

## 論文の内容の要旨

論文題目 Gapmer 型アンチセンスの肝毒性発現に関する研究

氏名 釘宮 啓

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 RNA 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。核酸医薬品の中でも Gapmer 型アンチセンス (以下、Gapmer と呼ぶ) は、現在までに 3 品目上市されている有力な創薬モダリティである。しかしながら Gapmer には、肝毒性懸念があることが知られている。実際に、2013 年に米国においてヘテロ接合性家族性高コレステロール血症を対象として承認された Mipomersen (商品名: Kynamro®) は、欧州では不可逆的な肝障害リスクが理由の一つとして承認を拒絶されている。この Gapmer の肝毒性発現機構については、従来から研究がおこなわれているが未だ詳細に解明されていない。今後、Gapmer を安全な医薬品として継続的に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となっている。

そこで本研究では、Gapmer 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検討をおこなった。文献情報やこれまでの創薬経験から、Gapmer は薬理活性が強い配列ほど肝毒性が強く惹起される傾向にあるが、薬理活性が弱い配列は概して肝毒性を示さないことが知られている。また、肝毒性を示す Gapmer はオフターゲット作用を有することも報告されている。これらの知見をふまえ、今回、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、核酸化合物自体が持つ毒性や RNA 切断機構と肝毒性の関連性、標的 RNA に対する配列特異性解析などを調査した。

Gapmer は、配列特異的かつ RNase H1 (Ribonuclease H1) 依存的に標的 RNA の切断を誘導する。一方、Gapmer の RNA 切断に重要な中央部位 ("Gap" 領域) を化学修飾した Non-Gapmer (Mixmer ともいう) は標的 RNA の切断活性が消失する。第 1 章では、この二つのアンチセンス核酸の構造とメカニズムの差異が肝毒性に及ぼす影響を調査した。高活性かつ高毒性を示す GR-Gapmer および Acs11-Gapmer と同一塩基配列を有する GR-NonGapmer および Acs11-NonGapmer 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した。その結果、Gapmer 投与群において標的 mRNA のノックダウンと肝毒性マーカー (ALT および AST) の上昇が認められた。一方、Non-Gapmer 投与群ではノックダウン活

性と肝毒性が同時に消失した。これらのことからアンチセンス核酸による肝毒性は Gapmer 構造に起因し、RNA 切断に依存する可能性を見出した。第 2 章では、Gapmer による RNase H1 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 H1 発現抑制が Gapmer 投与による肝毒性にどのような影響を与えるかを調べた。具体的には、マウスに RNase H1 に対する siRNA を事前投与することで肝臓中の RNase H1 発現を抑制（50%以下）した条件下、GR-Gapmer および Acs11-Gapmer を投与し薬理活性と肝毒性発現を調べた。その結果、肝臓中 RNase H1 の発現を抑制することにより、それぞれの Gapmer のノックダウン活性が優位に減弱し、かつ肝毒性も著しく抑制されることを見出した。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唆された。第 3 章では、肝毒性が強い Acs11-Gapmer と同一の mRNA 領域を標的とした GalNAc3-siRNA を設計・合成し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おこなった。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 投与では肝毒性が認められたが、GalNAc3-siRNA 投与では肝毒性は惹起されなかった。これらのことから Gapmer による肝毒性は、標的配列に対する切断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された。第 4 章では、Gapmer の作用部位の同定をおこなった。前章において Acs11-Gapmer は肝毒性を引き起こすが、GalNAc3-siRNA は肝毒性を惹起しないことが明らかとなった。この差異は、siRNA は細胞質で RNA を切断するが、Gapmer は核内において RNA を切断するために肝毒性が惹起されるとの仮説を立てた。その検証のために Acs11-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 前駆体である pre-mRNA の部分定量をおこなった。全長約 7 万塩基からなる pre-mRNA のイントロンに約 5000 塩基おきにプライマーを設計し生理食塩水投与群との量比を qRT-PCR により解析した。その結果、GalNAc3-siRNA 投与において 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、エキソンの発現レベルのみ約 80%程度減少した。一方、Gapmer 投与においては pre-mRNA のエキ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 50~80%程度減少することが示された。以上のことから、肝毒性を示す Gapmer は核内で pre-mRNA を切断し、siRNA は細胞質で mRNA を切断することが示唆された。第 5 章では、Gapmer の標的 RNA に対する配列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 Gapmer (Malat1-1MM) による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 により標的配列以外の完全一致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想定され、ゲノム情報およびマイクロアレイデータを用いて解析をおこなった。まずゲノムデータベース中で肝毒性を示す Acs11-Gapmer の標的と類似した配列を探索したところ、約 400 ヶ所の標的類似配列が見つかった。そのうち約 150 ヶ所はタンパク質をコードする遺伝

子中に存在し、その多くがイントロン配列中に存在した。さらに Acs11-Gapmer 20 mg/kg 投与後 24 時間のマウス肝臓中 RNA のマイクロアレイデータを再解析し、150 種類の遺伝子発現が抑制されているか調べたところ、約 8 種類の遺伝子発現が抑制されていることが示唆された。qRT-PCR を用いて RNA を定量したところ、これら 8 種類のうち 6 遺伝子が 80% 程度発現抑制を受けていた。なお 6 遺伝子の標的類似配列は、すべてイントロンに存在したことから、Acs11-Gapmer が核内で pre-mRNA を非特異的に切断したと考えられた。一方、肝毒性を示さない Malat1-1MM も同様の検討を実施したが、RNA の非特異的な切断は確認できなかった。これらの結果から、Gapmer の標的類似配列の非特異切断（配列特異性）と肝毒性は関連することが示唆された。

以上まとめると、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が示唆された。さらに、細胞質に比べ膨大な種類の RNA が存在する核内で Gapmer は RNase H1 依存的に RNA を切断したことから、それら核内の RNA 全てが Gapmer の非特異的切断の標的となり得ることが明らかとなった。実際に、Acs11-Gapmer は核内にしか存在しない 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の要因の一つと考えられる。このように Gapmer は核内で様々な RNA を非特異的に切断し、必須遺伝子を切断することで毒性を惹起していると推察された。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、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。本研究の成果は、Gapmer による毒性発現メカニズムの一端を明らかにする糸口となることや、高い有効性と安全性を併せもつ画期的な Gapmer の創製につながることを期待される。