

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03656

研究課題名（和文）体細胞ゲノム編集創薬の実現による家族性高コレステロール血症の根本的治療

研究課題名（英文）Development of drug delivery system for CRISPR/Cas9 for the treatment of familial hypercholesterolemia

研究代表者

山本 剛史（Yamamoto, Tsuyoshi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：80636994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CRISPR/Casシステムゲノム編集システムのin vivo送達技術を開発し、家族性高コレステロール血症（FH）ホモ接合体に対する治療薬剤の開発を進めた。具体的には肝実質細胞膜上に高発現する受容体を足場として、この受容体に対する親和性リガンドを導入したCRISPR/Casシステムを開発すべく、糖鎖リガンドや化学修飾の導入可能位置に関する構造活性相関研究を行った。この結果、FH関連遺伝子の発現抑制効果を維持したまま、改変型CRISPR/Cas9システムを肝臓へ効率よく送達することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性高コレステロール血症（FH）は顕著なコレステロール血症とともに若年性冠動脈疾患を伴う遺伝性疾患である。特にFHホモ接合体はわが国の指定難病でもあり、出生後ただちに集中的な治療が必要である。薬物療法は効果が十分でなく約60%がLDLアフェレシスと呼ばれる体外循環療法を受けている。さらに治療抵抗性の場合には肝移植に頼らざるを得ない。CRISPR/Casシステムに代表されるゲノム編集治療が実現されればFHの根本的治療法になり得るが、これまで技術的なハードルがあった。本研究はその一つである体内動態の課題解決に資する技術を開発するものであり、FH治療の発展に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed an in vivo delivery technology of the CRISPR/Cas9 genome editing system to pave the way for a therapeutic agent for homozygous familial hypercholesterolemia (FH). Specifically, we have conducted structure-activity relationship studies on possible locations of targeting ligands and chemical modifications on a CRISPR/Cas system that targets a highly expressed receptor on the liver parenchymal cells as a delivery scaffold. As a result, we have succeeded in efficiently delivering the engineered CRISPR/Cas9 system to the liver while maintaining the repressive effect on the expression of a FH-related gene.

研究分野：核酸医薬学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9 核酸 DDS 家族性高コレステロール血症

1. 研究開始当初の背景

シトシンの脱アミノ化反応は、1つの細胞で1日あたり約500回と非常に高頻度で起こり、ウラシルを介してC・GをT・A塩基対へ変化させる可能性がある。こういった日常的なゲノムの揺らぎが結果として一塩基多型 (SNPs) として後生に受け継がれる。ヒト疾患に關与する遺伝子異常は60,000種ほど報告されているが、そのうちの約60%がSNPsにより引き起こされている。近年大きな注目を集めるCRISPR/Casを代表とする「ゲノム編集技術」は、これらのゲノム変異を効率よく除去・修正可能であることから、ツールとしてのみならず新たな創薬モダリティとしても期待が寄せられている。より最近ではCRISPR/Cas技術を応用した「Base Editor」と呼ばれるツールも開発され、*in vitro* においてはピンポイントでC⇌TとA⇌Gの相互変換を精度良く行えるようになり、SNPsの修復に期待が寄せられる¹⁾。しかしながら、モダリティとして広く利用するには、CRISPR/Casシステムの*in vivo* デリバリーが大きな課題と言える^{2,3)}。実際に我々のグループが治療薬開発に取り組んできた家族性高コレステロール血症 (Familial Hypercholesterolemia, FH) の中でも、このBase Editor技術により「原理的」には根治が可能となるポピュレーションが多数存在しており、CRISPR/Casシステムの*in vivo* デリバリーの実現によりFHをはじめ様々な遺伝子疾患の根本的治療が可能となることが期待される。家族性高コレステロール血症 (FH) は顕著なコレステロール血症とともに若年性冠動脈疾患を伴う遺伝性疾患である。原因遺伝子として主に肝臓にてコレステロール代謝を担うLDL受容体、アポリポタンパク質BおよびPCSK9の3つの遺伝子が同定されており、FH患者の約70%がこのいずれかの遺伝子に変異を有する。特に、FHホモ接合体はわが国の指定難病でもあり、出生後ただちに集中的な治療が必要である。薬物療法は効果が十分でなく約60%がLDLアフェレシスと呼ばれる体外循環療法を受けている。さらに治療抵抗性の場合には肝移植に頼らざるを得ない (斯波ら、家族性高コレステロール血症診療ガイドライン2017)。従って、FHホモ接合体に対する有効な新規治療薬剤が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Casシステムゲノム編集システムの*in vivo* 送達技術を開発し、家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体に対する治療薬剤の開発を目指す。研究分担者の斯波らは、国立循環器病研究センターにて実際に診察を行うホモFH症例の中で特に重症かつ頻度が高い症例において、LDL (low-density lipoprotein) 受容体遺伝子上の一塩基多型 (SNP) を見出した。本SNPは、LDL受容体のスプライシング異常を引き起こし、LDL受容体活性を完全に欠損させる。患者由来の検体を利用可能など本チームの唯一性は高く、*in vivo* でのSNP修復を目指した本治療研究は応用性も高い。そこで、本研究ではLDL受容体は主として肝臓で機能していることに着目し、CRISPR/Casシステムを肝実質細胞に送達する技術を開発することを目的とする。一般に、ゲノム編集に用いられるCRISPR/Casシステムは、Casタンパク質とsgRNAからなるRNA/タンパク質複合体 (RNP) として使用される⁴⁾。このRNP複合体をそのままの形で送達する技術は、CRISPR/CasをコードするプラスミドDNAを(非)ウイルスベクターなどに封入して導入する従来の方法⁵⁾に比べ安全性・簡便性などの点で優位性があると期待されるが、技術的なハードルがありこれまで達成された例はない。

3. 研究の方法

代表者の山本は肝臓特異的な糖鎖-受容体相互作用に着目し、RNAなどのオリゴヌクレオチドを肝実質細胞へと効率よく送達するための「人工糖鎖リガンド」の開発に成功してきた⁶⁾。本研究では、肝実質細胞膜上に高発現するアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) に対する高親和性リガンドを導入したCRISPR/Casシステムを開発すべく、糖鎖リガンドをコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを種々構築し、CRISPR/Casシステムへの導入、それらのコンストラクトの活性および体内動態の最適化を進めた。

4. 研究成果

(1) 糖鎖リガンドをコンジュゲート型CRISPR/Casシステムの設計と構築

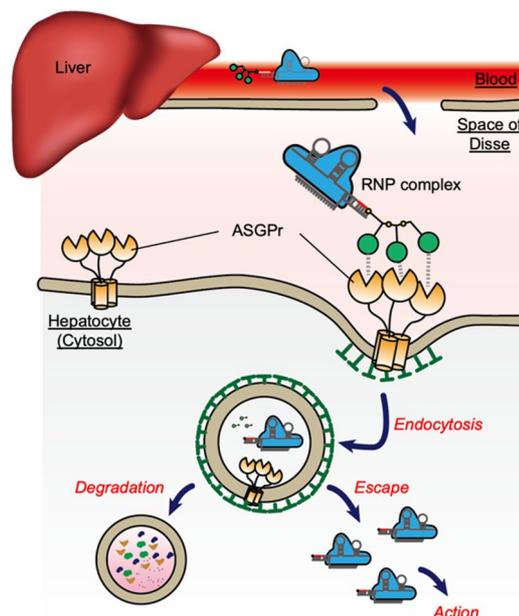


図1 肝臓標的型CRISPR/Cas複合体

図 1 は、肝細胞に豊富に発現するアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) を標的とした CRISPR/Cas システムの肝臓への移行と細胞内動態に関する模式図である。本研究のリガンドコンジュゲート型 CRISPR/Cas システム設計指針として、血中よりディッセ腔を経て流入する RNP (RNA-protein) 複合体が ASGPR と GaINAc との相互作用及び、エンドサイトーシスにより、細胞内に取り込まれ、その後適切なタイミングで、RNP 本体がリガンド及び受容体から離れる分子設計が重要と考えた⁶⁾。Daudna らの先行研究では、糖鎖リガンドを Cas9 に導入⁷⁾しており、この場合、ASGPR とリガンドとの相互作用が Lysosome 付近まで維持されるため、細胞質内へのシステムの移行が難しかった。そこで本研究では、RNA 側にリガンドを導入することでこの問題を解決することとした。CRISPR/Cas9 の結晶構造⁸⁾等を参照し、Cas9 との相互作用に関与しない RNA の領域および外界に曝露された領域を特定し、糖鎖リガンドの導入および化学修飾の導入による生体内安定性の向上を試みた。とりわけ、tetraloop 領域や stemloop2 領域は Cas9 認識を免れ、開かれた構造をしていることから重点的に改変を導入した。CRISPR に用いられる RNA は様々なパターンが知られているが、本研究では化学合成の容易さの観点から sgRNA のような長鎖 RNA ではなく、tracrRNA と crRNA よりなる 2 本のより短鎖の RNA を用いることとした (図 2ab)。これらの構造改変を導入してもヌクレアーゼ機能を維持しているコンストラクトを探索した。ここで標的遺伝子として、FH の原因遺伝子として知られる Apolipoprotein B (APOB) 遺伝子をモデル遺伝子として機能評価を行った (図 2c)。具体的には、ヒト肝がん由来 Huh-7 や HepG2 細胞のゲノムを抽出し、標的遺伝子領域を増幅し、ヌクレアーゼ活性の評価を行ったところ、例えば図 2a のように、tetraloop 領域に付着末端領域を導入した crRNA に対して結合可能な、tag を導入したコンストラクトは、高い APOB 遺伝子切断活性を保持していることが判明した (図 2d)。一方で、化学修飾の導入位置によっては、Cas9 の DNA 切断活性に大きな影響を与えることが明らかとなり、構造活性相関に関する知見が明らかとなった。

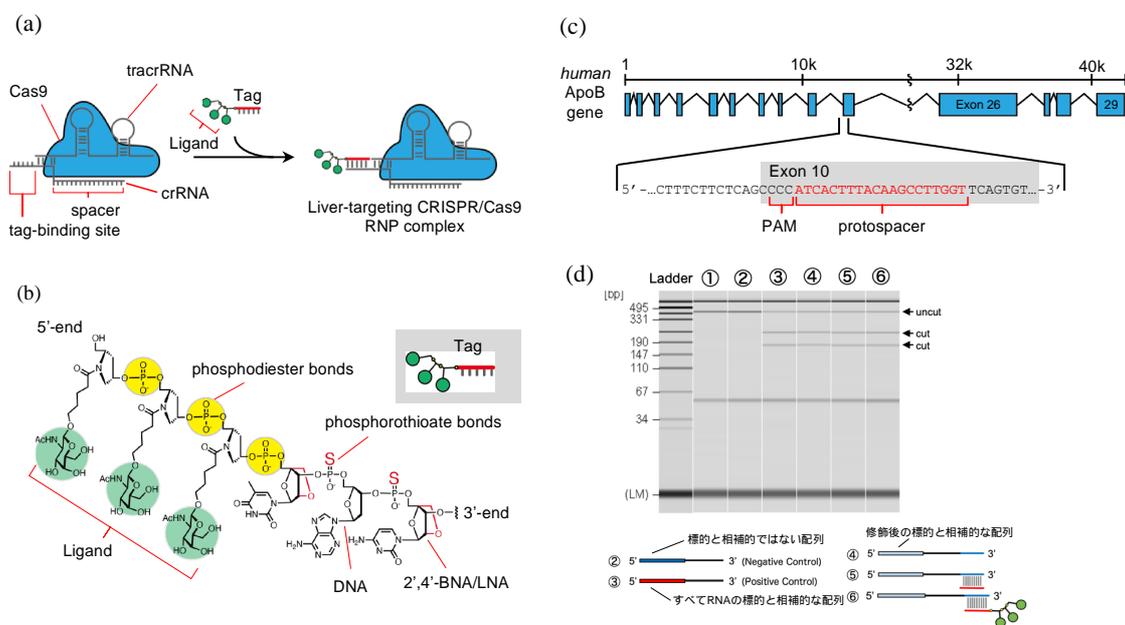


図 2 糖鎖リガンドコンジュゲート型 CRISPR/Cas システムの設計と機能評価

(2) CRISPR/Cas9 システムの細胞内ゲノム編集効率評価

そこで、図 2 に示した糖鎖リガンドコンジュゲート型システムが、細胞内で機能するかどうかを検討するべく *in vitro* 実験を実施した。具体的には、Huh-7 細胞に対して当該システムをトランスフェクションにより導入し、24 時間~数日後に細胞から RNA およびゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いた ApoB mRNA の発現量の解析と標的領域のゲノム配列の解読をおこなった。結果の一例を図 3 に示した。ApoB mRNA の有意な発現量低下と標的領域の DNA 配列の揺らぎが認められた (図 3 赤枠の中盤以降)。このことから、広範な化学修飾を有する本コンストラクトは細胞内環境においてもゲノム編集活性を保持していることを見出した。他方、APOB の Exon10 を標的とした CRISPR/Cas9 システムの例から明らかとなった点として、ゲノム配列は変化させても、対応する ApoB mRNA の当該領域の塩基配列に変化はなかったことからスプライシング不良などの原因により転写産物自体が除去されていることも判明した。本研究により、我々の糖鎖リガンドコンジュゲート型 CRISPR/Cas システムがトランスフェクション試薬などのアシストがあれば細胞内でも活性を示すことが明らかとなった。

(3) CRISPR/Cas9 システムの *in vivo* 動態評価

我々の糖鎖リガンドコンジュゲート型 CRISPR/Cas システムが狙いとする体内動態、すなわち

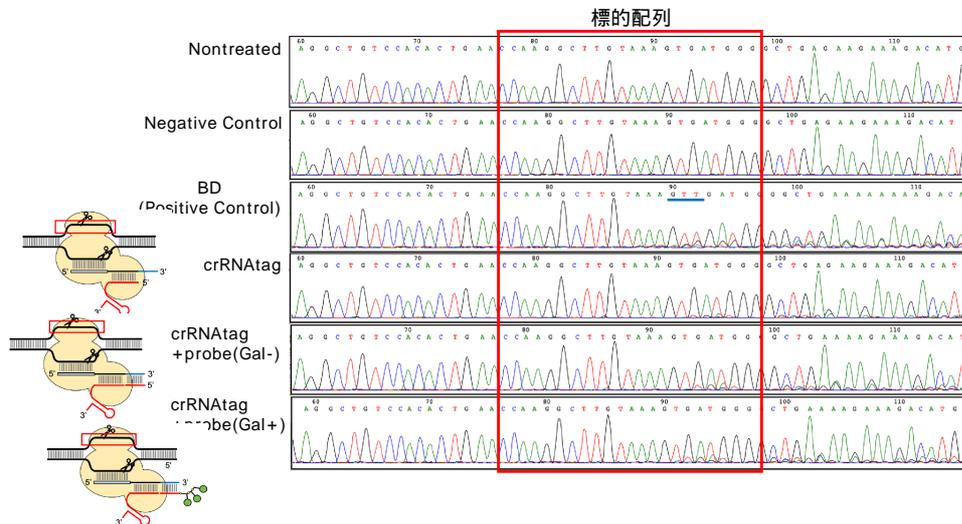


図 3 in vitro でのゲノム編集効果の確認

肝臓指向性を有しているかどうかを評価するために Alexa647 などの生体深部を観察可能な蛍光色素を crRNA に導入し、体内動態を評価することとした。BALB/c nu-nu の雄マウスに対して、当該コンストラクトを尾静脈より投与し、蛍光強度の経時変化を IVIS イメージング装置を用いて解析した。結果の一例を図 4 に示す。糖鎖付き tag を用いて CRISPR/Cas9 システムを投与した場合には投与直後から 15-20 分後をピークに、肝臓（矢印）にて蛍光強度が高く、一方糖鎖を持たないコンストラクトは、肝臓への有意な移行を確認できなかった。これらのことから、我々は、糖鎖リガンドコンジュゲート法により型 CRISPR/Cas9 システムを肝臓へ効率よく送達することに成功した。現在我々は、ApoB 遺伝子でのこれらのクリアなデータに基づき、FH の原因となる LDL 受容体の SNP を修復しうる CRISPR/Cas9 base editor システムを構築し、FH 治療への応用を進めている。

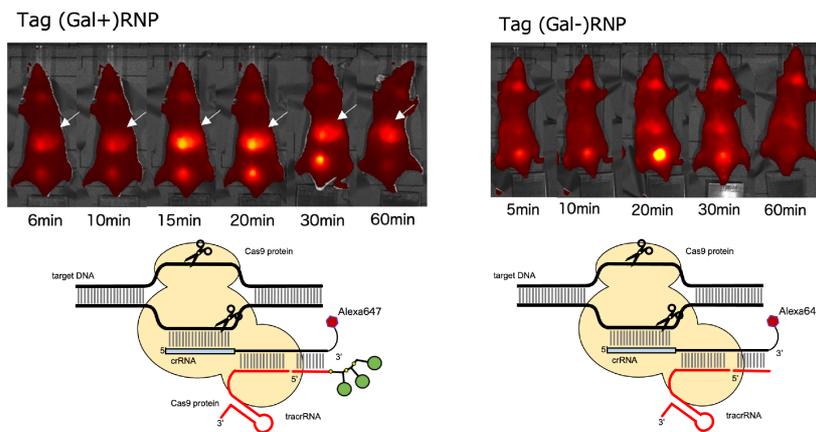


図 4 蛍光ラベル CRISPR/Cas9 システムの体内動態解析

- 1) Gaudelli, N. M. *et al. Nature* **551**, 464–471 (2017).
- 2) Kang, H. *et al. Nat. Commun.* **12**, 1–9 (2021).
- 3) Xu, C. F. *et al. Adv. Drug Deliv. Rev.* **168**, 3–29 (2021).
- 4) Jinek, M. *et al. Science* **337**, 816–821 (2012).
- 5) Musunuru, K. *et al. Nature* **593**, 429–434 (2021).
- 6) Yamamoto, T. *et al. Bioorganic Med. Chem.* **24**, 26–32 (2016).
- 7) Feng, X. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **140**, 6596–6603 (2018).
- 8) Nishimasu, H. *et al. Cell* **156**, 935–949 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamamoto Tsuyoshi, Sawamura Motoki, Terada Chisato, Kashiwada Koki, Wada Fumito, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of modular conjugation strategy for N-acetylgalactosamine-targeted antisense oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 109-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2019.1677911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Tsuyoshi, Terada Chisato, Kashiwada Koki, Yamayoshi Asako, Harada Shiba Mariko, Obika Satoshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Synthesis of Monovalent N Acetylgalactosamine Phosphoramidite for Liver Targeting Oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry	6. 最初と最後の頁 e99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpnc.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fumoto Shintaro, Yamamoto Tsuyoshi, Okami Kazuya, Maemura Yuina, Terada Chisato, Yamayoshi Asako, Nishida Koyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Understanding In Vivo Fate of Nucleic Acid and Gene Medicines for the Rational Design of Drugs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 159 ~ 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13020159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Tsuyoshi, Mukai Yahiro, Wada Fumito, Terada Chisato, Kayaba Yukina, Oh Kaho, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 13
2. 論文標題 Highly Potent GalNAc-Conjugated Tiny LNA Anti-miRNA-122 Antisense Oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 817 ~ 817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13060817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oyama Shota, Yamamoto Tsuyoshi, Yamayoshi Asako	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent Advances in the Delivery Carriers and Chemical Conjugation Strategies for Nucleic Acid Drugs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3881 ~ 3881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13153881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Terada Chisato, Wada Fumito, Uchida Mei, Yasutomi Yukari, Oh Kaho, Kawamoto Seiya, Kayaba Yukina, Yamayoshi Asako, Harada-Shiba Mariko, Obika Satoshi, Yamamoto Tsuyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Programmed Instability of Ligand Conjugation Manifold for Efficient Hepatocyte Delivery of Therapeutic Oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 404 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2021.0036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao Juki, Yamamoto Tsuyoshi, Yamayoshi Asako	4. 巻 42
2. 論文標題 Therapeutic application of sequence-specific binding molecules for novel genome editing tools	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100427 ~ 100427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Fumito, Yamamoto Tsuyoshi, Kobayashi Tadayuki, Tachibana Keisuke, Ito Kosuke Ramon, Hamasaki Mayumi, Kayaba Yukina, Terada Chisato, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 26
2. 論文標題 Drug discovery and development scheme for liver-targeting bridged nucleic acid antisense oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 957 ~ 969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Terada Chisato; Wada Fumito; Yamayoshi Asako; Harada-shiba Mariko; Obika Satoshi; Yamamoto Tsuyoshi
2. 発表標題 3-Amino-1,2-Propanediol-Linked Monomeric GalNAc Phosphoramidite For Efficient Delivery Of Antisense Oligonucleotides To Hepatocytes
3. 学会等名 16th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田知邑・和田郁人・山吉麻子・斯波真理子・小比賀聡・山本剛史
2. 発表標題 肝臓指向型アンチセンス核酸の動態改善に向けた 新規GalNAcリガンドの構築と活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田知邑・和田郁人・山吉麻子・和田健彦・斯波真理子・山本剛史
2. 発表標題 肝臓標的型アンチセンス核酸のためのリガンド/リンカー構造の最適化研究
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安富由加梨・寺田知邑・山吉麻子・山本剛史
2. 発表標題 (2S,4S)-ピロリジンPNAの合成と結合能評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田知邑、山吉麻子、山本剛史
2. 発表標題 肝臓標的化核酸医薬のための新規Nアセチルガラクトサミンリガンドの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王芳帆、寺田知邑、山吉麻子、山本剛史
2. 発表標題 安全性の高いin vivoゲノム編集システムの開発
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 剛史, 寺田 知邑, 和田 郁人, 山吉 麻子, 斯波 真理子, 小比賀 聡
2. 発表標題 組織標的化アンチセンス核酸のための新規コンジュゲーションリンカーの開発
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Terada Chisato; Mukai Yahiro; Wada Fumito; Kayaba Yukina; Oh Kaho; Yamayoshi Asako; Harada-Shiba Mariko; Obika Satoshi; Yamamoto Tsuyoshi
2. 発表標題 Effective sequestering of miRNA-122 by GalNAc-conjugated tiny LNAs.
3. 学会等名 IS3NA-IRT Virtual Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田知邑, 和田郁人, 山吉麻子, 斯波真理子, 小比賀聡, 山本剛史
2. 発表標題 リガンド結合型アンチセンス核酸のためのリンカーデザインとその生物活性評価
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本剛史
2. 発表標題 臨床応用に向けた核酸医薬の開発研究
3. 学会等名 核酸化学若手フォーラム2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本核酸化学会、杉本 直己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	斯波 真理子 (Harada-Shiba Mariko) (70271575)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 郁人 (Wada Fumito) (90760843)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任 研究員 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関