

# Axcelead

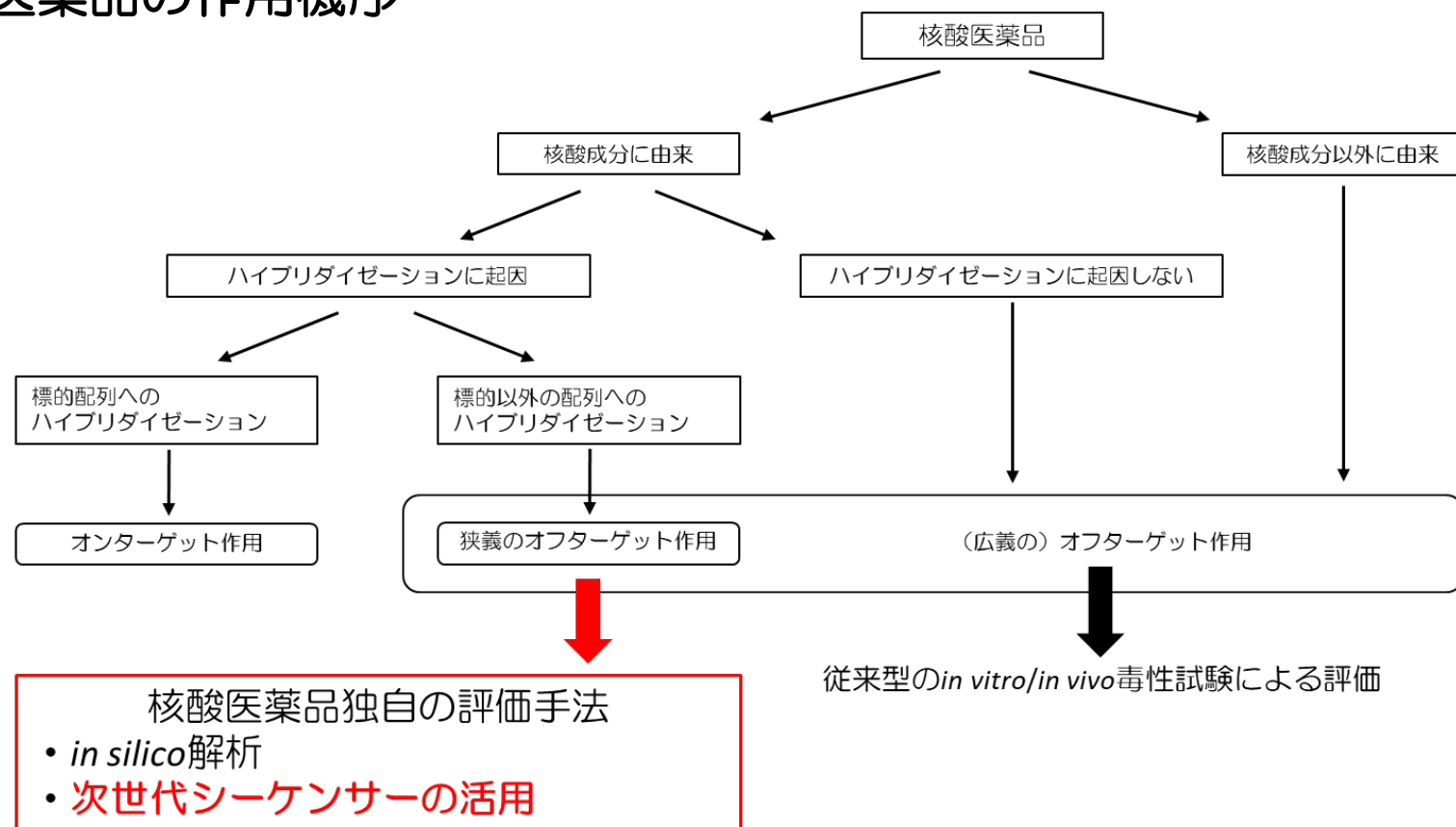
## HAB研究機構学術年会 スポンサーセッション 核酸創薬における次世代シーケンサーの活用

Axcelead Drug Discovery Partners株式会社  
統合トランスレーショナル研究、バイオインフォマティクスグループ  
浅野 真也

2020年9月4日

# 核酸医薬品における作用点・毒性

## 核酸医薬品の作用機序

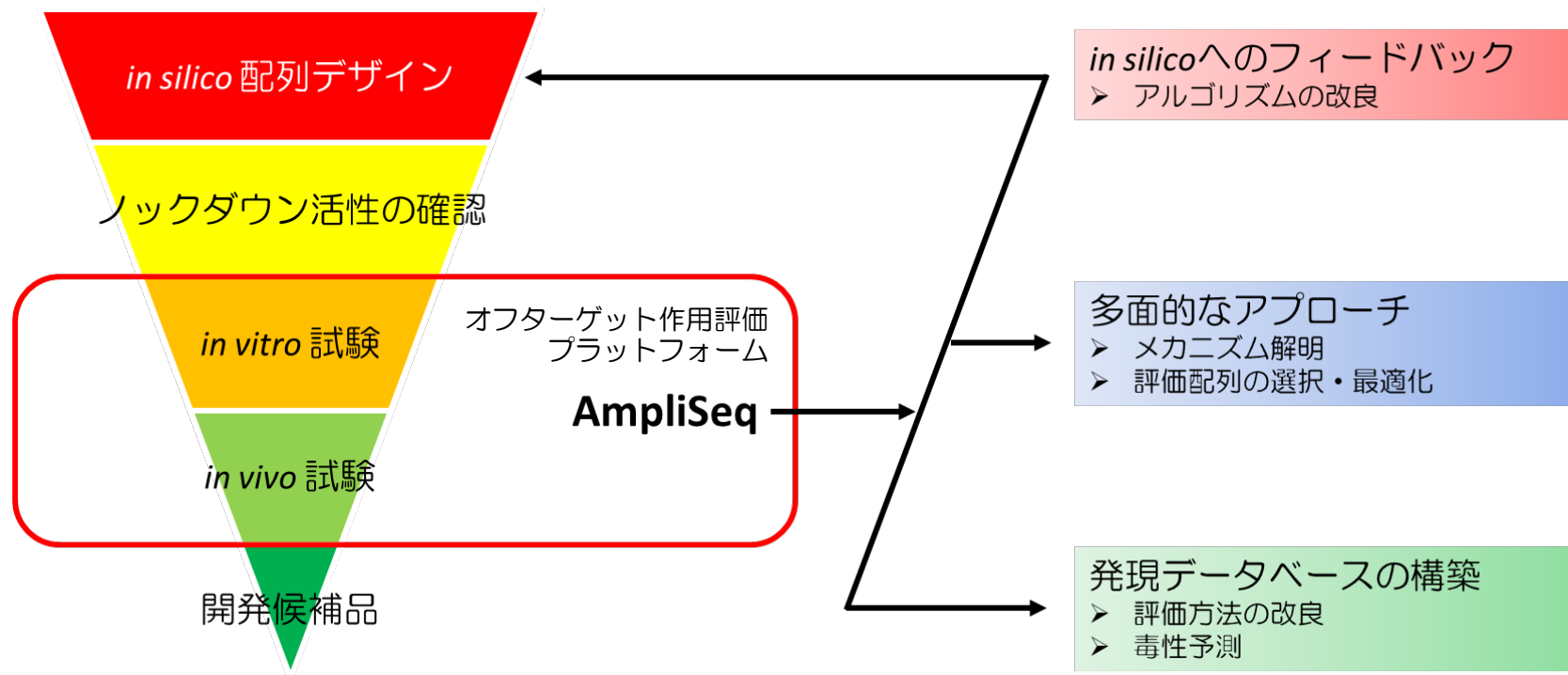


医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. PMDRS. 46(10). 681 ~ 686 (2015) より一部改変

ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット作用を評価するために、Axceleadでは次世代シーケンサーを用いた評価を考えています。

# オフターゲット作用評価プラットフォーム

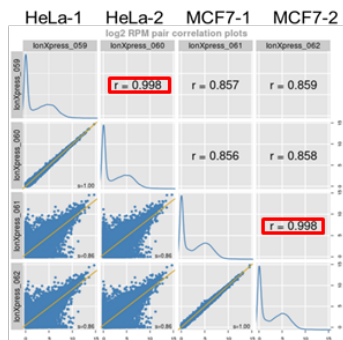
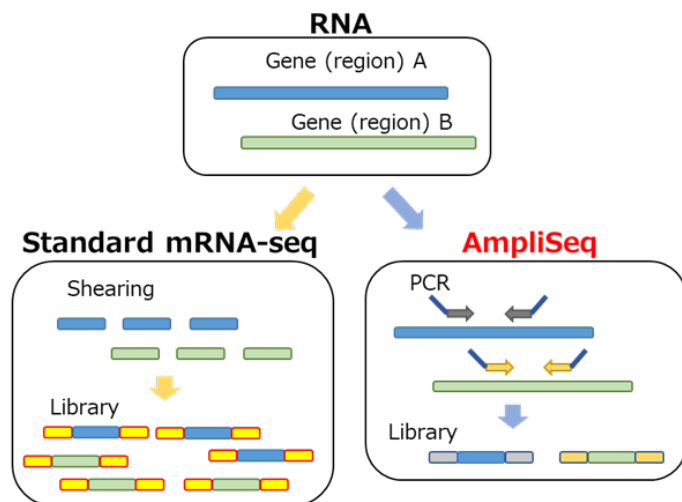
次世代シーケンサーを用いたアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) のオフターゲット評価



次世代シーケンサーで取得した網羅的遺伝子発現データを有効活用することで、**核酸医薬品開発の効率化**だけでなく**核酸医薬品開発プロセス全体の加速化**が期待されます。

# Ion Torrent 次世代シーケンサー

## Ion AmpliSeq Transcriptomeを用いた網羅的遺伝子発現解析

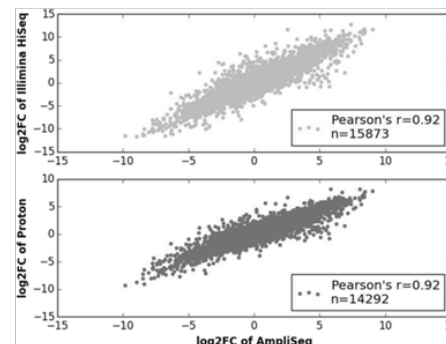


### AmpliSeqの特徴

- 少量のRNA (10 ng)からデータ取得が可能
- 20,000を超える遺伝子の発現データを取得

Target数	
ヒト	20,802 (> 95% of human RefSeq genes)
マウス	20,767 + 3,163 (> 90% of mouse RefSeq genes)

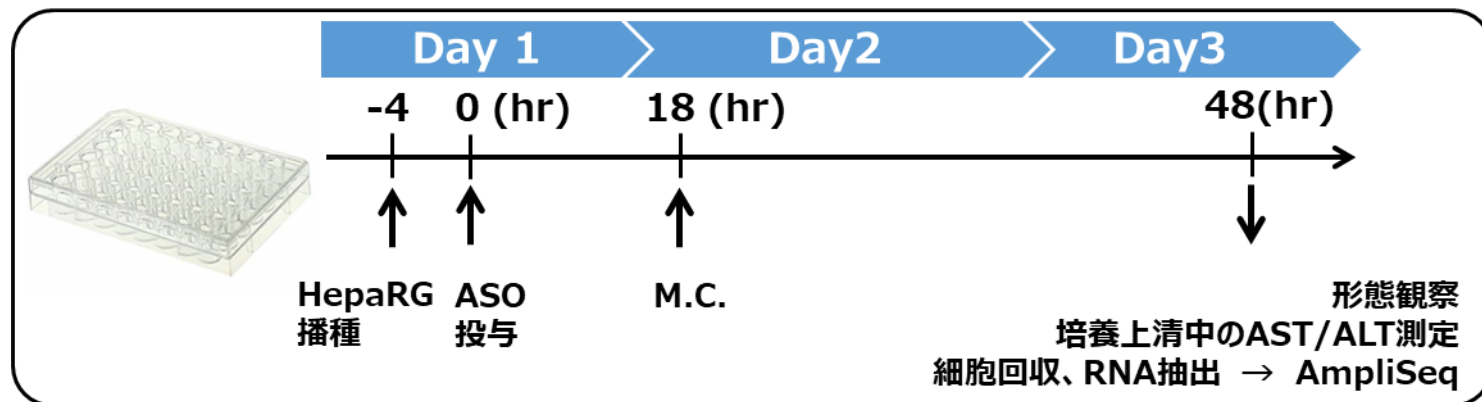
- 一般的なRNA-seqやqPCRとの高い相溶性



- 再現性のあるデータを取得可能

※新規の転写産物やスプライシングバリエントは測定できない

# AmpliSeqを用いたオフターゲット作用評価の事例

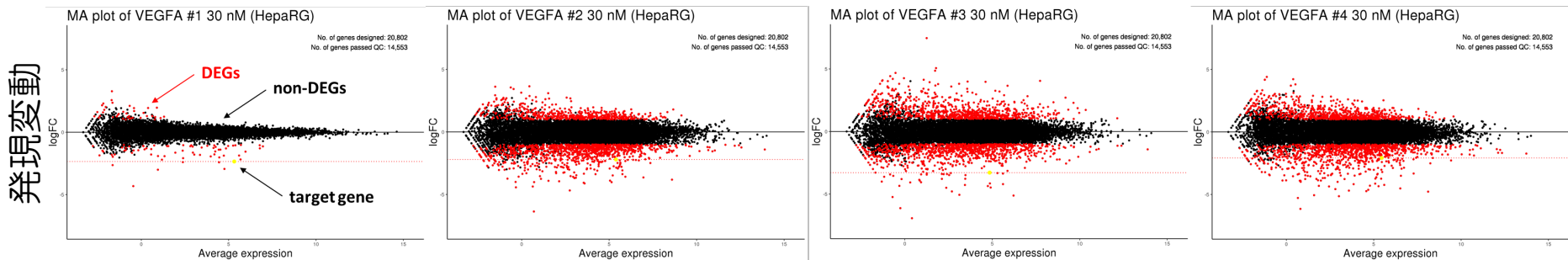


AmpliSeqを用いたオフターゲット作用評価の内容を第5回日本核酸医薬学会（2019年）でポスター発表した、ルクサナバイオテク社との共同研究結果を例として紹介します。

【試験内容】 VEGFA mRNAを標的としたギャップマー型ASO 4配列 (VEGFA # 1-4)を、ヒト肝腫瘍由来細胞株HepaRGにトランスフェクション後 48時間後におけるHepaRG細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。

# NGSによる多面的アプローチ – 遺伝子発現変動 –

## 対照群に対する網羅的遺伝子発現変動解析結果

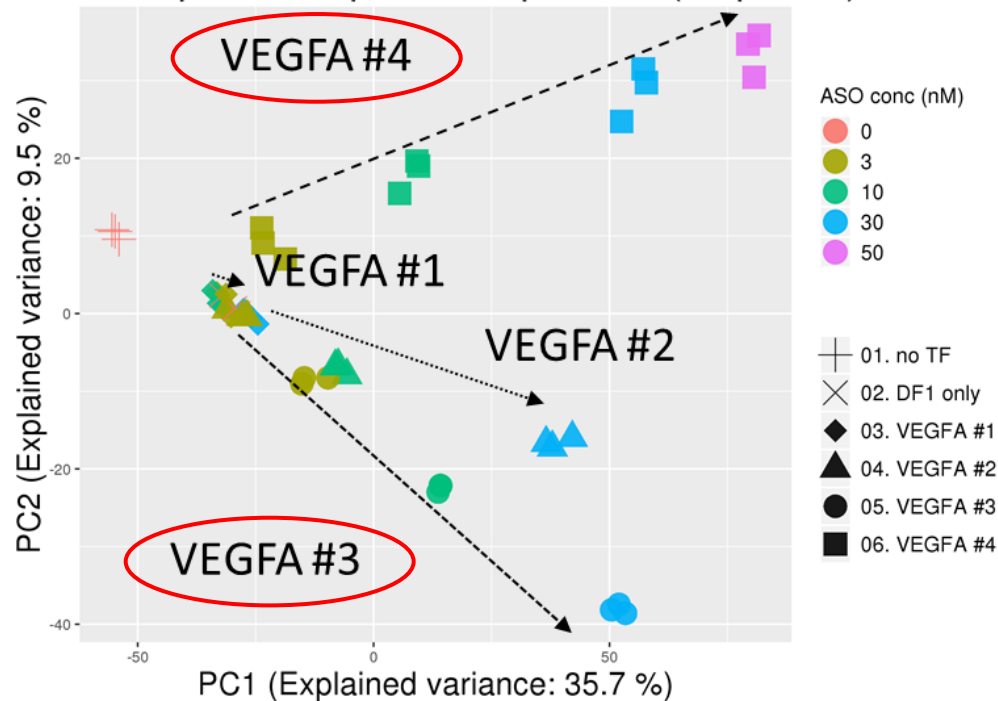


網羅的な遺伝子発現変動解析によって、(1) 標的遺伝子のノックダウン活性と  
(2) オフターゲット作用による遺伝子発現変動を同時に評価することができる。

- ✓ VEGFA #1では発現変動遺伝子は少ないが、VEGFA #2-4では多く標的遺伝子よりも発現低下している遺伝子が多かった。
- 発現変動遺伝子やオンターゲット作用との比較等から、オフターゲット作用の低いASOを選択できる。

# NGSによる多面的アプローチ – 発現プロファイル –

## 主成分分析によるASOの発現プロファイル PCA plot of expression profiles (HepaRG)



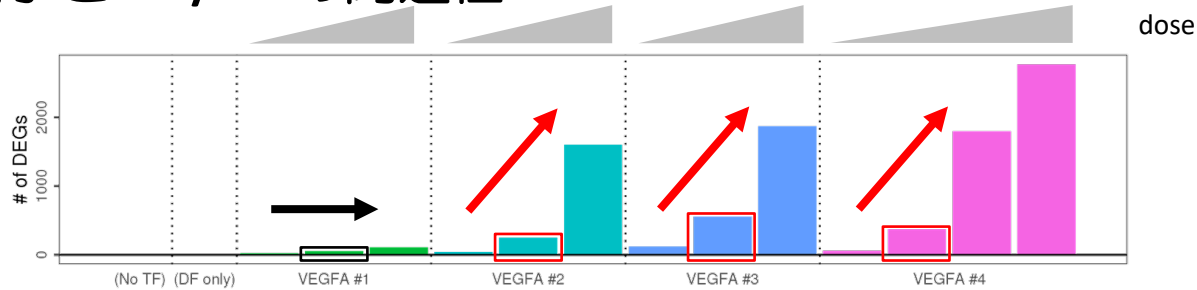
主成分分析によって、網羅的な遺伝子発現データからASOのプロファイリングが可能になる。

- ✓ ASOごとに用量に併せて特有のプロファイルを示し、発現変動遺伝子が多かったVEGFA #3, 4はそれぞれ異なる発現プロファイルを示した。
- 発現プロファイルからASOのクラスタリングや特徴付け (characterization)ができる。

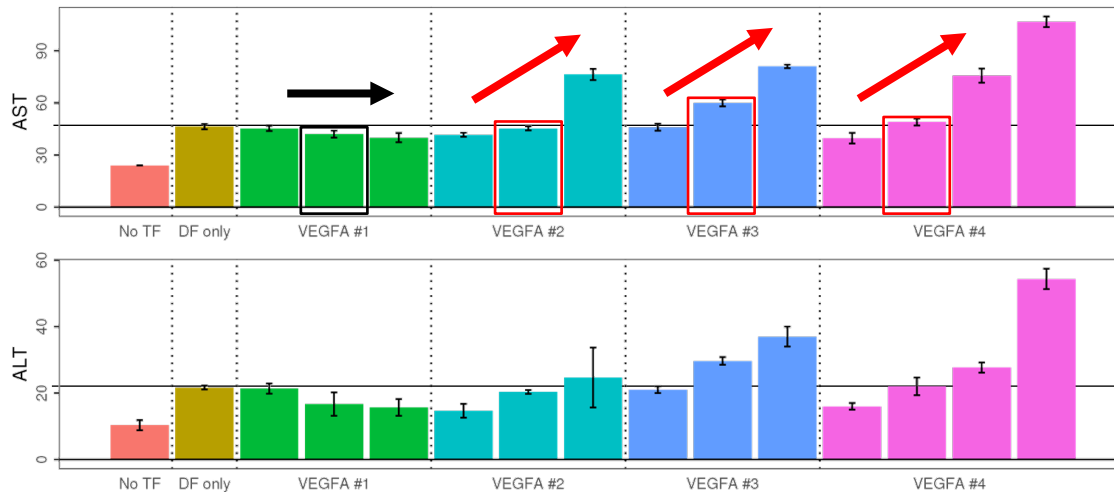
# NGSによる多面的アプローチ – 細胞傷害性との関連 –

## 発現変動遺伝子とAST/ALTの関連性

AmpliSeq  
発現変動遺伝子数



細胞傷害性



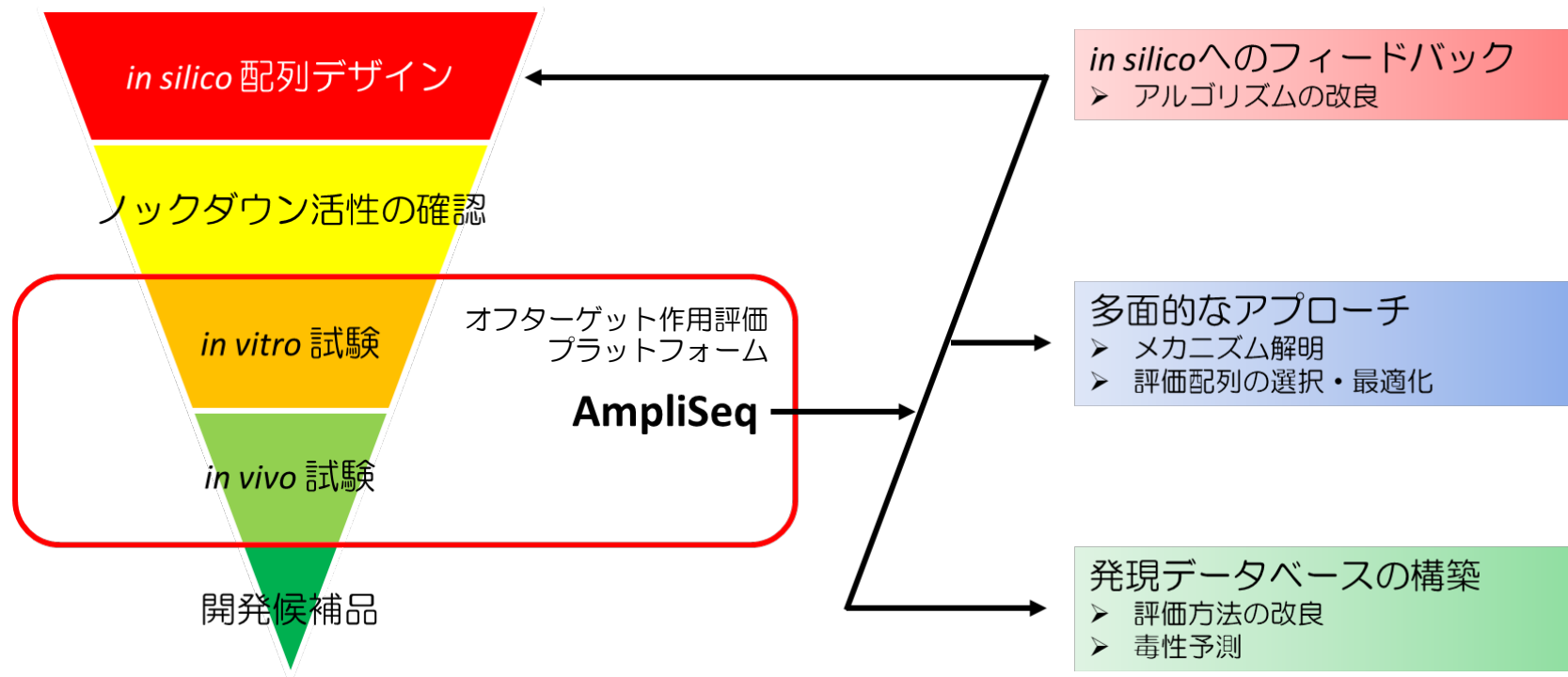
次世代シーケンサーによって捉えた遺伝子変動は、細胞傷害性と関連している。

- ✓ 発現変動遺伝子が少ないVEGFA #1ではASTの上昇は認められないが、発現変動遺伝子の多いVEGFA #2-4ではASTが上昇していた。
- 発現変動遺伝子数と細胞傷害性が関連している。
- ✓ ASTの上昇が見られない濃度域においても、VEGFA #1と#2-4で発現変動遺伝子数に違いが認められた。
- 表現型として検出される前の段階でも、mRNAレベルでの影響を捉えることができる。



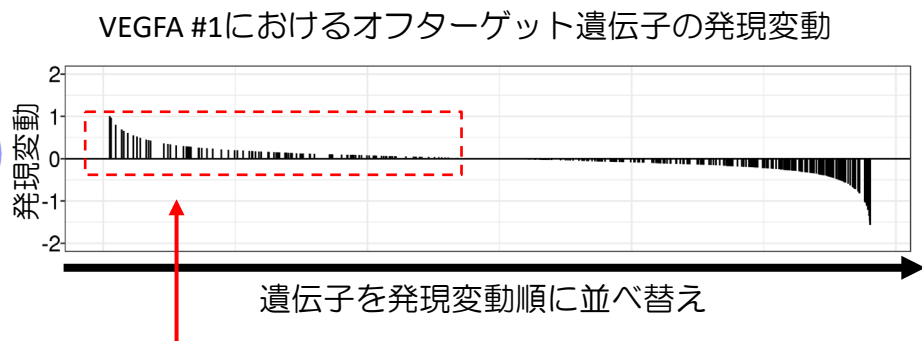
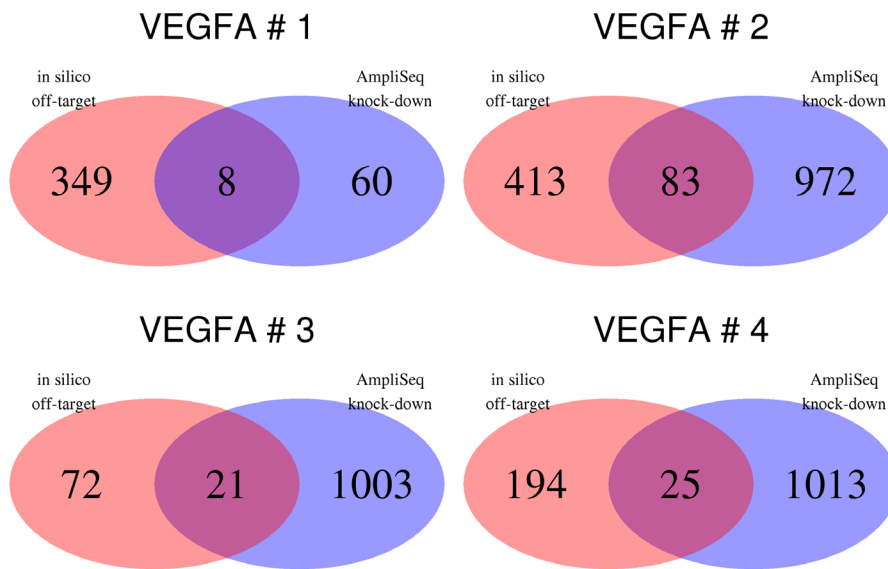
# オフターゲット作用評価プラットフォーム

次世代シーケンサーを用いたアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) のオフターゲット評価



# in silico デザインへのフィードバック

## 配列から予測されるオフターゲット遺伝子とAmpliSeq発現低下遺伝子の比較



オフターゲット遺伝子の中には  
AmpliSeqで発現が上昇している遺伝子も認められる。

配列から予測されるオフターゲット遺伝子 (2ミスマッチ以内)  
AmpliSeqで発現低下しているノックダウン遺伝子

網羅的に遺伝子発現を測定しているため、配列から予測されるオフターゲット遺伝子が実際に発現低下していたのか比較した。

- ✓ 2ミスマッチ以内のオフターゲット遺伝子とAmpliSeqで得られたノックダウン遺伝子はあまりオーバーラップしておらず、むしろ発現上昇している遺伝子も認められた。
- 本試験の条件において、「2ミスマッチ以内」の条件だけでは実際の発現低下の予測精度は低い。

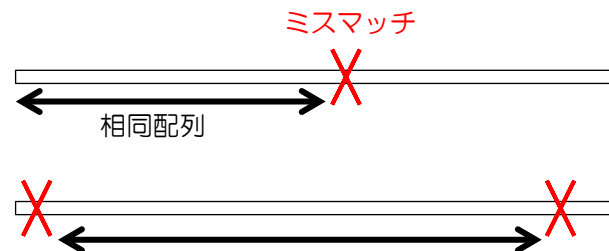
# in silico デザインへのフィードバック

## オフターゲット遺伝子の予測精度向上

2ミスマッチ + 相同配列が12塩基以上のオフターゲット遺伝子



実際にAmpliSeqで発現低下している遺伝子だけが  
多く検出された。

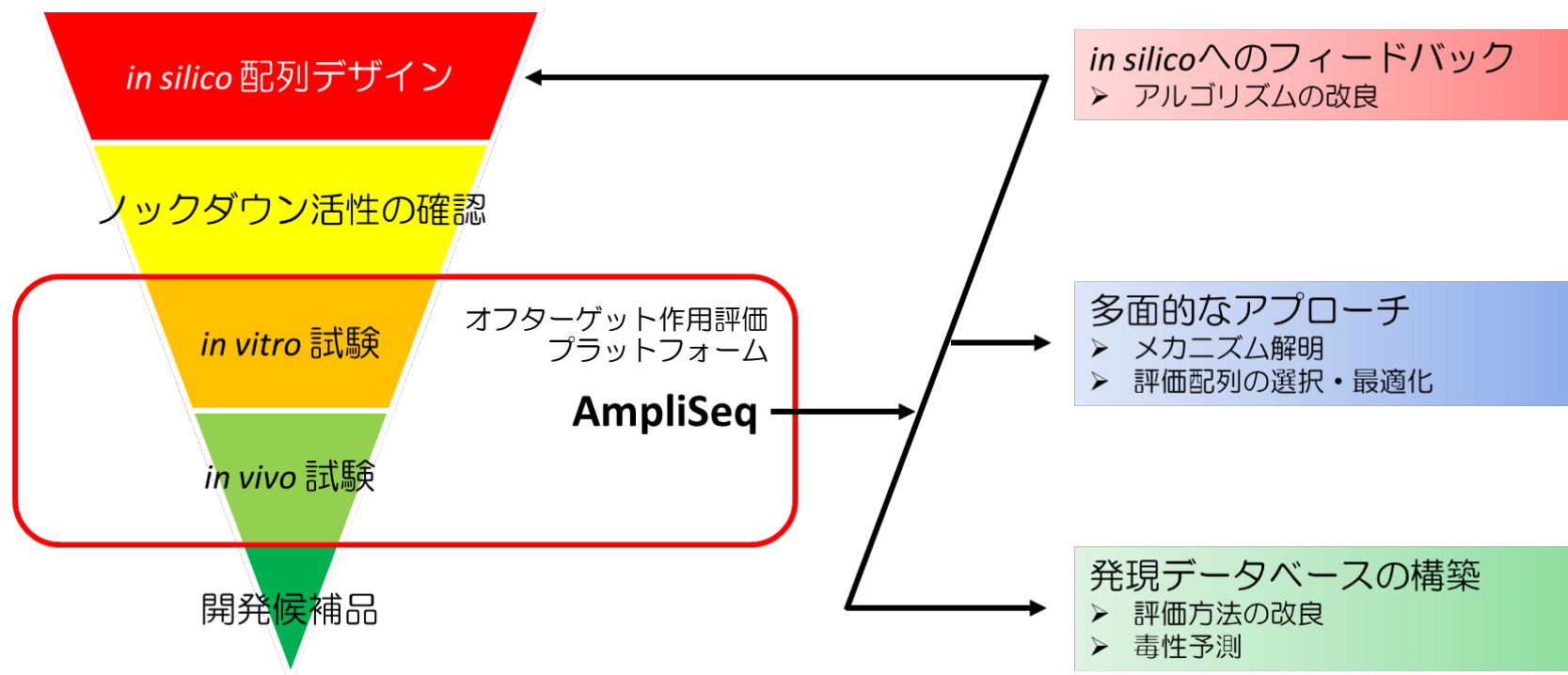


配列からの予測と網羅的遺伝子発現解析の実測値から、オフターゲット遺伝子の予測アルゴリズムの精度を向上させることができる。

- ✓ 「2ミスマッチ以内」に加えて「連続した相同配列が12塩基以上」という条件では、AmpliSeqで実際にノックダウンしている遺伝子だけを絞り込むことができた。
- 開発初期からオフターゲット作用の少ないASOのデザインが期待できる。

# オフターゲット作用評価プラットフォーム

次世代シーケンサーを用いたアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) のオフターゲット評価



次世代シーケンサーで取得した網羅的遺伝子発現データを有効活用することで、**核酸医薬品開発の効率化**だけでなく**核酸医薬品開発プロセス全体の加速化**が期待されます。

# 謝辞（敬称略）

Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社

吉田唯馬  
坂口和弥  
清水文  
福田良  
藤井亮

ルクサナバイオテック株式会社

梅本忠士  
鈴木高尾  
関口和生  
佐藤秀昭

ご清聴ありがとうございました。