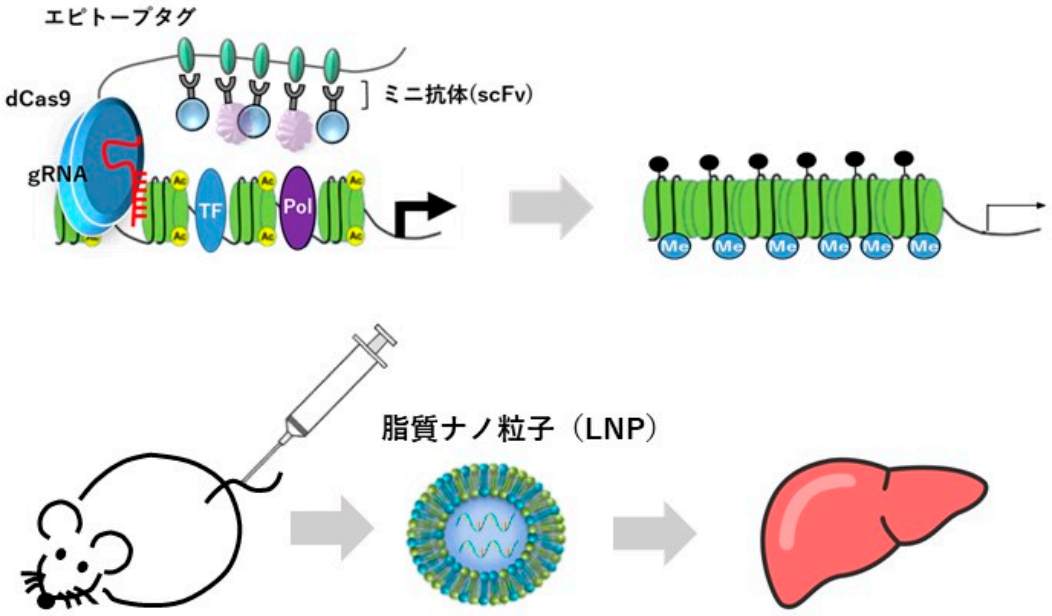
37　mRNA封入脂質ナノ粒子によるFHのエピゲノム治療法開発	畑田　出穂

【目的】ゲノム編集治療はオフターゲット効果による予期せぬ遺伝子変異が大きな問題であり実用化の大きな壁となっている。それに対しエピゲノム編集は遺伝情報を操作せずにそのスイッチを操作するため安全である。本研究ではエピゲノム編集システムを mRNA ワクチンで使用され安全な mRNA 封入脂質ナノ粒子によりデリバリーする家族性高コレステロール血症の新たな治療法を開発する。

【方法】dCas9-SunTag システムを用いて標的遺伝子の発現抑制を検討した。すなわち細胞に (a) KRAB 単独 : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、(b) Dnmt 単独 : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-Dnmt、(c) KRAB+Dnmt : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、scFv-Dnmt を導入して遺伝子発現の抑制を検討した。また脂質ナノ粒子による mRNA の肝臓へのデリバリーについても検討した。

【結果】(a) KRAB 単独、(b) Dnmt 単独と比較して (c) KRAB+Dnmt の両方を標的にリクルートすると相乗的に発現を抑制することができた。その抑制効果の強さは (c) KRAB+Dnmt、(a) KRAB 単独、(b) Dnmt 単独の順であった。またマイクロ流体装置を使用すると脂質と mRNA を最適な条件で混合することにより再現よく均一な直径 80 nm の脂質ナノ粒子を作製することができ、肝臓へのデリバリーは効率がよいことが分かった。

エピゲノム編集システムと脂質ナノ粒子による肝臓へのデリバリー



37. mRNA 封入脂質ナノ粒子による FH のエピゲノム治療法開発

畑田　出穂

群馬大学 生体調節研究所 ゲノム科学リソース分野

Key words：エピジェネティクス，ゲノム編集，エピゲノム編集

緒　言

ねらった DNA を切断する CRISPR/Cas9 のようなゲノム編集ツールは、特定の遺伝子を切断し破壊することができる。ゲノム編集はいくつかの遺伝性疾患の治療法として臨床に近いところまで来ているが、オフターゲット効果という大きな問題がその実用化において大きな壁となっている。すなわち標的配列だけではなく標的と類似した配列の切断や、染色体の切断に伴う予期せぬ転座が起こることがあり、これがゲノム編集治療に際しての大きなリスクとなっている（図 1）。

このような中、DNA の塩基配列を変化させないという選択肢に、研究者たちはますます期待を寄せている。エピゲノムとは細胞の中でどの遺伝子を使い、どの遺伝子を使わないかを決めている「遺伝子のスイッチ」であり、その実体は DNA メチル化やヒストン修飾である。そこで特定の遺伝子のエピゲノムを自在にオン、オフに操作する技術であるエピゲノム編集を用いれば、ゲノム編集よりも安全かつ柔軟に遺伝子操作できる可能性がある（図 1）。すなわちゲノム編集は遺伝情報を操作するため、意図しない変異をもたらす危険性があるが、エピゲノム編集の場合は遺伝情報を操作しないので安全で、可逆的であるので元に戻すことも可能である。それでいながらエピゲノム修飾は細胞分裂を経ても維持される性質があるのでアンチセンス、siRNA や抗体医療と異なり治療効果は半永久的である。また、エピゲノム編集は、遺伝子の活性を完全に消し去るのではなく、わずかに上げたり下げたりするような、より繊細な操作ができる可能性もある。

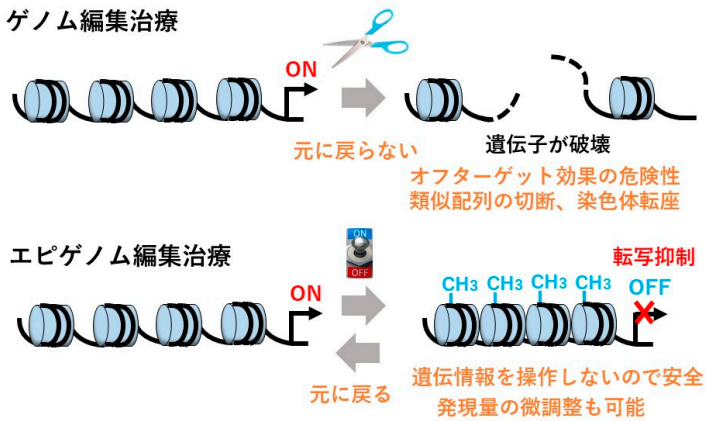


図 1. ゲノム編集とエピゲノム編集による治療法の違い
ゲノム編集は遺伝情報を操作するため、意図しない変異をもたらす危険性があるが、エピゲノム編集の場合は遺伝情報を操作しないので安全で、可逆的であるので元に戻すことも可能である。

そこでこの研究では家族性高コレステロール血症（Familial Hypercholesterolemia：FH）を対象としたエピゲノム編集治療のモデルを確立することを目的とする。FH は、LDL 受容体関連遺伝子の変異による遺伝性疾患であり、常染

色体優性遺伝形式をとる。FH は遺伝的背景のない高コレステロール血症に比べて LDL コレステロール増加の程度が著しく、動脈硬化の進展は早いので、早発性冠動脈硬化症を引き起こす。わが国における FH 患者総数は、25 万人以上にのぼる。スタチン、エゼチミブなどの治療薬があるが、これらの薬が効かない患者には血漿交換療法などを行う。FH 患者を対象とした LDL 受容体分解促進タンパク質である PCSK9 の遺伝子を破壊するゲノム編集治療の臨床試験が行われているが、オフターゲット効果による有害事象が懸念される。そこで *PCSK9* 遺伝子のスイッチをオフにする（転写抑制）エピゲノム編集治療法を開発する。これにより安全な FH の半永久的な治療の可能性が開ける。

我々はこれまでにゲノム編集の技術（CRISPR/Cas9）を応用し、DNA 切断活性欠損の Cas9（dCas9）とタグと抗タグを組み合わせたエピゲノム編集技術を開発した［1]。この技術では特定のゲノム領域に結合した dCas9 に多くのエピゲノム修飾因子をリクルートすることで（図 2b）、単に dCas9 にエピゲノム修飾因子を融合したもの（図 2a）と比較して強力に標的遺伝子のエピゲノムを操作し遺伝子発現を変化させることができる。すなわち dCas9 の端にタグを複数個つないであるので（dCas9-SunTag）、抗タグ抗体（scFv）にエピゲノム修飾因子をつなげたものがたくさんリクルートされ標的のエピゲノムの強力な操作を行うことができる。さらにこの技術を動物に応用することにより特定の遺伝子のエピゲノムを操作したマウスを作製することにも成功し、*in vivo* での有効性も検証済みである［2]。そこでこの研究では PCSK9 発現を抑制するために遺伝子発現を強力に抑制するエピゲノム編集システムを開発する。

PCSK9 は肝臓が主な発現臓器であり、治療標的臓器を肝臓とし、エピゲノム編集システムのデリバリーを行う。デリバリー法としてはファイザー社やモデルナ社の新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチンと同様に mRNA を脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticle : LNP）を検討する。mRNA ワクチンは 2021 年 5 月 13 日時点で米国の場合 2 億 6 千万回接種されており安全性は非常に高いと考えられる。またウイルスベクターのように抗原性がないため万人に用いることができるうえ複数回の投与も可能である。例えばアデノ随伴ウイルスベクター（AAV ベクター）の場合 30～50%の人は、自然感染により AAV に対する中和抗体を既に持っているため、AAV ベクターを用いることができない。また感染経験がない場合でも 1 度投与すると中和抗体ができるため 2 度目に用いることはできない。脂質ナノ粒子にはこのような制限がなく、DNA ではなく mRNA を用いていると染色体に組み込まれる危険性もなく、長期間残存しないのでさらに安全性が増す。

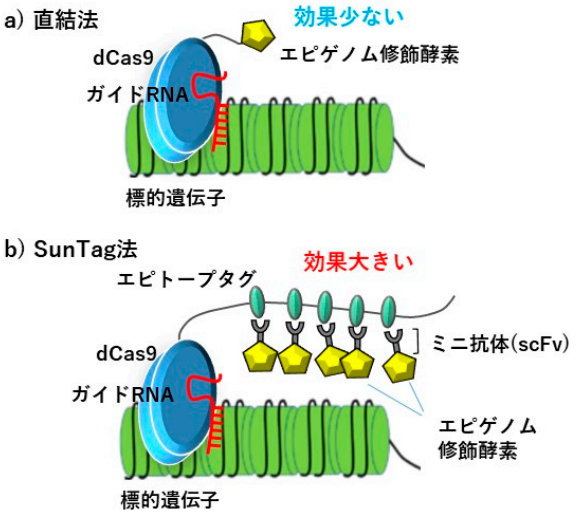


図 2. エピゲノム編集システム

a) 直結法 : dCas9 にエピゲノム修飾因子を融合したもの。

b) SunTag 法 : dCas9 の端にタグを複数個つないであるので、抗タグ抗体（scFv）にエピゲノム修飾因子をつなげたものがたくさんリクルートされ標的のエピゲノムの強力な操作を行うことができる。

方法および結果

1. 発現抑制型エピゲノム編集システムの構築

ヒストンの修飾因子をリクルートする KRAB と DNA メチル化因子である Dnmt を dCas9 とガイド RNA を用いて標的遺伝子にリクルートすることでヒストン修飾と DNA メチル化の両方を操作し、強力に発現抑制を起こさせることをねらった。そのために細胞にそれぞれ（a）KRAB 単独：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、（b）Dnmt 単独：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-Dnmt、（c）KRAB＋Dnmt：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、scFv-Dnmt を導入して遺伝子発現の抑制を検討した（図 3）。その結果、（a）KRAB 単独、（b）Dnmt 単独に比較して（c）KRAB＋Dnmt では相乗的発現が抑制されることが分かった。

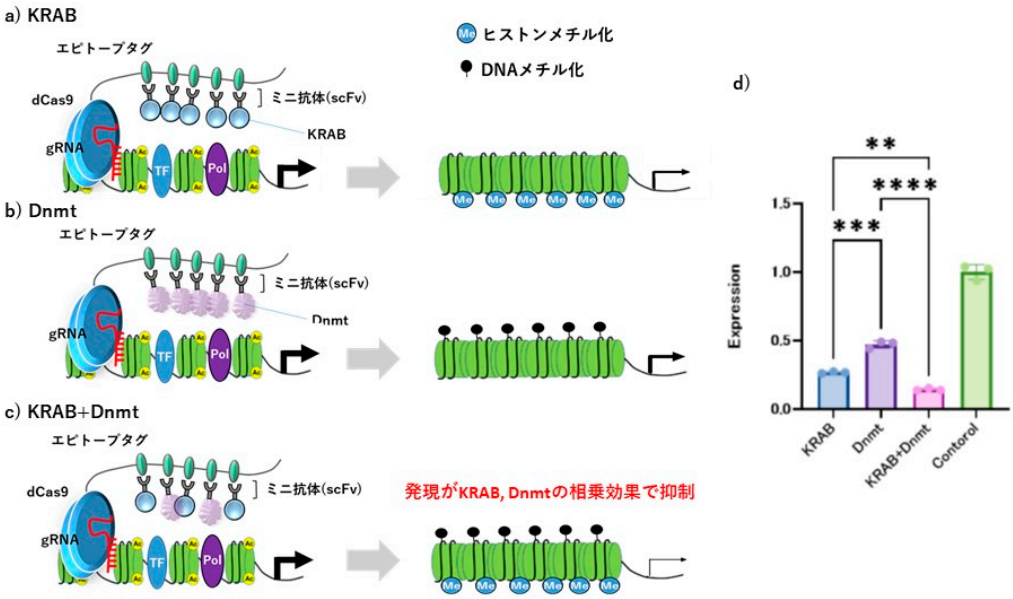


図 3. エピゲノム編集における KRAB と Dnmt の相乗効果

a）KRAB 単独：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB を導入。

b）Dnmt 単独：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-Dnmt を導入。

c）KRAB＋Dnmt：dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、scFv-Dnmt を導入。

d）リアルタイム PCR による発現測定。one-way ANOVA、**P＜0.01、***P＜0.001、****P＜0.0001。

2. エピゲノム編集システムデリバリーシステムの構築

PCSK9 は肝臓が主な発現臓器であり、治療標的臓器を肝臓とし、エピゲノム編集システムのデリバリーを行う。デリバリー法としては mRNA ワクチンを封入した脂質ナノ粒子を用いた。*In vitro* 転写したエピゲノム編集システムの RNA を封入した脂質ナノ粒子を作製した。脂質ナノ粒子の自己組織化をコントロールするマイクロ流体装置（NanoAssemblr）を使用すると脂質と mRNA を最適な条件で混合することにより再現よく均一な直径 80 nm の粒子を作製することができた。脂質ナノ粒子はマウスに静脈注射後、主に肝臓に取り込まれエンドソームに輸送されるので、mRNA が発現するためには、ここから脱出する必要がある。用いた脂質ナノ粒子は pH 応答性の第三級アミンを含有するので細胞にとりこまれたのちエンドソーム内酸性環境でプロトン化を受け、カチオン性を帯びることでエンドソーム膜との融合が促進され、エンドソームから脱出することができる［3］。

封入した mRNA が脂質ナノ粒子で肝臓にデリバリーされうまく働いているかを Cas9 mRNA とガイド RNA を導入してゲノム編集がどの程度おこっているかを指標に検討した。その結果、ゲノム編集は 70%の効率でおこっていることがわかった。

考　察

本研究から KRAB 単独、Dnmt 単独を用いたエピゲノム編集と比較して KRAB と Dnmt の両方を用いた場合は相乗的に遺伝子発現が抑制されることがわかった。これはヒストン修飾と DNA メチル化修飾は遺伝子発現制御に関して相乗的な効果を持つことを示唆している。また脂質ナノ粒子を用いて mRNA と gRNA が効率的に肝臓に取り込まれていることがわかった。この後、KRAB と Dnmt の両方を用いたエピゲノム編集システムの mRNA と gRNA を脂質ナノ粒子を用いて肝臓にデリバリーすることにより、効率良く標的遺伝子をエピゲノム編集できることが期待できる。

mRNA 封入脂質ナノ粒子を用いたエピゲノム編集治療のフォーマットが確立すれば、それを用い標的遺伝子を変更すれば、他の疾患の治療に応用することが可能である。標的の変更はガイド RNA の配列を変えるだけあり非常に簡単である。例えばトランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーなど肝臓を対象とする疾患であれば同じ脂質ナノ粒子を用いることが可能であり標的遺伝子を変えるだけでよい。アミロイド沈着を起こすトランスサイレチンを産生臓器である肝臓で発現抑制することで治療可能である。また脂質ナノ粒子を他の臓器へのデリバリーにカスタマイズできれば他の臓器の疾患治療にも対象を広げることができる。例えば免疫系の細胞に導入すれば、自己免疫疾患、炎症性疾患、癌免疫療法に応用することが可能である。また神経系の細胞に導入すればパーキンソン病やアルツハイマー病など神経変性疾患に応用することも可能である。例えばアルツハイマー病でアミロイドβ遺伝子の発現を抑制すれば治療が可能になると考えられる。

エピゲノム編集治療は遺伝子のスイッチを操作する。従ってあらゆる標的に対してその作用を抑制（発現抑制）、増強（発現活性化）することにより治療に利用することができる。これはアンチセンス、siRNA 治療のように抑制しかできない治療法にはない利点である。また 2 週間程度しか効果がない、アンチセンス、siRNA 治療と異なり遺伝子のスイッチの効果は半永久的である。さらに遺伝子治療やゲノム編集治療と異なり遺伝情報自体を操作しないので安全性も高い。このようにエピゲノム編集は効果が長く安全な治療法が様々な疾患に適用できる可能性を広げ、遺伝子を標的とした治療の新たな選択肢となるであろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、群馬大学生体調節研究所生体情報ゲノムリソースセンターゲノム科学リソース分野の森田純代、群馬医療福祉大学の安部由美子である。最後に、本研究課題に対して助成をして頂きました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝致します。

文　献

1） Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9–peptide repeat and scFv–TET1 catalytic domain fusions. Nat Biotechnol. 2016 Oct;34(10):1060-1065. Epub 2016 Aug 29. PMID: 27571369 DOI: 10.1038/nbt.3658

2） Horii T, Morita S, Hino S, Kimura M, Hino Y, Kogo H, Nakao M & Hatada I. Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome. Genome Biol. 2020 Apr 1;21(1):77. PMID:32198422 DOI: 10.1186/s13059-020-01991-8

3） Akita, H.; Noguchi, Y.; Hatakeyama, H.; Sato, Y.; Tange, K.; Nakai, Y.; Harashima, H. Molecular Tuning of a Vitamin E-Scaffold pH-Sensitive and Reductive Cleavable Lipid-like Material for Accelerated in Vivo Hepatic siRNA Delivery. ACS Biomater. Sci. Eng. Sep 14;1(9):834-844. Epub 2015 Aug 20. PMID: 33445261 DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00203