

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）シグナルかく乱作用に基づく新規ヒト発生毒性試験法による核酸医薬品の安全性評価

（英 語）Development of a novel human in vitro assay based on signal disruption for the developmental toxicity assessment of nucleic acid therapeutics

研究開発実施期間：令和 4 年 8 月 1 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）大久保 佑亮
（英 語）Okubo Yusuke

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・安全性生物試験研究センター 毒性部・室長

（英 語）National Institute of Health Sciences, Center for Biological & Safety research, Division of Cellular & Molecular Toxicology, Chief

II 研究開発の概要

公開用報告書案（和文）

背景

RNA のレベルで生体を制御可能な核酸医薬品は、従来の低分子化合物に比べ標的特異性が高く劇的な治療効果が期待されることから、精力的に開発が進められている。しかしながら、その標的特異性の高さゆえに種特異性も高い核酸医薬品は、動物種によっては臨床候補品が薬理作用を示さないこともあり、サロゲートによる毒性評価に頼らざるを得ない。一方で、標的 RNA 以外の RNA へのハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット毒性は、従来の動物試験では評価は困難である。そのため、ヒトゲノムを対象とした *in silico* 解析やヒト細胞を用いた *in vitro* 解析によりオフターゲット毒性の予測がなされているが、例えオフターゲット毒性が予測されても、実際に毒性を発現するかは未知数である。

発生毒性は、妊婦に対する臨床試験が実質的に不可能であることから非臨床試験の評価が非常に重要である。ただし、核酸医薬品については、たとえ生殖発生毒性試験を行ったとしても、動物試験ではハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット毒性を評価できないため、発生毒性を有する可能性を否定できないのが現状である。一方、女性の社会進出に伴い晩産化が進んでおり、妊娠・出産を希望する女性の年齢層と悪性腫瘍等の疾患が好発する患者の年齢層が重なって来ている。また、疾患を抱えながらも妊娠出産を希望する場合や妊娠期間中に病気を発症した場合、その治療薬の胎児影響にかかる情報不足から治療に苦慮する事も少なくない。その解決法として、2021 年に改訂された医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン (ICH S5 (R3)) では動物試験代替法の利用について言及されているが、現行の代替法では発生毒性試験を代替できるものはない。したがって、ヒトの発生毒性を外挿可能な新規の *in vitro* 試験を開発することが医薬品開発の効率や安全性の担保、社会的な意義の観点から喫緊の課題である。

目的

本研究では、我々が開発したヒト iPS 細胞を用いた発生毒性を評価可能な integrated Signal Disruption Test (iSDT) 法を用い、ヒトの核酸医薬品のハイブリダイゼーション依存的な毒性を外挿可能な新規の *in vitro* 試験を開発する。

iSDT 法

iSDT 法は半減期が短く高輝度なルシフェラーゼ (NanoLuc: Nluc) と生細胞において連続したレポーターアッセイが可能な発光基質 (Endurazine) を組み合わせた生細胞ルシフェレースアッセイを用いる。レポーターヒト iPS 細胞 (201B7 株) として、チロシンカイネース型受容体の下流で働く血清応答因子の応答配列 Serum response element (SRE) の制御下で Nluc を発現する FGF シグナルレポーターを用いる。このシステムを用い既知の発生毒性物質による FGF シグナルのかく乱作用のダイナミクスを計測する。溶媒対照に対する変化率の積分値 (Area between the curve: ABC) を用い、試験した各濃度の ABC の総和 (ABC-AUC) を算出することで、シグナルかく乱の大きさを表す指標とする。その指標を基に、陽性および陰性の化学物質に対して ROC 曲線解析を行うことで閾値を設定する。

研究の内容と成果

iSDT 法の核酸医薬品対応への改良

従来の iSDT 法は、低分子化合物によるシグナルかく乱作用の動的変化を複数点の生細胞レポーターアッセイシステムにて定量し、発生毒性を評価するものである。本研究ではアンチセンスヌクレオチドや siRNA などの核酸医薬品の中から一種を選択し、iSDT 法を核酸医薬品の評価法として改良した。

従来の iSDT 法で使用していたヒト iPS 細胞は優れた発生毒性評価を示しているが、核酸医薬品の評価においては技術的課題から導入が困難であった。そこで、その他のヒト細胞を用いたリアルタイムレポーターアッセイシステムを構築した。その結果、低分子化合物の評価において、ヒト iPS 細胞には劣るが高い正確度を示す細胞 X が見つかった。その細胞を用いて X 遺伝子と Y 遺伝子を標的とした核酸医薬品によるシグナルかく乱作用を計測したところ、X 遺伝子においてはシグナルかく乱が観察された。核酸医薬品の評価においては用量相関を示す実験の構築が困難であったことから、iSDT 法を改良し、低分子化合物と核酸医薬品のシグナルかく乱作用を比較した。その結果、X 遺伝子を標的とした核酸医薬品は既知の低分子発生毒性物質と同程度のシグナルかく乱を示すことが明らかになった。

多色リアルタイム発光アッセイの開発

評価系の再現性を高めるため、Nluc（青色発光）と SLR3（赤色発光）の組み合わせによる内部標準を含んだ多色リアルタイム発光アッセイを開発した。今後、異なる発光波長を光学フィルターで分離し、同一細胞内での相対比較による、測定誤差の低減を目指す。

社会的意義と今後の展望

本研究により、核酸医薬品の発生毒性評価を目的とした in vitro 試験法のコンセプトが示された。これは、動物実験に代わる新たな評価法として、OECD 試験ガイドラインの方向性とも合致し、今後の行政への受入やガイドライン化に向けた重要なステップになる。今後は、評価物質数を増やし、妥当性、再現性を検証し、試験系の改良を続ける。また、開発した in vitro 発生毒性試験の公定化を見据え、多施設間での再現性検証や、ガイドライン適用における実務的な要件（スループット性、コスト、判定基準など）の整理を進める。本研究で得られた知見をもとに、国内外の関係機関と連携を強化し、より信頼性の高い医薬品安全性評価体制の構築に貢献する。

Background

Nucleic acid-based therapeutics, which enable precise regulation of biological processes at the RNA level, are being increasingly explored due to their relatively high target specificity and the potential for meaningful therapeutic outcomes compared to traditional small-molecule drugs. Nonetheless, this specificity can also lead to species-dependent pharmacological differences, and the effects observed in humans may not always be reliably reproduced in animal models. As a result, toxicological evaluations are often supplemented with surrogate approaches. Furthermore, hybridization-dependent off-target toxicity—arising from unintended interactions between therapeutic oligonucleotides and non-target RNAs—is difficult to assess using conventional animal studies. To address this, *in silico* predictions using the human genome and *in vitro* assays employing human cells are commonly used. However, even when such interactions are computationally or experimentally suggested, the extent to which they lead to actual toxicity remains to be fully elucidated.

Developmental toxicity is especially difficult to evaluate in clinical trials, particularly in pregnant women. As a result, reliable nonclinical testing plays an essential role. Even when reproductive or developmental toxicity tests are conducted for nucleic acid-based drugs, hybridization-dependent off-target toxicity remains difficult to assess in animals, leaving certain potential risks insufficiently characterized.

To address this, the revised ICH S5(R3) guideline issued in 2021 mentions the use of alternative methods to animal testing for reproductive and developmental toxicity. However, no current *in vitro* alternatives are available to fully replace animal-based developmental toxicity tests. Therefore, developing new *in vitro* methods capable of extrapolating human-relevant developmental toxicity is an urgent need from both scientific and societal standpoints.

Objective

This study aims to develop a novel *in vitro* test capable of evaluating hybridization-dependent toxicity of nucleic acid-based drugs in humans by adapting our previously developed integrated Signal Disruption Test (iSDT), which utilizes human iPS cells.

iSDT Method

The iSDT assay employs a live-cell luciferase system that combines a bright, short half-life luciferase (NanoLuc; Nluc) with a substrate (Endurazine) that enables continuous luminescence detection in living cells. As a reporter, we use human iPS cells (201B7 line) engineered to express Nluc under the control of the serum response factor (SRF), a downstream effector of tyrosine kinase signaling, particularly via the FGF pathway. This system allows for real-time monitoring of signal disruption dynamics induced by known developmental toxicants. Signal disruption is quantified using the area between the curves (ABC) method, comparing treated and control samples. The sum of the ABC values at each tested concentration serves as an index of disruption magnitude. Based on these values, a threshold is determined using ROC curve analysis to differentiate positive and negative toxicants.

Research Content and Results

Optimization and Refinement of iSDT for nucleic acid-based drugs

The original iSDT method was designed to dynamically quantify signal disruption induced by small

molecules. In this study, we selected representative nucleic acid therapeutics such as antisense oligonucleotides or siRNAs and adapted the iSDT method for their evaluation.

Although human iPS cells used in the original iSDT system offer excellent developmental toxicity assessment capabilities, they posed technical challenges for nucleic acid delivery. To address this, we established an alternative reporter system using other human cell lines. Among them, Cell X demonstrated high classification accuracy for small molecules, albeit slightly lower than iPS cells.

Using Cell X, we assessed signal disruption caused by nucleic acid drugs targeting genes X and Y. Notably, one candidate targeting gene X showed a clear signal disruption response. Because it was difficult to construct a dose-response curve for nucleic acid therapeutics in our assay, we refined the analysis method to enable comparative evaluation of signal disruption between small molecules and nucleic acid drugs. The results indicated that certain nucleic acid-based agents targeting gene X caused signal disruption comparable to known developmental toxicants.

Development of a multicolor real-time luciferase assay

To improve the assay's reproducibility, we developed a dual-color real-time luciferase assay combining Nluc (blue emission) and SLR3 (red emission) to include an internal control. Going forward, we aim to minimize measurement variability by employing optical filters to separate distinct emission wavelengths, allowing for intra-cellular relative comparison.

Social Relevance and Future Outlook

This study presents a proof-of-concept for a novel in vitro developmental toxicity assay specifically targeting nucleic acid-based drugs. The approach aligns with the evolving direction of OECD test guidelines and offers a critical step toward regulatory acceptance and potential guideline inclusion.

Going forward, we plan to expand the number of test compounds and validate the method's reproducibility and robustness. We will continue to refine the system while preparing for inter-laboratory validation and alignment with regulatory requirements, such as throughput, cost, and evaluation criteria. Through collaboration with national and international stakeholders, we aim to contribute to the establishment of a reliable safety assessment framework for the next generation of human therapeutics.