

令和元年度報告書

核酸医薬品のオフターゲット効果のリスク評価に資する
ヒト遺伝子機能の抽出と分類

令和2年2月

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

委託先 株式会社三菱ケミカルリサーチ

目次

<サマリー及び調査結果の利用にあたっての留意点>	1
第1章 調査の概要	2
第1節 調査の目的	2
第2節 調査の概要	2
第3節 調査及び取りまとめ方法	2
1. 調査対象遺伝子	2
2. 調査の取り進めの概要	3
3. 具体的な調査の取り進め手法と留意点	7

資料編

別表1：調査対象遺伝子のリスト

別表2：調査結果（日本語版）

別表3：調査結果（英語版）

<サマリー及び調査結果の利用にあたっての留意点>

本調査では、RNA 分解型アンチセンスや siRNA 等、標的 RNA を低減させる核酸医薬品について、相補結合依存的に発現抑制されるオフターゲット遺伝子のリスク評価を円滑に行うため、発現抑制による機能低下がリスクとなると考えられるヒト遺伝子を抽出・分類した。具体的には、「循環器、呼吸器、中枢等の生命維持に重要な機能を果たしている遺伝子群」、「がん関連遺伝子群」、「疾患関連遺伝子群 (形成異常を含む)」という観点から約 1,700 遺伝子を選定し、ヒト病態情報データベース及びノックアウトマウスの病態情報データベースを基に、核酸医薬品のオフターゲット効果のリスク評価に資する情報を整理し、表（日本語版及び英語版）に取りまとめた。

ヒト疾患は単一遺伝子疾患を除くと、一つの疾患に複数の遺伝子が関与していると考えられ、また一つの遺伝子が複数の疾患に寄与する場合もある。このような疾患と遺伝子との関連については個別に研究がなされているが、オフターゲット効果による毒性発現の観点から個々のヒト遺伝子が発現抑制された際のリスクを包括的に調査・整理した例はこれまでにない。本調査は、発現抑制による機能低下がリスクとなりうるヒト遺伝子を抽出・分類するための最初の試みとして、生命維持に重要な機能を有する遺伝子及び疾患との関与が大きいと考えられる遺伝子約 1,700 個をまず選定し、いわば「β版」としてヒトとマウスの病態情報を整理したものである。したがって、疾患関連遺伝子を網羅した調査ではないことに注意が必要である。本調査のリストに載っていない遺伝子についても、オフターゲット効果による毒性発現のリスクを有している可能性があることにご留意頂きたい。

本調査では網羅性及び信頼性が高いと考えられるデータベース（Genetics Home Reference、Online Mendelian Inheritance in Man、Mouse Genome Informatics）を利用し、ヒトとマウスの病態情報を抽出したが、これらのデータベースは随時アップデートがなされており、調査時（2019年9月～12月）には記載のなかった情報が追加あるいは改変されている可能性がある。また、本調査により作製したリストは、次頁以降に示した手順で調査・整理を試みたものであり、ある遺伝子に関するリスクの有無を保証するものではない。本リストの利用者は、上記のデータベース等を自身で調査し、また、本調査では取り上げなかった自然変異、conditional なノックアウト、ノックダウン等についても、一次文献を含めて最新の調査解析が必要と考える。リスクの判断にあたっては、利用者の責任においてなされたい。

第1章 調査の概要

第1節 調査の目的

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED) 革新基盤創成事業部 事業推進課では、核酸医薬品のオフターゲット効果の予測※により抽出したオフターゲット遺伝子のリスク評価を円滑に行うために、発現抑制により機能低下が起こった場合、ヒトにおいて毒性発現のリスクが高いと考えられる遺伝子を抽出・分類するための調査を実施する。

※：[in silico 解析と in vitro 解析（ヒト細胞を用いた遺伝子発現変動解析）を組み合わせた評価]

第2節 調査の概要

AMED では医療研究開発革新基盤創成事業（CiCLE 事業）において、アンチセンス医薬品や siRNA 医薬品に代表される核酸医薬品の開発研究を推進している。核酸医薬品をはじめとする革新的医薬品を創出するためには、有効性の追求のみならず、安全性を評価するための試験法を確立することが重要であり、また、試験から得られた結果を効率よくリスク評価につなげることが肝要である。核酸医薬品の安全性担保については、核酸医薬品に特有の考慮事項である「オフターゲット効果に起因する毒性」のリスク評価に注目が集まっているが、現状では、オフターゲット遺伝子を特定する手法については確立されつつあるものの、得られたオフターゲット遺伝子を効率よく、適切にリスク評価につなげるスキームは整備されていない。

本調査では、この問題にアプローチするため、「発現抑制により機能低下が起こった場合、ヒトにおいてリスクが高いと考えられる遺伝子」をあらかじめ抽出・分類するための調査を実施した。具体的には、第一段階として、データベース等を用いた調査により、ヒトにおいて毒性発現のリスクが高いと考えられる遺伝子を抽出し、リスク評価の観点からこれらの遺伝子を分類した。

本調査では、調査内容の妥当性を検証しながら進めるため、少数の遺伝子について予備調査を行い、その内容について有識者に進捗報告を行い、以降の検討プロセスについて承認を得て進めた。一連の作業の開始時には、具体的キーワードの設定等について AMED や有識者の直接指導を受けて実施した。また、調査結果の中間結果をとりまとめて有識者委員に報告を行った。なお、内外の外部有識者に対するヒアリングについては、進捗報告の委員会あるいは中間結果報告に対して、特定の遺伝子に関するヒアリングの必要性が指摘されなかったため実施していない。

第3節 調査及び取りまとめ方法

1. 調査対象遺伝子

調査対象遺伝子は、核酸医薬品のオフターゲット効果のリスク評価という観点に立ち、治験開始時に特に留意すべき生命維持に重要な機能を果たしている遺伝子群、治験実施時及び上市後の長期投与あるいは妊娠可能な女性への投与を考慮した際に留意すべきがん及び形成異常に関連した遺伝子群に加え、遺伝子の変異による機能変化と疾患との関連が高いと考えられる遺伝子群を中心に、有識者が選定したヒト遺伝子を調査対象とし

た。

具体的には、以下に示す遺伝子群である。各ソースに記載のある遺伝子数と合わせて表 1 に示す。具体的な遺伝子名とこれらのソースでの収録状況は資料編別表 1 に示す。

表 1 調査対象遺伝子の概要

ソース	遺伝子数	備考
Safety panel 対応遺伝子	112	・生理機能(循環、中枢等)に関わる遺伝子群 Eurofin 社の in vitro 安全性薬理プロファイリング用製品 「SafetyScreen87 Panel (https://www.eurofindiscoveryervices.com/catalogmanagement/viwitem/SafetyScreen87-Panel-Panlabs/PP223)」の評価対象におけるヒト遺伝子群
NCC オンコパネル由来	48	・がん関連の遺伝子群 NCC オンコパネルで機能低下が病態と関連があると解釈されている遺伝子群 (https://www.ncc.go.jp/jp/ncch/information/20180403/index.html#07 の青字の遺伝子)
Shibata list	241	・がん関連の遺伝子群 独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)科学委員会細胞組織加工製品専門部会において、細胞組織加工製品の「造腫瘍性」について議論された際に、文献(Cancer Research, Vol.72(2012):636-644)及び国立がん研究センターの柴田龍弘氏が提出した資料より作成された家族性腫瘍の原因遺伝子として報告されているがん関連遺伝子のリスト。これまでの報告からがんにおいて最初の体細胞変異と想定されるもの及びがん変異データベース等において高頻度に認められるがん関連遺伝子が含まれる。 (https://www.pmda.go.jp/files/000155938.pdf の表 1) GHR とは別の遺伝子名(synonym)で記載されたもの、リスト内で同一遺伝子別名表記の重複あり
Genetics Home Reference (GHR)	1,473	・ヒトの病態と関わる遺伝子群 米国 National Institutes of Health の National Library of Medicine が提供する遺伝子の変異がヒトの健康に及ぼす影響に関する情報を提供するウェブサイト Genetics Home Reference(GHR)に登録されている遺伝子群(https://ghr.nlm.nih.gov/gene の A~Z に記載の遺伝子、published August 20, 2019 の遺伝子を採用)
合計(重複除去)	1,695	

2. 調査の取り進めの概要

調査対象として選定されたヒト遺伝子について、まずヒト病態情報データベースの情報を基に、核酸医薬品のオフターゲット効果のリスク評価に資する情報を整理した。ヒト病態情報データベースには調査対象遺伝子選定に用いた Genetics Home Reference (GHR) に情報が整理されているため、まずこのデータベースを用いた。ただし、このデータベース以外から選定されているヒトの遺伝子については調査できないため、ヒト遺伝子情報を豊富に含むデータベースとして Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM)を調査に加えた。また、遺伝子の機能喪失についてはこれまでに報告されたノックアウト(KO)マウスの表現型について情報を集約した Mouse Genome Informatics (MGI) に、ヒトで報告の無い遺伝子の機能喪失について情報が含まれると考えられるため、調査に加えた。また、種間の遺伝子の機能喪失と病態を考察するには、該当する遺伝子がヒトとマウスで同じ機能を担っているかどうか重要となる。そのため、当該調査では遺伝子データベースである Ensembl を用いてヒト遺伝子産物(タンパク質)と配列の類似し

たマウスタンパク質 (Ensembl では“オルソログ”と表現されている) の相同性を記載した。また、ヒトタンパク質に対するマウスの類似タンパク質が複数ある場合には、その情報を整理した。一方、マウスタンパク質に対してヒトの類似タンパク質がいくつあるかについては調査できていない。

ヒトとマウスにおいて、配列上の類似タンパク質が機能的な相同分子にならない場合があるので、ヒト遺伝子とマウス遺伝子の対応については注意を要する。例えば、ヒトにおいて配列の類似した遺伝子ファミリーが存在し、当該ファミリー遺伝子の数がヒトとマウスで異なる場合、一次配列上の類似性の情報のみで機能的な相同分子を特定することは困難である。

利用したデータベースとその特徴を表 2 に示す。

表 2 利用したデータベースとその特徴

1) ヒト遺伝疾患データベース: Genetics Home Reference (https://ghr.nlm.nih.gov/)	
特徴	遺伝疾患に関する情報が 1,500 件ほど集約されている。疾患との因果関係がウェブ情報で参照でき、引用元も確認できる。遺伝子の発現低下が病態発症に寄与するかしないかを判断する際に当該ウェブ情報もしくはその引用文献が活用できる。1 遺伝子に複数の疾患情報が存在する場合は複数の情報が登録されており、遺伝子疾患の情報を詳しい。
2) ヒト遺伝疾患データベース: Online Mendelian Inheritance in Man (https://www.omim.org/)	
特徴	既知の全てのメンデル型遺伝子疾患と 15,000 異常の遺伝子に関する情報を収録するヒト遺伝子と遺伝子疾患のオンラインカタログ。遺伝子と疾患に関する情報のコンテンツが多い。コンテンツの量としては 1) の GHR をしのぐ。遺伝子の発現低下が病態発症に寄与するかしないかを判断する際にウェブ情報もしくはその引用文献が活用できる。
3) マウス KO 情報データベース: Mouse Genome Informatics (http://www.informatics.jax.org/)	
特徴	遺伝子、ゲノム及び生物学的データを統合した実験用マウスのデータベースリソース。マウス (<i>Mus musculus</i>) のオルソログの KO 動物の情報から遺伝子の機能について考察する際に活用できる。
4) 遺伝子データベース: Ensembl (https://asia.ensembl.org/index.html)	
特徴	比較ゲノム研究を支援するための脊椎動物ゲノムに関するゲノムブラウザー。本調査では、ヒト遺伝子情報からマウスの KO 情報を調べる際にマウスのオルソログの調査を行うのに利用した。オルソログのヒトとマウスの相同性についてタンパク質レベルで比較可能。

ヒト遺伝子疾患に関しては、主として GHR を用いて調査を行い、GHR に遺伝子の記載がない場合は、OMIM を用いて調査を行った。それと並行して、MGI を用いて KO マウスに関する情報を収集し、Ensembl はマウスとヒトの遺伝子の相同性を確認するのに利用した。

ヒト遺伝子疾患及び KO マウスの表現型に関しては、遺伝子のリスク評価に資するため、表 3 に記載の観点で分類を行った。

ヒト遺伝子疾患については、①疾患の情報の有無、②情報がある場合は、遺伝子の発現抑制によるリスクを対象としていることを念頭に、機能低下、機能亢進、及びそれ以外 (変異による、生理機能とは関連しない新たな機能発現等) の分類を設けた。また、既存情報では分類できないケースも考慮し、不明の選択肢も設けた。③表現型発症までの期間に関しては、機能喪失による影響が即時的に病態発症として影響をもたらすか、持続した喪失が病態発症をもたらすかを考察する参考として即時性、遅延性、それ以外の分類を設けた。④病態の分類については病態の重篤性や長期投与、妊娠可能な女性へ投

与などを考慮し、致死的、がん、形成異常、それ以外の分類を設けた。それ以外の中には視覚や聴覚などの感覚器への影響も含まれることがある。

KO マウスの表現型については、まず、⑤病態情報の有無に加えて病態情報があっても発生過程で致死的な場合は成体への影響は不明となるため、胎生致死に関しては別途分類した。また、病態情報無しについても KO 動物の情報があっても病態が出ないケースと KO 動物の情報がないケースを分別した。⑥表現型発症までの期間及び⑦病態の分類についてはヒト遺伝子疾患と同様に分類した。

表3 ヒト遺伝子疾患及びKO マウスの病態に関するリスク評価の観点

評価の観点	分類	備考
ヒト遺伝子疾患		
① ヒト遺伝子疾患情報の有無	P:有	
	A:無	
② 遺伝子機能の変化の内容	A:機能低下	
	B:機能亢進	
	C:転座等、変異で新たな作用発現	転座等で融合遺伝子を生じる、変異により全く新しい酵素活性を獲得する、変異によりタンパク質の凝集体を生じそれが疾患につながる等の新たな作用を発現するもの
	D:不明	機能の変化はあるものの、病態に影響を及ぼすメカニズムが不明なもの
③ 表現型発症までの期間	A:即時性	出生前、あるいは出生直後に症状が現れるもの
	B:遅延性	
	C:それ以外、不明	
④ 病態の分類	A:致死的	
	B:がん	
	C:形成異常	外観だけでなく、明らかな臓器異常も含む
	D:上記以外	
KO マウスの病態		
⑤ ノックアウト動物における病態情報の有無	P:有	
	A:無	KO マウスは存在するが病態といえる表現型の変化がない
	N:胎生致死	
	X:KO マウス情報無し	KO マウスに関する情報が得られない
⑥ 表現型発症までの期間	A:即時性	
	B:遅延性	
	C:それ以外、不明	
⑦ 病態の分類	A:致死的	
	B:がん	
	C:形成異常	外観だけでなく、明らかな臓器異常も含む
	D:上記以外	

3. 具体的な調査の取り進め手法と留意点

取りまとめの表は、遺伝子ごとに上記のイメージにある項目から構成されているので、項目ごとにどのように調査を行ったかを示すとともに、留意点をまとめる。

(1)、(2) ヒト遺伝子の Gene symbol 及び Gene ID

Gene symbol は HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) の official symbol を、GeneID は National Center for Biotechnology Information の GeneID を記載してある (いずれも <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>にて検索)。

(3) 遺伝子の機能

GHR の当該遺伝子の「Normal Function」から、遺伝子の機能に関する部分を抽出した。GHR に記載のないものは、OMIM を用いた。

(4) ヒト遺伝子疾患情報の有無

(5) に記載したヒト遺伝子疾患の内容により、「P: 有」又は「A: 無」の判断を行った。さらに、一つの遺伝子で複数の疾患がある場合は、(1) 疾患名 A、(2) 疾患名 B 等、分けて記載した。

(5) ヒト遺伝子疾患の内容

GHR の「Health Conditions Related to Genetic Changes」の部分の疾患名を抽出した。ただし、疾患名のみで当該遺伝子の変異との関連の記載のない疾患は採用しなかった。GHR にないものについては、OMIM の「Gene-Phenotype Relationships」、「Molecular Genetics」あるいは「Allelic Variants」から関連する遺伝子疾患名を抽出した。

(6) 遺伝子機能の変化の内容

(7) に記載した変化の内容に沿って、「A: 機能低下」、「B: 機能亢進」、「C: 転座等、変異で新たな作用発現」、「D: 不明」の分類を付与した。疾患が複数ある場合は、疾患ごとに分類を付与しているため、一つのコラムに複数の分類が記載されている場合もある。

(7) 左記判断の根拠

GHR の「Health Conditions Related to Genetic Changes」の部分の疾患に関する記載、GHR にないものについては、OMIM の「Molecular Genetics」あるいは「Allelic Variants」の記載から (6) の分類の根拠となる情報を記載した。「A: 機能低下」、「B: 機能亢進」及び「C: 転座等、変異で新たな作用発現」の分類に関しては、変異等による当該遺伝子産物自体の比活性の増減の他、発現量の変化、分解の速度の変化、発現制御の不全等を踏まえて総合的に判断している。疾患が複数ある場合は、疾患ごとに根拠を記載した。

(8) 表現型発症までの期間

(10) に記載した根拠を基に病態表現型の発現までの期間により、「A: 即時性」、「B: 遅延性」、「C: それ以外、不明」の分類を付与した。同じ疾患でもタイプにより病態表現型の発現時期が異なる、あるいは症状ごとに発現時期が異なるものがあるので、「A:

即時性」、「B：遅延性」の分類を同時に付与したことがある。疾患が複数ある場合は、疾患ごとに分類を付与している。

(9) 病態の分類

(10)に記載した根拠を基に疾患ごとに病態を、「A：致命的」、「B：がん」、「C：形成異常」、「D：上記以外」に分類した。同じ疾患でも複数の病態を生じる場合があるので、複数の分類を付与したことがある。疾患が複数ある場合は、疾患ごとに分類を付与している。

(10) 病態判断の根拠

GHRの「Health Conditions Related to Genetic Changes」の部分の疾患に関する記載、GHRにないものについては、OMIMの「Molecular Genetics」あるいは「Allelic Variants」の記載から(8)及び(9)の分類の根拠となる情報を記載した。疾患が複数ある場合は、疾患ごとに記載している。なるべくその疾患（あるいはその疾患のタイプ）に特徴的な症状等を記載するよう心掛けたが、全ての症状を記載したわけではないことに留意が必要である。

(11) 左記情報源（データベース等）

(4)～(10)の分類、記載の基となったソースを記載した。

(12) KO動物における病態情報の有無

MGIの「Mutations, Alleles, and Phenotypes」欄の「phenotype references」の文献情報（基本的に抄録を参照）及び「All Mutations and Alleles」に記載のマウスの表現型情報を基に作成した(14)及び/又は(17)の記載に基づき、KOマウスにおける病態情報の有無に関して、「P：有」、「A：無」、「N：胎生致死」又は「X：KOマウス情報無し」の分類を付与した

(13) ヒトとマウスのタンパク質の相同性（%）

Ensembl (Ensembl 98: Sep 2019) を用いて、当該ヒト遺伝子を検索し、「マウスオルソログ」と記載されている遺伝子（タンパク質レベルで、ヒトの遺伝子と類似した配列を持つマウス遺伝子）について、「View Sequence Alignments」→「View Protein Alignment」を選択し、マウスの「% identity (Protein)」の数値を記載した。ヒトとマウスとでアミノ酸残基数が大きく異なる場合は、それぞれ残基数をパーセンテージの下に記載した（ヒトは human 又は H、マウスは mouse 又は M と記載）。また、類似性の関係に特徴のあるものは、Ensemble の記載に基づき 1-to-many、many-to-many を記入した。オルソログが複数記載されている場合は、オルソログごとに相同性の数値を記載している。Ensembl では「マウスにオルソログ無し」となっている場合でも、MGI では KO マウスが記載されている場合もある。

(1 4) KO マウスの疾患の内容

KO マウスは当該遺伝子に関する MGI の「Mutations, Alleles, and Phenotypes」欄の「Mutations and Alleles」に記載のマウスのうち、「Targeted (Null/knockout)」とあるものを中心に変異の内容、タンパク質あるいは転写物の有無に注意して選択し、「homozygous」とあるものの表現型を、根拠とした論文と共に記載した ((#### 2005) 等、同一著者で同一年に複数の論文がある場合は 2005a, b 等)。似た表現型について記載した論文が複数あった場合は、どちらか一方のみを記載し、なるべく多様な表現型を抽出するよう心掛けた。KO に関して、どこまで当該遺伝子が破壊されているかは、MGI の記載、根拠となった論文の抄録からは詳細が分からない場合もあり、必ずしも完全な KO でないものが混じっている可能性があることに留意が必要である。自然の変異により遺伝子機能を喪失したもの、conditional KO は採用しなかった。

(1 5) 表現型発症までの期間

MGI の「Mutations, Alleles, and Phenotypes」欄の「phenotype references」の文献情報（基本的に抄録を参照）及び「All Mutations and Alleles」に記載のマウスの表現型情報を基に作成した (1 4) 及び／又は (1 7) に記載した根拠を基に、ノックアウト動物における表現型発症までの期間を、「A: 即時性」、「B: 遅延性」、「C: それ以外、不明」に分類した。(8) と同じく、症状ごとに発現時期が異なるものがあるので、「A: 即時性」、「B: 遅延性」の分類を同時に付与したことがある。マウスとヒトとでは寿命が違うので、生後どこまでを「A: 即時性」とするかについて、判断がばらついている可能性がある。

(1 6) 病態の分類

MGI の「Mutations, Alleles, and Phenotypes」欄の「phenotype references」の文献情報（基本的に抄録を参照）及び「All Mutations and Alleles」に記載のマウスの表現型情報を基に作成した (1 4) 及び／又は (1 7) に記載した根拠を基に、KO マウスの病態の重篤度として、「A: 致死的」、「B: がん」、「C: 形成異常」、「D: 上記以外」の分類を付与した。複数の病態を生じる場合があるので、複数の分類を付与したことがある。なるべく当該マウスに特徴的な症状等を記載するよう心掛けたが、全ての症状を記載したわけではないことに留意が必要である。

(1 7) 病態重篤度判断の根拠

KO マウスは当該遺伝子に関する MGI の「Mutations, Alleles, and Phenotypes」欄の「Mutations and Alleles」に記載のマウスのうち、「Targeted (Null/knockout)」とあるものを中心に変異の内容、タンパク質あるいは転写物の有無に注意して選択し、「homozygous」とあるものの表現型を、根拠とした論文と共に記載した ((#### 2005) 等、同一著者で同一年に複数の論文がある場合は 2005a, b 等)。似た表現型について記載した論文が複数あった場合は、どちらか一方のみを記載し、なるべく多様な表現型を抽出するよう心掛けた。KO に関して、どこまで当該遺伝子が破壊されているかは、MGI の記載、根拠となった論文の抄録からは詳細が分からない場合もあり、必ずしも完全な KO でないものが混じっている可能性があることに留意が必要である。自然の変異により遺

伝子機能を喪失したもの、conditional KOは採用しなかった。

(18) 左記情報源 (データベース等)

(12) ~ (17) の分類、記載の基となったソースを記載した。

(19) 備考

備考欄には、以下のような情報を記載した。

- ・ヒト遺伝子疾患に関して、当該遺伝子が GHR 及び OMIM に載っていない場合
- ・当該遺伝子が染色体ではなく、ミトコンドリアにコードされている場合
- ・当該遺伝子が X連鎖遺伝子である場合(当該遺伝子が X染色体上に載っている場合、雄マウスには X染色体は一つしかないため、hemizygous な KO で実質的に両アレルの KO と同等になる等)
- ・KO マウスでは胚性致死となるが、ヘテロ接合性 KO マウスには何らかの病態情報がある、あるいはない等