

## 第50回ブレイクスルー研究会議事録

### 「ゲノム編集技術、見えてきた医療応用の未来」

1. 日時：2018年1月15日（月）18時から19時50分
2. 場所：日本経済大学大学院
3. 参加者：12名
4. 講師：花園豊氏（自治医科大学先端医療技術開発センター長、  
分子病態治療研究センター再生医学研究部教授）
5. 内容：（要約）
  - ①自己紹介（名古屋出身、東大医学部（血液学）、1995年NIH（遺伝子治療研究）  
1998年～自治医大、現在自治医科大学再生医学研究部教授）。
  - ②ゲノム編集技術とは
    - ・ゲノム編集技術で、ゲノムを切って（昔から自然放射線が行っていたが、人工的にゲノムの任意の場所を切れることが凄い）、繋ぐ（もともと細胞に備わった仕組みで、それを利用）、いわばゲノムの外科手術。
    - ・ゲノム編集技術は、部位特異的なヌクレアーゼ（編集技術）を利用して、思い通りに標的遺伝子を改変する技術である。ヌクレアーゼとしては、2005年以降に開発・発見された、ZFN（ズィーエフエヌ、または、ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、TALEN（タレン）、CRISPR/Cas9（クリスパー・キャスナイン）（標的認識技術）。
    - ・応用範囲は広い（研究用モデル細胞・生物の作成、疾患の治療・診断、農水産育種、有用物質（細胞や菌等）の生産等）
    - ・特許紛争（3つの人工酵素の中で特に使いやすいとされているのはCRISPR/Cas9で、2015年時点で研究の主流である。使いやすさの代償として、CRISPR/Cas9では標的的部位ではない場所を改変するオフターゲットと呼ばれる欠点が多い。これが生じると、がんといった疾患を発症する恐れがあるため、この欠点を克服するための研究も進展中である。スウェーデン・ウメオ大学のエマニュエル・シャルパンティエ氏とアメリカ合衆国・カリフォルニア大学のジェニファー・ダウドナ氏対MIT大のフェン・ザン氏が紛争中）
    - ・特許推移と比率では、日本は遅れている。（2/3は米国、日本は2.1%）
    - ・企業関連図（参入企業は多いが、日本企業はタカラバイオ参入）
  - \*補足：経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）によると、2030年の世界のバイオ関連市場は国内総生産（GDP）の2.7%に相当する約200兆円と予測されており、潜在的な市場は非常に大きなものと推測される。バイオ医薬品産業の急速な発展やライフサイエンス研究分野におけるR&Dの活性化、政府によるゲノム関連研究への資金援助の増加、合成生物学への活用の増加、遺伝子組換え作物の生産量増加等に牽引され、大幅に成長すると期待される。

- ゲノム編集技術

DNA に二本鎖の損傷 (Double-Strand Break: DSB) を作る、つまり DNA を構成する 2 重螺旋の両方の鎖を切断することである。切断したい標的塩基配列に相補的な配列を含む guide RNA (crRNA : tracrRNA) と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質により、ゲノム上の任意の配列を切断。

その切断の後、DNA 修復の機構として非相同末端結合 (NHEJ) か、相同組換え修復 (Homology-Directed Repair: HDR) が起こる。

末端結合は遺伝子ノックアウトと遺伝子ノックインがあり、総同組み換えは遺伝子ノックインである。

こうして DNA 切断酵素 Cas9 は、DNA の部位特異的改変を可能としている。

- \* 遺伝子ノックアウト (英: gene knockout) は、ある生物の遺伝子に機能欠損を導入するという遺伝子工学の技法。

- \* 遺伝子ノックイン (gene knock-in) とは、生物の染色体の特定の遺伝子座にタンパク質をコードする相補的 DNA 配列を挿入する遺伝子工学的手法。

現在、細胞の送達技術効率が低い。また相同組み換えの効率が低い。

- いくつかの事例・報告 (2014年 AIDS ゲノム編集治療、2015年中国からヒト受精卵ゲノム編集、2016年米国遺伝子治療学会のトピックス、2016年肺がんへのゲノム編集治療に中国臨床試験、突き進む中国等)

### ③ゲノム編集技術をめぐって

- In Vivo ゲノム編集治療の課題 (ゲノム編集ツールの細胞内送達が難しい、遺伝子ノックインが起こりにくい)
- デリバリーとノックインの問題を解決してゲノム修復治療を成功させるには? (修復細胞がわずかでも増殖・生存優位性がある): 2014年、マウスでのノックイン治療成功、
  - \* 修復細胞 (疾患の責任遺伝子が修復された細胞)
- デリバリーや相同組み換え効率が悪くとも治療可能な疾患もある。
- 2017年 初のノックイン治療 (米国サンガモ・セラピューティックス社。「ジンクフィンガー・ヌクレアーゼ」使用、治療対象「ムコ多糖症 II 型」)
- 2018年以降 ノックイン治療も開始予定 (米国、スイス等)
- 血友病治療例 (1回の注射—自治医大)
- アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるゲノムを傷つけないベクターで、miniCAS9の開発でCAS9を搭載可能。
  - \* AAVベクター: アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターは、非病原性ウイルスに由来し、非分裂細胞に効率よく遺伝子導入でき、遺伝子発現が長期間持続することから遺伝子治療用ベクターとして期待されている。

\*ウイルスベクター：遺伝子を細胞内に運ぶウイルスをベクター（ウイルスベクター）と呼んでいる。

- 相同組み換えベクターによる治療効果は限定的
- 相同組み換えでも末端結合でも効くベクター  
「二刀流」ベクター／AAV「二刀流」ベクターで血友病は治療できる
- AAV遺伝子治療の利点と欠点  
利点（非分裂細胞である肝細胞にも遺伝子導入可能）、  
欠点（ゲノムに挿入不可、分裂細胞で効果希薄）
- 血友病マウスのゲノム編集治療実験  
AAV-miniCas9で肝細胞ゲノム編集可能、効果は持続。
- ピッグにおいてもAAB8は肝臓に集積で血友病ピッグの治療。
- 造血幹細胞の遺伝子治療による発がん  
\*造血幹細胞（ぞうけつかんさいぼう; hematopoietic stem cell - HSC）とは  
血球系細胞に分化可能な幹細胞である。ヒト成体では主に骨髄に存在し、白血球（好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球、マクロファージ）、赤血球、血小板、肥満細胞、樹状細胞を生み出す。骨髄幹細胞ともいう。幹細胞の定義として、一つの細胞が分裂の結果2種類以上の細胞系統に分化（differentiation）可能であると同時に幹細胞自体にも分裂可能であり（self-renewal: 自己複製）結果として幹細胞が絶える事なく生体内の状況に応じて分化、自己複製を調整し必要な細胞を供給している事になる。
- ランダムな遺伝子導入治療から変異箇所特異的なゲノム修復治療  
発がんを抑えるために安全性の高いベクターが工夫されている。  
一方ゲノム編集技術応用で部位特異的に修復できるので、発がんが少なく期待（実験中）
- SCIDマウスゲノム編集治療の実施中  
\*SCID: SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency)  
SCIDマウスはDr. Melvin Bosmaらによって1980年にC.B-17系統マウスで発見された自然発症の突然変異体で、定染色体劣性の遺伝様式をとる。このマウスはT・B細胞がないことから、重度の免疫不全を呈し、したがってその異種細胞、組織の移植に対する拒絶が少なく、ヒトの正常造血細胞ですら移植可能であることが報告されている。この疾患原因遺伝子の一つがインターロイキン2受容体γ鎖遺伝子であることが明らかにされている。
- SCIDピッグゲノム編集治療実施中→自治医大

(注意) \*は、旭岡が追加しています。

(最近の新聞情報 日経産業2017-11-28 24面)

\* 「一塩基編集技術」

クリスパー・キャス9は、精度が高く簡単に適用できる特徴。

然しオフターゲットにより、予想外の遺伝子変異や欠損のリスクが避けがたい。そこで、「一塩基編集技術」が開発され、一つの塩基ごとに自在に変換できるとされる。新技術はハーバード大とブロード研究所グループが発表した。

この技術は①クリスパーキャス9のDNAを切断する酵素を不活性化し、②アミド基と呼ぶ化学構造を取り除く脱アミド酵素と融合させ、③編集したい配列の位置を決めるガイドRNAと呼ぶ合成したRNAと一緒に細胞内に導入する④反応はガイドRNAとクリスパーキャス9が複合体となり、DNAの2本の鎖をほどこしながら滑り込みガイドRNAとペアになる配列に結合⑤ここで脱アミド酵素が働き、結合した部位から5塩基ほど離れた目的の塩基を変換。⑥化学的に変換された塩基は細胞分裂する際に、DNA複製酵素によって別の塩基と認識され、⑦それを鋳型にDNAが合成されて一塩基編集が完成される。

次の焦点は遺伝子治療の開発に移行。

以上（文責：旭岡叡峻）