

ゲノム編集技術を用いた画期的な遺伝子治療開発と課題

2019年9月14日

山口照英
金沢工業大学
日本薬科大学



本日の話題

- 遺伝子治療について
- 遺伝子治療の光と影
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待
- ゲノム編集の安全性

遺伝子治療

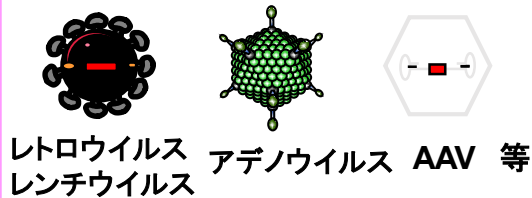
遺伝子を外から補充・付加する治療法

体内 (In vivo) 遺伝子治療 (遺伝子を組み込んだベクターの投与)

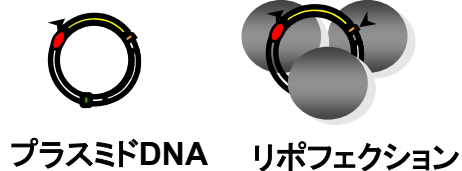
体外 (ex vivo) 遺伝子治療 (遺伝子導入細胞の投与)

ベクターの例

◆ ウイルスベクター



◆ プラスミドベクター



◆ 腫瘍溶解性ウイルス

直接投与



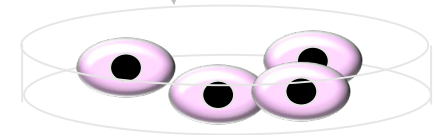
腫瘍内、
筋肉内、
眼内、肝臓
内、脳内、
皮内 等

標的細胞を取り出す
(自己、同種)

造血幹細胞
T細胞 等

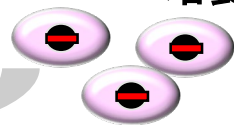
培養、増幅

ベクターによる遺
伝子導入



培養、増幅

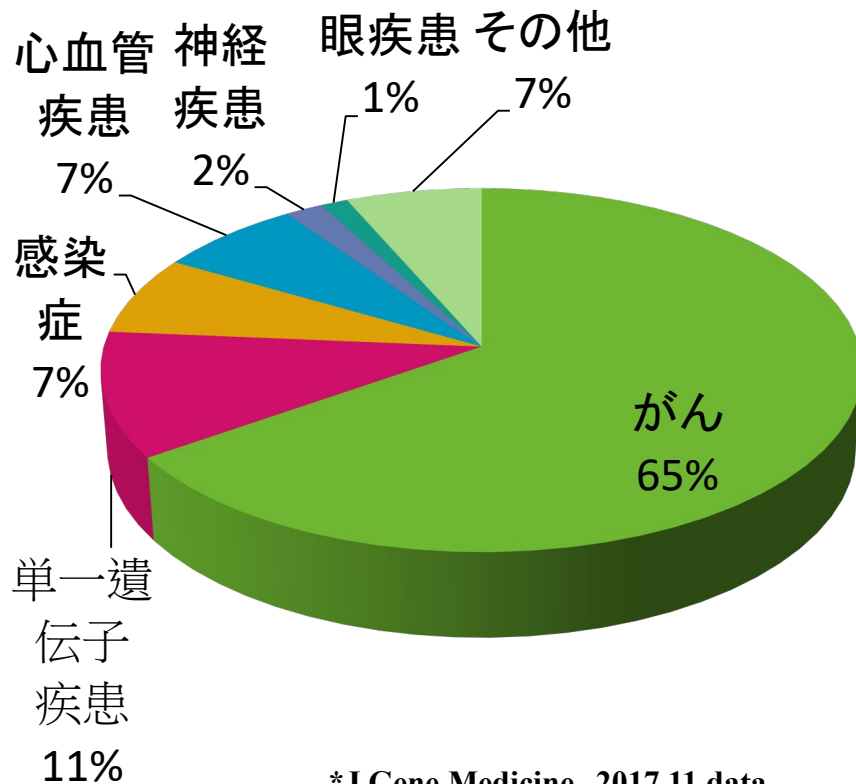
投与



遺伝子導入細胞

- 遺伝子の変異が原因の病気では、正常な遺伝子を補充することで治療効果
- がんなどの難病に対しても開発が進んでいる
- 欧米では既に計8品目が上市、日本は2品目承認

遺伝子治療の対象疾患



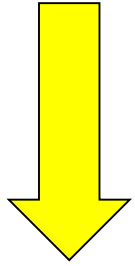
*J Gene Medicine 2017.11 data

- **がん**(メラノーマ、B細胞性白血病)、前立腺癌、肺癌、脳腫瘍、頭頸部癌など
- **単一遺伝子疾患**: 先天性免疫不全症(**ADA欠損症**)、**レーバー病**、**LPL欠損症**、血友病、 β サラセミア、副腎白質ジストロフィーなど
- ウイルス感染症: HIV/AIDS、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなど
- 心血管疾患: 閉塞性動脈硬化症、狭心症、心筋梗塞等
- 神経疾患: パーキンソン病、アルツハイマー病、ALSなど
- 眼疾患: 網膜色素変性、加齢黄斑変性など

遺伝子疾患だけでなく様々な疾患を対象として開発研究が行われている
初期には重篤な疾患を対象としたためにがん疾患の比率が高い

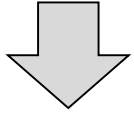
遺伝子治療の歴史

創世期



- 1970年代: 組換えDNA技術の発展
- 1990年: **世界で初めての遺伝子治療実施(米): ADA欠損症**
- 1995年: **日本で初めての遺伝子治療実施: ADA欠損症**
- 1999年: **アデノウイルスベクターの大量投与による死亡事故(米)**
- 2000年: **X-SCID遺伝子治療で初めての成功例が報告される(仏)**
- 2002年: **X-SCID遺伝子治療の副作用で白血病発症(仏)**

停滞期



再興期



実用化

- 2008年頃から単一遺伝子疾患を中心に成功例の報告が相次ぐ
- 2012年: ASGCTがTarget 10(**5-7年以内に実用化が期待される遺伝子治療対象疾患**)を発表
- 2012年: 先進国で初めての遺伝子治療製品(AAV)が欧州で承認
- 2015年: 欧米で初めての腫瘍溶解性ウイルス製品(HSV)が欧米で承認
- 2016年: 欧州で遺伝子導入細胞製品2品目承認(ADA欠損症、GVHD予防)
- 2017年: 米国でCAR-T細胞製品2品目、遺伝子治療製品(レーバー病)1品目承認
- 2019年: 日本でCAR-T細胞製品とHGFプラスミド製品の承認

欧米で承認された遺伝子治療用製品

製品名（社名）	製品の種類	導入遺伝子	適応症	承認国
Glybera (UniQure)	AAV1	リポ蛋白質リパーゼ (S447Xバリエーション)	LPL欠損症	欧州 2012 (2017承認整理)
Imlygic (Amgen)	腫瘍溶解性HSV1	GM-CSF	メラノーマ	米・欧 2015
Strimvelis (GSK)	レトロ-造血幹細胞	ADA	ADA欠損症	欧州 2016
Zalmoxis (MolMed)	レトロ-T細胞	HSV-TK Mut2 /ΔLNGFR	ハプロHSC移植 のGVHD予防	欧州・条件付承認 2016
Kymriah (Novartis)	レンチ-T細胞 (CAR-T細胞)	抗CD19 キメラ抗原受容体	B細胞性急性リン パ芽球性白血病	米国2017 日本 2019
Yescarta (Kite Pharma)	レトロ-T細胞 (CAR-T細胞)	抗CD19 キメラ抗原受容体	B細胞性 リンパ腫	米国2017
Luxturna (Spark Therapeutics)	AAV2	RPE65	レーバー 先天性黒内障	米国2017
AMG0001	HGF-プラスミド	HGF	下肢動脈梗塞 バージャー病	日本 2019
Zolgensma (Novartis)	scAAV9	SMN1	脊髄性筋萎縮症	米国 2019

実用化が期待される遺伝子治療対象疾患Target 10

January 6, 2012

From: the American Society of Gene & Cell Therapy and all the Society's past Presidents

To: NIH Director, Francis S Collins

“Target 10” group of disease and disorders

2012年に発表されたTarget 10中
4品目が2018までに承認

1. レーバー先天性黒内障⇒ Spark 米国で承認 (2017)
2. ADA-SCID⇒ GSK 欧州で承認2016
3. 血友病B⇒ Baxter、Sparks Phase I/II
4. X-SCID (Phase I/II)
5. パーキンソン病 (Phase I)
6. 加齢黄斑変性⇒ Sanofi-Genzyme (Phase I)
7. 副腎白質ジストロフィー⇒ Bluebird Bio (Phase II/III)
8. サラセミア(溶血性貧血) ⇒ Bluebird Bio (Phase II/III)
9. リンパ腫⇒Novartis, Kite Pharma米国で承認 (2017)
10. メラノーマ⇒ Amgen 欧米で承認 2015

5～7年以内に実用化が
期待される主な病気

・パーキンソン病	脳
・副腎白質 ジストロフィー	脳、 副腎
・加齢黄斑変性	目
・メラノーマ	皮膚
・血友病	血液
・ADA欠損症	
・サラセミア	

米遺伝子細胞治療学会
による

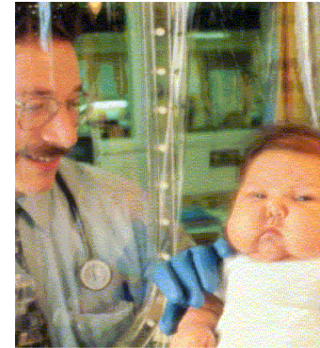
本日の話題

- 遺伝子治療について
- 遺伝子治療の光と影
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待
- ゲノム編集の安全性

遺伝子治療の成功例と副作用

成功例

- アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA-SCID)
- X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)
- 慢性肉芽腫症 (CGD)
- パーキンソン病
- レーバー先天性黒内障 (LCA)
10名全員が視力 (光感受性) 回復 (2009)
- 副腎白質ジストロフィー (ALD)
2名とも症状の進行停止 (2009)
- β サラセミア (2010)



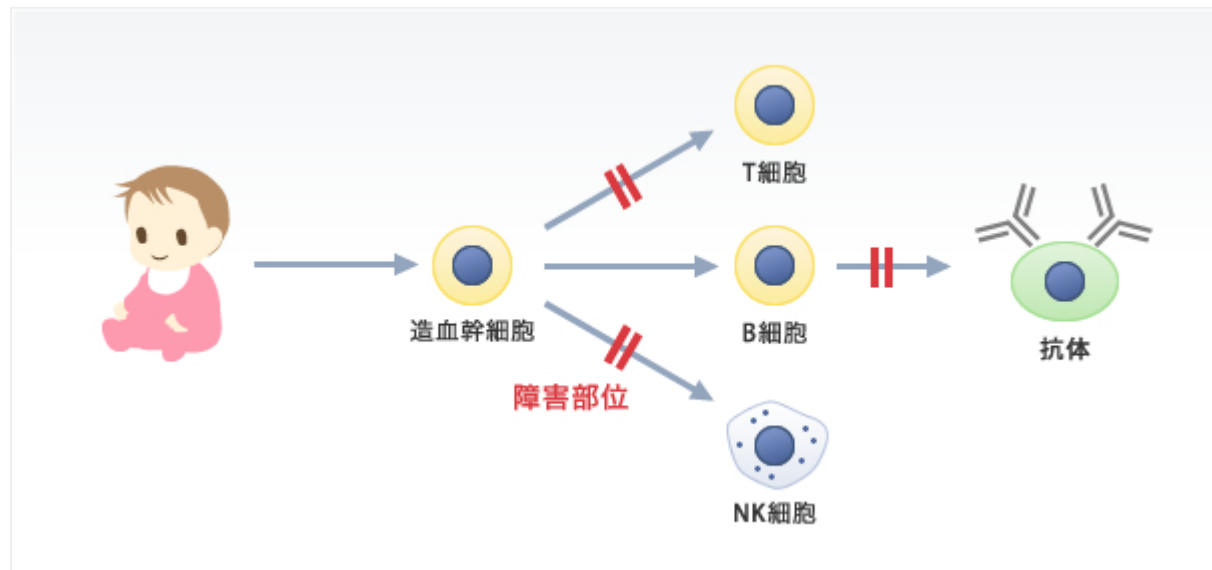
無菌室でしか生きられないX-SCID患児が普通の生活を

重篤な副作用

- アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡 (米・1999年)
- X-SCID遺伝子治療でレトロウイルスベクターによる遺伝子の染色体挿入により、20名中5名にT細胞白血病様症状発症 (仏英・2002年～)
- 単一遺伝子疾患では目覚ましい成果が得られているが、がんなどの非遺伝的疾患に対する効果は限定的 (特定のがんに対して著効を示す事例がでてきた)
- 予想外の重篤な副作用も生じるなど、遺伝子治療はまだ医療として克服すべき点が多いが、安全性・有効性を高めるための研究が進められている

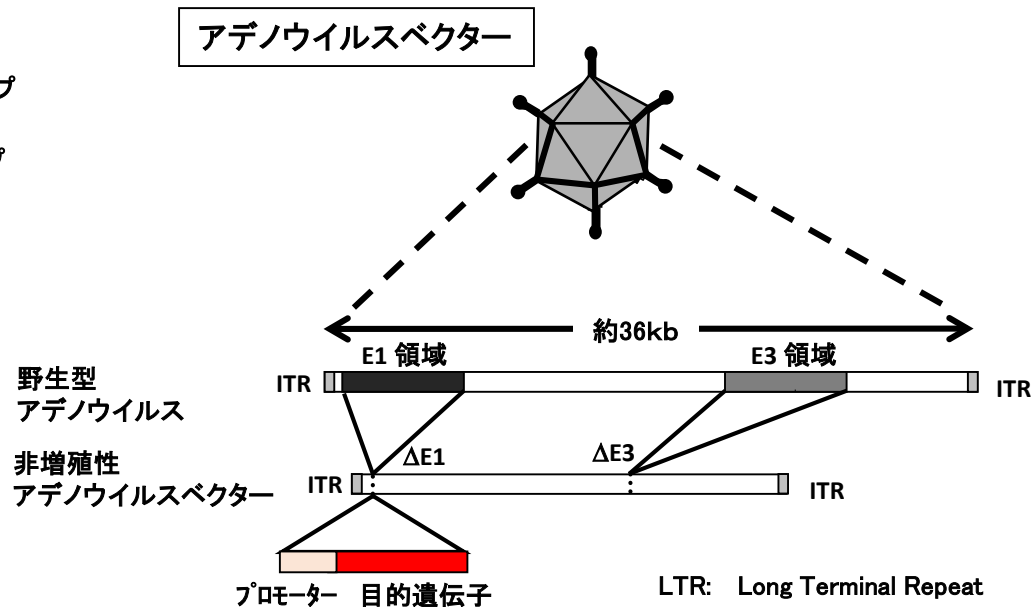
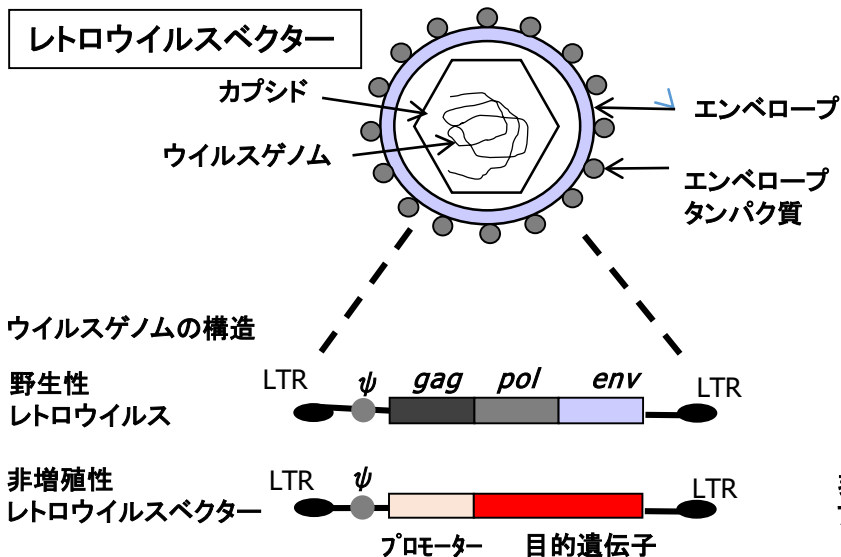
X-SCID免疫不全症

- X-SCIDはX染色体に位置する γ_c 鎖遺伝子の異常で起る先天性疾患。 γ_c 鎖は、リンパ球の発生・分化・機能を制御するインターロイキン-2 (IL-2)、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21の細胞膜受容体
- X-SCID患児は抗体産生やがん細胞を破壊するNK細胞などのリンパ球の成熟不全により感染症を繰り返す
- 治療法: 抗体(ガンマグロブリン)の投与. 骨髄移植(無治療では無菌室での生活)
- リスク要因: 感染症発祥 ⇒ 骨髄移植でのリスク
適合ドナーの存在

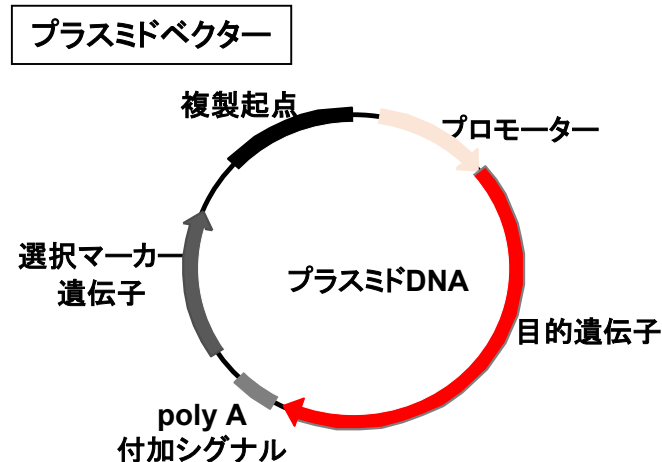
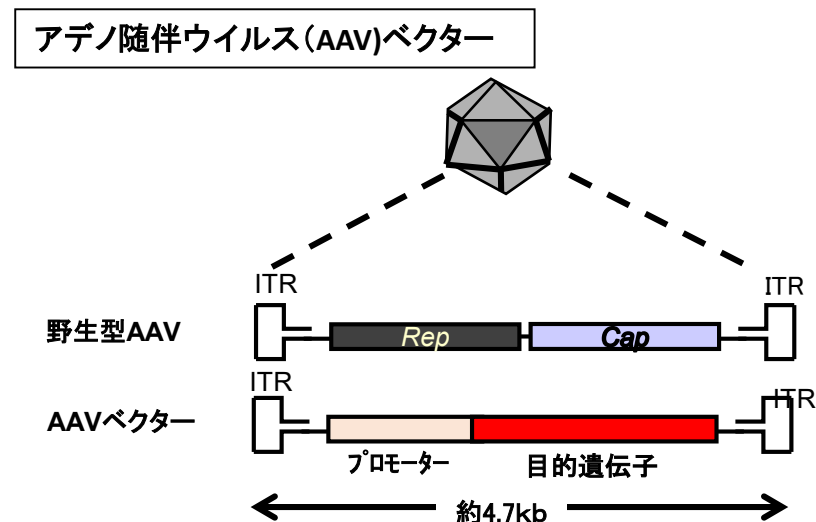


From 原発性免疫不全症候群情報サイトe-免疫.com

主な遺伝子治療用ベクターの構造(例)

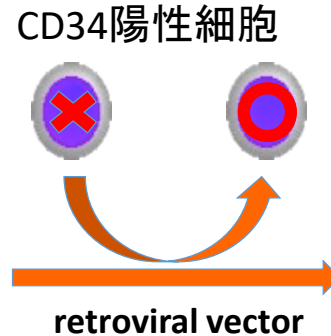


LTR: Long Terminal Repeat
 ψ : パッケージングシグナル
ITR: Inverted Terminal Repeat



レトロウイルスベクターの挿入変異によるがん化

X-SCID遺伝子治療:造血幹細胞を使用した理想的な遺伝子治療



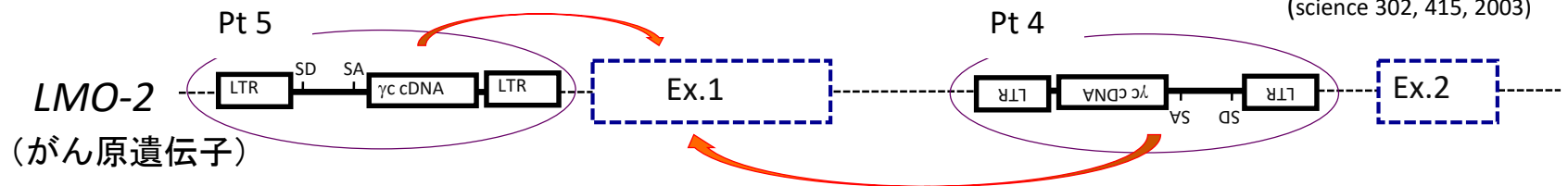
After his gene therapy, he was running around at home

- He is a normal little boy now -

(science, 2000)

LMO-2遺伝子座への挿入による白血病の発症

(science 302, 415, 2003)



急性T細胞白血病の原因遺伝子であるTAL-1のコファクターとして機能し、TAL-1と同時にLMO-2が発現するとT細胞白血病を発症する。さらにTAL-1とLMOファミリーはGATA3のコファクターとして働き、その下流の転写活性化因子として機能する

現在より安全とされるレンチウイルスを用いた臨床試験で好成績が得られている

先端医療技術のコストの課題と普遍化



Emma Whitehead は2010年に急性白血病になり、抗がん剤治療も効かず余命半年と宣告。CART療法では重篤な副作用も出たが白血病細胞が駆除された

遺伝子改変したCART-19による画期的な効果

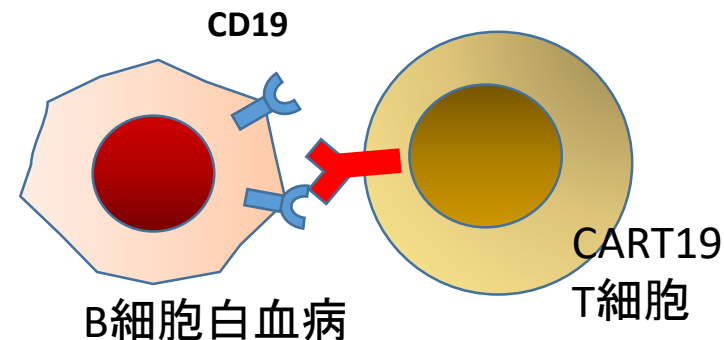
Emma Whitehead は2010年に急性白血病になり、抗がん剤治療も効かず**余命半年**と宣告されCART療法に最後の望みを託す。CART療法では重篤な副作用も出たが白血病細胞が駆除され、現在もALLサバイバーとして元気に生活している。

CAR T細胞療法製剤の開発

- FDA 2017年に2つの抗CD19 CARを発現する自己CTL細胞を承認
- Novartis社のCART製品KymriahがFDAから承認. 小児・若年r/r B-ALL適応. 2017年10月9日
- 米Kite Pharma社の**CART製品である**Yescarta (axicabtagene ciloleucel)が**FDAから承認**. 2種以上の全身療法でも有効性が得られなかった再発/難治性の**大細胞型B細胞性リンパ腫**の成人患者. 2017年10月18日
- 2019年2月20日Kymriah: 再生医療等製品・生物由来技術部会が製造販売を承認

今後CART019 以外のCTL製品がでてくるか:
固形がん

**ユニバーサルドナー細胞技術の実用化: 患者ではなくドナー由来のCAR-T細胞の利用
高額な医療費の課題**



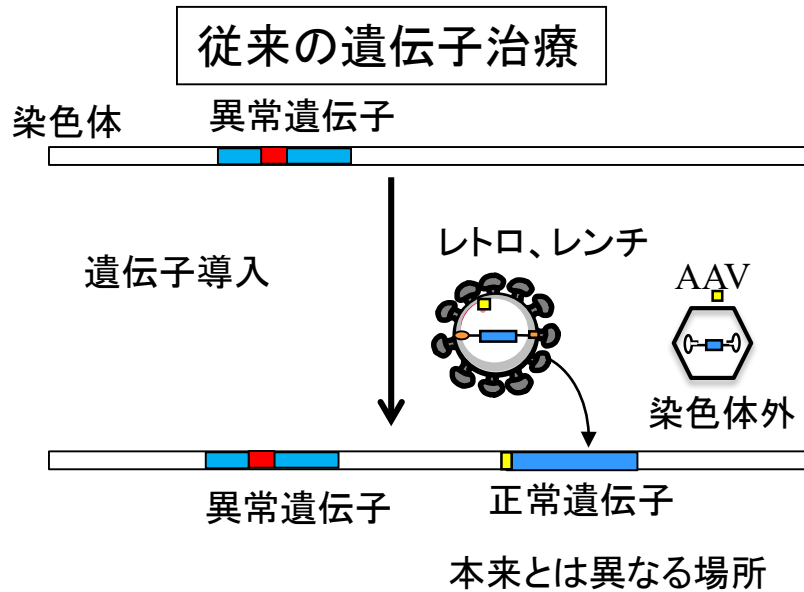
CAR T細胞療法製剤の開発

- FDA 2017年に2つの抗CD19 CARを発現する自己CTL細胞を承認
- Novartis社のCART製品KymriahがFDAから承認.小児・若年r/r B-ALL適応. 2017年10月9日
- 米Kite Pharma社のCART製品であるYescarta (axicabtagene ciloleucel)がFDAから承認. 2種以上の全身療法でも有効性が得られなかった再発/難治性の~~大細胞型~~大細胞型B細胞性リンパ腫の成人患者. 2017年10月18日
- **がん治療を受けた患者ではCARTの製造(増幅)が困難な場合がある**
- **ユニバーサルCART製品の開発(FDAが同種由来CARTの治験を承認.2018) ⇒ ゲノム編集への期待**
- **サイトカインストーム症、毛細管漏出症、致死的脳症などの重篤な副作用をどのように制御していくかが課題**

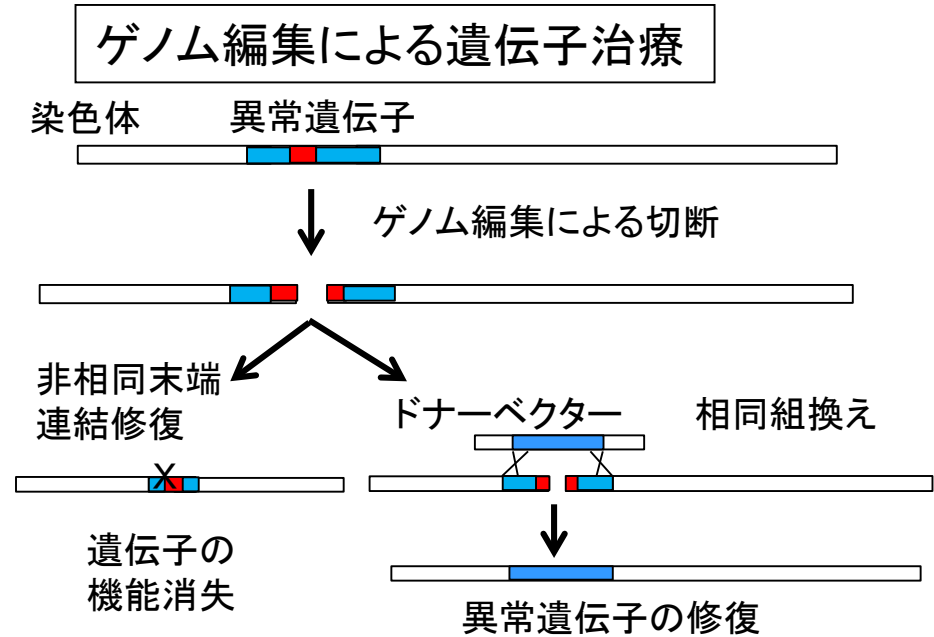
本日の話題

- 遺伝子治療について
- 遺伝子治療の光と影
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待
- ゲノム編集の安全性

遺伝子治療とゲノム編集による治療の違い



- 遺伝子を補充・付加する治療法
- 異常遺伝子は残る
- 正常遺伝子の組み込み部位は制御不能
→がん化の可能性
- 導入遺伝子の発現調節は困難



- 異常遺伝子や特定の遺伝子の機能消失（優性遺伝病の治療）
- 異常遺伝子の変異を修復（究極の遺伝子治療）
- がん化を生じない安全な部位への遺伝子導入
- 遺伝子の発現調節も可能

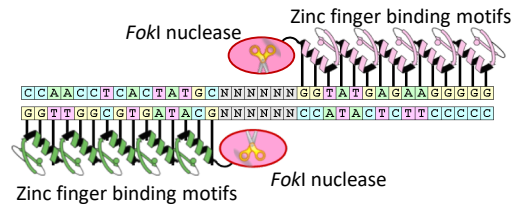
従来の遺伝子治療では実現できない治療が可能

しかし開発が進むにつれて課題も明らかに

ZFN/TALEN/CRISPRによるゲノム編集

1996年～

Zinc finger nucleases (ZFNs)



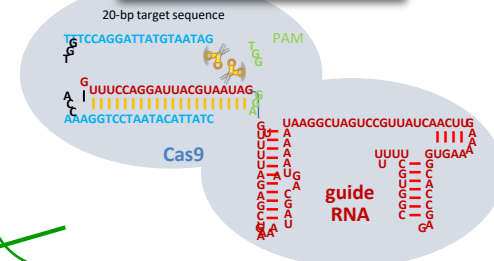
2010年～

TALE nucleases (TALENs)



2012年～

CRISPR/Cas9



二本鎖切断
(DSB)

遺伝子X

non-homologous end joining
(NHEJ)

遺伝子indel X

ノックアウト(破壊)

homologous recombination
(HR)

遺伝子GFP X

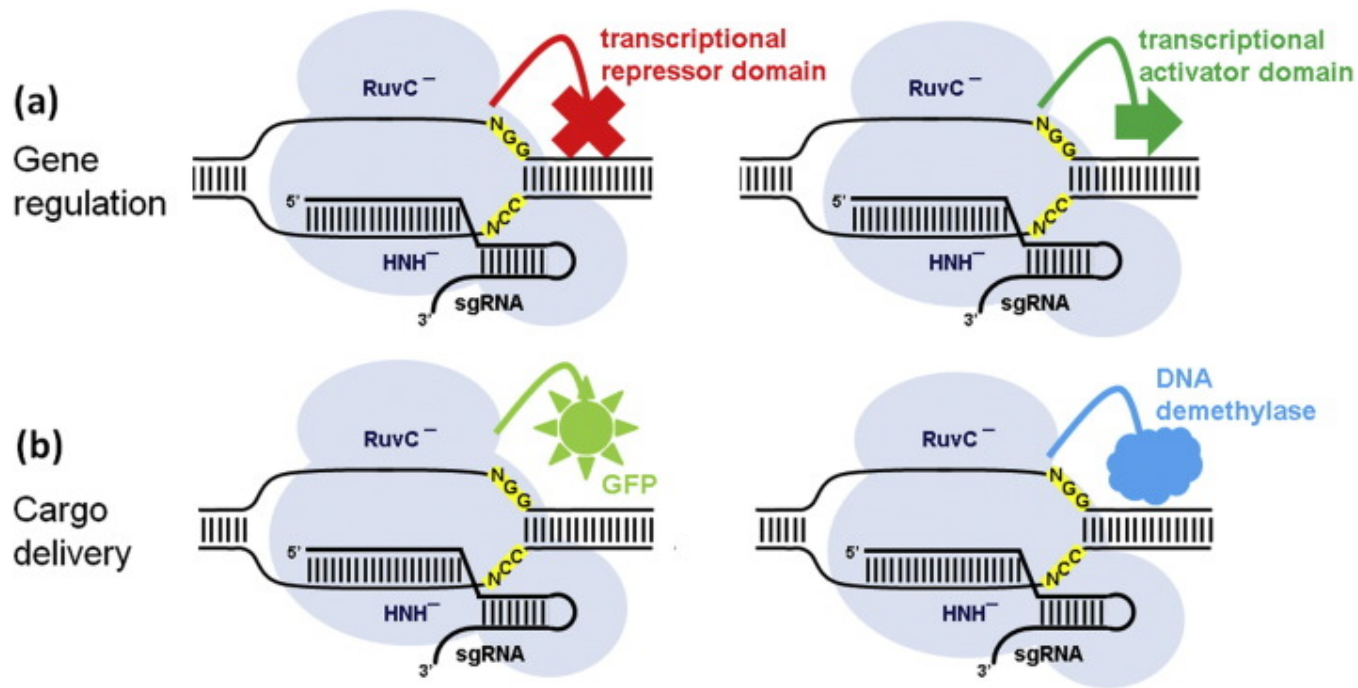
ノックイン(挿入)

遺伝子暗号はATGCの4つの塩基からなり、ヒト染色体は30億塩基からなる
目的遺伝子を確実にとらえるには特異的な遺伝子配列を認識する設計が必要⇔in silico

CRISPR/Casの改良の取り組み

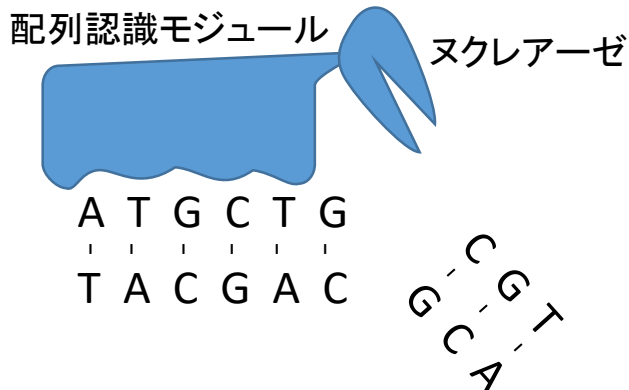
dead Cas9 (dCas9)

- 切断しないCas9 (dead Cas9) が開発されている。
- dead Cas9は、リプレッサードメイン又はアクチベータードメインを結合させたCas9が、遺伝子発現を調節するプロモーター領域等に結合し、遺伝子の発現を抑える (CRISPRi)、又は遺伝子の発現を上げる (CRISPRa) ものや、緑色蛍光タンパク (GFP) を結合して狙った遺伝子を光らせたり、メチラーゼ、デメチラーゼを結合させてメチル化、脱メチル化したりするものもある。



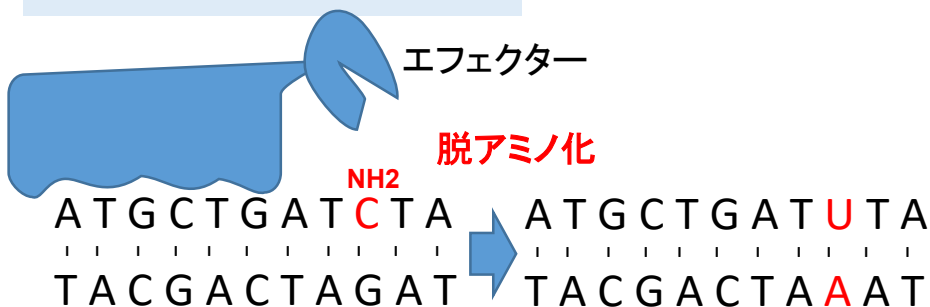
ゲノム編集遺伝子治療の定義と適用範囲

ゲノム編集による遺伝子切断



DNA二本鎖切断 → 欠失／挿入
相同組換え

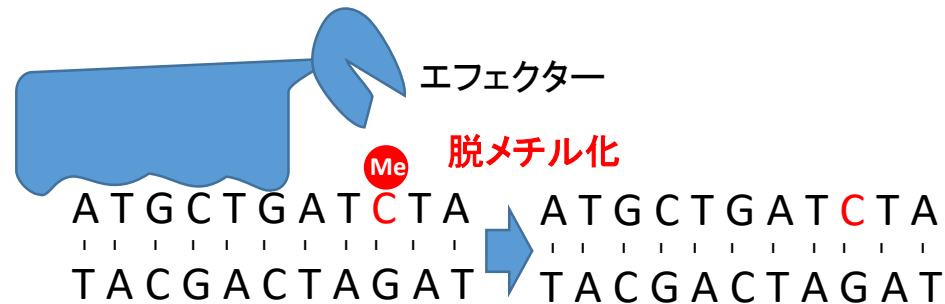
切断しないゲノム編集



脱アミノ化
(デアミナーゼ) → 点変異

リコンビナーゼ → 組換え

遺伝子改変
に該当



DNAメチル化/
脱メチル化

ゲノム以外の
修飾

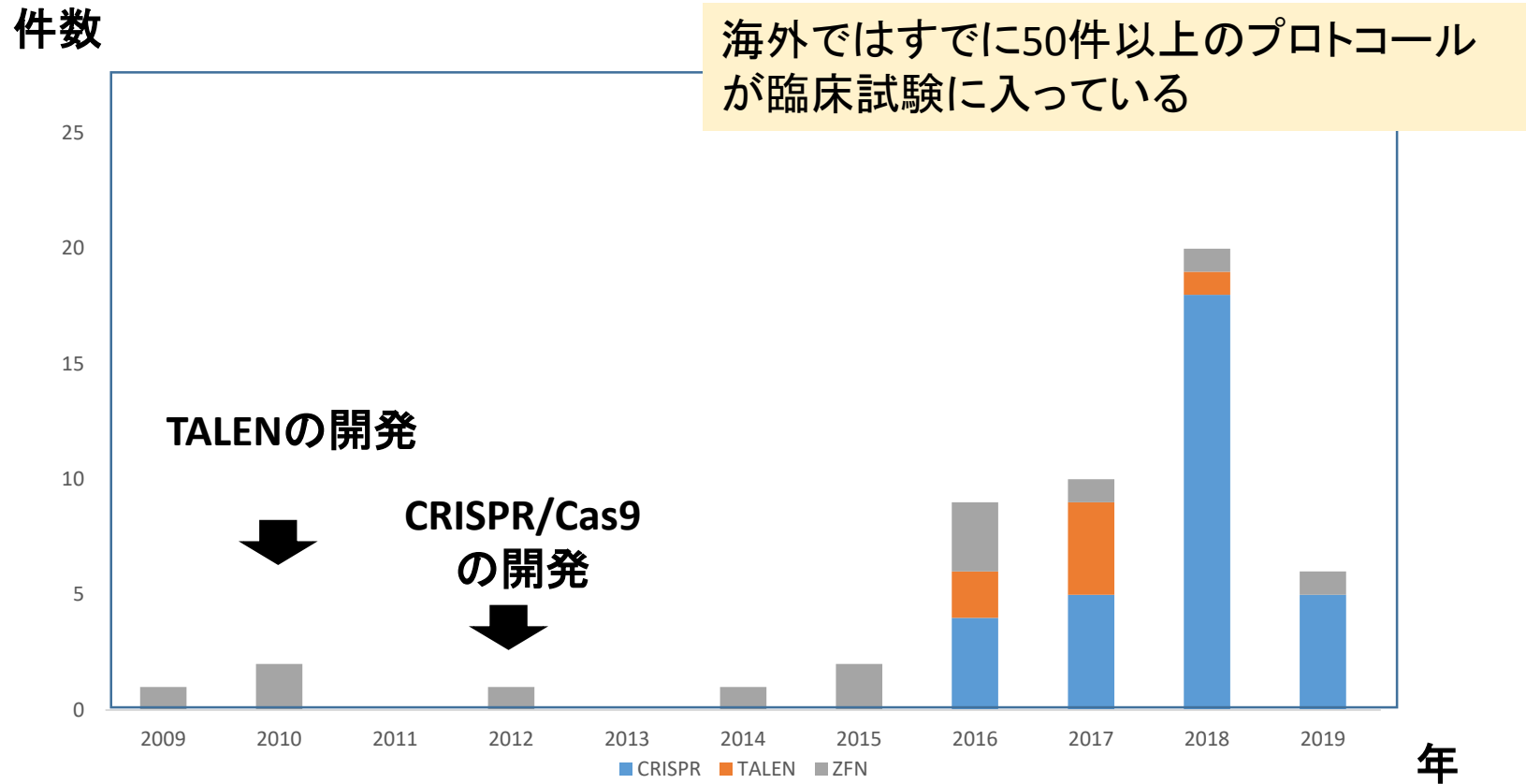
DNAの特異的修飾は
遺伝子治療の範囲

遺伝子発現制御

現時点では含めないが
今後の検討課題

ゲノム編集治療の臨床試験登録件数

(ClinicalTrials.gov, 2019.6)



日本ではまだ実施されていないが、海外ではゲノム編集の臨床試験が急増

Clinicaltrial.govに登録済のゲノム編集臨床試験

受理年	対象疾患	状況	ゲノム編集の種類、導入法			標的細胞・組織・臓器	標的遺伝子	ゲノム編集目的	治験段階
2009	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2012	HIV	実施中	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2014	HIV	実施中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	造血幹細胞	CCR5	KO	Phase 1
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2016	血友病B	リクルート中	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ムコ多糖症1型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ALL、CML	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	非小細胞肺がん	実施中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	子宮頸部前がん病変	未実施	ZFN	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV	KO	Phase 1
2016	小児ALL	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	膀胱がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	腎細胞がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	前立腺がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	ムコ多糖症2型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2017	EBウイルス性腫瘍	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	パピローマウイルス性子宮頸部上皮内部腫瘍	未実施	TALEN, CRISPR	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV16, HPV18 E7	KO	Phase 1
2017	食道がん	リクルート中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 2

CCR5を改変してHIVに感染しないようにする

HIV感染するリスクの高い人のなかで感染しない人がいることが発見



HIVが感染するリンパ球のCCR5に変異があることがわかる
CCR5に変異を入れるとHIVに感染なくなり、HIV陽性患者のCCR5を改変することにより治療が可能では



HIVはCCR5を介して
CD4+リンパ球に感染



CCR5



CD4陽性リンパ球

CCR5への結合を阻害するHIV
治療薬が開発中

ヒト胚をゲノム編集することのリスク

香港大学で開催された国際ヒトゲノム編集サミットで中国の科学者がヒト受精卵のゲノム編集を行い既に二人の子供が生まれていると報告(2018. 11)

中国の南方科技大学の賀建奎副教授がHIVに感染しないようにヒト胚にゲノム編集を行い2人の女兒が生まれたと報告

Gene editing

Scientist in China defends human embryo gene editing

The Guardianの記事より

He Jiankui uses Hong Kong summit to reply to critics of his Crispr-Cas9 trials altering baby DNA for HIV resistance



▲ He Jiankui says he is proud of the work that has led to the birth of genetically changed twins Nana and Lulu.
Photograph: Imaginechina/Rex/Shutterstock

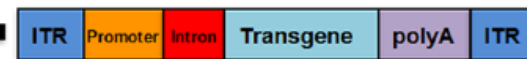
血友病AAV遺伝子治療

効率的な産生
遺伝子コドンの最適化
CpG含量

AAVベクターの結
成型の選択
空ベクター
最適な製造



rAAV Vector Genome



- 十分な効果を得ることが難しい
- いかに効率よく発現させるか

F-VIIIやF-IXに対する中和抗体

Pediatric patients

Liver disease

Therapeutic Options

- Antiviral therapy
- Skeletal muscle gene therapy

AAVに対する中和抗体

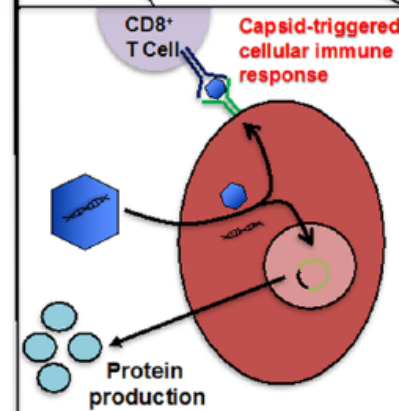
Therapeutic Options

- Plasmapheresis
- Empty capsids
- Immunosuppression
- Novel serotype
- Regional delivery

Therapeutic Options

- Lower vector dose
- Immunosuppression

Doshi & Arruda : Gene therapy for hemophilia:
what does the future hold? Ther Adv Hematol
2018, Vol. 9(9) 273–293

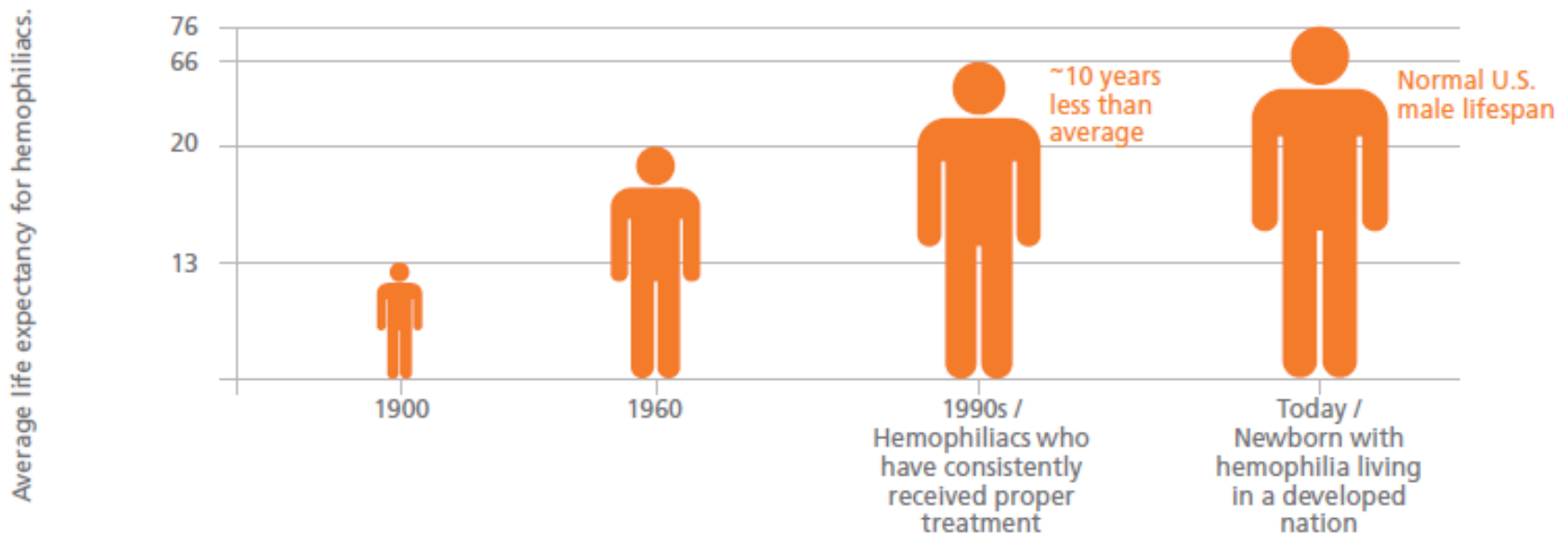


血友病治療薬開発と患者の延命効果

血液製剤やバイオ医薬品開発の努力により現在では健常人に近い人生が送れるようになってきている

Costs will rise as growing numbers of patients live longer and develop additional complications (e.g., obesity, low bone density).

Better treatments have increased Hemophiliac life expectancy

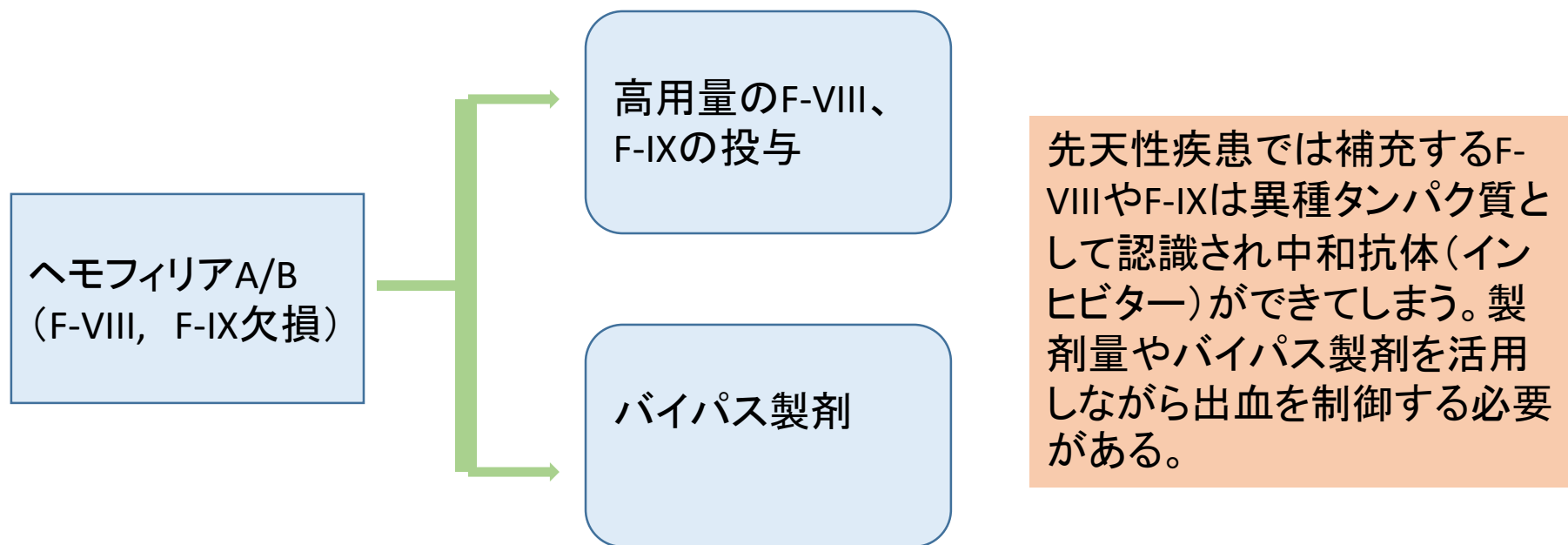


National Hemophilia Foundation. History of Bleeding Disorders. Accessed at: <https://www.hemophilia.org/Bleeding-Disorders/History-of-Bleeding-Disorders> on 01.13.2015.

National Haemophilia Council. What is the life expectancy of someone with haemophilia? Accessed at: http://www.nationalhaemophiliacouncil.ie/home/faqs/what_is_the_life_expectancy_of_someone_with_haemophilia/ on 01.13.2015.

我が国では血漿由来製品と組換えDNA製品の2つが承認

血友病治療：インヒビターとの戦い



バイパス製剤としては、血液凝固第X(10)因子加活性化第VII(7)因子(FVIIa/FX)、血液凝固因子抗体迂回活性複合体(aPCC)、遺伝子組換え活性化第VII(7)因子(rFVIIa)などが用いられる

化血研、業務停止処分へ 「薬事制度揺るがす」

2015/12/25 日本経済新聞

化血研は処分期間中、医薬品の出荷ができなくなる。ただ、代替がきかない一部の血液製剤やワクチンなどは患者への影響が大きいいため処分対象から外す

患者ごとに製剤特性に合わせた治療が行われており、異なるF-VIII製品では出血コントロールが難しい

血友病A及びBを対象とした遺伝子治療薬の開発

血友病

- 第8因子は肝臓で生産され、血中に一定量の維持されなければ出血傾向等の有害事象が発症する
- 歯茎からの出血や関節での出血も頻発し、特に関節での出血により変形性関節症を引き起こす

遺伝子治療での課題

- 十分な量の第8因子や第9因子の供給が必要

十分な第8因子の供給が可能な
AAVベクターを開発

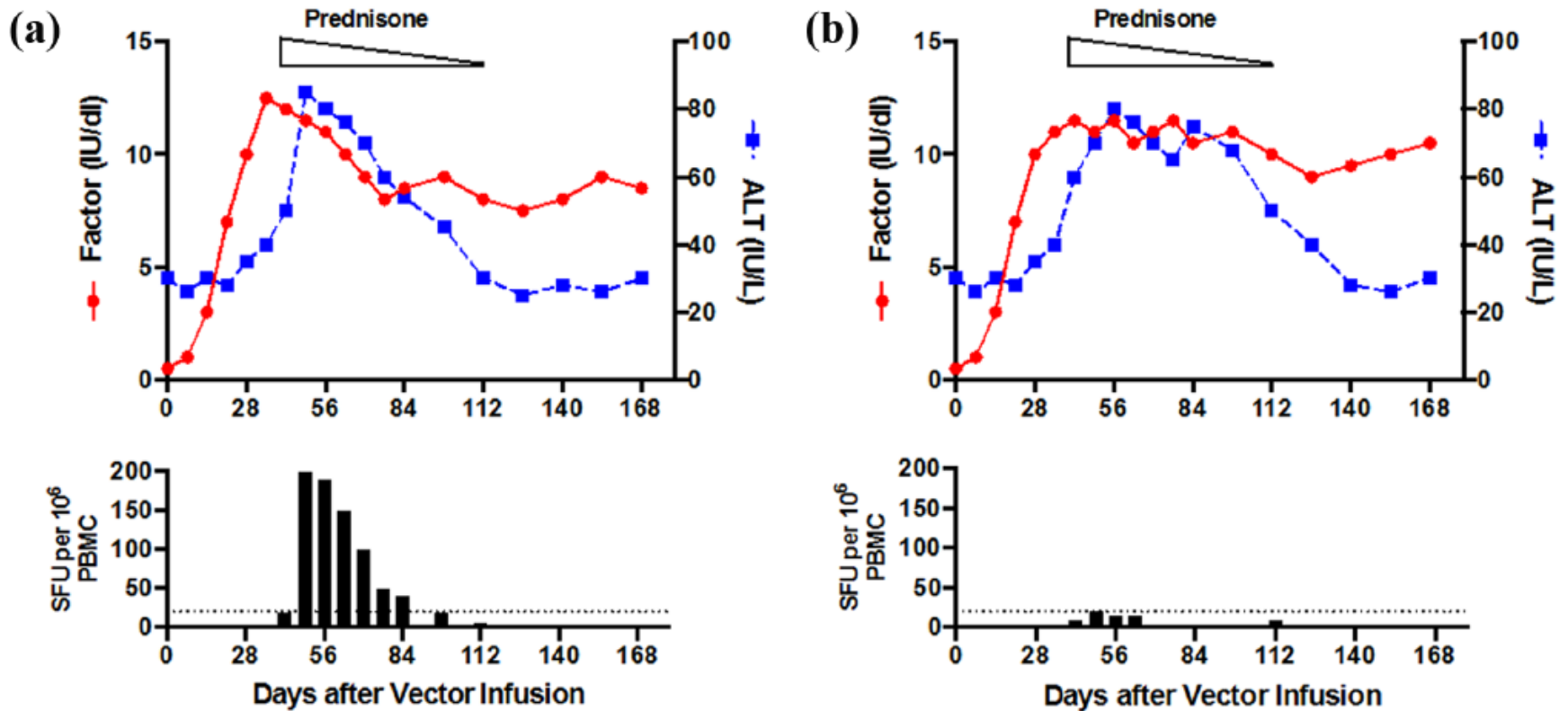
Hemophilia A

Pfizer/Sangamo: SB-525 is a gene therapy that uses an AAV vector to deliver a new therapeutic copy of the Factor VIII gene to the patient's liver cells, designed to enable the liver to produce and secrete functionally active Factor VIII protein into the bloodstream.

遺伝子治療によるヘモフィリア治療の長所と欠点

- 新しい技術であり、長期に亘る有効性や安全性が課題
- 挿入変異のリスク
- 継続した第8因子や第9因子の産生が期待され1回の投与により何年にも亘って効果が持続
- 単回での薬剤費は高いと想定されるが生涯にわたる医療費は抑制可能
- 幼少期(乳児期)に投与することにより免疫応答が抑えられインヒビター発生が抑制

血友病AAV遺伝子治療



Ohmori et al: CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B. Scientific Reports volume 7, Article number: 4159 (2017) |

体内ゲノム編集の臨床試験

- **血友病B**: 血液凝固第9因子の遺伝子変異により、出血が止まらなくなる遺伝性疾患
- **ムコ多糖症1型、2型**: 代謝酵素の欠損により、様々な臓器障害、脳の障害が進行する遺伝性疾患
- 現在の治療法は不足している血液凝固因子/欠損酵素の注射(週1、2回、一生涯)

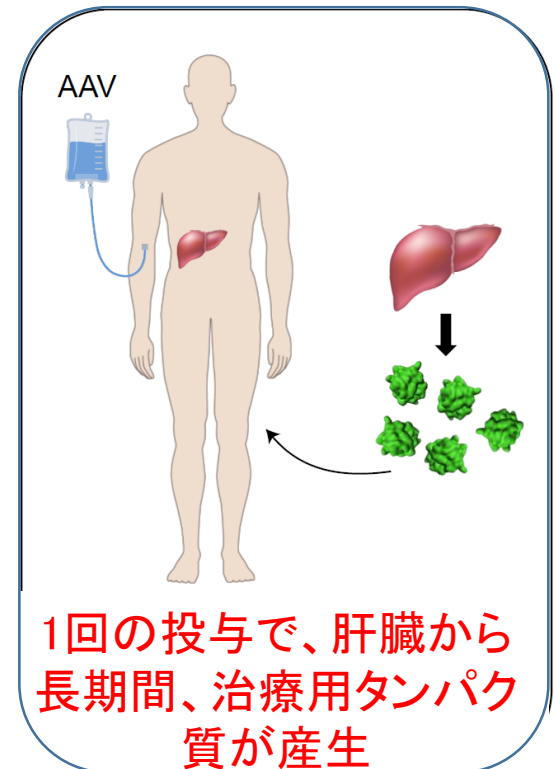
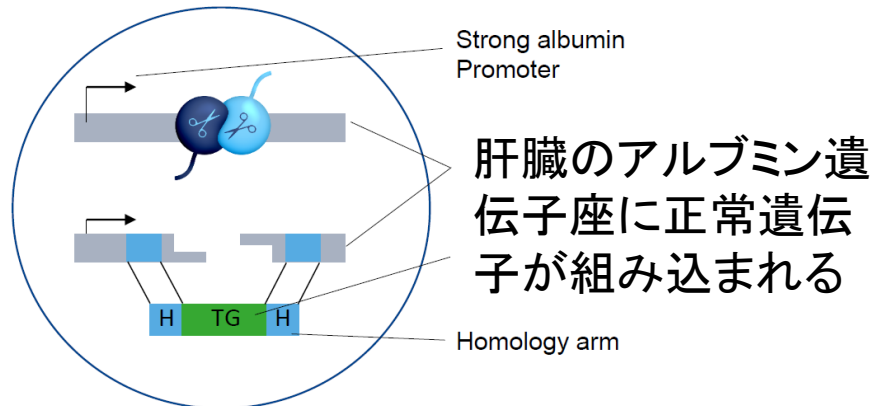


体内ゲノム編集(2017投与開始)

AAV2/6ベクターにゲノム編集コンポーネントを搭載



ZFN1, ZFN2
治療用正常遺伝子



体内ゲノム編集の臨床試験

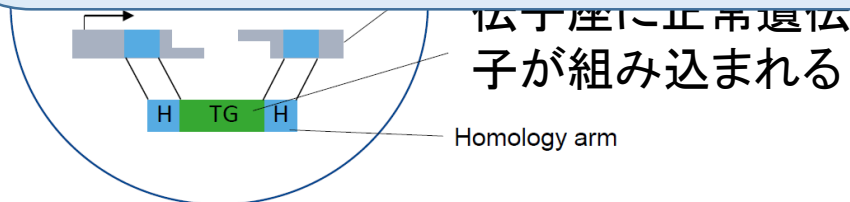
- **血友病B**: 血液凝固第9因子の遺伝子変異により、出血が止まらなくなる遺伝性疾患
- **ムコ多糖症1型、2型**: 代謝酵素の欠損により、様々な臓器障害、脳の障害が進行する遺伝性疾患
- 現在の治療法は不足している血液凝固因子/欠損酵素の注射(週1)



従来の遺伝子導入型ベクターによる遺伝子治療とゲノム編集を用いた血友病治療法の開発が進む。

必ずしもどちらの方が優れているかという問題ではなく、その疾病の特徴にあった治療法が開発されてくることが望ましい
このような遺伝子治療は単回投与では非常に高額ではあるが一回の投与により生涯にわたる効果が得られればむしろ医療費の低減化に寄与する

AAV2/6へ
ゲノム編集
システムを搭



1回の投与で、肝臓から
長期間、治療用タンパク
質が産生

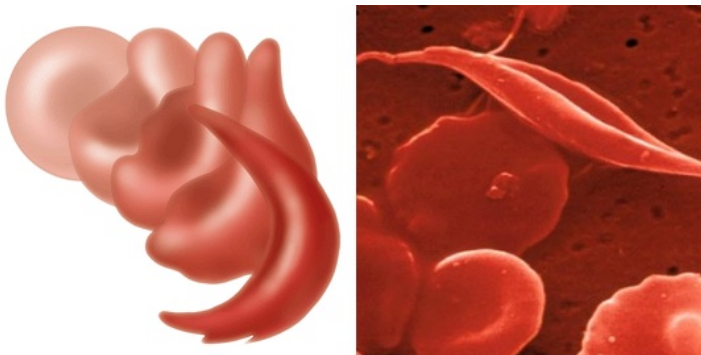
鎌形赤血球症

- アフリカ、地中海沿岸、中近東、インド北部に高発現する遺伝的疾患
- 赤血球の酸素運搬を担うβヘモグロビンの遺伝子(11番染色体)の6番目の遺伝子がグルタミンからバリンに変っているために起こる先天性疾患
- 毛細血管内でヘモグロビンが重合し三日月のように変形して詰まらせる。同時に溶血も起こり重度の貧血を起こす

鎌型赤血球症の患者はマラリアに抵抗性があつたために熱帯マラリア蔓延地域で選択圧がかからなかったと想定される

正常型遺伝子 3'-GGA CTC CTC-5'
アミノ酸配列 -Pro Glu Glu

鎌型赤血球症 3'-GGA CAC CTC-5'
アミノ酸配列 -Pro **Val** Glu



ヘモグロビンの6番目の遺伝子をCACからCTCに戻すことができれば治療効果が期待できる
ただし赤血球の元になる造血幹細胞を全て改変するのは至難

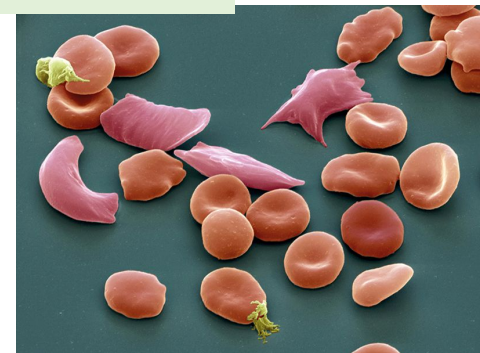
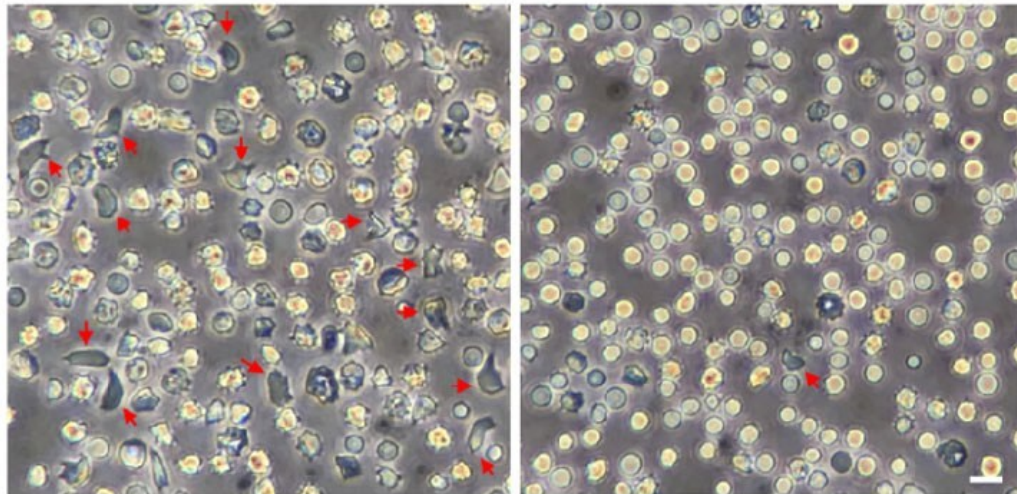
CRISPR/Casを用いた鎌形赤血球の臨床試験

A CRISPR Approach to Treating Sick Cell

Posted on April 2nd, 2019 by Dr. Francis Collins

Unedited

Edited



鎌形赤血球患者のヘモグロビン遺伝子をCRISPR/Casで破壊し、胎児型ヘモグロビン(HbF)を誘導



胎盤
臍帯
羊水
卵膜

お母さんの赤血球はヘモグロビンA(HbA)
胎児の赤血球はヘモグロビンF(HbF)
HbFはHbAより酸素への親和性が高いために
HbAの酸素を効率よく受け取れる

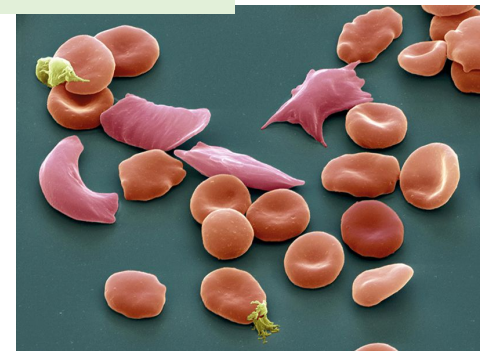
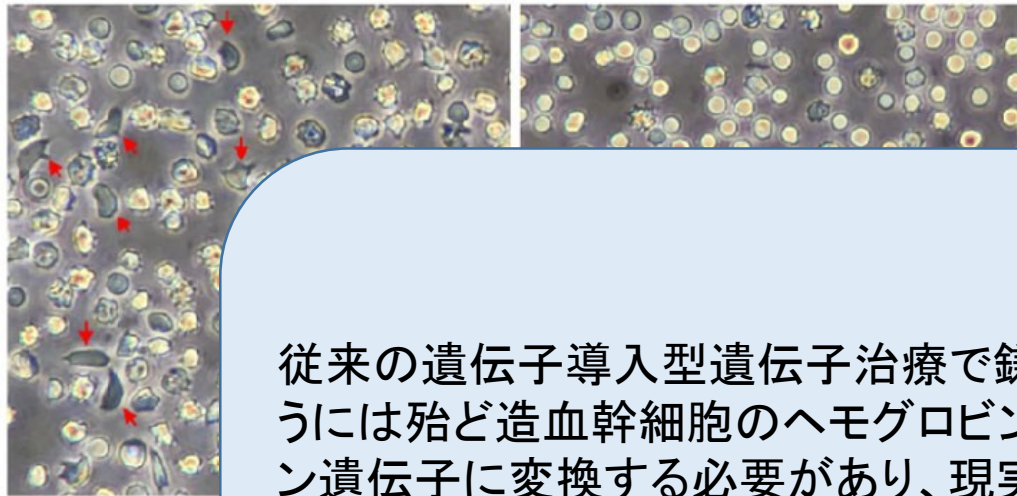
CRISPR/Casを用いた鎌形赤血球の臨床試験

A CRISPR Approach to Treating Sick Cell

Posted on April 2nd, 2019 by Dr. Francis Collins

Unedited

Edited



従来の遺伝子導入型遺伝子治療で鎌形赤血球の治療を行うには殆ど造血幹細胞のヘモグロビン遺伝子を正常型ヘモグロビン遺伝子に変換する必要があり、現実的には困難(遺伝子を導入しただけでは異常ヘモグロビン遺伝子は残ったまま)ゲノム編集を用いた成人型ヘモグロビンをノックアウト(遺伝子を破壊)するのは遺伝子導入よりも比較的効率よくおこなうことが可能

ヘモグロビン
を破壊し、
bF)を誘導

HbA)

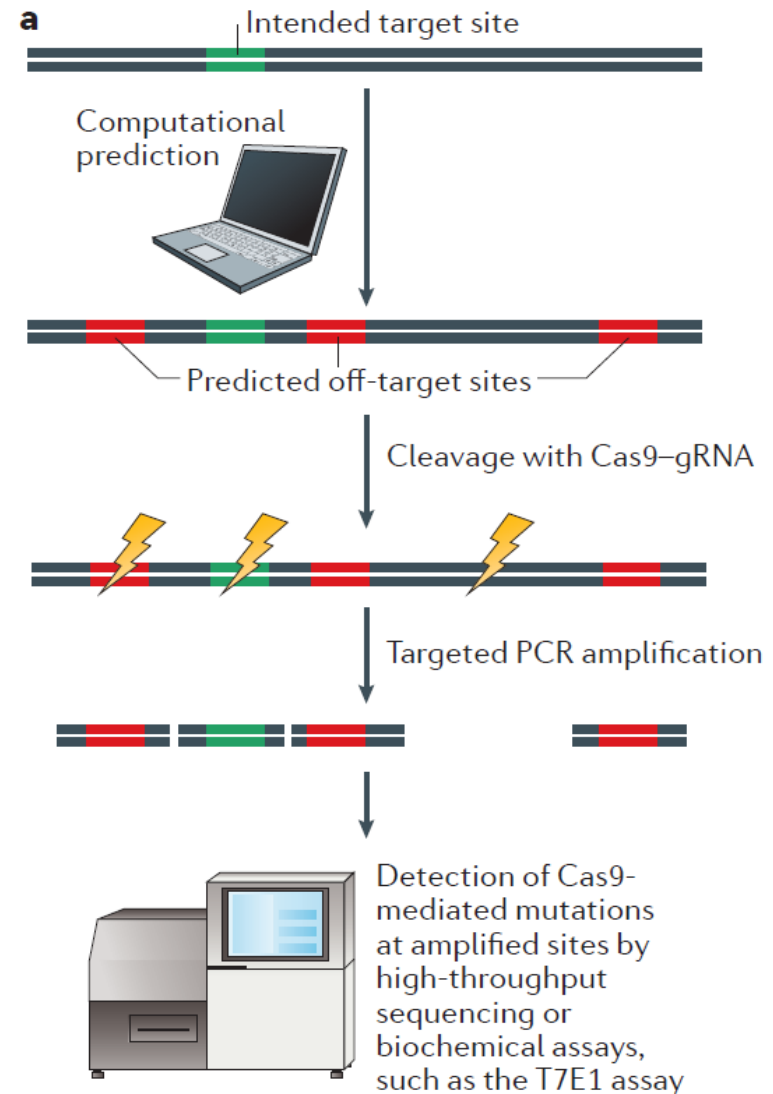
高いために

本日の話題

- 遺伝子治療について
- 遺伝子治療の光と影
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待
- ゲノム編集の安全性

安全性: オフターゲット効果の評価法

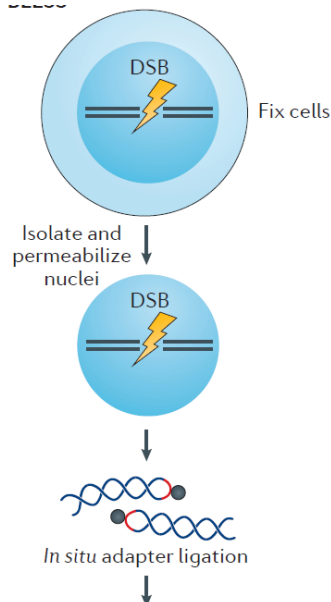
- In silicoでオフターゲット候補部位を予測し、PCR増幅後次世代シーケンサーによりディープシーケンスする方法
 - ✓ 検出感度 0.1%以下?
 - ✓ 全てのoff-target siteを予測できる保証はない
- 全ゲノムシーケンスにより検出する方法
 - ✓ 検出感度 ~1%?
 - ✓ クローニングした細胞株では培養により自然変異が入る可能性



(Tsai SQ et al. Nat.Rev. Genet 17, 300,2016)

オフターゲット変異のgenome-wide検出法

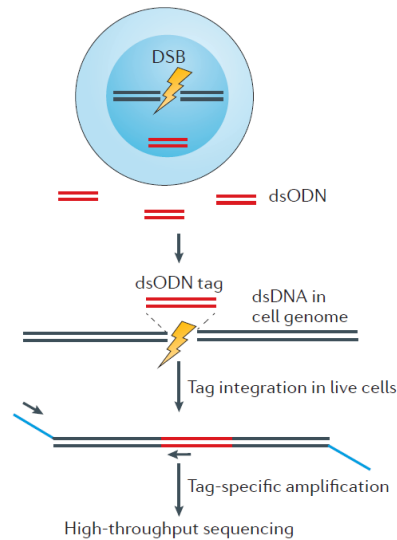
BLESS (2013)



DSB部位にbiotinラベルアダプターを結合させ、avidinで選択後、次世代シーケンス
検出感度 ~1%

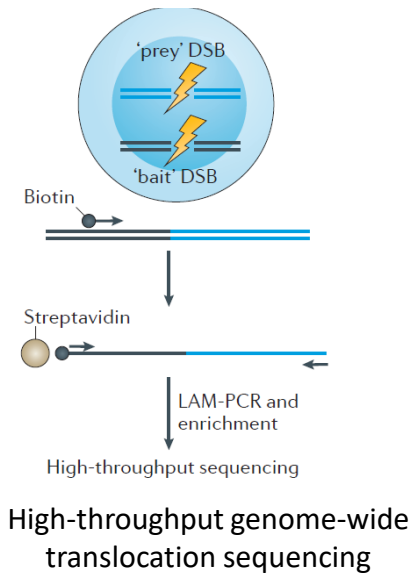
Breaks labelling, enrichment on streptavidin and next-generation sequencing (BLESS)

Guide-seq (2015)



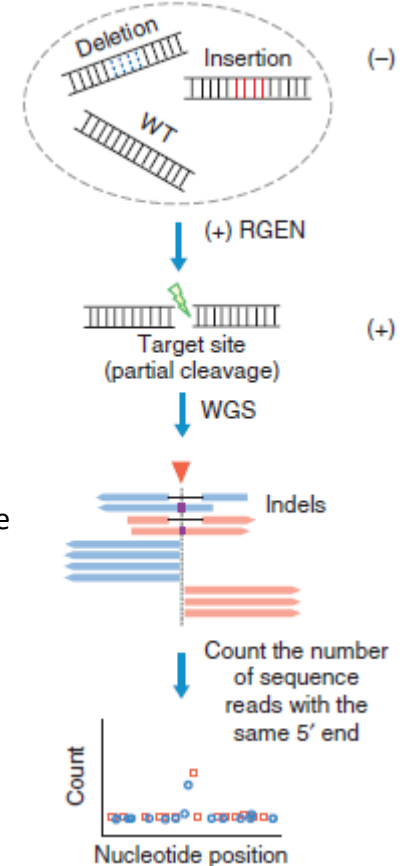
DSBによりNHEJが起こる際にdsODNを取り込ませ、特異的プライマーを用いたLAM-PCR後、次世代シーケンス
検出限界 ~0.1%

HTGTS(2015)



DSBによる転座部位を、特異的プライマーを用いたLAM-PCR、次世代シーケンスで検出
検出限界 ~0.1%

Digenome-seq (2015)



Cell-freeでDSB後、全ゲノムシーケンスし、同一5'末端として検出
検出感度 0.1%以下

- ✓ 各方法にはそれぞれ得意、不得意あり
- ✓ これらの方法を用いてもあくまで予測でしかない
- ✓ 実際に投与する細胞の変異を見ることはできない

(Tsai SQ et al. Nat.Rev. Genet 17, 300,2016)

ゲノム編集の医療応用の問題点

1. 従来の遺伝子治療の問題

- (主に) ベクターの免疫原性、細胞毒性
- ベクターの挿入変異による造腫瘍性等 (レトロウイルス、レンチウイルス)

遺伝子治療の研究 = delivery, 安全性, 免疫の研究

2. ゲノム編集に固有の問題

- 人工制限酵素 (細菌由来!) の免疫原性、細胞毒性
- 人工制限酵素の遺伝毒性 (オフターゲット変異)
 - がん関連遺伝子の変異リスク
- 染色体切断による転座や欠失
- 遺伝子ノックイン時のP53の変異

問題その1：人工制限酵素の免疫原性

- 人工制限酵素の免疫原性

- 65%に抗spCas9抗体、79%に抗SaCas9抗体、46%に抗SaCas9 T細胞
(Charlesworth *et al.*, *BioRxiv*, 2018)
- 2.5%に抗spCas9抗体、10%に抗SaCas9抗体 (ELISA)
(Simhadri *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018)
- AAV-CRISPRのマウス骨格筋投与後、Cas9に対する液性・細胞性免疫応答
(Chew *et al.*, *Nature Methods*, 2016)
- 免疫原性の決定因子：ベクターの血清型、投与経路、投与量、プロモーター特異性、宿主、*etc.*
- *ex vivo* vs. *in vivo*、タンパクで導入
- 患者スクリーニング

- 免疫抑制？

- 本当に遺伝子付加治療よりも有利か？

- 遺伝子（付加）治療も大型動物への移行が困難だった

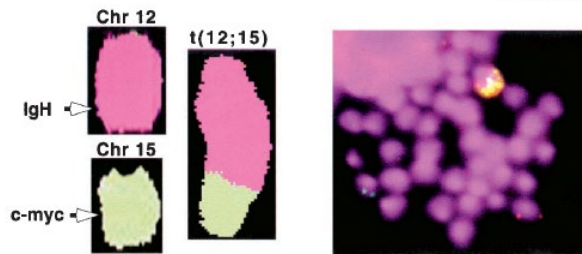
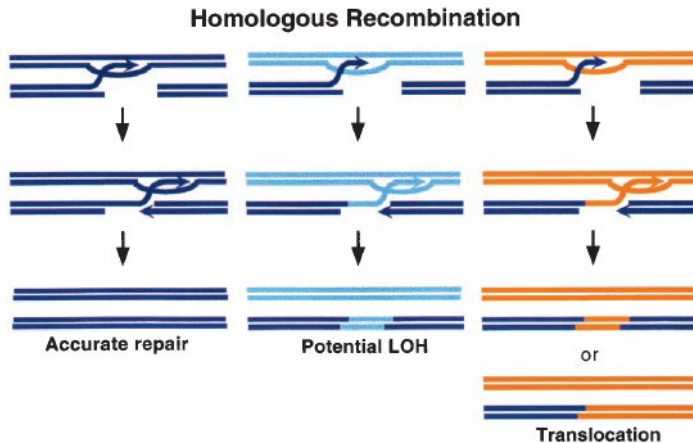
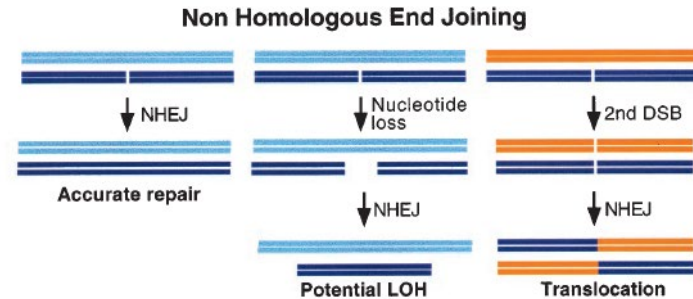
問題その2：オフターゲット以外のDNA変異

頻度	変異/バリエーション	細胞あたりの頻度	
	酵素の オフターゲット変異	<0.001 (0.1%)?	• 検出法 • 転座、large deletion?
	ドナーDNAのランダム 部位への組み込み	~ 0.05 (5%)?	• 相同組換え修復 • 検出困難 • dsDNA
	DNA 複製エラー	>10 ($1 \rightarrow 10^8$ 細胞として)	• iPS細胞
	個人間の DNAバリエーション	$>10^6$	• オフターゲット変異 との区別

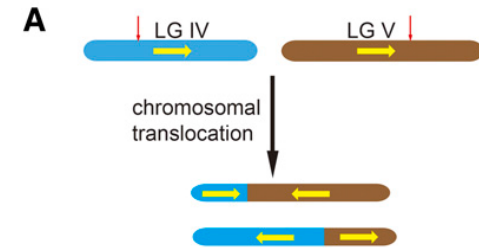
- 外来DNAが残らない → 変異を見つけにくい
- *in vivo*法： オフターゲット変異の蓄積
使用する動物とヒトゲノムとの違い
→ オフターゲット配列が予測不可能

変異は必ず生じる → がん化に関係する変異かが重要. 多くの変異は細胞死をまねく

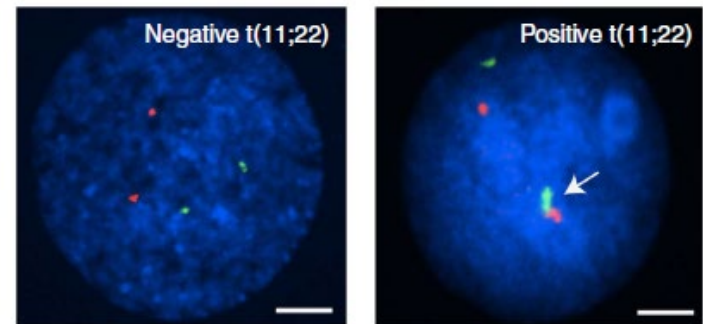
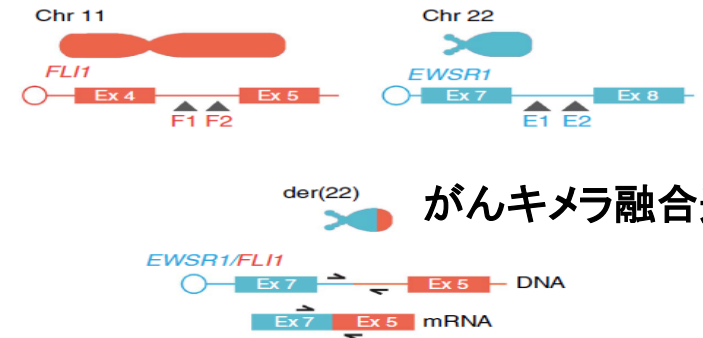
問題その3:ゲノム編集の安全性評価:染色体転座リスク



Ferguson & Frederick :DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572 (2001)

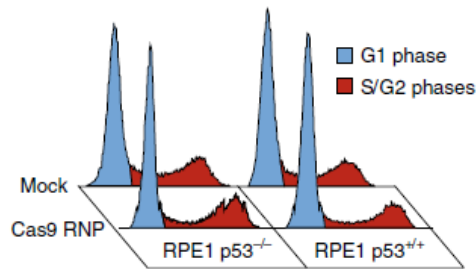
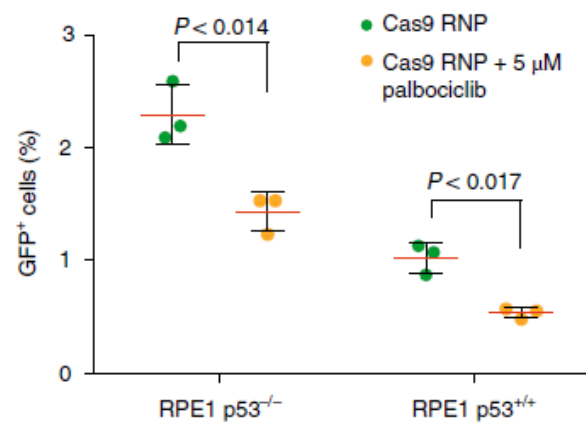
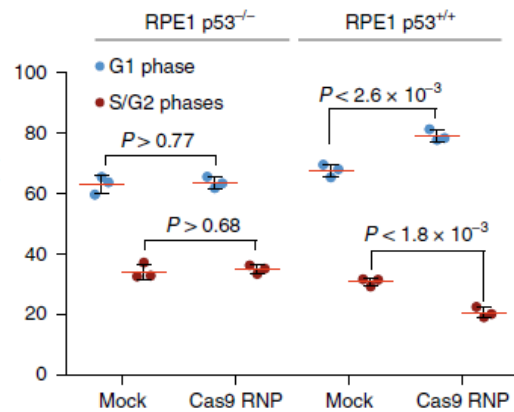


Chen et al: Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 2017



Torres et al: Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR–Cas9 system. *Nature Communications* 2014

問題その4：CRISPR・CAS9によるHDRゲノム編集はp53変異のある細胞で起きやすい



P53: がん抑制遺伝子

CRISPR/Cas9によるゲノム編集をがん抑制遺伝子であるp53KOヒト網膜細胞に適用すると効率よくゲノム編集できるが、正常細胞ではクリスパーに対抗してがん抑制遺伝子が働き、編集に失敗しやすいことを報告。P53の影響で細胞が死んだり、増殖が停止するという。著者らは、結果としてがん化の恐れが高い細胞が多く残る可能性がある」と指摘

Haapaniemi et al: CRISPR/Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat. Med. 2018
Ihry et al: p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells Nat. Med. 2018

まとめ

- 従来の遺伝子治療は遺伝子導入(ノックイン)技術. 特定の部位に挿入することはできない
- 遺伝子導入による遺伝子治療で画期的な治療効果が認められるようになったが発がんリスクなど克服すべき課題がある
- ゲノム編集技術は従来の遺伝子治療の欠点を克服できる可能性のある技術であり、究極の遺伝子治療になる可能性をもつと期待されている
- ゲノム編集は技術的には未完成の部分が多く、克服すべき課題は多い
- 従来型の遺伝子治療とゲノム編集を比較してどちらが優れているという問題ではない。それぞれ特徴を生かした開発が進められる必要がある