

Gapmer型ASOにおける オフターゲット効果のリスク評価手法の提案

玉野 史結¹ 伊澤 和輝¹ 柳澤 溪甫¹ 大上 雅史¹ 秋山 泰^{1,a)}

概要: アンチセンス核酸医薬品の一つである Gapmer 型 ASO の創薬では、標的以外の遺伝子（オフターゲット遺伝子）の発現も抑制してしまうオフターゲット効果による毒性が問題となっている。実験的なスクリーニング試験による同効果のリスク評価は時間的、金銭的コストが大きいため、計算機によるリスク推定が期待される。本研究では、RNase H1 酵素認識部位、ASO-mRNA 間の結合エネルギー、mRNA の二次構造からリスクスコア計算を行った。先行研究で用いられた、ApoB 遺伝子を標的とする 13-mer の ASO と PCSK9 遺伝子を標的とする 13-mer の ASO それぞれについて、多数の遺伝子における遺伝子発現変動比の実験値と推定したリスクスコアのピアソン相関係数を計算すると、 -0.091 、 -0.124 であり、評価指標として実用的でないことが確認された。しかしながら、リスクスコアを過剰算出している遺伝子群とその他の遺伝子群では ASO 導入前の遺伝子発現量に統計的に有意な差が確認でき、オフターゲット効果のリスク推定には ASO 導入前の遺伝子発現量が重要であることが示唆された。

キーワード: 核酸医薬、アンチセンス核酸、オフターゲット効果

Proposal of Evaluation Off-target Effects Method in Gapmer ASO

TAMANO SHU¹ IZAWA KAZUKI¹ YANAGISAWA KEISUKE¹ OHUE MASAHITO¹ AKIYAMA YUTAKA^{1,a)}

Abstract: In the development of gapmer ASOs, there is a problem that not only the on-target gene but also off-target genes are down-regulated. Evaluating the off-target effects by experimental screening tests is time-consuming and economically burdensome. Therefore, computational risk assessment is needed. In this study, we proposed a risk score in terms of cleavage by RNase H1, binding energy between an ASO and an mRNA, and the secondary structure of mRNAs. For the evaluation, we used the 13-mer gapmer targeting human APOB (gap-A13) and the 13-mer gapmer targeting human PCSK9 (gap-P13) used in previous study. For each gapmer ASO, Pearson correlation coefficients between the experimental values of log fold-change (logFC) and the assessed risk scores were calculated for a large number of genes. The results of the calculations were $r = -0.091$ for gap-A13 and $r = -0.124$ for gap-P13. This result indicates that the risk score is not practical as a valid risk measure. However, there was a statistically significant difference in gene expression intensity before the introduction of ASO between the gene groups with overestimated risk scores and the others. This suggests that the gene expression intensity before ASO introduction is important for evaluating off-target effects.

Keywords: nucleic acid medicine, antisense oligonucleotide, off-target effects

1. 導入

1.1 アンチセンス核酸 (Antisense Oligonucleotide; ASO)

核酸医薬品とは一般に、デオキシリボ核酸 (DNA)、リ

¹ 東京工業大学 情報理工学院 情報工学系
Department of Computer Science, School of Computing,
Tokyo Institute of Technology

a) akiyama@c.titech.ac.jp

ボ核酸 (RNA) あるいはその化学修飾体が十～数十塩基程度連続したオリゴ核酸で構成され、遺伝子発現を介さず直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品と定義される。[1] 核酸医薬品は、従来の低分子医薬品や抗体医薬品では標的にできなかった RNA もターゲットとできるため、理論的にはあらゆる遺伝子を標的にでき、遺伝性疾患や難治性疾患に対する治療薬として期待されている。[2] 2021 年 12 月までにアメリカ食品医薬品局 (FDA)、欧州医薬品審査庁 (EMA)、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の少なくとも 1 つで承認された核酸医薬品は 15 種類であり、そのうち半数以上の 9 種類がアンチセンス核酸 (Antisense Oligonucleotide; ASO) である。[3]

ASO の一つである Gapmer 型 ASO は mRNA または pre-mRNA を標的とする ASO であり、RNase H1 による DNA-RNA 二重鎖の認識・切断を誘発することによって、標的とする遺伝子 (オンターゲット遺伝子) の発現を抑制するという作用機序となっている。Gapmer 型 ASO は、RNase H1 によって認識されない修飾核酸から成る wing 領域と、RNase H1 によって認識され得る DNA 骨格の gap 領域から構成される Gapmer 構造とすることにより、gap 領域で RNase H1 を活性化させることができる。RNase H1 が、gap 領域の DNA と遺伝子 mRNA または pre-mRNA で形成される DNA-RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖を切断することによって、オンターゲット遺伝子の発現を抑制することが可能となっている。[4]

1.2 オフターゲット効果

RNase H1 による DNA-RNA の二重鎖の認識・切断は、連続する 6 塩基以上の完全相補な二重鎖に対して行われ、連続した非修飾核酸 5 塩基と修飾核酸 1 塩基の場合にも切断されうる。[5] そのため、ASO と RNA 間に数塩基のミスマッチや挿入・欠失が存在している場合でも、RNase H1 が認識・切断する可能性がある。RNase H1 の特性により、標的としていない遺伝子の mRNA または pre-mRNA に ASO が結合した場合にも、RNase H1 が RNA 鎖を切断してしまうことで、本来発現すべき遺伝子の発現も抑制してしまうことがある。これを「オフターゲット効果」と呼ぶ。

Gapmer 型 ASO において、オフターゲット効果によって本来発現すべき遺伝子の発現を抑制することによって肝毒性を呈するということが動物実験により明らかとなっている。[6] しかしながら、オフターゲット効果による毒性の程度を動物実験のみで評価することは難しいとされている上に、網羅的なスクリーニング試験によって安全性を評価することは時間的・金銭的コストがかかる。そのため、ヒト RNA データベースを用いた *in silico* 解析とヒト細胞を用いた *in vitro* 解析によってオフターゲット毒性の程度を予測する必要がある。[7]

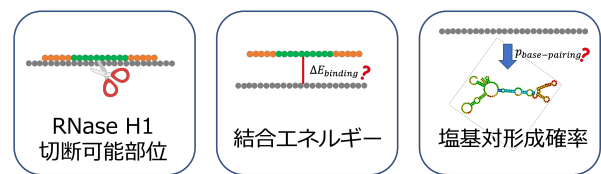


図 1 本研究で考慮する 3 要素

in silico 解析によるオフターゲット効果の推定方法として、Gapmer 型 ASO と mRNA, pre-mRNA 間のミスマッチ・挿入・欠失の数による推定方法が研究されており、ミスマッチ・挿入・欠失の数が少ないほど、遺伝子の発現が抑制される傾向があることが報告された。[8], [9] 一方で、ミスマッチ・挿入・欠失の数が多く場合でも発現が抑制されている遺伝子も存在しており、ミスマッチ・挿入・欠失の数だけでオフターゲット候補遺伝子を判断すると、実際にオフターゲット効果を呈する遺伝子を見逃している可能性があるため、オフターゲット効果の評価指標を改善する必要がある。

1.3 本研究の目的

ある遺伝子をオンターゲットとする Gapmer 型 ASO の創薬において、ASO として設計された全候補配列に対して、網羅的なスクリーニング試験によって安全性を評価することはコストがかかる。そのため、計算機上でオフターゲット効果を呈するリスクを予測し、オフターゲット候補遺伝子を絞り込む必要がある。そこで本研究では a) RNase H1 切断可能部位、b) 結合エネルギー、c) 塩基対形成確率の 3 要素による、オフターゲット効果のリスクのスコア化を行い、オフターゲット効果の評価手法を提案する。この手法により、Gapmer 型 ASO の設計支援を行うことを目的とする。

2. 提案手法

従来の ASO のオフターゲット効果の推定は塩基配列の相補性に基づくものであり、ミスマッチ・挿入・欠失の位置やエネルギー的安定性に基づく詳細な評価がされておらず、オフターゲット遺伝子をオフターゲット遺伝子でないと推定している危険性がある。そこで本研究では、既存研究では考慮できていない RNase H1 の特性に基づく評価と mRNA の二次構造という要素に加え、従来考慮されてこなかった結合安定性を含め、図 1 に示す 3 要素から総合的な評価を行う。

RNase H1 は連続する 6 塩基以上の DNA-RNA 二重鎖を認識・切断し、gap 領域 5 塩基と wing 領域 1 塩基の DNA-RNA 二重鎖を認識して切断する場合もあることが明らかとなっている。[5] そこで、本研究では gap 領域とその左右に隣接する 1 塩基ずつを加えた領域を考え、その中で 6 塩基以上の DNA-RNA 二重鎖を形成するか否かを考

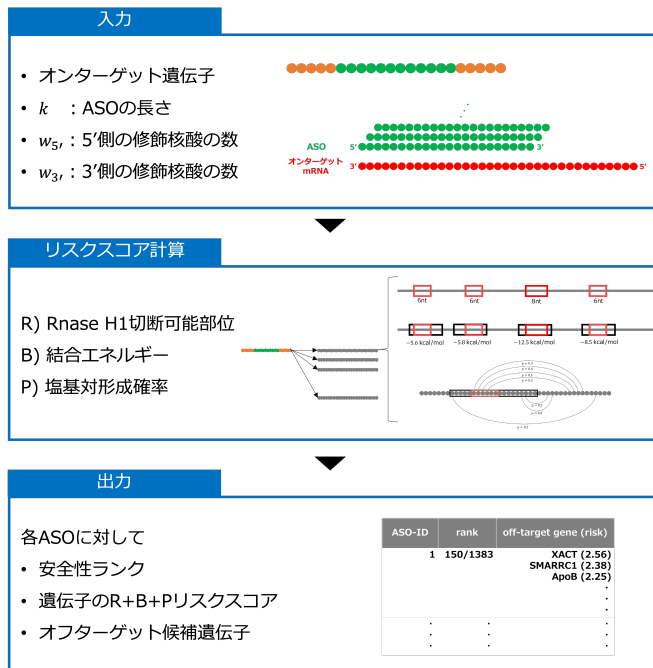


図 2 提案手法の概要

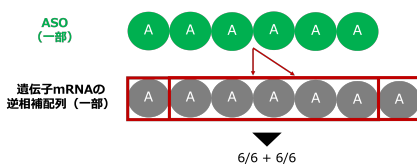


図 3 遺伝子 mRNA 上で 6 塩基以上一致領域が重複する場合の計算例

慮し、各要素に対してオフターゲット効果のリスクのスコア化を行う。それぞれの要素に対するリスクスコアの単純和をとることで計算されたスコアを各遺伝子の「R+B+P リスクスコア」と定義する。提案手法の概要を図 2 にまとめた。なお、以降では ASO の長さを k とする。

2.1 RNase H1 切断可能部位によるリスクスコア (R リスクスコア)

ASO が各遺伝子 mRNA の逆相補配列と 6 塩基以上一致している領域がいくつあるかに基づいてスコア化を行う。6 塩基一致領域が 1 つ存在する場合のリスクを 1 とし、12 塩基一致領域 1 つと 6 塩基一致領域 2 つのリスクが等しくなるように、 n 塩基一致 ($n \geq 6$) している領域に対してスコアを $\frac{n}{6}$ とする。各遺伝子 mRNA に対して、6 塩基以上一致している領域を全て列挙し、それぞれのスコアの和をとる。また、図 3 に示すように、遺伝子 mRNA 上で n 塩基一致領域が重複する場合、RNase H1 による認識・切断の可能性は倍増すると仮定し、重複して数え上げ、計算を行う。

R+B+P リスクスコアの計算を行う上で、外れ値による影響ならびに要素によるリスクスコアへの寄与の偏りを軽減するため、式 (1) に従って、スコアに 1 を足して自然対

数を取り、式 (2) に従って、 $[0,1]$ 正規化を行う。

$$v' = \ln(v + 1) \quad (1)$$

$$\text{RISKSCORE}(i, j) = \frac{\text{SCORE}(i, j) - \min(\text{SCORE})}{\max(\text{SCORE}) - \min(\text{SCORE})} \quad (2)$$

v は変換前のスコア、 v' は変換後のスコア、 n を遺伝子数、 q を ASO として設計された全候補配列の数と定義し、SCORE を $[0,1]$ 正規化前の $n \times q$ のスコア行列、RISKSCORE を $[0,1]$ 正規化後の $n \times q$ のリスクスコア行列と定義している。式 (2) は、 $[0,1]$ 正規化後の j 番目の ASO 候補配列の i 番目の遺伝子のリスクスコアを表している。これらの手順により計算されたリスクスコアを RNase H1 切断可能部位によるリスクスコア (以下、R リスクスコアと称する) と定義し、RNase H1 によって遺伝子 mRNA が切断される可能性がどの程度であるのかというリスクをスコア化する。

2.2 結合エネルギーによるリスクスコア (B リスクスコア)

ASO の gap 領域とその左右に隣接する 1 塩基ずつを加えた領域を考え、その中で ASO と連続する 6 塩基以上の二重鎖を形成する領域を含む遺伝子 mRNA の k 塩基のみ切り出し、その領域に対して結合エネルギーを計算する。結合エネルギーに応じて ASO と遺伝子 mRNA の結合確率の比が指数的に変動することを考慮し、1 つの遺伝子 mRNA に対して結合エネルギーを計算した領域が複数ある場合には、計算された複数のエネルギーの最小値 (*i.e.* 最も結合安定性の高い場合のエネルギー変化) を ASO と遺伝子 mRNA との結合エネルギーとしてスコア化を行う。またこの操作によってオフターゲットリスクの高い遺伝子をオフターゲットリスクが低いと予測してしまう偽陰性を防ぐことも可能である。一方、6 塩基以上の二重鎖を形成する領域がない場合や、結合するとしても結合エネルギーが 0 kcal/mol を上回る場合には、ASO とその遺伝子 mRNA との結合エネルギーは 0 kcal/mol と計算する。

本研究におけるリスクスコアは、スコアが高くなるとオフターゲット効果の危険性が高くなるように設計する。本研究において、0 kcal/mol を上限に設定しているため、スコアの絶対値を取ることによって、スコアが高くなると、オフターゲット効果のリスクが高くなるように変換することができる。また、R リスクスコア計算同様に、要素によってリスクスコアへの寄与が大きく偏らないように、式 (2) に従って、 $[0,1]$ 正規化を行い、これを結合エネルギーによるリスクスコア (以下、B リスクスコアと称する) と定義する。これらの手順によって、ASO と各遺伝子 mRNA がどの程度エネルギー的に安定であるのかをスコア化する。

2.3 塩基対形成確率によるリスクスコア (P リスクスコア)

B リスクスコア計算同様に、ASO と連続する 6 塩基以上の二重鎖を形成する領域を含む遺伝子 mRNA の k 塩基領域のみ切り出し、その領域に含まれる全ての塩基が他の塩基とどの程度の確率で塩基対を形成し得るかに基づいてスコア化する。

まず、 k 塩基領域の全塩基に対し、どの塩基とどの程度の確率で塩基対を形成しうるかを計算する。ここで計算される確率 p_i はある 1 つの塩基が、塩基 i と塩基対を形成する確率であり、これを k 塩基領域に含まれる全ての塩基に対して計算する。同時に期待精度最大 (Maximum Expected Accuracy; MEA) 構造 [10], [11] を計算し、MEA 構造をとる場合には、ある 1 つの塩基はどの塩基と塩基対を形成するのかを算出する。この 2 つの計算結果を用いて、MEA 構造をとると仮定した場合に、 k 塩基領域の各塩基が塩基対を形成する確率を推定することができる。この確率が大きい場合には、 k 塩基領域は塩基対を形成している可能性が高く、ASO がアクセスする可能性が低いことを意味している。それぞれの塩基に対して算出された確率の総和をとることで、 k 塩基領域のアクセシビリティのリスクをスコア化する。なお、先述した通り、確率は 1 つの塩基に対して和が 1 となるように計算されているため、ここで計算された MEA 構造をとる場合の k 塩基領域に含まれる全塩基の確率和は 1 を超える場合もある。このようにして計算した確率和が小さい場合、その領域は塩基対を形成していない可能性が高いことを意味するため、最も確率和が小さい領域をその遺伝子 mRNA の塩基対形成確率によるリスクスコアとすることで、オフターゲットリスクの高い遺伝子をオフターゲットリスクが低いと予測してしまう偽陰性を防ぐ。

R リスクスコア計算同様に、外れ値による影響を軽減するため、式 (1) に従って、スコアに 1 を加えて自然対数をとる。また、B リスクスコア計算同様に、リスクスコアが高くなると、オフターゲットリスクが高くなるようにするため、式 (3) に従って、スコアの反転を行う。この値を v'_{rev} と定義する。また、他の要素同様に、要素によってリスクスコアへの寄与が大きく偏らないように式 (2) に従って、[0,1] 正規化を行い、これを塩基対形成確率によるリスクスコア (以下、P リスクスコア) と定義する。これらの手順によって、ASO が各遺伝子 mRNA にどの程度アクセスしやすいのかをスコア化する。

$$v'_{rev} = \ln(k+1) - \ln(v'+1) \quad (3)$$

3. リスクスコア評価実験

3.1 使用したデータ

本実験において必要なデータは以下に示すとおりである。

- (1) 全遺伝子の mRNA の配列情報
- (2) ASO 導入前後における遺伝子発現量を測定した実験データ

全遺伝子の mRNA 配列情報は、GENCODE (<https://www.genecodegenes.org/>) よりヒトゲノム GRCh38 染色体配列 (GRCh38.p13.genome.chromosomes.fa.gz) およびヒト遺伝子アノテーション情報

([gencode.v38.basic.annotation.gff3.gz](https://www.genecodegenes.org/gencode.v38.basic.annotation.gff3.gz)) を取得し、それらをもとに抽出した。計算の際にはトランスクリプトバリエーションは別遺伝子として扱い、配列が長く二次構造が計算できなかったもの 1 件 (遺伝子名: XACT, トランスクリプト名: 203) を除く 111,750 件の mRNA 配列に対して行った。

ASO 導入前後における遺伝子発現量を測定した実験データは、NCBI-GEO データベースより取得したアレイデータ (GSE190473)[8] を使用した。このデータには、ASO を導入する前の遺伝子発現量と、オンターゲット遺伝子を ApoB 遺伝子とする 13-mer の ASO (以下、gap-A13 と称する) と、オンターゲット遺伝子を PCSK9 遺伝子とする 13-mer の ASO (以下、gap-P13 と称する) をそれぞれ Lipofectamine 2000 を使用して Huh-7 細胞に導入し、24 時間経過後の遺伝子の発現量を取得したものが含まれている。コントロール群、gap-A13、gap-P13 それぞれに対し、各 4 回ずつ発現量をマイクロアレイによって解析している。なお、この実験データにおける ASO は 5' 側の wing 領域が 2 塩基、gap 領域が 8 塩基、3' 側の wing 領域が 3 塩基の 13-mer の ASO となっている。それぞれの配列情報を表 1 に示す。

3.2 リスクスコアの妥当性評価

各遺伝子に対して算出された R+B+P リスクスコアがオフターゲット効果を呈するリスクの指標として妥当であるか検討するために、実験によって得られた各遺伝子の ASO 導入前後における発現量のデータを用いる。実験データには、ASO 導入前の遺伝子発現量、ASO 導入後の遺伝子発現量のデータが含まれており、ASO 導入後の遺伝子発現量がコントロール群に比べて減少しているものは Gapmer 型 ASO がその遺伝子の mRNA または pre-mRNA と二重鎖を形成し、RNase H1 によって認識・切断されていることを意味する。また、計算した R+B+P リスクスコアはオフターゲット効果のリスクを数値化したものであり、R+B+P リスクスコアが高い遺伝子ほど、ASO 導入後の遺伝子発現量が ASO 導入前に比べて減少することを意味する指標である必要がある。そのため、R+B+P リスクスコアと、式 (4) で定義される ASO 導入後の遺伝子発現量と ASO 導入前の遺伝子発現量の比を表す FC (fold-change) の対数値 ($\log FC$) との間の相関関係を確認し、強い負の相関が確認できれば、R+B+P リスクスコアはオフターゲット効果のリスクを表す指標として妥当であると言える。なお、

表 1 リスクスコアの妥当性評価で用いる実験データで利用された ASO の情報. wing 領域の化学修飾はいずれも LNA である.

オンターゲット遺伝子		ASO の配列 (5' - 3')	ASO の構造 ($w_{5'}$ - gap - $w_{3'}$)
gap-A13	ApoB	GCATTGGTATTCA	2 - 8 - 3
gap-P13	PCSK9	GTCTGTGGAAGCG	2 - 8 - 3

R+B+P リスクスコアは遺伝子発現抑制率の高さを評価するスコアであるため、オンターゲット遺伝子に対してはリスクスコアが高くなることが望ましい。

$$\log FC = \log_2 \frac{\text{ASO 導入後の遺伝子発現量}}{\text{ASO 導入前の遺伝子発現量}} \quad (4)$$

3.2.1 評価指標

評価指標として、各遺伝子の算出した R+B+P リスクスコアと実験データから算出した遺伝子発現変動比 (log FC) との間のピアソン相関係数を用いる (式 5)。

$$r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (5)$$

ここで n は遺伝子の数を表し、 x_i は遺伝子 i に対する R+B+P リスクスコア、 y_i は ASO を導入することによる遺伝子 i の発現変動比 (log FC) を表す。また、 \bar{x} は各遺伝子に対して算出された R+B+P リスクスコアの平均値、 \bar{y} は遺伝子発現変動比 (log FC) の平均値を表す。

3.2.2 リスクスコアの算出

R リスクスコアは、GENCODE より抽出した遺伝子 mRNA の配列情報を基に、オンターゲット遺伝子に対して ASO の全候補配列を切り出し、ASO 候補配列と遺伝子 mRNA 間で計算を行った。B リスクスコアは、Rsearch-v1.2[12] を用いて計算を行った。なお、B リスクスコアの計算の際には、DNA-RNA 間の結合エネルギーを計算する必要があるため、Sugimoto ら [13] によって示されている DNA-RNA 間の最近接塩基対パラメータを用いるように、オプションとして "-m su95" を指定した。P リスクスコアは、LinearPartition[14] を用いて計算を行った。塩基対形成確率の計算並びに MEA 構造の計算はデフォルトのオプションで行った。各遺伝子に対して R+B+P リスクスコアと実験値を 1 対 1 に対応させた結果、対象遺伝子は gap-A13 で 19,304 件、gap-P13 で 19,288 件となった。

4. 結果

gap-A13, gap-P13 それぞれの ASO に対して算出した全遺伝子の R+B+P リスクスコアと log FC の散布図を図 4 に示す。散布図の 1 点は 1 つの遺伝子を表し、縦軸はそれぞれの遺伝子の遺伝子発現変動比 (log FC)、横軸はそれぞれの遺伝子の R+B+P リスクスコアを表す。

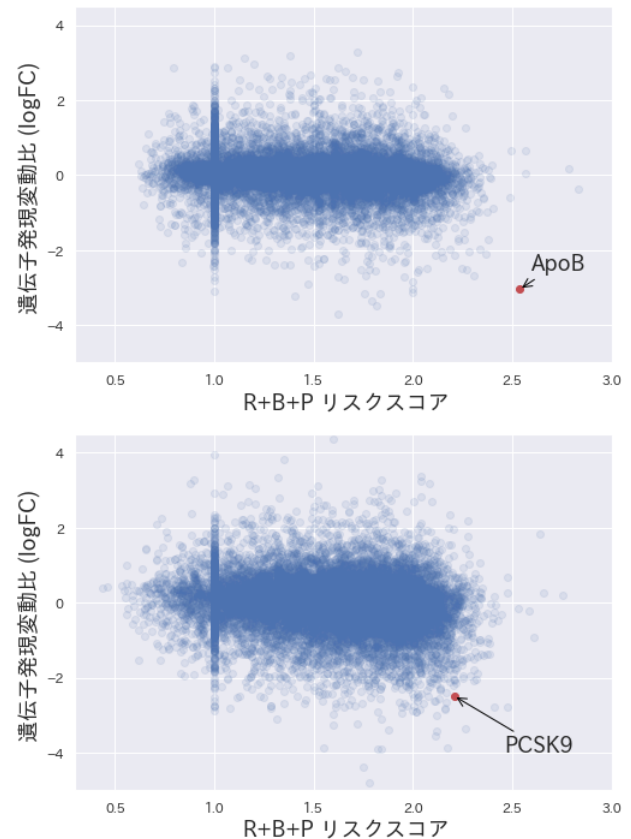


図 4 ASO を導入することによる各遺伝子の R+B+P リスクスコアと log FC との関係. 上図は gap-A13, 下図は gap-P13 に対する散布図である。

gap-A13 を導入することによる各遺伝子の R+B+P リスクスコアと遺伝子発現変動比 (log FC) とのピアソン相関係数は -0.091 , gap-P13 の場合には -0.124 となり、R+B+P リスクスコアがオフターゲット効果の評価指標として実用性があるという結果は得られなかった。一方で、オンターゲット遺伝子に対しては R+B+P リスクスコアを高く計算できていることが確認できた。

5. 考察

実験 1 の結果 (図 4) より、遺伝子発現変動比 (log FC) が低い遺伝子に対してリスクスコアを低く算出したり、log FC が 0 付近の遺伝子に対してリスクスコアを高く算出していることがわかる。この原因について詳しく調べるために、ASO 導入前の遺伝子発現量と log FC との関連性について考える。

ASO 導入前の遺伝子発現量が少なければ、わずかな発

現量の変化が log FC の値に大きく現れる一方で、ASO 導入前の遺伝子発現量が多ければ少し発現量が変化しても log FC の値に大きな変化はみられないと考えた。そこで、log FC が低い遺伝子に対して R+B+P リスクスコアを低く算出している遺伝子は ASO 導入前の遺伝子発現量が少なく、log FC が 0 付近の遺伝子に対して R+B+P リスクスコアを高く算出している遺伝子は ASO 導入前の遺伝子発現量が多くなっているという仮説を検証するため、R+B+P リスクスコアを過大に算出している遺伝子群とそれ以外の遺伝子群、R+B+P リスクスコアを過小に算出している遺伝子群とそれ以外の遺伝子群の間で ASO 導入前の遺伝子発現量の対数値に差があるかを調べる。

R+B+P リスクスコアの過剰算出の基準値は、スコアの最大値 (3.0) と最小値 (0.0) の平均値 (1.5) とした。また、ヘテロ接合型ノックアウト動物において、ASO 投与後の遺伝子発現量が ASO 投与前の遺伝子発現量の 50% を上回る場合、ほとんどオフターゲット効果による異常が確認されない [8] ため、log FC の基準値は -1 とした。これらの基準値を用いて、R+B+P リスクスコアを過大に算出している群を、R+B+P リスクスコアの総和が 1.5 より大きく、log FC が -1 以上の遺伝子とし、R+B+P リスクスコアを過小に算出している群を、R+B+P リスクスコアの総和が 1.5 より小さく、log FC が -1 以下の遺伝子とした。図 5 より、R+B+P リスクスコアを過大に算出している遺伝子群の方が ASO 導入前の遺伝子発現量が多い傾向があることがわかり、実際にマンホイットニーの U 検定 (片側検定, 有意水準 5%) によって、R+B+P リスクスコアを過大に算出している遺伝子群の方がその他の遺伝子群より統計的に有意に ASO 導入前の遺伝子発現量が多いという結果が示された ($p < 0.001$)。また、図 6 より、R+B+P リスクスコアを過小に算出している遺伝子群の方が ASO 導入前の遺伝子発現量が少ない傾向があることがわかり、マンホイットニーの U 検定 (片側検定, 有意水準 5%) によって、R+B+P リスクスコアを過小に算出している遺伝子群の方がその他の遺伝子群より統計的に有意に ASO 導入前の遺伝子発現量が少ないという結果が示された ($p < 0.001$)。

このことから、オフターゲット効果のリスクは ASO を導入する前の遺伝子発現量にも関わることがわかり、ASO を導入する前の発現量が小さければわずかな発現量の変化がオフターゲットリスクに繋がるのに対し、ASO を導入する前の発現量が大きければ少しの発現量の変化ではオフターゲット効果を呈するリスクになり得ない。そのため、オフターゲット効果の推定には ASO 導入前の発現量という観点からの評価も必要である。

6. まとめ

6.1 結論

本研究では、Gapmer 型 ASO のオフターゲット効果の

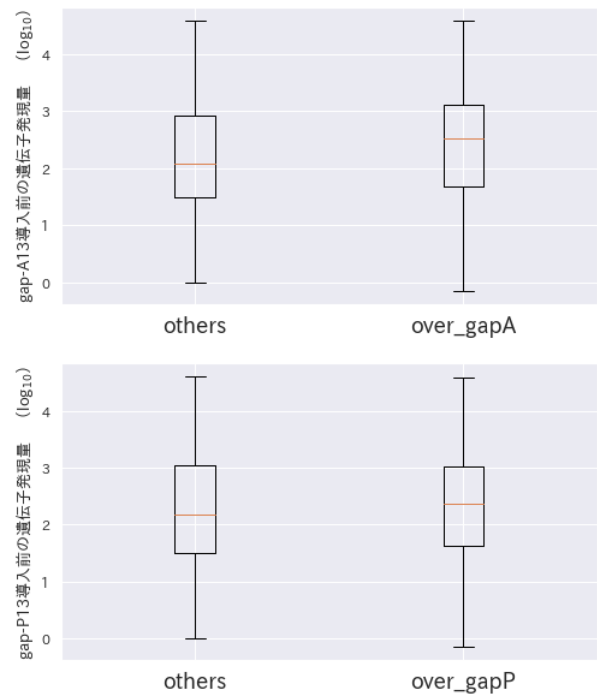


図 5 リスクスコアを過大に算出している遺伝子群 (右) とその他の遺伝子群 (左) での ASO 導入前の遺伝子発現量の差異. 上図は gap-A13, 下図は gap-P13 に対する箱ひげ図である。

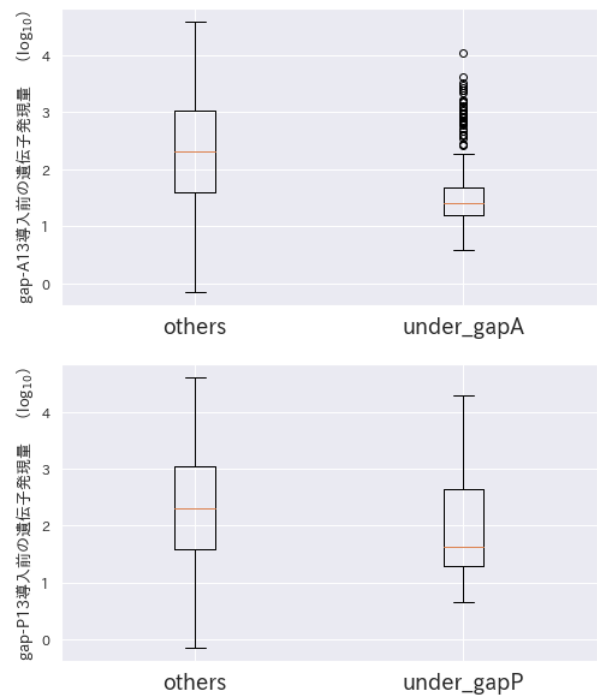


図 6 リスクスコアを過小に算出している遺伝子群 (右) とその他の遺伝子群 (左) での ASO 導入前の遺伝子発現量の差異. 上図は gap-A13, 下図は gap-P13 に対する箱ひげ図である。

推定で従来考慮されてこなかった a) RNase H1 切断可能部位 b) 結合エネルギー c) 塩基対形成確率の 3 つの観点から、Gapmer 型 ASO におけるオフターゲット効果のリスク評価のシステムを構築した。

NCBI-GEO で公開されているアレイデータ

(GSE190473) を用いて、ある 1 つの ASO に対して算出された各遺伝子のリスクスコアの妥当性評価を行ったが、ApoB 遺伝子をオンターゲットとする 13-mer の ASO、PCSK9 遺伝子をオンターゲットとする 13-mer の ASO について、リスクスコアと遺伝子発現変動比 (log FC) との間のピアソン相関係数はそれぞれ -0.091 、 -0.124 となり、相関関係は見られなかった。しかしながら、リスクスコアを過大に算出している遺伝子は、他の遺伝子に比べ遺伝子発現量が多く、リスクスコアを過小に算出している遺伝子は、他の遺伝子に比べ遺伝子発現量が少ないことが確認され、ASO を導入する前の遺伝子発現量がオフターゲット効果のリスクを考える上で必要な因子になると考えられる。

6.2 今後の課題

6.2.1 バルジループの考慮

本研究で使用した RIssearch-v1.2 では、ASO-RNA の二重鎖の一部が塩基対を形成していない部分の構造であるバルジループ (bulge loop) の場合のエネルギー計算を行うことができていない。しかしながら、挿入・欠失の数が 1 であれば、RNase H1 によって認識・切断され得る [9] ため、本研究において計算対象外であったバルジループを形成しうる領域を計算することにより、B リスクスコアの精度が向上する可能性があると考えられる。

6.2.2 wing 領域の考慮

本研究では Gapmer 型 ASO における wing 領域が両端に数塩基連続して存在すると仮定して計算を行ったが、wing 領域は数塩基連続していない場合も考えられ、その場合に RNase H1 が連続する 6 塩基以上の DNA-RNA 二重鎖を認識・切断するという特性を適用するには、gap 領域とその左右に隣接する wing 領域 1 塩基ずつの領域のみで連続する 6 塩基以上の完全相補一致領域という単純な手法ではなく、他の手法を検討する余地があると考えられる。さらに、本研究では DNA-RNA 間の最近接塩基対パラメータで wing 領域と遺伝子 mRNA 間の結合エネルギーも計算したが、wing 領域には化学修飾が施されており、最近接塩基対パラメータとは異なる結合エネルギーとなる上に、wing 領域に施す化学修飾の種類によっても結合エネルギーは変化する。ゆえに、wing 領域の位置および修飾の種類は Gapmer 型 ASO におけるオフターゲット効果を推定する上で重要である。

6.2.3 遺伝子の発現量・重要性の考慮

本研究において、 $R+B+P$ リスクスコアを過大に算出してしまった遺伝子は、ASO 導入前の発現量が多く、過小に算出してしまった遺伝子は、ASO 導入前の発現量が少ないことが確認できた。したがって、リスクスコアに ASO 導入前の発現量の要素も加えることにより、過大評価・過小評価を抑えることができると考える。また、本研究では、全ての遺伝子を等価に扱っていたが、生命科学的には遺伝

子の重要性に差異がある。各遺伝子に対するリスクスコアの計算において、遺伝子の重要度を加味することができれば、より実用性の高いシステムを構築することができると考えられる。

謝辞 本研究の実施にあたり、生命科学的な助言を頂いた東京工業大学生命理工学院生命理工学系の正木慶昭助教に深謝する。

参考文献

- [1] 井上 貴雄, 佐々木 澄美, 吉田 徳幸. 核酸医薬開発の現状と今後の展望. *Drug Delivery System*, 34(2): 86–98, 2019.
- [2] 井上 貴雄. 核酸医薬品の開発動向. *ファルマシア*, 54(10): 943–947, 2018.
- [3] 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部: 承認された核酸医薬品 (2021 年 12 月時点), 入手先 (<https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf>) (2022.2.12).
- [4] Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19(10): 673–694, 2020.
- [5] Wu H, Lima WF, Crooke ST. Properties of cloned and expressed human RNase H1. *J. Biol. Chem.*, 274(40): 28270–28278, 1999.
- [6] Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.*, 35(2): 687–700, 2007.
- [7] Lindow M, Vornlocher HP, Riley D, Kornbrust DJ, Burchard J, Whiteley LO, Kamens J, Thompson JD, Nochur S, Younis H, Bartz S, Parry J, Ferrari N, Henry SP, Levin AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, 30(10): 920–923, 2012.
- [8] Yoshida T, Naito Y, Yasuhara H, Sasaki K, Kawaji H, Kawai J, Naito M, Okuda H, Obika S, Inoue T. Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes to Cells*, 24(12): 827–835, 2019.
- [9] Michel S, Schirduan K, Shen Y, Klar R, Tost J, Jaschinski F. Using RNA-seq to Assess Off-Target Effects of Antisense Oligonucleotides in Human Cell Lines. *Mol. Diagn. Ther.*, 25(1): 77–85, 2021.
- [10] Do CB, Woods DA, Batzoglou S. CONTRAfold: RNA secondary structure prediction without physics-based models. *Bioinformatics*, 22(14): e90–e98, 2006.
- [11] Knudsen B, Hein J. Pfold: RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3423–3428, 2003.
- [12] Wenzel A, Akbasli E, Gorodkin J. RIssearch: fast RNA-RNA interaction search using a simplified nearest-neighbor energy model. *Bioinformatics*, 28(21): 2738–2746, 2012.
- [13] N. Sugimoto, S.-i. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, and M. Sasaki. Thermodynamic Parameters To Predict Stability of RNA/DNA Hybrid Duplexes. *Biochemistry*, 34(35): 11211–11216, 1995.
- [14] Zhang H, Zhang L, Mathews DH, Huang L. LinearPartition: linear-time approximation of RNA folding partition function and base-pairing probabilities. *Bioinformatics*, 36(Suppl.1): i258–i267, 2020.