

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) RNA 製品の品質・安全性評価法の確立
(英語) Establishment of methods for quality and safety assessment of RNA-based therapeutics

研究開発実施期間: 令和2年12月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 井上 貴雄
(英語) Takao Inoue

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長
(英語) National Institute of Health Sciences・Division of Molecular Target and Gene Therapy Products・
Division Head

II 研究開発の概要

【背景と目的】

近年、生体機能を RNA レベルで制御する核酸医薬や mRNA 医薬の開発が大きく進展しており、これまで治療法に乏しかった遺伝性疾患、難治性疾患、がん、感染症などに対する新たなモダリティとして注目を集めている。これらの先端的医薬品のうち、RNA で構成される siRNA 医薬や mRNA 医薬については、従来のモダリティとは異なる特有の構造・作用機序・性質を有するが、その品質・安全性評価法の確立に資する科学的データが不足しており、評価科学の観点からのウェット研究が求められている。特に mRNA 医薬については、より先進的であるため、本研究の開始時点（2020 年 12 月）において、品質・安全性評価に関する体系的な研究は全く行われていない。以上の背景を踏まえ本研究では、siRNA 医薬および mRNA 医薬について、品質評価および安全性評価に関する研究を行い、その基盤データを踏まえて品質・安全性評価法を確立することを目的とする。

【実施内容と成果】

siRNA 医薬に関する検討

siRNA 医薬は標的 RNA と相補的に結合し、標的 RNA を切断・分解することで薬効を発揮する。そのため、siRNA 医薬の安全性評価における特有の考慮事項の一つとして、標的 RNA と似た配列を有する RNA に相補結合して作用する相補結合依存的オフターゲット作用に起因する毒性発現に留意する必要がある。siRNA 医薬によるオフターゲット毒性は RNA 分解型アンチセンスと同じ評価スキームで予測できると考えられるが、RNA 鎖を切断する分子機構や切断の対象となる RNA は両者で異なるため、オフターゲット候補遺伝子の検索条件を新たに検証する必要がある。また、siRNA 医薬では、siRNA の各鎖（センス鎖、アンチセンス鎖）の全長にわたって相補性を有する RNA を切断するオフターゲット作用のほか、各鎖のシード領域と呼ばれる 7 塩基長の領域が mRNA の 3'非翻訳領域（3'UTR）に相補結合することで生じるオフターゲット作用が知られている。以上を踏まえ本研究では、複数のモデル siRNA を用いて、siRNA 医薬がオフターゲット作用を誘導する配列条件や評価スキームに関するウェット検証を行い、下記の成果を得た。

- ・ モデル siRNA について in silico 解析によりオフターゲット候補遺伝子を検索したところ、siRNA の各鎖が全長にわたって相補性を有する遺伝子は不適合箇所を 3~4 個所許容しても数個~数十個程度であるのに対し、各鎖のシード領域（7 塩基長）に相補性を有する遺伝子は、完全相補する遺伝子で数千個存在することが明らかになった。
- ・ ヒト細胞にモデル siRNA を導入し、網羅的な遺伝子発現変動解析を実施した結果、siRNA を構成する各鎖と全長にわたり相補性を有する遺伝子については、オフターゲット作用の影響は限定的であった一方で、各鎖のシード領域が 3'UTR に相補結合する遺伝子では RNA 切断を指標としたオフターゲット作用が起こりやすいことを見出した。以上より、siRNA のオフターゲット候補遺伝子の検索条件として、少なくともシード配列が 3'UTR と完全相補する mRNA を対象とする必要があることを示した。

mRNA 医薬に関する検討

mRNA 医薬は核酸医薬と同様に核酸で構成されるモダリティであるが、核酸医薬より分子量が圧倒的に大きく（mRNA 医薬：数千塩基長、核酸医薬：十数~数十塩基長）、インビトロ転写によって酵素的に製造され、キャップやポリ A など特有の構造を有している点で核酸医薬と異なる。目的物質由来不純物としては、目的物質の塩基長と異なる不純物（短鎖長不純物及び長鎖長不純物）、5'末端のキャップ構造の欠損体、

3'末端の PolyA 鎖長が異なる類縁体などが存在する。短鎖長不純物や長鎖長不純物では、目的物質では想定されていない二本鎖 RNA (dsRNA) が分子内に部分的に生じる可能性がある。dsRNA は RIG-1 や TLR9 などの核酸受容体に認識され、自然免疫系の活性化により炎症反応を誘起する可能性がある。製造工程由来不純物としては、反応系に含まれる酵素 (ポリメラーゼ、DNase など) 由来の残留タンパク質やテンプレート DNA が含まれる。以上のような mRNA の特性を念頭に、全長 mRNA 含有率、キャップ付加率、PolyA の長さ、dsRNA の評価法等について検討を行い、下記の成果を得た。

- ・ キャピラリーゲル電気泳動を用いた全長 mRNA 含有率の評価法を確立した。また、本評価法を用いて 4000 塩基程度より短いモデル RNA について分析条件の精査を行い、分離に影響を及ぼす因子 (ゲル濃度・変性剤・泳動前の熱処理等) を抽出・整理するなど、本評価法に関する留意点を明確化した。
- ・ 液体クロマトグラフィー質量分析を用いたキャップ付加率の評価法を確立した。また、モデル mRNA を用いた解析から、本評価法のプローブ設計やデータ解析の考え方などに関する留意点を明確化した。
- ・ 液体クロマトグラフィー質量分析を用いた PolyA 長の分析手法の評価法を確立した。また、本手法を用いてモデル mRNA の PolyA 長を解析し、PolyA の長さが鋳型 DNA により規定される製造法であっても、PolyA 長は特定の値に定まらないことを見出した。さらに、液体クロマトグラフィー質量分析を用いた本評価の限界と問題点を明確化した。
- ・ dsRNA の分析手法として、dsRNA 検出 ELISA 法を確立した。既存の抗 dsRNA 抗体の組み合わせや作用時間・濃度などの検出条件を厳密に検討し、dsRNA を高感度に検出可能な最適条件を決定した。本手法の特性 (具体的にどのような構造を持つ dsRNA を認識しているのか等) を明確化するため、RNA の高次構造予測アルゴリズム等を用いて独自の dsRNA モデル (二重鎖部分の長さや数が異なる様々な dsRNA 群) を作製した。本モデル RNA 群を用いて、本手法の特性評価を進めた。
- ・ mRNA の炎症原性の評価法を検討し、mRNA による自然免疫活性化を広く検出可能な細胞種を選定した。mRNA 医薬の送達キャリアとして、それ自体では炎症反応を誘導せず、mRNA そのものによる炎症反応の評価に適したキャリアを特定し、mRNA の導入条件・作用時間等の条件を最適化した。

成果の発表

- ・ 核酸医薬に特有の薬物動態評価の考え方を整理し、文書として発表した (医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 52, 76-84, 2021)。また、既承認アンチセンス医薬の薬物動態評価の現状を包括的に調査し、文書として発表した (医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 52, 150-163, 2021 ; Nucleic Acid Therapeutics, 33, 83-94, 2023)。
- ・ 核酸医薬のオフターゲット毒性の予測・評価法に関する考え方を整理し、文書として発表した (Clinical Neuroscience, 41, 652-657, 2023)。
- ・ mRNA 医薬の品質評価 (品質評価項目と分析方法など) の考え方、留意点、課題点等を整理し、文書として発表した (医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54, 300-311, 2023 ; 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54, 322-329, 2023)。
- ・ 核酸医薬、mRNA 医薬の国内外における開発動向や規制動向に関する調査研究を実施し、その成果を文書として発表した (実験医学, 39, 170-177, 2021 ; Medical Science Digest, 549, 5648-652, 2023 ; PHARMSTAGE, 22, 1-10, 2022 など)。

- ・ 本研究班において議論した核酸医薬および mRNA 医薬の品質評価の考え方、留意点、課題点等を整理し、書籍として取り纏めた。書籍の企画にあたり、研究代表者の井上、研究分担者の小比賀が監修を務め、当研究班に参画する研究協力者が多数執筆者として参加した（核酸医薬品の CMC 管理戦略（品質評価・不純物管理）、サイエンス&テクノロジー（2022.9.29 発刊）；核酸医薬・mRNA 医薬の製造分析の基礎と基盤技術開発、CMC リサーチ（2023.2.15 発刊））。
- ・ 本研究班のアウトリーチ活動の一環として、研究期間内で 5 回のシンポジウムを実施した。本研究で得られた成果を広く発信し、産官学の専門家と意見交換を行った。
 - ✓ 「核酸医薬品の薬物動態評価」(第 14 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(令和 3 年 6 月 28 日開催))
 - ✓ 「オフターゲット効果の評価と毒性発現機構」(第 15 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(令和 4 年 8 月 3 日開催))
 - ✓ 「mRNA 医薬の現状と今後の展望」(第 16 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(令和 5 年 1 月 17 日開催))
 - ✓ 「核酸医薬の CMC に関する取り組み～産官学の立場から～」(第 17 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(令和 5 年 7 月 13 日開催))
 - ✓ 「核酸医薬開発を支援する業務受託機関等の取り組み」(第 18 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム(令和 5 年 11 月 22 日開催))

【意義】

本研究で実施されたウェット検証から得られたデータは、核酸医薬および mRNA 医薬の品質・安全性評価に関する考慮事項ならびに各評価法に関する技術的指針の科学的根拠となる。本研究の知見は、核酸医薬および mRNA 医薬の研究開発の推進ならびに承認審査の効率化に寄与し、ひいては遺伝性疾患や難治性疾患、がん、感染症等の早期克服につながるものと期待される。

In recent years, the development of oligonucleotide therapeutics or mRNA therapeutics has been progressing rapidly and is attracting attention as new therapeutic tools for hereditary, intractable diseases, cancer, infectious diseases, etc. Among these advanced therapeutics, siRNA and mRNA therapeutics composed of RNAs have unique structures, mechanisms of action, and properties that differ from those of conventional modalities. However, there is a lack of scientific data that would contribute to developing quality and safety assessments methods that account for their characteristics; wet research from the perspective of evaluation science is required. In particular, because of the more advanced nature of mRNA therapeutics, no systematic studies on quality and safety assessment were conducted when this study was initiated (December 2020).

In light of the above background, this study aimed to examine how the quality and safety of siRNA and mRNA therapeutics should be evaluated and to develop a method for quality and safety assessments based on scientific data. We validated the evaluation scheme for off-target effects for siRNA therapeutics and clarified the search conditions for off-target candidate genes. As a study on mRNA therapeutics, we developed analytical methods for full-length mRNA, cap structure, PolyA length, and double-stranded RNA, and clarified consideration points for each method. A selection of the papers presented are listed below.

1. Takakusa H, Iwazaki N, Nishikawa M, Yoshida T, Obika S, Inoue T. Drug metabolism and pharmacokinetics of antisense oligonucleotide therapeutics: Typical profiles, evaluation approaches, and points to consider compared with small molecule drugs. *Nucleic Acid Therapeutics*, 33, 83-94, 2023.
2. Yoshida T, Inoue T. Evaluation of off-target effects of oligonucleotide therapeutics. *Clinical Neuroscience*, 41, 652-657, 2023.
3. Yamamoto T, Uchida E, Inoue T. Quality Evaluation Points and Analytical Methods for mRNA-based Therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 54, 300-311, 2023.
4. Yoshida T, Yamashita T, Yamamoto T, Ohoka N, Itaka K, Akita H, Takeshita F, Mineno J, Tsujihata S, Yamaguchi T Uchida E, Inoue T. Consideration for Evaluation of mRNA Therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 54, 322-329, 2023.
5. Yoshida T, Inoue T. Current status of regulation for oligonucleotide therapeutics. *Experimental Medicine*, 39, 170-177, 2021.
6. Inoue T, Yoshida T. Consideration for Quality and Safety Assessment of Oligonucleotide Therapeutics in Japan. *Medical Science Digest*, 549, 5648-5652, 2023.