように変動するかを検討した。

【方法】

1. 使用化合物

1-1. 標的遺伝子

本検討では、第1章で使用した GR および Acs11 と、新たに選定したアポリポタンパク質 B (apolipoprotein B : ApoB)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 : Hprt1)、およびヒトキネシンファミリーメンバー11 (human kinesin family member 11 : human KIF 11) の計5つをモデル遺伝子として用いた。なお、ApoB は LDL (low density lipoprotein) 受容体のリガンドとして知られおり、この ApoB を標的にした Gapmer をマウスに投与にすることにより非高密度リポタンパク質コレステロール (non-high-density lipoprotein cholesterol : non-HDL-C) が減少することが報告されている[60]。また、Hprt1 はハウスキーピング遺伝子として広く知られている。さらに、human KIF 11 は有糸分裂中に双極紡錘体を確立するために必要なモータータンパク質として報告されており、本検討では既報配列を改変し合成した[61]。

1-2. Gapmer

株式会社ジーンデザインで合成、精製された化合物を使用した。本章で使用した Gapmer の ID と塩基配列を以下に示す (表 4.)

表 4. 本節で使用した Gapmer のリスト

ID	Target	Sequence*	Ref.
GR-Gapmer	GR	5'-GTctttaccTGG-3'	29
Acs11-Gapmer	Acs11	5'-CTCcatgacacagcaTTa-3'	-
ApoB -Gapmer	ApoB	5'-GCattggtatTCA-3'	60
Hprt1-Gapmer	Hprt1	5'-GGcataaccTGG-3'	-
hKif11-Gapmer	**human KIF11	5'-TCCaagtctactgtAGT-3'	61
*All of oligonucleotides were fully modified with phosphorothioate. Upper case: LNA, Lower case: DNA			
**Human Kif11 gapmer is 2-mer shorter than original 2'MOE gapmer (ISIS183881).			

1-3. siRNA

第 1 節で使用した siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) をそれぞれ実験に供した。

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与、採血、および臓器採取

実験 1：肝臓中 RNase H1 発現抑制下における GR-Gapmer の肝毒性発現検討

7 週齢の雄性 C57BL6/J マウス (日本クレア) に対して、siRNA- invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-N.C.) 7mg siRNA/kg、またはコントロールとして生理食塩水をそれぞれ尾静脈から投与した。その投与 2 日後に、生理食塩水に溶解した GR-Gapmer を 10mg/kg の投与量で皮下投与した。Gapmer 投与後、4 および 7 日目に尾静脈から採血、10 日目に sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取後、肝臓を摘出した (図 7.a)。肝臓は PBS で洗浄後、qRT-PCR 解析のために約 40mg を RNeasy (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後に -80°C で解析まで保存した。

実験 2：肝臓中 RNase H1 および H2a 発現抑制下における Acs11-Gapmer の肝毒性発現検討

7 週齢の雄性 C57BL6/J マウス (日本クレア) に対して、siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) をそれぞれ 7mg siRNA/kg で尾静脈投与を行い、その投与 2 日後に Acs11-Gapmer を 20mg/kg の投与量で生理食塩水に溶解し皮下投与した。Gapmer 投与後、10

日目に sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取後、肝臓を摘出した (図 8.a)。肝臓は PBS で洗浄後、液体窒素で瞬間凍結し解析まで -80°C にて保存した。また qRT-PCR 解析のために一部 (約 40mg) を RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後、解析まで -80°C で保存した。

実験 3：肝臓中 RNase H1 発現抑制下における ApoB、Hprt1、hKif11-Gapmer の肝毒性発現検討
7 週齢の雄性 C57BL/6/J マウス (日本クレア) に対して、siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-N.C.) をそれぞれ 7mg siRNA/kg で尾静脈投与を行い、その投与 2 日後に ApoB、Hprt1、hKIF11-Gapmer をそれぞれ 80、20、80mg/kg の投与量で皮下投与した。Gapmer 投与後、3 および 5 日に尾静脈から採血、7 日目には sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取した (図 10.a)。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で RNA を精製し、Superscript III First Strand Synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーセットは以下に示した (表 5.)。

表 5. 使用したプライマーリスト

Gene		Primer Sequence
Acs11	Forward	GCAGCGGCATCATCAGAAAC
	Reverse	TGTCACCATCAGCCGGACTC
GR	Forward	GTGAAATGGGCAAAGGCGATAC
	Reverse	CAGGGCAAATGCCATGAGAA
RnaseH1	Forward	ACGAGCAGGAATTGGCGTTTAC
	Reverse	CTGAGCCTTGGCTTGCATGA
RnaseH2a	Forward	CCCGAGACAAGGCTGTGAAGA
	Reverse	TGTGCTCCAACCTGAACCGTACAA
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

5. ALT および AST の測定

ALT および AST は Transaminase CII-test Wako（和光純薬工業）を使用し添付のマニュアルに従って測定した。

6. ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質の検出

採取した肝臓は、TissueLyzer（Qiagen）により 7mm ステンレススチールビーズを用いて 5 倍量の放射免疫沈降アッセイ緩衝液（Sigma-Aldrich）存在下でホモジナイズした。ホモジネートしたタンパク質濃度は、BCA アッセイキット（Thermo Fisher Scientific）を使用して測定した。12.5 μ g のホモジネートを SDS-PAGE にかき PVDF 膜に電氣的に転写し、一次抗体として抗 RNaseH1 抗体（Proteintech；抗体希釈率 1：1200）や抗 Acs11 抗体（Cell Signaling Technology；抗体希釈率 1：1000）、または抗 β -アクチン抗体（Sigma-Aldrich；抗体希釈率 1：1000）を反応させ、さらに HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）結合二次抗体（GE Healthcare）を反応させた。その後、ECL システム（GE healthcare）を用いて化学発光させメンブレン上のバンドを検出した

7. TUNEL（TdT-mediated dUTP nick end labeling）法によるアポトーシス細胞の同定

マウス肝組織におけるアポトーシス細胞の検出は、GE Healthcare 製の In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein を用いて添付のマニュアルに従い TUNEL 法により実施した。まずマウス肝臓から厚さ 10 μ m の凍結切片を調製した。その切片を 0.1% Triton-X 100 を含む 0.1% クエン酸を用いて氷上で 2 分間インキュベートし PBS で洗浄後に、37 $^{\circ}$ C で 60 分間 TUNEL 反応溶液に浸漬した。PBS で洗浄した後、切片を共焦点顕微鏡 FV500（Olympus）にて観察し、細胞数をカウントした。

8. 統計解析

解析結果の統計比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。特に記載がない限り、データは平均 \pm 標準偏差（SD）で表記し、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

実験 1：肝臓中 RNase H1 発現抑制下における GR-Gapmer の肝毒性発現検討

本実験では、予め肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した条件下で、肝毒性を示すことがわかっている GR-Gapmer を投与した場合に肝毒性がどのように変動するかを検討した。まず前処置として siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-N.C.) または生理食塩水をそれぞれ尾静脈内投与し、その 2 日後に GR-Gapmer を皮下投与し 4、7 日目に採血、10 日目に解剖した (図 7.a)。

1-1. GR-Gapmer 投与による肝毒性比較

si-RNaseH1 前処置群は、siRNA 未投与群と比較して ALT および AST に有意な変化がなかった。一方、si-N.C.と生理食塩水前処置群においては siRNA 未投与群と比較して、4 日目以降 ALT および AST が有意に上昇し、その上昇は 10 日目まで持続した (図 7.b,c)。

1-2. マウス肝臓中の RNase H1 mRNA 発現量比較

GR-Gapmer 投与 10 日後のマウス肝臓中 RNase H1 mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した結果、si-RNaseH1 前処置群は生理食塩水前処置群と比較して 60%程度減少した。一方、si-N.C. 前処置群は生理食塩水前処置群と比較して有意な変化がなかった (図 7.d)。

1-3. マウス肝臓中の GR mRNA 発現量比較

GR-Gapmer 投与 10 日後のマウス肝臓中 GR mRNA 発現量を qRT-PCR により定量した結果、si-N.C.および生理食塩水前処置群と比較して、si-RNaseH1 前処置群でのみノックダウン効果が有意にキャンセル (10%程度) された (図 7.e)。

以上の結果から、si-RNaseH1 を用いて肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した条件下で、GR-Gapmer を投与するとノックダウン活性と肝毒性が減弱することが明らかとなった。

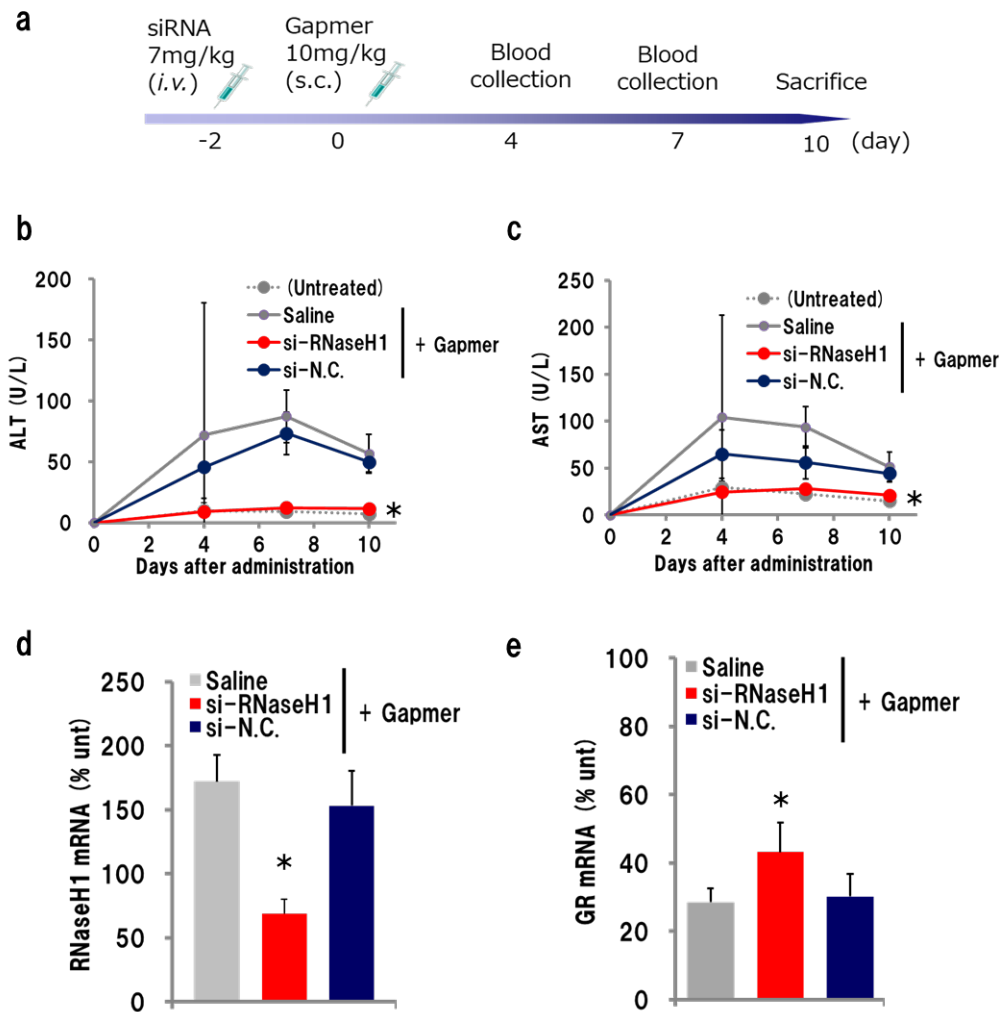


図 7. マウス肝臓中 RNase H1 の発現抑制下において GR-Gapmer を投与すると肝毒性が抑制された。(a) 実験プロトコル (b,c) 肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した後に、Gapmer を投与しても ALT および AST は未投与群と比較して有意な変化がなかった。一方、si-N.C.または生理食塩水前処置群では ALT および AST が上昇した。(d) si-RNaseH1 前処置群の肝臓中 RNaseH1 mRNA 発現量は、生理食塩水前処置群と比較して 60%程度減少した (Gapmer 投与 10 日後)。(e) si-RNaseH1 前処置群は、生理食塩水前処置群と比較して Gapmer のノックダウン効果が 10%程度有意にキャンセルされた。(n=4, mean ± S.D., *P<0.05, Mann-Whitney U test, vs saline+gapmer).

実験 2：肝臓中 RNase H1 および H2a 発現抑制下における Acs11-Gapmer の肝毒性発現検討

次に、Acs11-Gapmer を用いて肝臓中 RNase H1 および H2a 発現抑制下における肝毒性変動を調査した。本実験では、前処置として siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) をそれぞれ静脈内投与した 2 日後に、Gapmer を皮下投与し 10 日目に解剖した (図 8.a)。

2-1. Acs11-Gapmer 投与による肝障害マーカー比較

si-RNaseH2a または si-N.C. 前処置群において Acs11-Gapmer を投与すると、ALT は 170U/L 程度、AST は 180U/L 程度まで上昇した。一方、si-RNaseH1 前処置群では Acs11-Gapmer を投与しても ALT および AST は有意に上昇しなかった (図 8.b,c)。

2-2. マウス肝臓中の Acs11 発現比較

各 siRNA-invivofectamine 複合体 (si-RNaseH1、si-RNaseH2a、si-N.C.) を投与後、生理食塩水を投与したがマウス肝臓中 Acs11 mRNA 発現量は変動しなかった。しかしながら、Acs11-Gapmer 投与群では si-RNaseH2a と si-N.C. 前処置群において mRNA 発現量が約 80% 減少した。一方、si-RNaseH1 前処置群では Acs11-Gapmer 投与により mRNA 発現量が 63% の減少であったことから、si-RNaseH2a と si-N.C. 前処置群と比較して約 20% ノックダウンがキャンセルされた (図 8.d)。次に、ウェスタンブロッティング法により Acs11 タンパク発現を調査した。Acs11-Gapmer 投与により、すべての siRNA 前処置群で効果的に Acs11 タンパク量が減少したが、その発現レベルは si-RNaseH2a と si-N.C. 前処置群と比較して si-RNaseH1 前処置群の方が弱かった (図 8.e)。

2-3. マウス肝臓中の RNase H1 および RNase H2a mRNA 発現量比較

マウス肝臓中 RNase H1 は、si-RNaseH1 の前処置群でのみ、生理食塩水投与コントロール群と比較して mRNA 発現量が約 50% 減少した (図 9.a)。RNase H2a も si-RNaseH2a の前処置群でのみ生理食塩水投与コントロール群と比較して mRNA 発現量が約 50% 減少した (図 9.b)。これらのノックダウン効率は、Gapmer 投与群と生理食塩水投与群では同等であった。

2-4. 各前処置群における TUNEL アッセイ

これまでの報告から LNA 修飾 Gapmer は、マウス肝臓でアポトーシスを引き起こすことが知られている [29]。そこで、各 siRNA で前処置後、Acs11-Gapmer を投与されたマウスから調製した肝臓凍結切片を用いて TUNEL アッセイを実施した。その結果、si-N.C. または si-RNaseH2a の前処置 Gapmer 投与群において 30-40 視野当たりにつき一つ TUNEL 陽性細胞が観察された。一方、si-RNaseH1 前処置 Gapmer 投与群において TUNEL 陽性細胞は観察されなかった (図 9.c)。

以上の結果から、si-RNaseH1 を用いて肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した条件下において、Acs11-Gapmer を投与するとノックダウン活性と肝毒性が减弱した。一方、同様に RNase H2a の発現を抑制してもノックダウン活性と肝毒性発現には影響を及ぼさなかった。

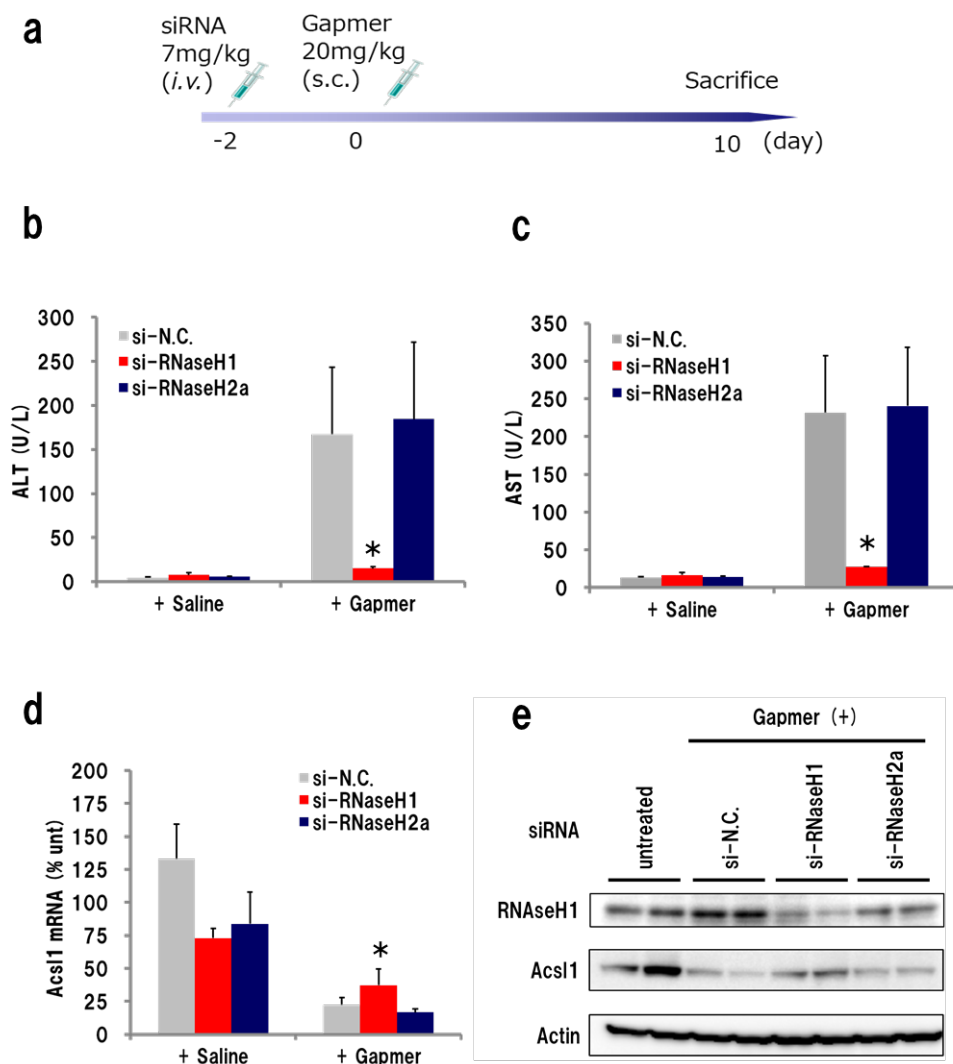


図 8. マウス肝臓中 RNase H1 の発現抑制下において Acs11-Gapmer を投与すると肝毒性が抑制された。(a)実験プロトコル (b,c) si-RNaseH1 を用いて肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した後に Gapmer を投与したところ、Gapmer 未投与群と比較して ALT および AST は有意な上昇が認められなかった。一方、si-N.C.または si-RNaseH2a 前処置群では ALT および AST が上昇した。(d) Gapmer 投与の場合、si-RNaseH1 前処置群の肝臓中 Acs11 mRNA ノックダウン率は 63%となり、si-N.C または si-RNaseH2a 前処置群と比較して約 20%ノックダウン率がキャンセルされた。(e) Acs11 タンパク質レベルの低下は、si-RNaseH1 前処置群の方がわずかに弱かった。(n=4, mean \pm S.D., *P<0.05, Mann-Whitney U test, vs saline+gapmer).

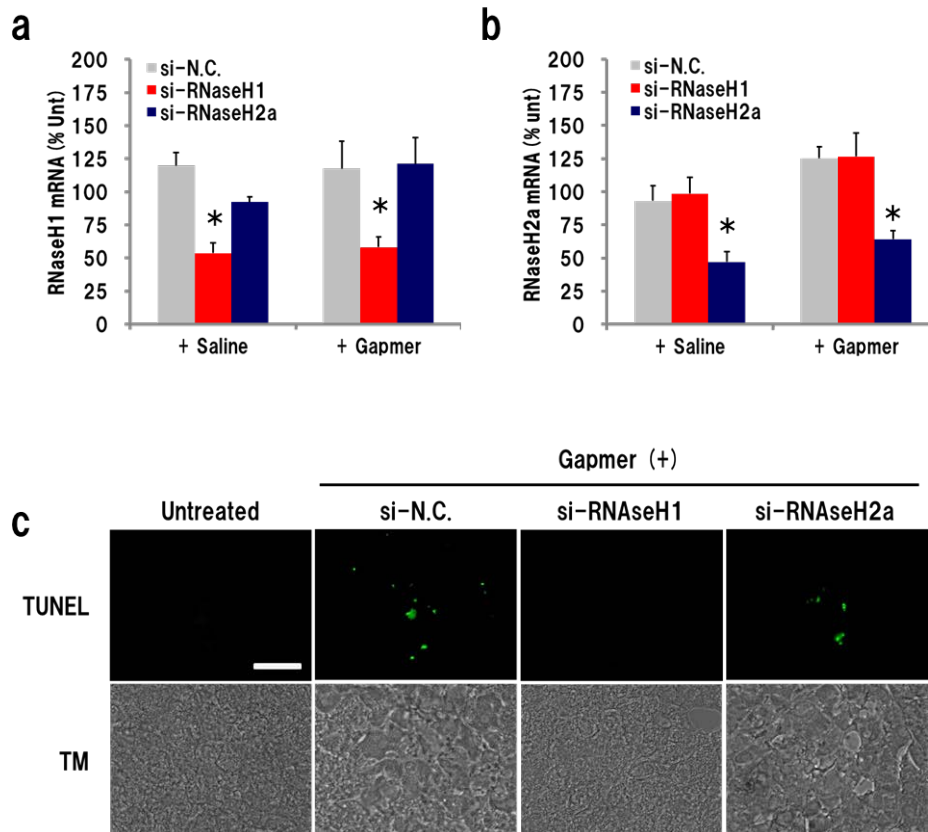


図9. マウス肝臓中 RNase H1 の発現抑制下において Acs11-Gapmer を投与すると肝毒性が抑制された。(a)マウス肝臓中 RNase H1 は、si-RNaseH1 の前処置群でのみ、生理食塩水投与コントロール群と比較して mRNA 発現量が約 50%程度に減少した。(b)マウス肝臓中 RNase H2a は、si-RNaseH2a の前処置群でのみ、生理食塩水投与コントロール群と比較して mRNA 発現量が約 40%程度に減少した。(c)肝臓凍結切片を用いた TUNEL アッセイを実施した結果、si-N.C.または si-RNaseH2a 前処置 Gapmer 投与群においては 30-40 視野当たりにつき一つ TUNEL 陽性細胞が観察された。一方、si-RNaseH1 前処置 Gapmer 投与群において陽性細胞は観察されなかった。(n=4, mean \pm S.D., *P<0.05, Mann-Whitney U test, vs saline+gapmer).

実験 3 : 肝臓中 RNase H1 発現抑制下における ApoB、Hprt1、hKIF11-Gapmer の肝毒性発現検討

これまでに si-RNaseH1 を用いた肝臓中 RNaseH1 の発現抑制下では、GR-Gapmer および Acs11-Gapmer の肝毒性が低減することを見出してきた。しかしながら、わずか 2 種類の Gapmer の現象でもって普遍性を述べることは困難である。そこで 3 種類の Gapmer を追加して同一の試験を実施した。本実験では、前処置として si-RNaseH1、si-N.C.と invivofectamine の複合体をそれぞれ尾静脈内投与した 2 日後に Gapmer を皮下投与し 3、5 日目に採血、7 日目に解剖した (図 10.a)。

その結果、すべての Gapmer (ApoB、Hprt1、hKIF11) 投与において、si-RNaseH1 を前投与した場合に si-N.C.投与群と比較して ALT および AST の上昇が抑制された (図 10.b)。

以上の結果から、si-RNaseH1 を用いて肝臓中 RNase H1 の発現を抑制した条件下では、ApoB、Hprt1、hKIF11-Gapmer すべての投与群において肝毒性が低減することが確認された。

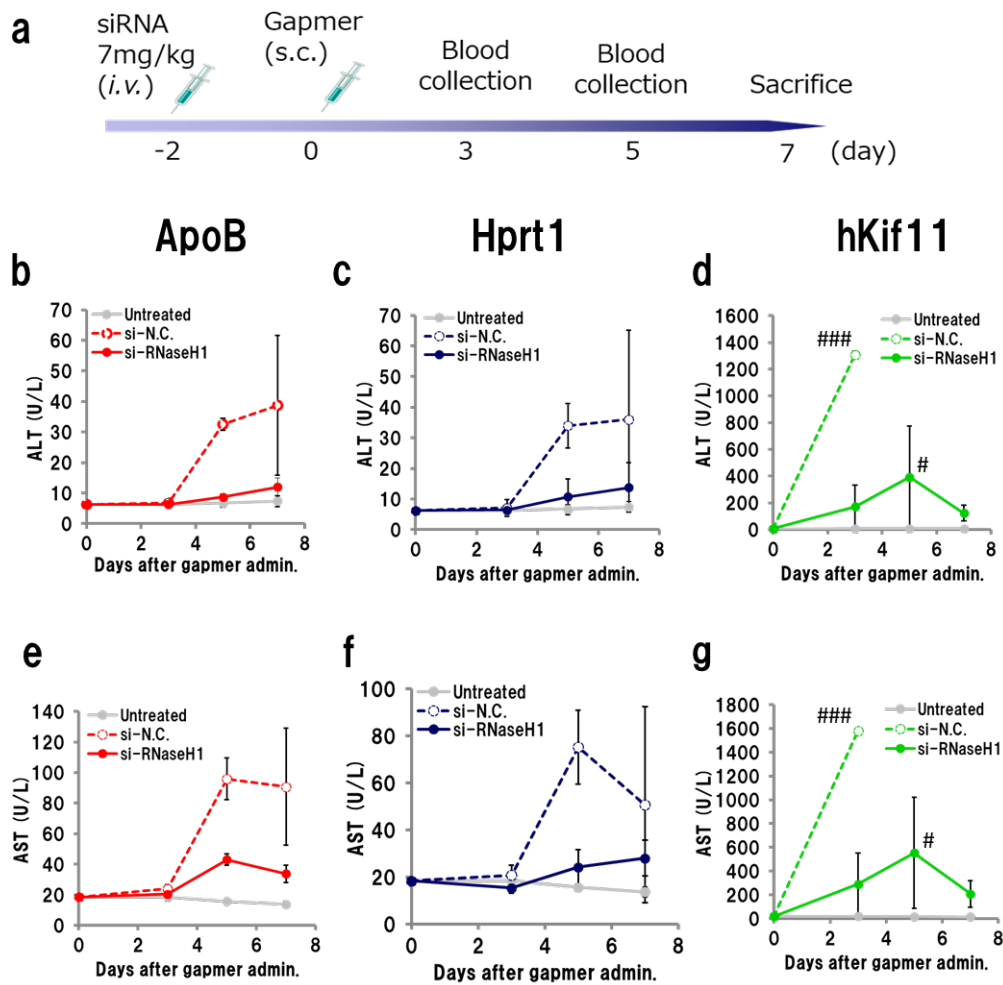


図 10. マウス肝臓中 RNase H1 の発現抑制下で ApoB、Hprt1、hKIF11-Gapmer を投与すると肝毒性が抑制された。(a)実験プロトコル (b-g) ApoB、Hprt1、hKIF11-Gapmer すべての投与群において、si-RNaseH1 を前投与した場合に si-N.C.投与群と比較して ALT および AST の上昇が抑制された。(n=3, mean ± S.D.). #体重減少のためマウスは安楽死処分とした。

【考察】

第1章において”Gap“構造に起因するRNA切断が、肝毒性発現の要因の一つであることが示唆された。その切断活性に中心的な役割を果たすのがRNase Hとの報告がある[12-14]。そこで本章では、siRNAを用いてマウス肝臓中RNase Hの発現を抑制した場合に、Gapmer投与により惹起される肝毒性がどのように変動するかを調べた。

まずsi-RNaseH1による肝臓中RNase H1の発現抑制下で、GR-GapmerおよびAcs11-Gapmerを投与すると肝毒性が大幅に減弱することが確認された。同時に、GR mRNAおよびAcs11 mRNAに対するそれぞれのGapmerのノックダウン活性も低下した。このノックダウン活性の低下は、RNase H1タンパク質の減少に伴うものと推察された。これらのことから、RNase H1 mRNA発現量（ノックダウン活性の低下）と肝毒性発現には相関関係があることが示唆された。

さらに、RNase H2の関与も調査した。si-RNaseH2aにより肝臓中RNase H2aの発現を抑制したが、Gapmer投与によるノックダウン活性と肝毒性発現のいずれにも有意な影響を示さなかった。

以上のことから、GapmerはRNase H1を介してRNAをノックダウンし、さらにそのノックダウン活性と肝毒性発現には相関関係があることが示された。これらの知見からGapmerによる肝毒性発現は、オンターゲットおよび/またはオフターゲットノックダウン作用に起因する可能性があることが示唆された。

第3章 siRNA を用いたオンターゲット作用の検討

【緒言】

アンチセンス核酸や siRNA などの核酸医薬品による毒性発現は、一般的に生体内タンパク質との相互作用などに起因する広義のオフターゲット作用や、標的 RNA に作用することで引き起こされるオンターゲット作用、あるいは非特異的な RNA 切断に起因する狭義のオフターゲット作用などの要因により惹起される可能性がある [24]。

第1章において Gapmer による肝毒性発現は、広義のオフターゲット作用により引き起こされる可能性が低いことを明らかにした。Gapmer は標的 RNA の塩基配列に対して配列特異的にハイブリダイズすることにより、RNase H を介した RNA 切断を誘導し薬理作用を示すとの報告がある[5]。しかしながら Gapmer が、標的 RNA に対するハイブリダイゼーションにより生ずる作用が強すぎる場合、オンターゲット作用と呼ばれる毒性発現に繋がる可能性がある[24]。

一方、Gapmer と同様に遺伝子発現をノックダウンできる創薬モダリティとして、siRNA が広く知られている[58,59]。Gapmer が RNase H1 を介して核内もしくは細胞質内で標的 RNA を切断するのに対し、siRNA は細胞質内で標的 RNA を切断する [62,63]。この siRNA は天然 RNA を用いた際に TLR を介した免疫反応が惹起されることがあるものの、Gapmer で引き起こされるような著しい肝毒性発現は報告されていない。

【目的】

本章では、Gapmer がオンターゲット作用により肝毒性を惹起するかどうかの検討を、siRNA を用いて実施した。具体的には高活性かつ高毒性の Acsl1-Gapmer をモデルとして、同一の Acsl1 mRNA 領域を標的とした siRNA を設計・合成し、薬理活性と肝毒性発現について比較検討を行った (図 11.)。つまり Gapmer および siRNA をそれぞれ投与し、同じレベルのノックダウン率を示した時に、両化合物ともに肝毒性が惹起されればオンターゲット作用が発現要因と考えた。

近年、分岐型の糖鎖リガンドである Triantennary N-acetyl galactosamine (GalNAc3) を siRNA やアンチセンス核酸にコンジュゲートした誘導体が、肝臓において標的 RNA 発現を効果的に抑制できることが報告されている (図 12.) [64,65]。そこで、本検討では siRNA のセンス鎖 5'末端側に GalNAc3 リガンドを導入した GalNAc3-siRNA を用いた (表 6.)。

なお、肝臓特異的に Acsl1 遺伝子を欠損させたノックアウトマウスは、肝毒性を惹起することなくトリアシルグリセロール合成と β 酸化が減少するとの報告がある[66]。

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与、採血、および臓器採取

7週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本クレア) に対して、Acs11-Gapmer は 1.25、2.5、5、10mg/kg、GalNAc3-siRNA は 100mg/kg の投与量でそれぞれ生理食塩水に溶解し、またコントロールとして生理食塩水を皮下投与にて 3 日間連続投与した。化合物投与 7 日後に sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取後、肝臓を摘出した。肝臓は PBS で洗浄した後に、pRT-PCR 解析のために約 40mg を RNeasy (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後に、解析まで -80°C で保存した。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で RNA を精製し、Superscript III First Strand Synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーセットは以下に示した (表 7)。

表 7. 使用したプライマーリスト

Gene		Primer Sequence
Acs11	Forward	GCAGCGGCATCATCAGAAAC
	Reverse	TGTCACCATCAGCCGACTC
IFN α	Forward	CTGTGCTTTCCTGATGGTCCTG
	Reverse	GGAATCCAAAGTCCTTCTGTCCT
IFN γ	Forward	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA
	Reverse	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
IL4	Forward	ACGGAGATGGATGTGCCAAAC
	Reverse	AGCACCTTGAAGCCCTACAGA
IL6	Forward	CAACGATGATGCACTTGCAGA
	Reverse	CTCCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA
TNF α	Forward	TATGGCCCAGACCCTCACA
	Reverse	GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

5. ALT および AST の測定

ALT および AST は Transaminase CII-test Wako（和光純薬工業）を使用し、添付のマニュアルに従って測定した。

6. 統計解析

解析結果の統計比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。特に記載がない限り、データは平均±標準偏差（SD）で表記し、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

本章では、オンターゲット作用の検討として Acs11-Gapmer と同一の mRNA 領域を標的とした GalNAc3-siRNA を投与し、薬理活性と肝毒性発現について Acs11-Gapmer と比較検討を行った。

1. qRT-PCR による Gapmer と siRNA のノックダウン活性評価

マウス肝臓中 Acs11 mRNA 発現量を定量した結果、Gapmer 5 mg/kg/day 投与において生理食塩水投与群と比較して 84%減少、GalNAc3-siRNA 100 mg/kg/day 投与において生理食塩水投与群と比較して 86%減少とほぼ同じノックダウン率を示した（図 13.a）。

2. Gapmer と siRNA の肝障害マーカー比較

Gapmer 5 mg/kg/day 以上の投与量において、ALT および AST が生理食塩水投与群と比較して有意に上昇した。一方、siRNA 100 mg/kg/day 投与群では ALT および AST は生理食塩水投与群と比較して変化がなかった（図 13.b, c）。

3. 肝臓中炎症性サイトカインの発現量測定

肝臓中炎症性サイトカインの mRNA 発現量を qRT-PCR により測定したところ、Gapmer 5mg/kg/day 以上の投与量において、IFN- γ , TNF- α , IL-6 などの mRNA 発現量が投与量依存的に有意に増加した。一方、GalNAc3-siRNA 投与群ではいずれの発現量も増加しなかった（図 13,d）。

以上の結果から、Gapmer により Acs11 mRNA を強力にノックダウンすると肝毒性が惹起されたが、siRNA を用いて Acs11 mRNA を同程度にノックダウンしても肝毒性は惹起されなかった。

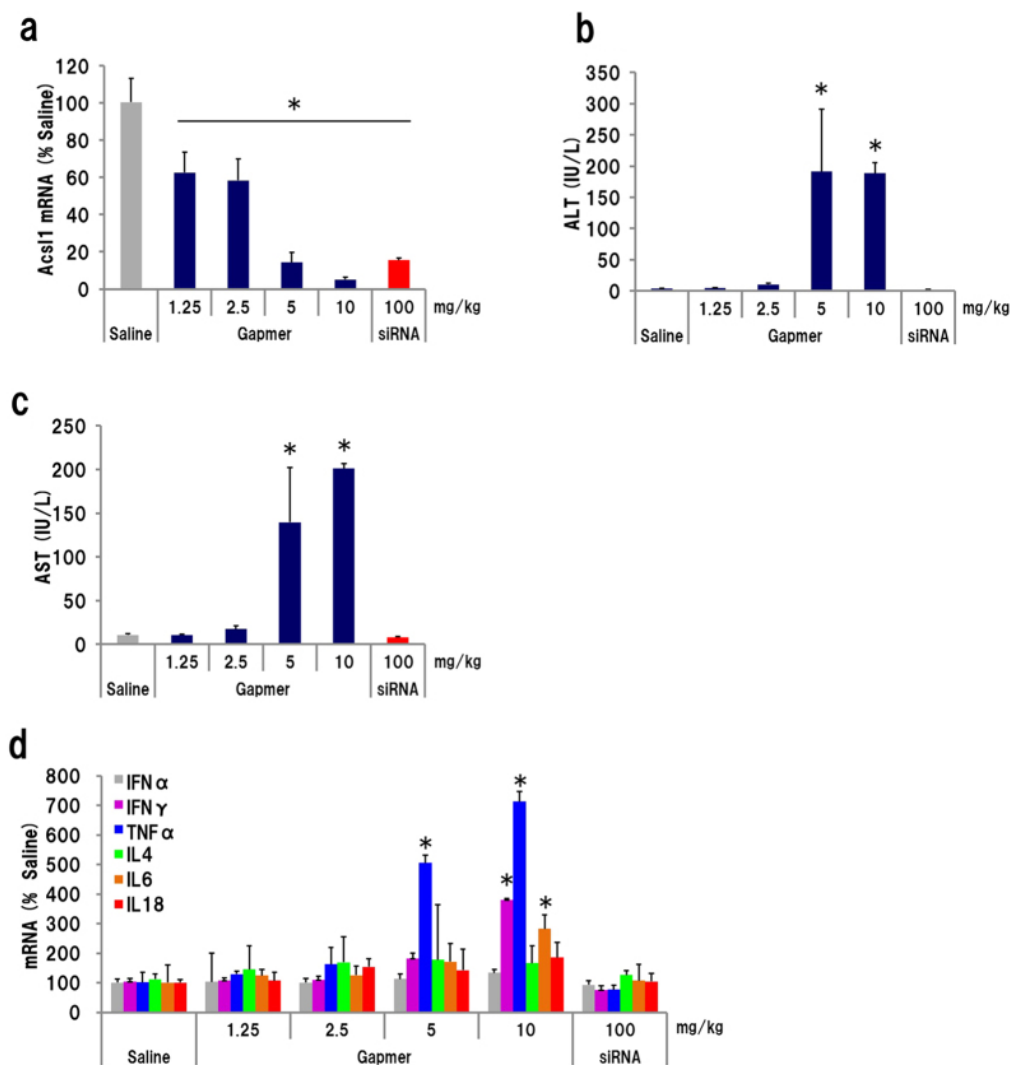


図 13. Gapmer は肝毒性を示したが siRNA は肝毒性を示さなかった。

(a) Gapmer 投与群 (5 mg/kg/day) と GalNac3-siRNA 投与群 (100 mg/kg/day) は生理食塩水投与群と比較してほぼ同じノックダウン率 (約 85% 減少) を示した。(b,c) 5 mg/kg/day 以上の Gapmer 投与群で ALT および AST の有意な上昇が確認されたが、siRNA 投与群では確認されなかった。(d) Gapmer 投与群でのみ肝臓中の炎症性サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-6) mRNA 発現量が増加した。(n=3, mean \pm S.D. *P<0.01, Mann-Whitney U test, vs saline).

【考察】

本章において、肝毒性を示す Acs11-Gapmer と同一の mRNA 領域を標的とした GalNAc3-siRNA を投与することにより、Acs11-Gapmer によるオンターゲット作用の検討を行った。その結果、Acs11-Gapmer および GalNAc3-siRNA 投与により、それぞれ投与量は異なるものの Acs11 mRNA 量を 85%程度減少させることができた。その同程度のノックダウン時に、Acs11-Gapmer 投与では肝毒性が惹起されたが、GalNAc3-siRNA 投与では肝毒性は認められなかった。

以上、Gapmer による肝毒性発現は標的配列に対する作用、つまりオンターゲット作用により生じるものではないことが示唆された。これらの知見から狭義のオフターゲット作用（非特異的 RNA 切断）により、肝毒性が惹起される可能性が示された。

第4章 Gapmer の作用部位の同定

【緒言】

真核生物では、一般的に DNA から転写された mRNA 前駆体である pre-mRNA にエクソンと呼ばれるアミノ酸配列コード領域とイントロンと呼ばれるアミノ酸配列非コード領域が存在することが広く知られている[67]。この pre-mRNA は、核内で 5'キャップ付加、3'末端の切断とポリ(A)鎖付加、RNA スプライシングといったプロセッシングを経て成熟するが、このイントロンが切り出されエクソンのみからなる成熟した mRNA は核外輸送により細胞質へ速やかに輸送されタンパク質翻訳に供されることが報告されている[68-70]。

Gapmer や siRNA などの核酸医薬品は、mRNA や pre-mRNA を創薬標的にできることが大きな特徴であるが、それらの標的に対する作用メカニズムは異なる。第2章の検討から、Gapmer は RNase H1 を介して RNA を切断することを示した[5]。この RNase H1 は、核とミトコンドリアに局在することが知られているが、主に核内で作用するとの報告がある[71]。一方、siRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) とよばれる RNA-タンパク質複合体を形成することにより相補的な配列領域をもつ mRNA の発現を抑制することが知られている。この RNA サイレンシングの機能複合体である RISC においては、細胞質に局在する Ago (argonaute) とよばれる一連のタンパク質が中心的な役割を果たすことが報告されている[62,63]。

そこで本章では、標的に対する作用メカニズムが異なる Gapmer と siRNA の作用部位を比較検討することにより、Gapmer による肝毒性発現に関する知見が得られることを期待した。

【目的】

第3章において、Acsl1-Gapmer は肝毒性を引き起こすが、同一の mRNA 領域を標的とした GalNAc3-siRNA は肝毒性を示さないことを明らかにした。この差異は、siRNA は細胞質に局在する Ago2 に取り込まれて標的 RNA を切断するが、Gapmer は核内において RNase H1 を介して mRNA の前駆体である pre-mRNA を切断することから生じているのではないかとの仮説を立て、qRT-PCR 解析により Gapmer および siRNA の作用部位の同定を行った[15,51,62,71]。

【方法】

qRT-PCR による pre-mRNA の部分定量評価

第3章で使用したマウス肝臓中の RNA をサンプルとして用いて、qRT-PCR により核内に存在する pre-mRNA の部分定量を実施した。全長約7万塩基からなる Acs1 pre-mRNA のイントロンとエキソンの約5000 base おきにプライマーを設計し、生理食塩水投与群をコントロールとして qRT-PCR による解析を行った。プライマーは、イントロン1、2、3、4、7、10、12 と、さらにエキソン1および12の一部を増幅するように設計した（表8）。

Target Exon/Intron	Amplicon		Primer Sequence
Exon1	99-171	Forward	CGGCCGCGACTCCTTAAATA
		Reverse	CACAGCGGCTGTCACTG
Intron 1	5706-5839	Forward	CGTGCGACCATAGGGCTAAA
		Reverse	CAGCATTAGGGCAAGACCCA
Intron 1	9393-9523	Forward	GTCATCCCCAGGTGTCTTGG
		Reverse	AACAGAAGGTCATCGCCAGG
Intron 1	15351-15450	Forward	TGCAGCTCCCCTTAAGATCC
		Reverse	AACTTAGCCCTGGTCTTGGG
Intron 1	19566-19684	Forward	TGGTACACCCTAGGCACTCA
		Reverse	TAGCCGCCACAAGACAACCTC
Intron 2	24913-25034	Forward	TCAGTGTGGCTGGTGTGT
		Reverse	CTCCAGCTGAGTCCCAAGG
Intron 2	28465-28611	Forward	GTGGCTAGACCGAGTTCTTTC
		Reverse	CTCTACTGGCTAATTTCTGTG
Intron 2	30052-30159	Forward	CCGTCCTTCTGCCGTAAGT
		Reverse	TTGGATAGGCGGAAGTGCTC
Intron 3	34903-34981	Forward	TCCAGATGTTCTGTGTCGCC
		Reverse	AAGGCCAGCATACTGACTC
Intron 4	40160-40333	Forward	CGGAAAGGACGCCAGATTGT
		Reverse	GTTCTGCCACTGCAACAAA
Intron 7	45459-45614	Forward	TAAGGCTCTGAAGCCCTTGC
		Reverse	AGTCATGCACCACTATGCC
Intron 12	54084-54190	Forward	TGTGAGTCCTGGTGCCAATC
		Reverse	CCACATCTATGGAGGCGGAC
Intron 12	54706-54802	Forward	CAGCATGAGCAGTTAGTCCAGC
		Reverse	GAGATGACAAAGAGTAGGTAAAGC
Intron 15	59143-59281	Forward	TGGAGGGGTCCTGAGTAGAC
		Reverse	CCACGCTCCCTCATAGGAAC
Exon 21	64881-65015	Forward	CGCTAATTTGTCAACGGGG
		Reverse	TCCACTCACTCCAATGCAGA

【結果】

Acs11 に対する Gapmer および GalNAc3-siRNA を投与したマウス肝臓中の RNA をサンプルとして用い、核内に存在する mRNA の前駆体である pre-mRNA の部分定量を行った。

まず Acs11-Gapmer においては、いずれのプライマーを用いても生理食塩水投与群と比較して pre-mRNA のイントロンおよびエキソンともに発現レベルが 50~80% 程度減少していることが確認された (図 14.a)。

一方、GalNAc3-siRNA の場合は、エキソンの発現レベルが約 80% 程度減少しているのに対して、イントロンのそれは生理食塩水投与群と比較して変化がなかった (図 14.b)。

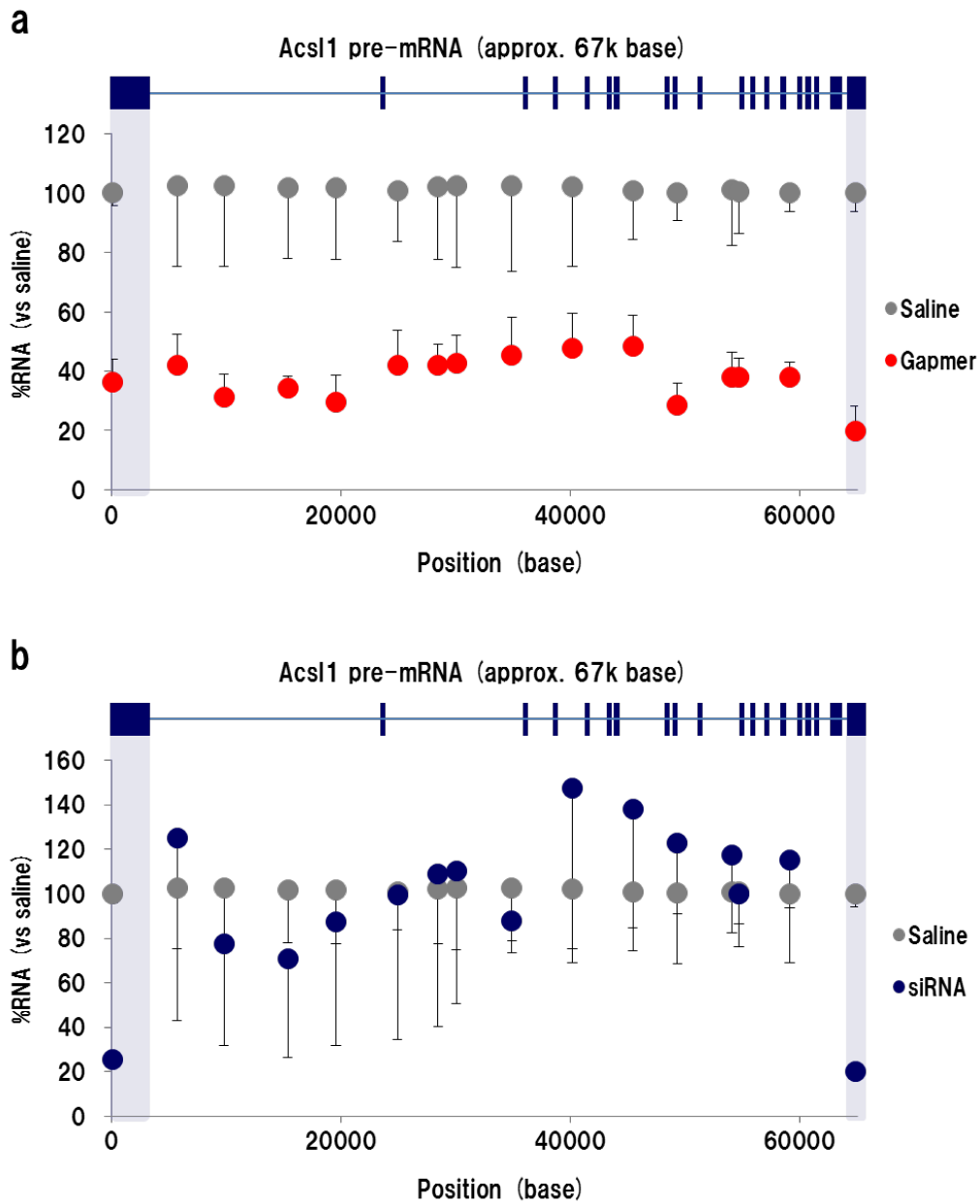


図 14. qRT-PCR によるマウス肝臓中 *Acs1* pre-mRNA の定量 (青線;イントロン、青正方形; エキソン)。 a) Gapmer 投与の場合、イントロンおよびエキソンともに生理食塩水投与群をコントロールとして 50~80% 程度減少した。 b) GalNAc3-siRNA 投与の場合、イントロンは陰性対照と変化がなかった。 (n=3, mean +/- SD)

【考察】

本章での検討から、GalNAc3-siRNA 投与において mRNA 前駆体である pre-mRNA のイントロンの発現レベルは生理食塩水投与群と比較して変化せず、エクソンの発現レベルのみ特異的に約 80%程度減少することが確認された。これは、siRNA は細胞質に局在する Ago2 を主要とする RISC に取り込まれた後に mRNA を切断するためと考えられた[59-61]。

一方、Gapmer 投与においては pre-mRNA のエクソンおよびイントロンの発現レベルが、ともに生理食塩水投与群と比較して約 50~80% 程度減少することが確認された。これまでに RNase H1 は、主に核内で作用することが報告されている[71]。これらのことから Gapmer の作用部位は核内であり、核内において pre-mRNA の切断を誘導することが示唆された (図 15.)。

以上、Gapmer は核内において pre-mRNA を切断することが肝毒性発現の要因の一つであると推察された。

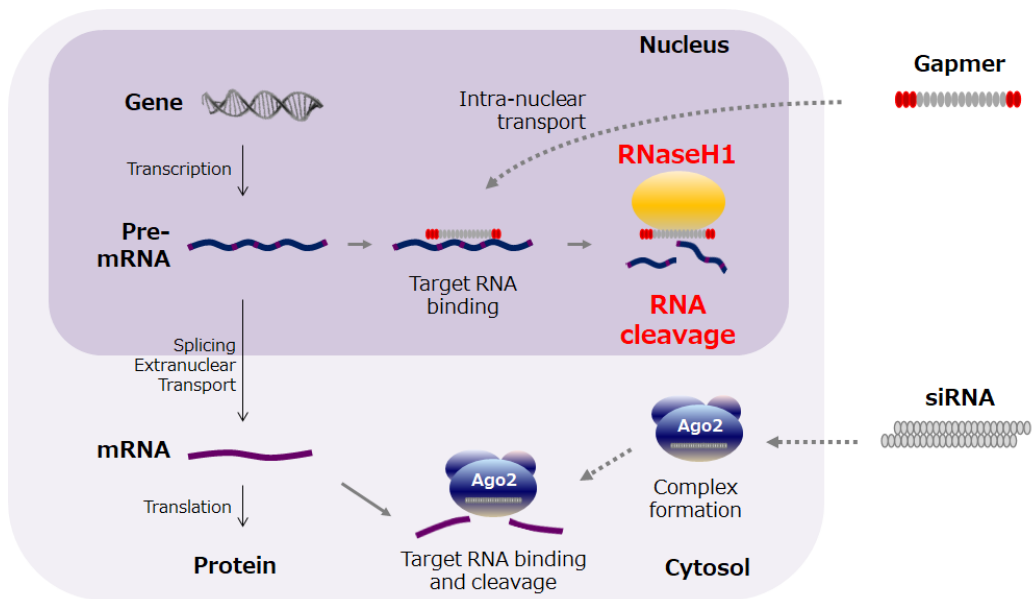


図 15. Gapmer と siRNA のノックダウンメカニズム

第5章 Gapmer によるオフターゲット作用の検討

【緒言】

アンチセンス核酸や siRNA などの核酸医薬品は、標的 RNA の塩基配列に対して配列特異的にハイブリダイズすることにより、転写や翻訳などの遺伝子発現過程に直接作用することが知られている[5,60,61]。これらの核酸医薬品は塩基配列情報を基に配列を設計できることから、一般的に特異性が高いモダリティとして考えられている。しかしながら同時に、標的配列と同一もしくは類似した他の配列にハイブリダイズをすることにより、狭義のオフターゲット作用と呼ばれる標的以外の RNA に作用することも懸念されている[37,38,72-74]。

実際に、21 塩基対の二本鎖 RNA である siRNA は seed 領域（ガイド鎖 5'末端からの 7 塩基）が mRNA の 3' UTR に対して相補的な配列を有する場合において、mRNA の分解や翻訳抑制が起こる可能性があることが知られている[73]。一方、Gapmer においてはハイブリダイゼーションに依存したオフターゲット作用の報告例は多くはないが、最近、Burel らによって毒性を示す Gapmer がオフターゲット作用により長鎖の pre-mRNA を切断する傾向があることが報告された[37]。また、別の研究グループからも Gapmer はオフターゲット作用により *in vitro* において pre-mRNA のイントロンとエキソン両方を切断したとの報告がある[38]。

さらに前章までの検討から、Gapmer による肝毒性は広義のオフターゲット作用やオンターゲット作用により惹起されるのではなく、Gapmer が核内において pre-mRNA を切断することが毒性発現の要因の一つとして示唆されている。

以上のような背景から Gapmer による肝毒性は、核酸医薬品に特有とされる狭義のオフターゲット作用（非特異的 RNA 切断）に起因すると推察された。また、このオフターゲット作用は Gapmer により標的以外の完全一致配列もしくは類似した配列を有する RNA が切断されることで生じると想定された。そこで本章では、肝毒性を示す Gapmer と肝毒性を示さない Gapmer をモデルに、ゲノムデータベースやマイクロアレイデータを用いて Gapmer による狭義のオフターゲット作用を検討した。

第1節 肝毒性を示す Gapmer のオフターゲット作用の検討

【目的】

第4章において、肝毒性を示す Acs11-Gapmer は核内で pre-mRNA を切断し、肝毒性を示さない GalNAc3-siRNA は細胞質で mRNA を切断することが判明した。さらに、Acs11-Gapmer は pre-mRNA のイントロンをほぼ均等に減衰させることも明らかにした。

Gapmer による肝毒性発現メカニズムについては、未だ詳細に解明されておらずその報告例も少ない[34-36]。しかしながら、最近、肝毒性を示す Gapmer はオフターゲット作用を示す傾向があることが報告された[37,38]。そこで本節においては、まず肝毒性を示す Gapmer が狭義のオフターゲット作用と呼ばれる非特異的 RNA 切断を引き起こすかどうかの検討を行った。具体的には、高活性かつ高毒性を示す Acs11-Gapmer の標的に対する特異性について、ゲノムデータベースやマイクロアレイデータを用いて多面的な解析を実施した。

【方法】

1. 使用化合物

1-1 アンチセンス核酸

第1章で使用した Acs11-Gapmer (5'-CTCcatgacacagcaTTa-3', N:LNA, n:DNA) および Acs11-NonGapmer (5'-CTCcatgaCAcagcaTTa-3', N:LNA, n:DNA) を生理食塩水で溶解し、実験に供した。

1-2 siRNA

第3章で使用した GalNAc3-siRNA を生理食塩水で溶解し、実験に供した。

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与および臓器採取

7週齢の雄性 C57BL6/J マウス（日本クレア）に対して、Acs11-Gapmer は 5mg/kg もしくは 20mg/kg の投与量、Acs11-NonGapmer は 20mg/kg の投与量にて皮下投与を行った。GalNAc3-siRNA は 100mg/kg の投与量で尾静脈投与を行った。肝毒性によって生じる二次的な遺伝子発現の変動を避けるため、化合物投与後 24 時間で sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取した後、肝臓を摘出した。肝臓は PBS で洗浄し、qRT-PCR 解析のために約 40mg を RNAlater (QIAGEN)

に浸し4°Cで一晩インキュベートした後に、解析まで-80°Cで保存した。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で RNA を精製し、Superscript III First Strand Synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) 、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーセットは以下に示した (表 9.)。

Gene		Primer Sequence
Acs11	Forward	GCAGCGGCATCATCAGAAAC
	Reverse	TGTCACCATCAGCCGGACTC
Adarb1	Forward	GAGGTCTCCGCCAGTCAAGAA
	Reverse	TCAGTGCTGCTGGAACCTGTG
Atg10	Forward	CTTGTAGTTACCAAGTGCCGGTTC
	Reverse	AATGGTTGCCAAGTATTGGATG
Brd4	Forward	TGCACGACTACTGTGACATCATCAA
	Reverse	GCACCAAATTCCTGGGCATC
Eea1	Forward	GAATCACTTGGACACAGCTCAACA
	Reverse	AGCTGATCCAAGTGCACACTGAC
Gtdc1	Forward	GTTGTCATCTCAACAGCCAAGCA
	Reverse	TGGGTAGCAGCCACAGTACACAG
Magi3	Forward	TGGTGGAGATAGGCCTGATGAA
	Reverse	GACAACATCTGCATGGGTGTGA
Map2k5	Forward	CAGCTAATAGAGCCGCTGCAGATA
	Reverse	CACAGGGCTGGTGTGTTGAGA
Msi2	Forward	CTGGCAGACGAGGCTTTAGAGG
	Reverse	CGGCATTATTGGTGTGGAATTG
Myk	Forward	CCGTGGAGCTGACTGTGGAA
	Reverse	GCTTGGTGGCAAACCTTGGTG
Prr16	Forward	TTAGTCTGGGCGACCTGAAG
	Reverse	GTCAGGGGTCAATCTGGTCAAC
Ptprg	Forward	TGCAGATCCGACGACGAAAG
	Reverse	ACGCGAGCATGGTGGTCTAA
Rabgap1	Forward	GCCCAGGTCGAAACGTGAA
	Reverse	GAGCCAGAAATATTGGTGCCTTG
Rbm26	Forward	TGTGCCTGGGCATGCTGTA
	Reverse	AGCGTCATCAATCTGACAGTCCTC
R3hdm1	Forward	GCATGGACACATTCCACATCAA
	Reverse	CCACTCGAGTTATCCGCTCGGTA
Tox	Forward	CATGCAGGTCCAGACTGCCTTA
	Reverse	TGCACCCAGAACGCACGTA
Whsc111	Forward	CAAGCAAGCCAGCAATCATT
	Reverse	CATGAGCAATGCCAATGTCC
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

5. マイクロアレイ解析と GGGenome を用いた配列相同性検索

マウス肝臓から単離された total RNA は、添付のマニュアルに従ってマウスの全ゲノム (4×44K) OligoMicroarrayKit (Agilent Technology) を用いてマイクロアレイ解析した。Acs11-Gapmer のオフターゲット候補となる本来の標的配列 (TAATGCTGTGTCATGGAG) に類似した塩基配列を含む RNA 転写産物は、高速塩基配列検索データベース GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/en>) を用いて配列相同性検索を実施した。

【結果】

本節では、Acs11-Gapmer の狭義のオフターゲット作用の検討として、マイクロアレイデータを用いた解析と、ゲノムデータベースとマイクロアレイデータを併用した二種類の解析手法により、Acs11-Gapmer の標的 RNA に対する特異性を調査した。以下に結果を示す。

1. マイクロアレイデータを用いた Acs11-Gapmer の狭義のオフターゲット作用 (非特異的 RNA 切断) の調査

1-1. オフターゲット候補遺伝子の選抜

まず、Acs11-Gapmer 20mg/kg 投与時のマウス肝臓中の RNA サンプルを用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果、タンパク質をコードする 16 種類の遺伝子発現が生理食塩水投与群と比較して 2 倍以上抑制された (図 16.a)。なお、Acs11-Gapmer の標的遺伝子は生理食塩水投与群と比較して 2 倍 (1.7 倍) 未満の発現抑制であった。さらに、16 種類の候補遺伝子は標的配列と高い相同性を有する塩基配列 (3~5 塩基のミスマッチを含む) を有しており、その配列はすべてイントロンに存在していた。また、これらの pre-mRNA の多くは 10 万塩基以上と長鎖であった (図 16.b)。

1-2. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

次に、実際にマウス肝臓中で上記の 16 種類のオフターゲット候補遺伝子がノックダウンされているかどうかを qRT-PCR により解析した。

1-2-1. Acs11-Gapmer と GalNAc3-siRNA のノックダウン活性比較

Acs11-Gapmer 投与群では、Msi2 (musashi rna binding protein 2) を除く 15 遺伝子の mRNA 発現量が生理食塩水投与群と比較して大幅に減少した。一方、GalNAc3-siRNA 投与群では生理食塩水投与群と比較して有意な減少は認められなかった (図 17.a)。

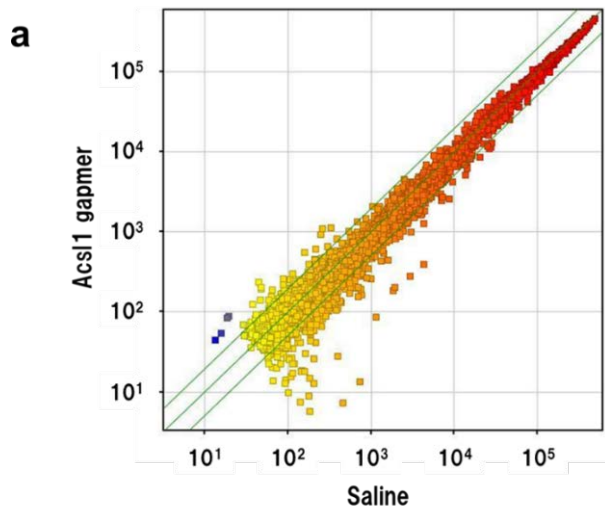
1-2-2. Acs11-Gapmer と Acs11-NonGapmer のノックダウン活性比較

Acs11-NonGapmer 投与群では、生理食塩水投与群と比較して 16 遺伝子の有意なノックダウン効果は認められなかったが、Acs11-Gapmer 投与群では多くの遺伝子でノックダウン効果が認められた (図 17.b)。

1-2-3. si-RNaseH-invivofectamine を前投与した際のノックダウン活性評価

si-RNaseH-invivofectamine を前投与した際の Acs11-Gapmer によるノックダウン活性を評価した結果、siRNA を用いたマウス肝臓中 RNase H1 の発現抑制により、Acs11-Gapmer のノックダウン活性がキャンセルされた (図 17.c)。

以上、マイクロアレイ解析から Acs11-Gapmer のオフターゲット候補遺伝子を 16 種類選抜した。それらのオフターゲット候補遺伝子は、本来の標的配列と比較して 3~5 塩基のミスマッチを含む標的類似配列を持ち、その類似配列はすべてイントロンに存在した。また、実際に Acs11-Gapmer を投与したところ、マウス肝臓中において 16 候補中 15 遺伝子がノックダウンされることが明らかとなった。なお、この 15 遺伝子の中には肝毒性発現に関与すると思われる重要遺伝子は含まれていなかった[37]。



b

Gene	Fold Change	Chr.	Position (from)	Position (to)	Putative Target Sequence	Mis-match	Intron/Exon	Pre-mRNA Length (k base)
Acs11	-1.7	8	46524947	46524964	TAATGCTGTGTCATGGAG	-	Exon	65
Adarb1	-2.0	10	77402589	77402606	TtgccCTGTGTCATGGAG	4	Intron	128
Atg10	-14.1	13	91106711	91106728	TtA_GCcTGTGTCATGGAG	3	Intron	289
Brd4	-2.6	17	32216092	32216108	T__TGCcCGTGTGTCATGGAG	4	Intron	88
Eea1	-2.0	10	95976543	95976560	TAAcatTGTGTCATGGAG	3	Intron	105
Gtdc1	-2.8	2	44876131	44876150	gAATGCTGaGggTCATGGAG	4	Intron	364
Magi3	-3.1	3	104139485	104139502	TtgTcCTGTGTCATGGAG	3	Intron	207
Map2k5	-3.0	9	63091083	63091100	TatTtCTGaTGTGTCATGGAG	3	Intron	215
Msi2	-2.7	11	88291142	88291158	TgA_GCTGTGTCATGGcG	3	Intron	379
Mylk	-3.0	16	34767986	34768002	CAATGaTGTGTCATGG_G	3	Intron	257
Prr16	-3.2	18	51316357	51316374	CAATGCTGTGTCA_GGttG	4	Intron	187
Ptprg	-2.5	14	12672498	12672515	TgATcCTGTGTCATGGa	3	Intron	688
R3hdm1	-2.4	1	130019578	130019595	aAgTaaTGTGTCATGGAG	4	Intron	134
Rabgap1	-3.0	1	162681669	162681686	TtgccCTGTGTCATGGAG	4	Intron	574
Rbm26	-2.5	14	105559318	105559334	gAATGCT_TaTCATGGAG	3	Intron	63
Tox	-2.8	4	6904802	6904819	TATtTCTGTGTCATttcG	5	Intron	305
Whsc111	-3.2	8	2678692	26787710	TAgTGCCcGtTGTGTCATGGAG	3	Intron	118

図 16. マイクロアレイデータを用いて Acs11-Gapmer のオフターゲット候補遺伝子が選抜された。(a) Acs11-Gapmer 投与群においてタンパク質をコードする 16 種類の遺伝子発現が 2 倍以上有意に抑制された。(b) 16 種類のオフターゲット候補遺伝子は標的類似配列 (3~5 塩基のミスマッチを含む) を有し、その類似配列はすべてイントロンに存在した。これらの pre-mRNA の多くは 10 万塩基以上と長鎖であった。

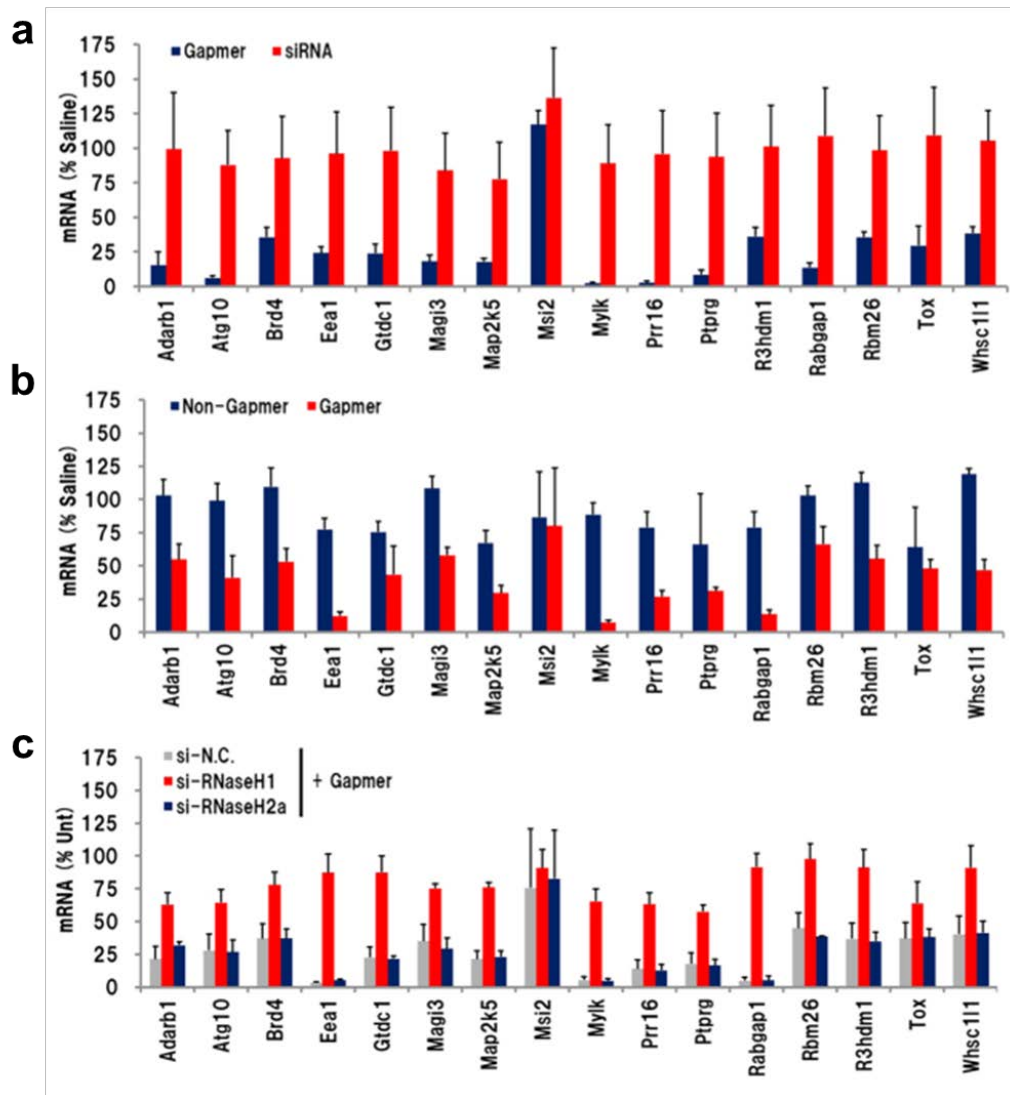


図 17. *Acs11*-Gapmer は狭義のオフターゲット作用 (非特異的 RNA 切断) を示した。(a) Gapmer 投与群において、16 種類のオフターゲット候補遺伝子中 15 種類についてノックダウン活性が認められた。一方、siRNA 投与群ではノックダウン活性が認められなかった。(b) Non-Gapmer 投与群ではノックダウン活性が認められなかった。(c) siRNA を用いて RNase H1 の発現を抑制することにより、Gapmer 投与によるオフターゲットノックダウン効果がキャンセルされた。(n=3 or 4, mean \pm S.D.)

2. ゲノムデータベースとマイクロアレイデータを用いた Acs11-Gapmer の狭義のオフターゲット作用（非特異的 RNA 切断）の調査

2-1. オフターゲット候補遺伝子の選抜

次に、先のマイクロアレイデータを用いる手法とは異なる解析手法により Acs11-Gapmer のオフターゲット作用を詳細かつ網羅的に調査した。具体的には、オンラインの高速塩基配列検索データベースである GCGenome を用いて、Acs11-Gapmer の標的配列に類似したゲノム上の配列（2塩基以下のミスマッチを含む）を網羅的に検索することで、オフターゲット候補遺伝子を選抜した。その結果、395 か所のゲノム上の配列を同定した。395 か所の中で、185 か所は RNA をコードする領域にあった。これら 185 か所の中で 155 か所はタンパク質をコードする遺伝子にあった（9 か所はエキソン、146 か所はイントロンにあった。Acs11 はエキソンに含まれていた。；表 10.）。次に、Acs11-Gapmer 5mg/kg 投与時のマウス肝臓 RNA サンプルを用いてマイクロアレイ解析を行った。その後、マイクロアレイデータを用いてオフターゲット候補遺伝子の発現を再解析した。その結果、上記の 155 か所中 8 種類がノックダウンされる可能性が高い遺伝子として選抜された（図 18.a）。

2-2. Acs11-Gapmer によるノックダウン活性評価

上記の 8 遺伝子が、マウス肝臓中で実際にノックダウンされているどうかを qRT-PCR により解析した。その結果、Acs11-Gapmer 投与群では Exoc4 (exocyst complex component 4) と Lrp11 (low density lipoprotein-related protein 11) を除く 6 遺伝子が生理食塩水投与群と比較して発現量が減少した（図 18.b）。また、これらノックダウンされた 6 遺伝子中の標的類似配列（2塩基以下のミスマッチを含む）はすべてイントロンに存在した。

以上、ゲノムデータベースとマイクロアレイデータを用いて配列相同性検索を行うことにより、肝毒性を示す Acs11-Gapmer のオフターゲット候補遺伝子として、2塩基以内のミスマッチを含む標的類似配列を持つ 8 種類が選抜された。これらの遺伝子は、実際に Acs11-Gapmer を投与することによりマウス肝臓中で 6 遺伝子がノックダウンされることを確認した。なお、この 6 遺伝子には肝毒性発現に関与すると推察される重要遺伝子は含まれていなかった[37]。

a

Gene	Fold Change	Chr.	Position (from)	Position (to)	Putative Target Sequence	Intron/Exon
Acs11	-1.72	chr8	46524947	46524964	TAATGCTGTGCATGGAG	Exon
Exoc4	-1.56	chr6	33600370	33600385	TAATGT_GTGTC_TGGAG	Intron
Lrp11	-1.78	chr10	7608461	7608477	TAATG_TGTGCATGGAG	Intron
Lrrc28	-1.70	chr7	67522355	67522370	TAA_G_TGTGCATGGAG	Intron
Pfkfb1	-2.04	chrX	150629038	150629055	TA T _CTGTGCATGGAG	Intron
Plce1	-2.20	chr19	38595764	38595779	TAATGCT_T_TCATGGAG	Intron
Psd3	-2.21	chr8	67944708	67944724	TAATGCTG a GTC_TGGAG	Intron
Snx29	-2.23	chr16	11377334	11377351	T c AT c CTGTGCATGGAG	Intron
Ubr3	-1.67	chr2	69948899	69948914	TAA_G_TGTGCATGGAG	Intron

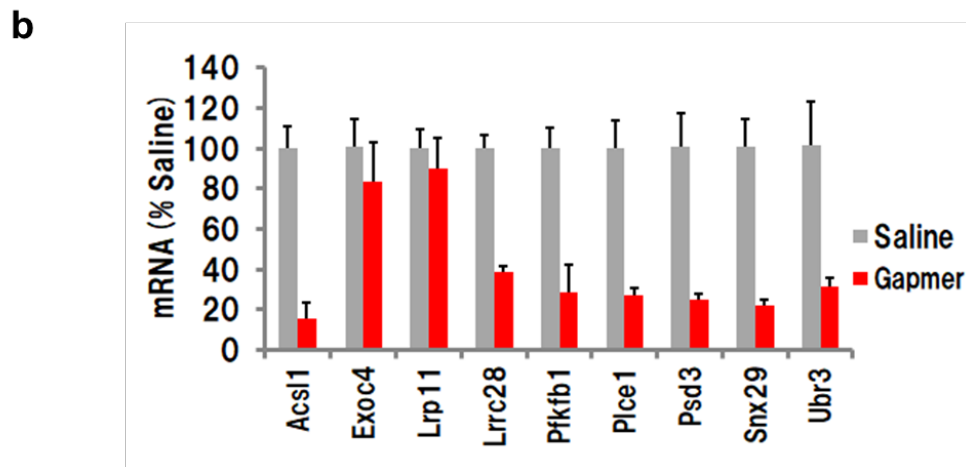


図 18. Acs11-Gapmer は狭義のオフターゲット作用 (非特異的 RNA 切断) を示した。(a)ゲノムデータベースとマイクロアレイデータから標的類似配列 (2 塩基以内のミスマッチを含む) を有するオフターゲット候補が 8 遺伝子選抜された。候補遺伝子中の標的類似配列はすべてイントロンに存在した。(b) Acs11-Gapmer を投与すると 8 種類のオフターゲット候補遺伝子中 6 種類がノックダウンされた。(n=3, mean ± S.D.)

表 10. Acs11-Gapmer の標的配列と類似した配列を含む RNA 転写産物のリスト

Chromosome	start	end	Sequence	Coding/ Non-coding	Gene name	Exon/ Intron
chr8	46524947	46524964	TAATGCTGTGCATGGAG	C	Acs11	Exon
chr7	83775834	83775852	TAATGTTGTGtCATGGAG	C	1700026D08Rik	Exon
chr13	77545167	77545182	TAATGCT_T_TCATGGAG	C	2210408I21Rik	Intron
chr9	41608483	41608499	TA_TGCTTTGCATGGAG	N	2610203C20Rik	-
chr13	28480970	28480988	TAATGCTGTGgTCATGtAG	N	2610307P16Rik	-
chr2	85518690	85518706	TGATGC_GTGCATGGAG	C	4833423E24Rik	Exon
chr16	25062417	25062433	TAATGCT_TGTCATTGAG	N	A230028O05Rik	-
chr2	69284106	69284121	TAATGCTGT_TCATG_AG	C	Abcb11	Intron
chr2	48846165	48846181	TAATGCTGTTTCATG_AG	C	Acvr2a	Intron
chr11	46105924	46105940	TAAGGCTGTGTC_A_GGAG	C	Adam19	Intron
chr1	165550670	165550685	TAATG_TGTGCATGG_G	C	Adcy10	Intron
chr7	76559516	76559532	TA_TGCTGAGTCATGGAG	C	Agb11	Intron
chr4	110926438	110926455	TTATCCTGTGCATGGAG	C	Agb14	Intron
chr6	29903768	29903784	TAATGCTGTGTGATGGAT	C	Ahcyl2	Intron
chr15	27558630	27558645	TAATG_TGTGTC_TGGAG	C	Ank	Intron
chr6	125768541	125768558	TAATGCCGTGCATAGAG	C	Ano2	Intron
chr6	125940084	125940100	AAATGCTG_GTCATGGAG	C	Ano2	Intron
chr10	26755703	26755720	TAATGCTGTGcTC_TGGAG	C	Arhgap18	Intron
chr18	39343004	39343021	TTATGCAGTGCATGGAG	C	Arhgap26	Intron
chr12	71095982	71095997	TAA_GCTGT_TCATGGAG	C	Arid4a	Intron
chr2	106967921	106967938	TAATGCTGGGTCTGGAG	C	Arl14ep	Intron
chr11	81238255	81238271	TAAT_CTGTGCATTGAG	C	Asic2 (Bnc1)	Intron
chr11	81657507	81657522	TAATGCTGTG_C_TGGAG	C	Asic2 (Bnc1)	Intron
chr4	66304198	66304214	TAATGC_GTGTGATGGAG	C	Astn2	Intron

chr18	64562824	64562839	TAATGCTGT_TCATG_AG	C	Atp8b1	Intron
chr4	32429941	32429956	TAATGCTGTGTC__GAG	C	Bach2	Intron
chr11	120259020	120259037	TAACGCTGTATCATGGAG	C	Bahcc1	Intron
chr1	25263878	25263895	TAATGCTTTCATGGAG	C	Bai3	Intron
chr6	34481345	34481363	TAATGCTGTGTCcATGGAG	C	Bpgm	Intron
chrX	134576652	134576670	TAAcTGCTATGTCATGGAG	C	Btk	Intron
chr2	14683640	14683657	TAATGCTGCGTCATGGAG	C	Cacnb2	Intron
chr14	12744604	12744619	TAATG_TGTGTC__GGAG	C	Cadps	Intron
chr6	23263177	23263193	CAATGCTGTGTCATgGGAG	C	Cadps2	Exon
chr9	58094123	58094138	TAATGCTGTGT_A_GGAG	C	Ccdc33	Intron
chr8	128989362	128989377	TAATGCTG_GTC_TGGAG	C	Ccdc7	Intron
chr8	118368810	118368827	TAgATGCTGTG_CATGGAG	C	Cdh13	Intron
chr2	35123117	35123133	TA_TCCTGTGTCATGGAG	C	Cep110	Intron
chr2	69045282	69045298	TAT_GCTGTGTCATGAAG	C	Cers6	Intron
chr6	89429442	89429458	TAATGCTGTGT_GTGGAG	C	Chchd6	Intron
chr16	10635188	10635206	TAATGCTGTGTTtATGGAG	C	Clec16a	Intron
chr6	123140308	123140324	TAATACTGTGTCATGGAA	C	Clec4a2	Intron
chr9	97933327	97933343	TAATGCTGT_TGATGGAG	C	Clstn2	Intron
chr6	102457003	102457020	TGATCCTGTGTCATGGAG	C	Cntn3	Intron
chr6	46280099	46280116	TTGTGCTGTGTCATGGAG	C	Cntnap2	Intron
chr12	101996702	101996718	TAATGTTGTGTCATGGAA	C	Cpsf2	Intron
chr8	15953641	15953658	TGATGCTGTGTCCTGGAG	C	Csmd1	Intron
chr8	16603199	16603215	TTATGCTG_GTCATGGAG	C	Csmd1	Intron
chr10	63534209	63534226	TCCTGCTGTGTCATGGAG	C	Ctnna3	Intron
chr19	39408080	39408097	TAATGATGTCTCATGGAG	C	Cyp2c38	Intron
chr19	39253765	39253782	TAATGCTGaTGT_ATGGAG	N	Cyp2c53-ps	-
chr5	145855833	145855848	TAATG_T_TGTCATGGAG	C	Cyp3a11	Intron

chr5	145775159	145775174	TAATG_T_TGTCATGGAG	C	Cyp3a44	Intron
chr2	104259095	104259112	TCATGCTGTGTCAAGGAG	C	D430041D05Rik	Intron
chr12	38565512	38565528	TGA_GCTGTGTCATGGAG	C	Dgkb	Intron
chr8	36941457	36941472	TAATG_TGT_TCATGGAG	C	Dlc1	Intron
chr19	25514017	25514035	TAATTCTGTGTaCATGGAG	C	Dmrt1	Intron
chr9	21834525	21834541	TAA_GCTGTGTGATGGAG	C	Dock6	Intron
chr14	41079034	41079049	TAATGCT_T_TCATGGAG	C	Dydc1	Intron
chr12	99832087	99832104	TAATGCAGTGTGATGGAG	C	Efcab11	Intron
chr18	33820562	33820578	TAA_GCTGTGTCAGGGAG	C	Epb4.114a	Intron
chr16	59963492	59963507	TAATG_TGTGT_ATGGAG	C	Epha6	Intron
chr6	33600370	33600385	TAATGT_GTGTC_TGGAG	C	Exoc4	Intron
chr9	76523386	76523401	TAATGCT_TG_CATGGAG	C	Fam83b	Intron
chr2	62509862	62509878	TA_TGCTGTGTCCTGGAG	C	Fap	Intron
chr4	95772152	95772168	TAATGCTATGTCA_GGAG	C	Fggy	Intron
chr1	174698224	174698240	TAATGCTGTGGC_TGGAG	C	Fmn2	Intron
chr7	89358818	89358834	TAA_GCTGTGTCATGTAG	C	frizzled 4	Intron
chr6	97425717	97425732	TAAT_CTGTGTCATGG_G	C	Frmd4b	Intron
chrX	168015938	168015954	TAATGCTGTGTCAT_CAG	C	Frmpd4	Intron
chr1	84714070	84714086	TAATG_TGAGTCATGGAG	C	G530015K09	Intron
chr2	54503830	54503848	TAATGCTGaTGcCATGGAG	C	Galnt13	Intron
chr14	23089849	23089865	TAATGCTGTGT_ATTGAG	N	Gm10248	-
chr4	12308074	12308092	TAAgTGCTGTGTCATTGAG	N	Gm11846	-
chrX	155899283	155899299	TAATTCTGT_TCATGGAG	C	Gm15155	Intron
chr13	28948119	28948135	TAATGCTGTGTCT_GGTG	N	Gm26735	-
chr3	134401340	134401357	TAATGCTGTGACTTGGAG	N	Gm26820	-
chr3	118454277	118454294	TAATGCTGAGACATGGAG	N	Gm26871	-
chr14	13863753	13863768	TAAT_CTGTGTCATGG_G	C	Gm281	Intron

chr9	118532276	118532291	TAATGCTGT_TCATG_AG	C	Golga4	Intron
chr14	115541924	115541941	TAATaGCTGTGTCATG_AG	C	Gpc5	Intron
chr10	45662136	45662154	TAATGCTGTGgTCATGAAG	C	Hace1	Intron
chr11	83768063	83768080	TAAT_CTGTGTCATtGGAG	C	Heatr6	Intron
chr13	14489283	14489298	TA_TGCTG_GTCATGGAG	C	Hecw1	Intron
chr11	90374297	90374312	TAA_G_TGTGTCATGGAG	C	Hlf	Intron
chr7	124086266	124086282	TAAGGCT_TGTCATGGAG	C	Hs3st4	Intron
chr3	68900070	68900087	TAATGCTGTGTcATGGAC	C	Ift80	Intron
chr16	96390209	96390227	TAATGCTGTGTtCTTGGAG	C	Igsf5	Intron
chr1	37304581	37304598	TCATGCTGTGTCGTGGAG	C	Inpp4a	Intron
chr6	148799008	148799024	AAATGCTGTGTCAT_GAG	C	Ipo8	Intron
chr8	126591262	126591278	TAATGCTTTGTC_TGGAG	C	Irf2bp2	Exon
chr5	49481327	49481343	TAATGCAG_GTCATGGAG	C	Kcnip4	Intron
chr7	45817607	45817623	TCA_GCTGTGTCATGGAG	C	Kcnj14	Exon
chr1	161129250	161129266	TAATGCTGTATCATGG_G	C	Klhl20	Intron
chr2	36084956	36084971	TAATG_T_TGTCATGGAG	C	Lhx6	Intron
chr10	7608461	7608477	TAATG_TGTGTCATGGAG	C	Lrp11	Intron
chr2	40598705	40598720	T_ATGCTGTG_CATGGAG	C	Lrp1b	Intron
chr5	35096836	35096852	TAAGGCTGT_TCATGGAG	C	Lrpap1	Intron
chr7	67522355	67522370	TAA_G_TGTGTCATGGAG	C	Lrrc28	Intron
chr15	91677720	91677735	TAATGCT_TGTCATG_AG	C	Lrrk2	Intron
chr6	80624304	80624320	TTAAGCTGTGTCATCGAG	C	Lrrtm4	Intron
chr7	55236490	55236507	TAATTCTGTGTCATAGAG	C	Luzp2	Intron
chr4	123540103	123540118	TAATGCTGTGTCA_G_AG	C	Macf1	Intron
chr5	20102598	20102614	TACTGCTGTG_CATGGAG	C	Magi2	Intron
chrX	105986118	105986133	TAATGCTGTGT__TGGAG	C	Magt1	Intron
chr13	103165792	103165809	TAATGCTGCTGTCATGG_G	C	Mast4	Intron

chr13	30204107	30204124	TGATTCTGTGCATGGAG	C	Mboat1	Intron
chr2	128794285	128794301	TATTGCTGTGTCA_GGAG	C	Mertk	Intron
chr7	136965926	136965941	TAATG_TGTGT_ATGGAG	C	Mgmt	Intron
chr12	57394173	57394191	TgAATGCTGTGCATGtGAG	C	Mipol1	Intron
chr17	83780341	83780357	TgAATG_TGTGCATGGAG	C	Mta3	Intron
chr11	80710752	80710767	TAAT_CTGTGTCA_GGAG	C	Myo1d	Intron
chr18	74444783	74444801	TAATtGCTGCGTCATGGAG	C	Myo5b	Intron
chr14	123406776	123406792	TAATG_TGTGTCA_GGAG	C	Nalcn	Intron
chr1	126215796	126215811	TAATG_TGtGCATGGAG	C	Nckap5	Intron
chr3	25586534	25586549	TAAT_CTGTGCATGGAT	C	Nlgn1	Intron
chr9	99470823	99470838	TAATGCTGTG_CATGGAA	C	Nme9 (Txndc6)	Exon
chr5	66274249	66274265	TCATGCTGTGTC_TGGAG	C	Nsun7	Intron
chr9	48362509	48362525	GAATGCTGTGTC_TGGAG	C	Nxpe4 (Fam55d)	Intron
chr9	27945855	27945872	TAATGCTGGGTCAGGGAG	C	Opcml	Intron
chr11	115345762	115345777	TAA_GCTGTGTCA_GGAG	C	Otop3	Intron
chr17	10539616	10539632	TCATGCTGTGCATGG_G	C	Pacrg	Intron
chr8	61834351	61834366	TAAT_CTGTG_CATGGAG	C	Palld	Intron
chr1	62110788	62110806	TAcAAGCTGTGCATGGAG	C	Pard3b	Intron
chr10	108360440	108360455	TAATGCTGTGTC_TGGGG	C	Pawr	Intron
chr5	57922288	57922305	AAATGCTCTGCATGGAG	C	Pcdh7	Intron
chr2	143649455	143649472	TAATGCTGTGTGCAGGAG	C	Pcsk2	Intron
chr14	48207181	48207196	TAATGCT_TGTCATGG_G	C	Peli2	Intron
chrX	150629038	150629055	TATT_CTGTGCATGGAG	C	Pfkfb1	Intron
chr9	105660749	105660766	TcAATGCTGTGGCATGGAG	C	Pik3r4	Intron
chr9	59674432	59674447	TAA_GCTGTGCATG_AG	C	Pkm	Intron
chr19	38595764	38595779	TAATGCT_T_TCATGGAG	C	Plce1	Intron
chr1	176262116	176262132	TAATGCC_TGTCATGGAG	C	Pld5	Intron

chr4	86666391	86666408	CAATGCTGTGCACGGAG	C	Plin2	Intron
chr3	54368435	54368451	TAATGCTGAGTCATGGAC	C	Postn	Intron
chr18	42704962	42704979	TAATGCTGTGCCTGCAG	C	Ppp2r2b	Intron
chr5	36936334	36936350	TACTGCTGTGTC_TGGAG	C	Ppp2r2c	Intron
chrX	101608947	101608962	TAATG_TGTGTCA_GGAG	C	Prrg1	Intron
chr8	67944708	67944724	TAATGCTGAGTC_TGGAG	C	Psd3	Intron
chr1	189757179	189757195	TACTGCTGTGCATGG_G	C	Ptpn14	Intron
chr2	90451681	90451696	TAATG_T_TGTCATGGAG	C	Ptpnj	Intron
chr2	132021620	132021635	TAATG_TGTGTCA_GGAG	C	Rassf2	Intron
chr1	131222499	131222515	TAATGCTGTCTCAT_GAG	C	Rassf5	Intron
chr5	28334254	28334271	TAAAGCTGTGGCATGGAG	C	Rbm33	Intron
chr13	105251886	105251903	TAATGCTGTGTgCAT_GAG	C	Rnf180	Intron
chr4	49640850	49640865	TAATG_TGTGTC_TGGAG	C	Rnf20	Intron
chr16	74148253	74148268	TAATG_TGTGTCATGGAT	C	Robo2	Intron
chr2	113184025	113184041	TAATGCTGTGCATG_TG	C	Ryr3	Intron
chr1	51296473	51296489	TAATGCTG_GTCATAGAG	C	Sdpr	Intron
chr10	127907647	127907663	TAATGCTTTGCATGGaAG	C	Sdr9c7	Intron
chr11	117242383	117242400	TTGTGCTGTGCATGGAG	C	Sept9	Intron
chr4	113700085	113700102	TAATGCTGTGTaCATGGAT	C	Skint5	Intron
chr8	78719002	78719019	TAATCCTGTGCCATGGAG	C	Slc10a7	Intron
chr2	165434988	165435004	TAATGCTGTGCTTGGGG	C	Slc13a3	Intron
chr19	28883669	28883686	TAAT_CTGTGTCAcTGGAG	C	Slc1a1	Intron
chr3	101913152	101913167	TAA_GCTGTG_CATGGAG	C	Slc22a15	Intron
chr11	53953426	53953443	TCATCCTGTGCATGGAG	C	Slc22a21	Intron
chr11	53867948	53867965	TCATCCTGTGCATGGAG	C	Slc22a5	Intron
chr11	120108321	120108336	TA_TGCTGTGTC_TGGAG	C	Slc38a10	Intron
chr12	30336893	30336909	TAATGCTGTGCCATG_AG	C	Sntg2	Intron

chr16	11377334	11377351	TCATCCTGTGTCATGGAG	C	Snx29	Intron
chr1	69890857	69890873	TA_TGCTGTGTCATAGAG	C	Spag16	Intron
chr19	46402879	46402896	TAAaTGCTGTGTCATGGAG	C	Sufu	Intron
chr18	5109542	5109558	AAATGCTGTGTCATGGAA	C	Svil	Intron
chr10	86392835	86392851	TAATG_TGTGTCATGGAG	C	Syn3	Intron
chr18	14800965	14800980	TAATGCTGTGT_ATGG_G	C	Taf4b	Intron
chr11	36152352	36152368	AAATGCTGTGTCATGGAA	C	Tenm2 (Odz2)	Intron
chr1	51142665	51142682	AAATACTGTGTCATGGAG	C	Tmeff2	Intron
chr9	75576264	75576280	TAAT_CTGTGTCATGTAG	C	Tmod2	Intron
chr1	105839964	105839981	TAATGCTGGGACATGGAG	C	Tnfrsf11a	Intron
chr3	27340712	27340729	TTATCCTGTGTCATGGAG	C	Tnfsf10	Intron
chr3	84170281	84170298	TAAcTGCTGTGTCATGGGG	C	Trim2	Intron
chrX	144675328	144675344	TAATGTTGT_TCATGGAG	C	Trpc5	Intron
chr13	56881298	56881315	TAA_GCTGTGtTCATGGAG	C	Trpc7	Intron
chr2	69948899	69948914	TAA_G_TGTGTCATGGAG	C	Ubr3	Intron
chr9	73957426	73957443	TTATGATGTGTCATGGAG	C	Unc13c	Intron
chr3	109481385	109481402	TAATGATGTATCATGGAG	C	Vav3	Intron
chr10	79268756	79268772	TAATGCTGTGT_ATGCAG	C	Vmn2r81	Exon
chr10	79379396	79379412	TAATGCTGTGT_ATGCAG	C	Vmn2r81	Exon
chr1	36779831	36779847	TCATGCTG_GTCATGGAG	C	Zap70	Exon
chr15	93392739	93392755	TAATTCTGTGTC_TGGAG	C	Zcrb1	Intron
chr17	30082062	30082079	AAATGCTGTGTGATGGAG	C	Zfand3 (Anub1)	Intron
chr6	116312864	116312881	TAgATGCTGTGTCA_GGAG	C	Zfand4	Intron
chr15	68093909	68093925	TTATGCTGTGTC_TGGAG	C	Zfat	Intron
chr4	55066017	55066033	TAATGCTGTTTCATGG_G	C	Zfp462	Intron
chr8	23910471	23910487	TATTGCTGT_TCATGGAG	C	Zmat4	Intron

第2節 肝毒性を示さない Gapmer のオフターゲット作用の検討

【目的】

前節において、肝毒性を示す Acs11-Gapmer は狭義のオフターゲット作用（非特異的 RNA 切断）を有することが明らかとなった。このことから Gapmer の標的に対する特異性は、肝毒性発現と関連することが示唆された。そこで次に、この特異性と毒性発現との関連をより詳細に検討するために肝毒性を示さない Gapmer による狭義のオフターゲット作用を調査した[75]。

本節では、モデル遺伝子として Malat1 (metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1) を選定し、Malat1 をターゲットとする既報の高活性かつ低毒性な Gapmer を用いて、標的に対する特異性について検討を行った。この Malat1 は転移性癌で発現上昇が見られ、核内に局在する long non-coding RNA として発見されたが、生理的な機能はよくわかっていない[76,77]。

【方法】

1. 使用化合物

まず、既報 Gapmer (Malat1-naïve) の配列特異性を調査した[77]。この Malat1-naïve の標的配列 (GCATTCAGTGAAGTAG) に対して完全一致もしくは1塩基ミスマッチを含む配列をマウスゲノム上で配列相同性検索を行ったところ、完全一致配列が5か所同定され、1塩基ミスマッチを含む配列が89か所同定された。

そこで、より高い配列特異性を有する Gapmer を求めて Malat1-naïve 配列の 3'-wing 領域 (G→T) を変換した Malat1-1MM を設計した。この Malat1-1MM はマウスゲノム上に完全一致の配列はなく1塩基ミスマッチが76配列と、Malat1-naïve と比較して高い配列特異性を有していた。これらの Malat1-naïve と Malat1-1MM を用いて、薬理活性および肝毒性評価を行った。

Gapmer は、株式会社ジーンデザインで合成、精製された化合物を使用した。本節で使用した Gapmer の ID と塩基配列、配列特異性を以下に示す (表 11.)。

表 11. 本節で使用した Gapmer のリスト

ID	Sequence*	Specificity	No. of target sequences in mouse genome		Ref.
			1 MM	0 MM	
			(RNA-coding genes)	(RNA-coding genes)	
Malat1-naïve	5'-CTAgttcactgaaTGC-3'	Mid-Low	89 (37)	5 (3)	77
Malat1-1MM	5'-CTAgttcactgaaTTC-3'	Mid-High	76 (32)	0	-

*All of oligonucleotides were fully modified with phosphorothioate. Upper case; LNA, Lower case: DNA

2. 動物実験

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験適正運用委員会の承認を得て規定に準拠して実施した。

3. 化合物投与、採血、および臓器採取

実験 1：Malat1-naïve および Malat1-1MM 投与によるノックダウン活性および肝毒性評価

7 週齢の雄性 C57BL6/J マウス（日本クレア）に対して、Malat1-naïve および Malat1-1MM は 10、20、200mg/kg の投与量で、それぞれ生理食塩水に溶解させ皮下投与した。化合物投与 7 日後に sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取した後に、肝臓を摘出した。肝臓を PBS で洗浄後、qRT-PCR 解析のために約 40mg を RNAlater (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後に、解析まで -80°C で保存した。

実験 2：マイクロアレイデータを用いた Malat1-1MM によるオフターゲット作用の検討

7 週齢の雄性 C57BL6/J マウス（日本クレア）に対して、Malat1-1MM を 20mg/kg の投与量にて生理食塩水に溶解させ皮下投与を行った。肝毒性によって生じる二次的な遺伝子発現の変動を避けるため、化合物投与後 24 時間で sodium pentobarbital による麻酔下にて全血を採取した後に、肝臓を摘出した。肝臓は PBS で洗浄し、マイクロアレイ解析のために約 40mg を RNAlater (QIAGEN) に浸し 4°C で一晩インキュベートした後に、解析まで -80°C で保存した。

4. qRT-PCR によるノックダウン活性評価

肝臓サンプルから RNeasy 96 Universal Kit (Qiagen) で total RNA を精製した。100ng の total RNA を用いて One Step SYBR primescript (Takara Bio)、ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により qRT-PCR を実施した。定量化された RNA レベルは Gapdh に対して補正した。なお qRT-PCR のプライマーは以下に示した (表 12.)。

表 12. 使用したプライマーリスト

Gene		Primer Sequence
Aff3	Forward	GACAATGGCGCATCGAACAC
	Reverse	TGTCAGCTAGAGCGCGGAGA
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
Golp3l	Forward	TGGATGAGACGCTCAAACACATTA
	Reverse	CCACCAGGTTCTTGCAATTC
Lrrc4c	Forward	AATGTTACTGCGGCAACCACTACTC
	Reverse	ATCTGTGGTCCGTGCCTCATC
Malat1	Forward	GACGGAGGTTGAGATGAAGC
	Reverse	ATTCGGGGCTCTGTAGTCCT
March1	Forward	ACGATGCTGTGAGCTCTGCAA
	Reverse	ACACAGGTGACGGCGATGA
Oprm1	Forward	CACGGCTAATACAGTGGATCGAA
	Reverse	AAGATCTGGCCACGCTGA
P4ha3	Forward	ACTTCATGCTGGCTGTCCTGTG
	Reverse	CCAGTGTTCAGTCTCAGGGTTG
Pdzn3	Forward	TGCTGATTGCAAGGCCTGA
	Reverse	TGAACTGCATGGCCTGGTG
Pitpnc1	Forward	AGGACCCTCACCATGGCAAC
	Reverse	GAACAACAGCTCTGGCCCAACTA

5. ALT および AST の測定

ALT および AST は Transaminase CII-test Wako（和光純薬工業）を使用し、添付のマニュアルに従って測定した。

6. マイクロアレイ解析と GGGenome を用いた配列相同性検索

マウス肝臓から単離された total RNA は、添付のマニュアルに従ってマウスの全ゲノム（8×60K）OligoMicroarrayKit（Agilent Technology）を用いてマイクロアレイ解析を行った。Malat1-1MM のオフターゲット候補となる本来の標的配列（GAATTCAGTGAAGTAG）に類似した塩基配列を含む RNA 転写産物は、高速塩基配列検索データベース GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/en>) を用いて配列相同性検索を実施した。

【結果】

実験 1 : Malat1-naïve および Malat1-1MM 投与によるノックダウン活性および肝毒性評価

まず、既報 Gapmer である Malat1-naïve とより高い配列特異性を持つ Malat1-1MM をマウスに投与し、ノックダウン活性と肝毒性発現を比較した[77]。qRT-PCR により Malat1 ノックダウン解析を行った結果、Malat1-naïve 投与の場合、10mg/kg 投与で生理食塩水投与群と比較して 92% 減少、200mg/kg 投与で 94%減少と強力なノックダウン活性を示した。Malat1-1MM 投与の場合も、10mg/kg 投与で生理食塩水投与群と比較して 89%減少、200mg/kg 投与で 92%減少と Malat1-naïve と同等の強力なノックダウン活性を示した (図 19.a)。また Malat1-naïve および Malat1-1MM 投与群ともに高用量投与 (200mg/kg) しても、生理食塩水投与群と比較して ALT と AST は有意に上昇しなかった (図 19.b,c)。

実験 2 : マイクロアレイデータを用いた Malat1-1MM によるオフターゲット作用の検討

2-1. オフターゲット候補遺伝子の選抜

次に、マイクロアレイデータを用いて配列特異性の高い Malat1-1MM の狭義のオフターゲット作用 (非特異的 RNA 切断) を調査した。まず、GGGnome を用いて Malat1-1MM の標的配列 (GAATTCAGTGAAGTAG) に対して類似塩基配列を含む配列相同性検索を行い、2 塩基未満のミスマッチを含むオフターゲット候補遺伝子を検索した。その後、マイクロアレイデータを用いてオフターゲット候補遺伝子の発現を再解析した。その結果、Malat1-1MM 投与により 8 種類の遺伝子発現が抑制傾向を示した (図 20.a)。これらのオフターゲット候補遺伝子のうち 4 種類は pre-mRNA に複数のターゲットのような配列を持っていた。また Malat1-1MM 投与により発現が上昇する遺伝子はなかった。

2-2. Malat1-1MM によるノックダウン活性評価

さらに、上記 8 種類のオフターゲット候補遺伝子がマウス肝臓中で実際にノックダウンされているかどうかを、Malat1-1MM 200mg/kg 投与時のマウス肝臓中 RNA サンプルを用いて qRT-PCR により解析した。その結果、高用量を投与したにも関わらず 8 遺伝子の mRNA 発現量は生理食塩水投与群と比較して有意な減少は認められなかった (図 20.b)。

以上、既報 Gapmer である Malat1-naïve と高い配列特異性を持つ Malat1-1MM をマウスに投与すると、それぞれ肝毒性を惹起することなく標的遺伝子を強力にノックダウンした[77]。さらに Malat1-1MM は、標的配列に類似した配列を含む 8 種類のオフターゲット候補遺伝子をノックダウンしなかった。

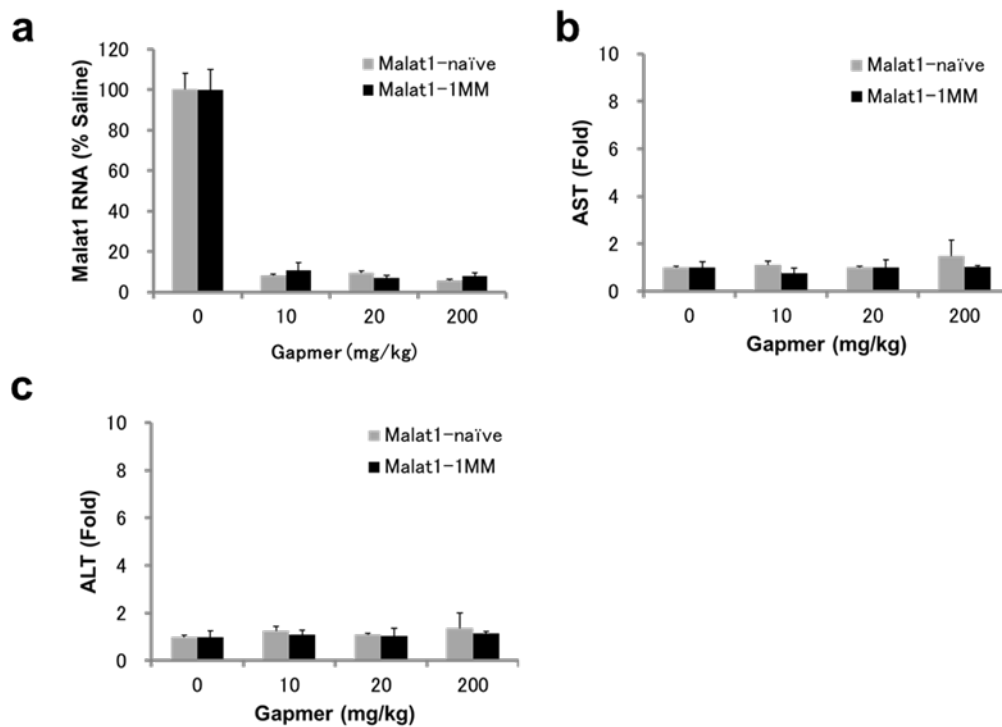


図 19. Malat1-naïve および Malat1-1MM は強力なノックダウン活性を示したが、肝毒性は惹起しなかった。(a)Malat1-naïve と Malat1-1MM 投与群ともに、すべての投与量において生理食塩水投与群と比較して強力なノックダウン活性 (約 90%減少) を示した。(b,c)ALT および AST は、Malat1-naïve および Malat1-1MM とともに高用量投与 (200mg/kg) しても生理食塩水投与群と比較して有意に上昇しなかった。(n=3, mean ± S.D.)

a

Gene	Malat1 expression (%)		Chr.	Position (from)	Position (to)	Sequence	MM	Intron/ Exon
	Malat1-1MM	Negative control						
Malat1	56	88	19	5801341	5801356	GcATTCAGTGAAGTAG	1	Exon
P4ha3	51	60	7	100314159	100314173	aAATTCAGTGA_CTAG	2	Intron
March1	61	102	8	65906628	65906644	GAATaCAGTGgAACTAG	2	Intron
March1	61	102	8	66096279	66096294	GAATTtAGTtAACTAG	2	Intron
March1	61	102	8	66452302	66452318	GAATTCtGTGaaACTAG	2	Intron
Pitpnc1	62	83	11	107213826	107213842	GAATTtAGTGAAGTAG	2	Intron
Pitpnc1	62	83	11	107333514	107333529	GcATgCAGTGAAGTAG	2	Intron
Aff3	64	87	1	38443237	38443251	GAAgTCAG_GAACTAG	2	Intron
Aff3	64	87	1	38644310	38644324	GAATTCAGaGAACT_G	2	Intron
Oprm1	64	90	10	7034859	7034872	GAATTCAGT_AACTAa	2	Intron
Pdzm3	65	91	6	101165688	101165703	GAATTtCAGTGAAGTAt	2	Intron
Lrrc4c	65	91	2	96567636	96567651	GAATTCAGTgtgCTAG	2	Intron
Lrrc4c	65	91	2	96623137	96623151	GAATTCAGTGAgCTAc	2	Intron
Lrrc4c	65	91	2	96652385	96652400	GAgcTCAGTGAAGTAG	2	Intron
Lrrc4c	65	91	2	97134081	97134098	GAATTCAGTGAcACTtAG	2	Intron
Lrrc4c	65	91	2	97197907	97197921	GAATTCA_TGAgCTAG	1	Intron
Lrrc4c	65	91	2	97405699	97405713	GAATTCAGTGAaT_G	2	Intron
Golph3l	66	91	3	95594239	95594253	GAAcTCAGT_AACTAG	2	Intron

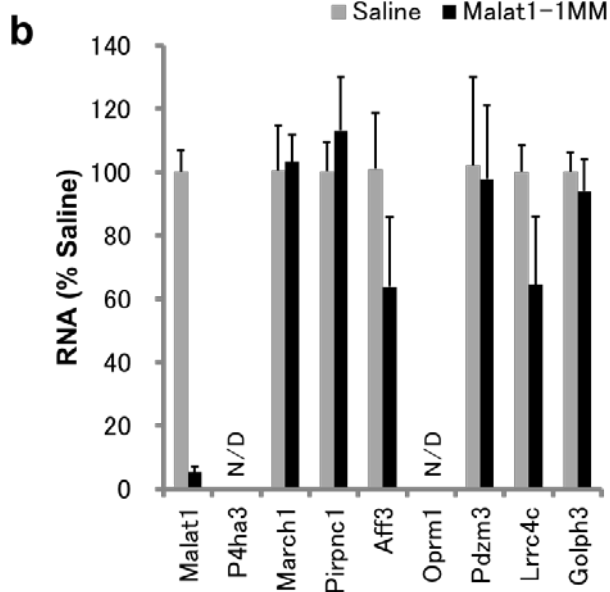


図 20. Malat1-1MM は狭義のオフターゲット作用を示さなかった。(a)マイクロアレイデータから標的類似配列 (2 塩基以内のミスマッチを含む) を有するオフターゲット候補が 8 遺伝子選抜された。候補遺伝子中の標的類似配列はすべてイントロンに存在した。(b)Malat1-1MM を投与してもオフターゲット候補遺伝子はノックダウンされなかった。(n=3, mean \pm S.D. N/D, not detected)

【考察】

本章では、Gapmer の標的 RNA に対する特異性と肝毒性発現は関連するとの仮説を立て、肝毒性を示す Acs11-Gapmer と肝毒性を示さない Malat1-1MM による狭義のオフターゲット作用(非特異的 RNA 切断)を検討した。このオフターゲット作用は、Gapmer の標的以外の完全一致配列もしくは類似した配列を有する RNA が切断されることで生じると想定された。これまでに毒性がある Gapmer は、オフターゲットノックダウン効果を示す傾向があることが報告されている[37,38]。そこでゲノムデータベースやマイクロアレイデータを用いて、Acs11-Gapmer と Malat1-1MM のオフターゲット作用を多面的に検討し、以下の知見を得た。

第1節では、肝毒性を示す Acs11-Gapmer は標的配列に類似した配列の非特異切断が認められたことから、狭義のオフターゲット作用が確認された。また、その標的類似配列は全てイントロンに存在していたことから、Acs11-Gapmer は核内において pre-mRNA を非特異的に切断していると推察された。

第2節では、肝毒性を示さない Malat1-1MM は、標的配列に類似した配列の非特異切断が認められなかった。この結果から、オフターゲット作用を示さなかったと明確に結論付けることはできないが、標的類似配列の非特異切断がみられない場合には肝毒性が惹起されないことが示唆された。同時に、Malat1-1MM は Acs11-Gapmer と比較して標的特異性および/または配列特異性が高い Gapmer であることが示された。

以上のことから、Gapmer による標的以外の標的類似配列の非特異切断と肝毒性発現は関連することが示唆された。しかしながら、Gapmer による非特異的な pre-mRNA 切断がなぜ肝毒性を惹起するのか、さらには Malat1-1MM が Acs11-Gapmer と比較して標的特異性および/または配列特異性がなぜ高いのか、これらの要因については未だ明確な答えは得られておらず、その解明に興味を持たれるところである。

総括

次世代の医薬品として多数の Gapmer が開発段階にあるが、一方で臨床および非臨床モデルにおいて肝毒性を高頻度で惹起することも報告されている[8,28-30]。しかしながらこれらの毒性発現メカニズムの詳細は不明であり、今後、安全かつ継続的な創薬プラットフォームとして Gapmer を活用していくためには、肝毒性発現の要因を明らかにすることが不可避であった。そこで本研究では、薬理活性および肝毒性発現の双方が強力な LNA 修飾 Gapmer をモデルとして用い、Gapmer による肝毒性発現の要因について、その発現メカニズムに焦点をあてた研究を実施し、以下の成果を得た。

第 1 章において、Gapmer の中央部、標的 RNA の切断に重要な部分（ ” Gap ” 領域）を化学修飾することで、ノックダウン活性と肝毒性が共に消失することを見出した。

第 2 章において、Gapmer の活性に必須な RNase H1 に対する siRNA を用いてマウス肝臓中 RNase H1 の発現を抑制したところ、全ての Gapmer のノックダウン活性と肝毒性が減弱もしくは消失することを見出した。これらの結果から、Gapmer による肝毒性は RNase H1 の活性に依存することを明らかにした。

第 3 章において、Gapmer と同一の mRNA 領域を標的とした siRNA を用いて、標的遺伝子を Gapmer と同程度にノックダウンしても肝毒性が惹起されないことを見出した。これらの結果から Gapmer による肝毒性は、オンターゲット作用ではないことを示した。

第 4 章において、Gapmer は核内で pre-mRNA を切断し、siRNA は細胞質で mRNA を切断することを示した。

第 5 章において、肝毒性を示す Gapmer は標的配列と類似した配列を有する多数の pre-mRNA を非特異的に切断したことから、狭義のオフターゲット作用を有することが確認された。一方、肝毒性を示さない Gapmer は標的類似配列の非特異切断が認められなかった。

以上の知見から、Gapmer による肝毒性発現の主要因は、RNase H1 を介した RNA の非特異的な切断であることを明らかにした。

細胞質に比べ膨大な種類の RNA が存在する核内において RNA が切断されるということは、それらの RNA 全てが Gapmer による非特異的切断の標的となり得ることを意味する[78-80]。実際に、Acs11-Gapmer は核内に存在する pre-mRNA を非特異的に切断し、標的以外の複数の遺伝子をノックダウンした。核内で作用するという点は細胞質で作用する siRNA と大きく異なる部分であり、Gapmer だけでみられる毒性発現の要因の一つである可能性がある。他のグループか

らも同様の報告があることを踏まえると、Gapmer は核内で様々な RNA を非特異的に切断し、必須遺伝子を抑制することで肝毒性を惹起していると推察された[37,38]。これはバイオインフォマティクスを駆使して mRNA のみならずゲノム全体を調べ、配列特異性が極めて高い配列を選抜することで Gapmer の毒性が回避できる可能性があることを示唆している。しかしながら肝毒性を示した Acs11-Gapmer の特異性はそれほど高くなかったことを考慮すると、現状、毒性を示さない Gapmer を選抜するためには *in silico* を用いた配列特異性解析だけでは十分とは言えず、*in vitro* や *in vivo* の検討を併せて実施し標的特異性を確認する必要があるだろう。

これらのことから、今後、毒性を示さない Gapmer を創製するためには、ゲノムレベルでの配列特異性の担保や、修飾を駆使した標的特異性の確保が重要になると考えられる。この配列特異性を担保するためには、マイクロレイや次世代シーケンサーなどを用いて毒性配列/非毒性配列間で類似配列を有する遺伝子の RNA 量比較など網羅的な解析を行うことにより、ゲノムレベルで特異性の高い配列が選抜可能なアルゴリズムの開発が必要となる可能性がある。また、標的特異性の確保には、標的 RNA に対する配列認識能向上や切断部位を厳密に制御するための新しい化学修飾ヌクレオチドの創製や配列モチーフ設計の精緻化が重要と考えられる [22,35,81,82]。加えて、最近、Shen らによって 5'-wing 領域から 2 塩基目の "Gap" 領域に 2'-OMe RNA を導入することにより Gapmer と生体内タンパク質間の相互作用が減少し、薬理活性の向上のみならず肝毒性が減少することが報告された[83-86]。これらの報告から、配列特異性や標的特異性以外にも生体内タンパク質との非特異的な相互作用も考慮する必要があるだろう。このようにバイオインフォマティクスや修飾化学技術、配列モチーフ設計などがさらに発展することにより、高い安全性を有する Gapmer の探索に繋がることが期待される。

以上をまとめると本研究の成果として、Gapmer による肝毒性発現の主要因は RNase H1 依存的な RNA の非特異的な切断であることを明らかにした。また、肝毒性を示さない Gapmer を創製するためには、ゲノムレベルでの配列特異性の担保や標的特異性の確保が重要となる可能性を示すことができた。本研究で得られたこれらの知見により、今後、Gapmer の毒性発現メカニズムの全貌が明らかとなり、さらには高い安全性と有効性を併せもつ画期的な Gapmer の創製につながることを期待したい。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご親切なるご指導、ご高配を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・薬品作用学教室教授、池谷裕二先生に謹んで感謝申し上げます。

本論文を審査して頂き、適切かつ有益な御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室教授 楠原洋之先生、東京大学大学院薬学系研究科・衛生化学教室准教授 河野望先生、東京大学大学院薬学系研究科・細胞情報学教室准教授 名黒功先生、東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室講師 前田和哉先生に深く感謝申し上げます。

本研究の機会を賜り、ご便宜およびご高配を賜りました塩野義製薬株式会社 武本浩氏、出口昌志氏、前川和彦氏に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なるご尽力を賜り、また有益なご助言及びご指導を頂きました塩野義製薬株式会社 粕谷武史氏、堀真一郎氏、渡邊郁剛氏、中嶋麻童氏、我原義成氏、六嶋正知氏、柳本徹氏ならびに核酸医薬グループメンバーをはじめ、ご協力を頂戴した皆さまに深く感謝致します。

最後に、支えて頂きました家族に心より感謝致します。

参考文献

1. <https://clinicaltrials.gov/>
2. 2019 年版世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望, シードプランニング, 2019.
3. Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 280-284.
4. Stephenson, M.L., Zamecnik, P.C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 285-288.
5. Crook, S.T. (2008) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, 2nd edition, Marcel Dekker, New York.
6. Bennett, F.C. and Swayze, E.E. (2010) RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev.*, **50**, 259-293.
7. Lindow, M. and Kauppinen, S. (2012) Discovering the first microRNA-targeted drug. *J. Cell Biol.*, **199**, 407-412.
8. Geary, R.S. (2009) Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 381-391.
9. Obika, S., Morio, K., Nanbu, D. and Imanishi, T. (1997) Synthesis and conformation of 3'-O,4'-C-methyleneribonucleosides, novel bicyclic nucleoside analogues for 2', 5'-linked oligonucleotide modification. *Chem. Commun.*, **17**, 1643-1644
10. Koshkin, A.A., Singh, S.K., Nielsen, P., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C.E. and Wengel, J. (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented

nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, **54**, 3607-3630

11. Seth, P.P., A Siwkowski, C.R., Allerson, G., Vasquez, S., Lee, T.P., Prakash, E.V., Wancewicz, D. (2009) Short antisense oligonucleotides with novel 2'-4' conformationally restricted nucleoside analogues show improved potency without increased toxicity in animals. *J. Med. Chem.*, **52**, 10-13.

12. Turchi, J.J., Huang, L., Murante, R.S., Kim, Y. and Bambara, R.A. (1994) Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 9803-9807.

13. Lazzaro, F., Novarina, D., Amara, F., Watt, D.L., Stone, J.E., Costanzo, V., Burgers, P.M., Kunkel, T.A., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2012) RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol. Cell*, **45**, 99-110.

14. Cerritelli, S.M., Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E. and Crouch, R.L. (2003) Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol. Cell*, **11**, 807-815.

15. Wu, H., Lima, W.F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H. and Crooke, S.T. (2004) Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J. Biol. Chem.*, **279**, 17181-17189

16. Yu, R.Z., Geary, R.S., Flaim, J.D., Riley, G.C., Tribble, D.L., vanVliet, A.A. and Wedel, M.K. (2009) Lack of pharmacokinetic interaction of mipomersen sodium (ISIS 301012), a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting apolipoprotein B-100 messenger RNA, with simvastatin and ezetimibe. *Clin. Pharmacokinetics*, **48**, 39-50

17. Yu, R.Z., Kim, T., Hong, A., Watanabe, T.A., Gaus, H.J. and Geary R.S. (2007) Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metabol. Dis.*, **35**, 460-468

18. Kastelein, J.J., Wedel, M.K., Baker, B.F., Su, J., Bradley, J.D., Yu, R.Z., Chuang, E., Graham, M.J. and Crooke, R.M. (2006) Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*, **114**, 1729-1735.

19. Dyck, P.K., Dyck, P.J., et al. (2017) Assessing mNIS+7Ions and international neurologists' proficiency in a familial amyloidotic polyneuropathy trial. *Muscle Nerve.*, **56**, 901-911.
20. Paik, J., Duggan, S. (2019) Volanesorsen: First Global Approval. *Drugs.*, **79**, 1349-1354.
21. Burel, S.A., SR Han, HS Lee, DA Norris, BS Lee, T Machemer, SY Park, T Zhou, G He, et al. (2013) Preclinical evaluation of the toxicological effects of a novel constrained ethyl modified antisense compound targeting signal transducer and activator of transcription 3 in mice and cynomolgus monkeys. *Nucleic Acid Ther.*, **23**, 213-227.
22. Shen, X. and DR, Corey. (2017) Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acid Res.*, **46**, 1584-1600.
23. Frazier, K. S., (2015) Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. *Toxicol. Pathol.*, **43**, 78-89.
24. 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, **46**, 681-686.
25. FDA Briefing Document, Mipomersen Sodium Injection 200 mg/mL (2012) NDA 203568
26. EMA public assessment report, Questions and answers on the refusal of the marketing authorisation for Kynamro (Mipomersen Sodium) -Outcome of re-examination (2013) EMA/177547/2013
27. Food and Drug Administration Center for Drug evaluation and Research 2018,
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211172lbl.pdf
28. Swayze, E.E., Siwkowski, A.M., Wancewicz, E.V., Migawa, M.T., Wyrzykiewicz, T.K., Hung, G., Monia, B.P. and Bennett, C.F. (2007) Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 687-700.

29. Stanton, R., Sciabola, S., Salatto, C., Weng, Y., Moshinsky, D., Little, J., Walters, E., Kreeger, J., DiMattia, D., Chen, T., Clark, T., Liu, M., Qian, J., Roy, M. and Dullea, R. (2012) Chemical modification study of antisense gapmers. *Nucleic Acid Ther.*, **22**, 344-559.
30. van Poelgeest, E.P., Swart, R.M., Betjes, M.G., Moerland, M., Weening, J.J., Tessier, Y., Hodges, M.R., Levin, A.A. and Burggraaf, J. (2013) Acute kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9. *Am. J. Kid. Dis.*, **62**, 796-800.
31. Seth, P.P., Jazayeri, A., Yu, J., Allerson, C.R., Bhat, B. and Swayze, E.E. (2012) Structure activity relationships of α -L-LNA modified phosphorothioate gapmer antisense oligonucleotides in animals. *Mol. Ther. Nucleic Acids.*, **1**, e47.
32. Seth, P.P., Allerson, C.R., Berdeja, A., Siwkowski, A., Pallan, P.S., Gaus, H., Prakash, T.P., Watt, A.T., Egli, M. and Swayze, E.E. (2010) An exocyclic methylene group acts as a bioisostere of the 2'-oxygen atom in LNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 14942-14950.
33. Egli, M., Pallan, P.S., Allerson, C.R., Prakash, T.P., Berdeja, A., Yu, J., Lee, S., Watt, A., Gaus, H., Bhat, B. *et al.* (2011) Synthesis, improved antisense activity and structural rationale for the divergent RNA affinities of 3'-fluoro hexitol nucleic acid (FHNA and Ara-FHNA) modified oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 16642-16649.
34. Burdick, A.D., Sciabola, S., Mantena, S.R., Hollingshead, B.D., Stanton, R., Warneke, J.A., Zeng, M., Martsen, E., Medvedev, A., Makarov, S.S., *et al.* (2014) Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4882-4891.
35. Hagedorn, P.H., Yakimov, V., Ottosen, S., Kammler, S., Nielsen, N.F., Høg, A.M., Hedtjörn, M., Meldgaard, M., Møller, M.R., Orum, H., *et al.* (2013) Hepatotoxic potential of therapeutic oligonucleotides can be predicted from their sequence and modification pattern. *Nucleic Acid Ther.*, **23**, 302-310.
36. Kakiuchi-Kiyota, S., Koza-Taylor, P.H., Mantena, S.R., Nelms, L.F., Enayetallah, A.E., Hollingshead, B.D., Burdick, A.D., Reed, L.A., Warneke, J.A., Whiteley, L.O., *et al.* (2014) Comparison of hepatic

transcription profiles of locked ribonucleic acid antisense oligonucleotides: evidence of distinct pathways contributing to non-target mediated toxicity in mice. *Toxicol. Sci.*, **138**, 234-248.

37. Burel, S.A., Hart, C.E., Cauntay, P., Hsiao, J., Macheimer, T., Katz, M., Watt, A., Bui, H.H., Younis, H., Sabripour, M. *et al.* (2015) Hepatotoxicity of high affinity gapmer antisense oligonucleotides is mediated by RNase H1 dependent promiscuous reduction of very long pre-mRNA transcripts. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2093-2109.

38. Kamola, P.J., Kitson, J.D., Turner, G., Maratou, K., Eriksson, S., Panjwani, A., Warnock, L.C., Douillard Guilloux, G.A., Moores, K., Koppe, E.L. *et al.* (2015) *In silico* and *in vitro* evaluation of exonic and intronic off-target effects form a critical element of therapeutic ASO gapmer optimization. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8638-8650.

39. Kawai, T. and Akira, S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **34**, 637-650.

40. Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-549.

41. Kawabata, T., Kinoshita, M., Inatsu, A., Habu, Y., Nakashima, H., Shinomiya, N. and Seki, S. (2008) Functional alterations of liver innate immunity of mice with aging in response to CpG-oligodeoxynucleotide. *Hepatology*, **48**, 1586-1597.

42. Senn, J.J., Burel, S. and Henry, S.P. (2005) Non-CpG-containing antisense 2'-methoxyethyl oligonucleotides activate a proinflammatory response independent of Toll-like receptor 9 or myeloid differentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 972-979.

43. Burel, S.A., Macheimer, T., Ragone, F.L., Kato, H., Cauntay, P., Greenlee, S., Salim, A., Gaarde, W.A., Hung, G., Peralta, R., Freier, S.M. and Henry, S.P. (2012) Unique O-methoxyethyl ribose-DNA chimeric oligonucleotide induces an atypical melanoma differentiation-associated gene 5-dependent induction of Type I interferon response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **342**, 150-162.

44. Vollmer, J., Jepsen, J.S., Uhlmann, E., Schetter, C., Jurk, M., Wader, T., Wüllner, M. and Krieg, A.M. (2004) Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides*, **14**, 23-31.
45. Watanabe, T.A., Geary, R.S., Levin, A.A. (2006) Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). *Oligonucleotides*, **16**, 169-180.
46. Food and Drug Administration Center for Drug evaluation and Research. 2013, Kynamuro (mipomersen sodium) Injection Pharmacology Review (s). www.accessdata.fda.gov/203568Orig1s000Rems
47. Koczor, C.A., Torres, R.A. and Lewis, W. (2012) The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **8**, 665-676.
48. Kassel, O. and Herrlich, P. (2007) Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Mol. Cel. Endocrinol.*, **275**, 13-29.
49. LI, L.O., Klett, E.L. and Coleman, R.A. (2010) Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1801**, 246-251.
50. Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S. (1999) Molecular diversities of RNases H. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 12-29.
51. Rychlik, M., P.; Chon, H., Cerritelli, S.M., Klimek, P., Crouch, R.J., Nowotny, M. (2010) Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Molecular. Cell*, **40**, 658-670.
52. Cerritelli, S.M, Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E., Crouch, R.J. (2003) Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Molecular Cell*, **11**, 807-815.
53. Akman, G, Frolova, Desai, R., Bailey, L.J., Yasukawa, T., Rosa, I.D. *et al.* (2016) Pathological ribonuclease H1 causes R-loop depletion and aberrant DNA segregation in mitochondria. *Proc. Natl Acad.*

Sci. USA, **30**, 4276-4285.

54. Reijns, M.A., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice LA., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, *et al.* (2012) Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome Integrity and development. *Cell*, **149**, 1008-1022.

55. Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R. and Roers, A. (2012) Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J. Exp. Med.*, **8**, 1419-1426.

56. Reijns, M.A., Bubeck, D., Gibson, L.C., Graham, S.C., Baillie, G.S., Jones, E.Y. and Jackson, A.P. (2011) The structure of the human RNase H2 complex defines key interaction interfaces relevant to enzyme function and human disease. *J. Biol. Chem.*, **286**, 10530-10539.

57. Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., *et al.* (2006) Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.*, **38**, 910-916.

58. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A, Driver, S.E, Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.

59. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **24**, 494-498.

60. Straarup, E.M., Fisker, N., Hedtjærn, M., Lindholm, M.W., Rosenbohm, C., Aarup, V, Hansen, H.F., Ørum, H., Hansen, J.B. and Koch, T. (2010) Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acid Res.*, **38**, 7100-7111.

61. Dobie, K.W. and Koller, E. (2006) Inventors; Isis Pharmaceuticals, Inc., assignee. Antisense modulation of kinesin-like 1 expression. United States patent US 7,163,927.

62. Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
63. Hutvagner, G., Simard, M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 22-32.
64. Nair J.K., Willoughby, J.L., Chan, A., Charisse, K., Alam, M.R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A.V., Milstein, S., *et al.* (2014) Multivalent *N*-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 16958-16961.
65. Watanabe, A., Nakajima, M., Kasuya, T., Onishi, R., Kitade, N., Mayumi, K., Ikehara T. and Kugimiya, A. (2016) Comparative characterization of hepatic distribution and mRNA reduction of antisense oligonucleotides conjugated with triantennary *N*-acetyl galactosamine and lipophilic ligands targeting apolipoprotein B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **357**, 320-330.
66. Li, O.L., Ellis, M.J., Paich, A.H., Wang, S., Gong, N., Altshuler, G., Thresher, J.R., Koves, R.T., Watkins, M.S., Muoio, M.D., Cline, W.G., Shulman, I.G. and Coleman, R.A. (2009) Liver-specific loss of long chain acyl-coA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and α -oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. *J. Biol. Chem.*, **284**, 27816-27826.
67. Warf, M.B., Berglund, J.A. (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 169-178.
68. Kiss, T. (2001) Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.*, **20**, 3617-22.
69. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2007) *Biochemistry, 6th edition*, WH Freeman & Co.
70. Hutvagner, G., Simard, M.J. (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 299-306.

71. Suzuki, Y., Holmes, J.B., Cerritelli, S.M., Sakhuja, K., Minczuk, M., Holt, I.J. and Crouch, R.J. (2010) An upstream open reading frame and the context of the two AUG codons affect the abundance of mitochondrial and nuclear RNase H1. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 5123-5134.
72. Lindow, M., Vornlocher, HP., Riley, D., Kornbrust, D.J., Burchard, J., Whiteley, L.O., Kamens, J., Thompson, J.D., Nochur, S., Younis, H., Bartz, S., Parry, J., Ferrari, N., Henry, S.P., Levin, A.A. (2001) Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 920-923.
73. Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W.S., Khvorova, A. (2006) 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods.*, **3**, 199-204.
74. Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, PS. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 635-637.
75. Kasuya, T., Kugimiya, A. (2018) Role of Computationally Evaluated Target Specificity in the Hepatotoxicity of Gapmer Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.*, **28**, 312-317.
76. Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W.E., Serve, H., Müller-Tidow, C. (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **22**, 8031-8041.
77. Hung, G., Xiao, X., Peralta, R., Bhattacharjee, G., Murray, S., Norris, D., Guo, S. and Monia, B.P. (2013) Characterization of target mRNA reduction through in situ RNA hybridization in multiple organ systems following systemic antisense treatment in animals. *Nucleic Acids Ther.*, **23**, 369-378.
78. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., *et al.* (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, **309**, 1559–1563.

79. Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., Barciszewski, J. (2005) A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1756**, 65–75.
80. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., *et al.* (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, **309**, 1559–1563.
81. Yamamoto, T., Yahara, A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M., Obika, S. (2015) Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo. *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 3757-3765.
82. Hagedorn, P.H., Hansen, B.R., Koch, T and Lindow, M. (2017) Managing the sequence-specificity of antisense oligonucleotides in drug discovery. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2262-2282.
83. Shen, W., De, Hoyos, CL., Migawa, M.T., Vickers, T.A., Sun, H., Low, A., Bell, T.A., Rahdar M., Mukhopadhyay, S., *et al.* (2019) Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 640-650.
84. Liang, X.H., Sun, H., Shen, W. & Crooke, S.T. (2015) Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2927-2945.
85. Shen, W. *et al.* (2018) Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2204-2217.
86. Burel, S.A., Han, S.R., Lee, H.S., Norris, D.A., Lee, B.S., Macheimer, T., Park, S.Y., Zhou, T., He, G, *et al.* (2013) Preclinical evaluation of the toxicological effects of a novel constrained ethyl modified antisense compound targeting signal transducer and activator of transcription 3 in mice and cynomolgus monkeys. *Nucleic Acid Ther.*, **23**, 213–227.