

● HepG2 細胞を用いた核酸医薬品の細胞毒性評価

TN521

Cytotoxicity by Nucleic Acid Drugs Using HepG2 Cells

[概要]

核酸医薬品は、低分子医薬品や抗体医薬品では標的にできなかった細胞内分子を標的にすることが可能であり、従来の医薬品では治療が困難であった疾患を根治する可能性を有した革新的な医薬品として近年注目を集めています。核酸医薬品の種類は標的・構造・作用機序によって分類され、その中でも開発が先行している Antisense oligonucleotide (ASO) は既に承認された治療薬もあり、現在も多くの医薬品候補の研究開発が進められています。ASO の特徴として修飾核酸の種類や位置を変えることで性質を変化させることができ短期的な開発が可能ですが、肝臓や腎臓などに移行しやすいことから、肝毒性の発現が懸念されています。そのため、開発初期に当該リスクを評価することは ASO の開発において大きな意義を有します。

当社では核酸医薬品の肝毒性を簡易的に評価する方法として、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 細胞) を用い、カスパーゼ-3 および-7 活性*を指標としてアポトーシスを評価する受託サービスを実施しています。以下に、当社での評価系の概要を示します。

試験に使用する陽性対照など試験実施に関する内容は、お気軽にご相談ください。

*カスパーゼはアポトーシスや炎症のプロセスにおいて中心的な役割をするプロテアーゼファミリーで、その下流に位置するカスパーゼ-3 および-7 はアポトーシス時に活性化されることから、アポトーシスの指標となります。

Keywords : 安全性試験、オリゴヌクレオチド、中分子医薬品、ニューモダリティ

[事例]

評価には、*in vivo* において肝毒性の有無が確認されている各種 ASO (Table 1) を用いました¹⁾。

核酸の細胞毒性を評価するためには、細胞に核酸を人工的にトランスフェクション (導入) する必要があります。播種後一晩培養した HepG2 細胞の培地をトランスフェクション試薬**および各種 ASO (0-100 nM) を含む培地に交換することにより ASO を細胞に導入し、その 24 時間後に Caspase-Glo™ 3/7 Assay System (Promega Corporation)²⁾ を用いてカスパーゼ-3 および-7 の活性 (Caspase Activity) を測定しました。

ASO を含まない培地でトランスフェクション処理した細胞 (Control) の Caspase Activity を 100% とし、各 ASO を導入した細胞の Caspase Activity (% of control) を算出しました (Fig.1)。その結果、*in vivo* で肝毒性を示す ASO では濃度依存的な Caspase Activity の上昇が認められましたが、肝毒性が認められていない ASO では Caspase Activity の上昇は認められませんでした。この結果から、本手法で *in vivo* の肝毒性を簡易的に予測できることが示されました。

**細胞膜は負電荷を持ち、核酸など同じく負に荷電している巨大分子を通過させないためのバリアとしての役割をもっています。本評価系で使用したカチオン性脂質媒介性トランスフェクション試薬は正電荷を持ち、核酸と複合体をつくります。そして、細胞膜と融合することで核酸の細胞膜通過を可能にさせます。

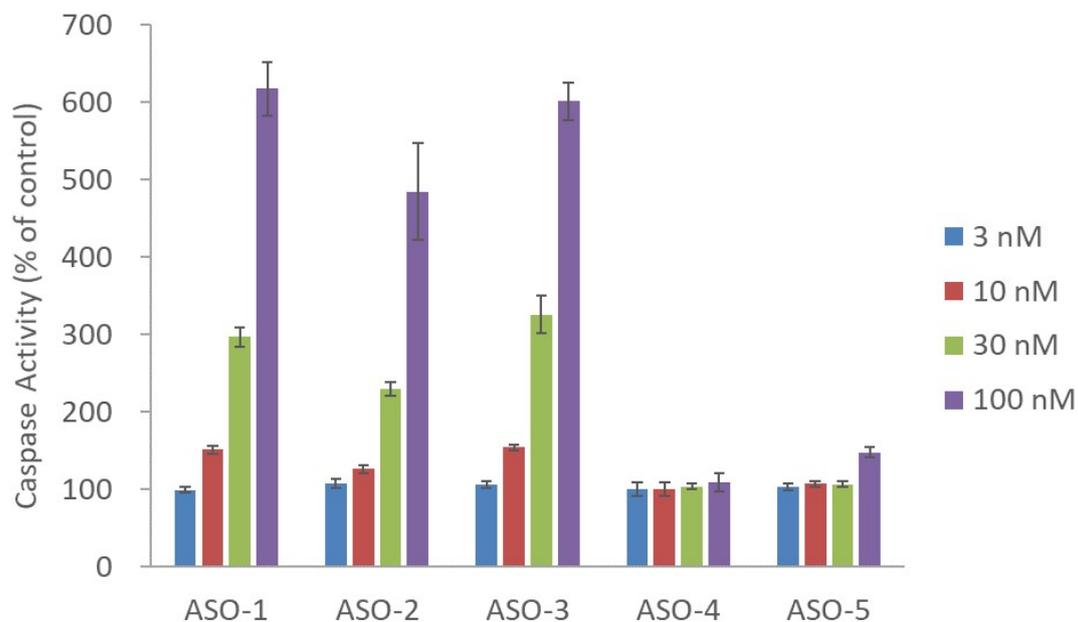


Fig. 1 Caspase3/7 activity of HepG2 cells transfected with ASOs

Table 1 ASO sequences and hepatotoxicity ¹⁾

No.	Sequence	<i>In vivo</i> hepatotoxic potential
ASO-1	EAEattccttgcETG	yes
ASO-2	GATgcctcccaGTT	yes
ASO-3	GEEtcccagttccTTT	yes
ASO-4	EAAaggaacacaEAT	no
ASO-5	EAAatgctgaaacTAT	no

Capital letters: LNA; small letters: DNA; E, 5-methylcytosin; all LNA-ASOs were fully phosphorothioated.

[文献]

1) Dieckmann, A., Hagedorn, P. H., Burki, Y., Brüggemann, C., Berrera, M., Ebeling, M., Singer, T., Schuler, F., *Mol Ther Nucleic Acids*, **10**, 45-54 (2018).

[引用]

2) Promega Corporation プロメガ (<https://www.promega.jp/>)