

ゲノム編集効率を大幅に改善する脂質ナノ粒子開発に成功

～ゲノム編集治療への貢献に期待～

ポイント

- ・ CRISPR/Cas RNP 送達に適した新たな脂質材料の開発により効率を約 10 倍向上。
- ・ 脂質材料の優れた生分解性により高い安全性を示す脂質ナノ粒子を構築。
- ・ CRISPR-LNP の静脈内投与により肝臓遺伝子の 98%以上のノックアウトを達成。

概要

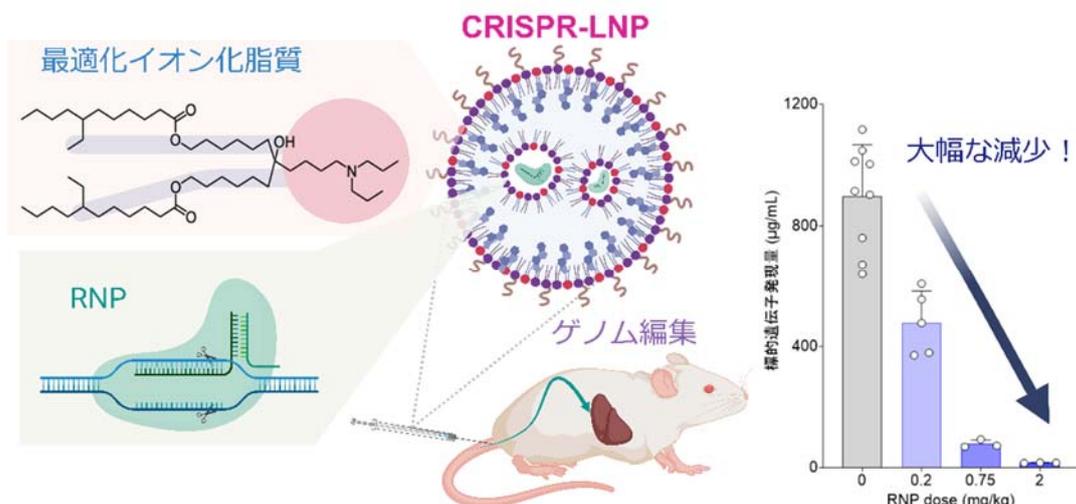
北海道大学大学院薬学研究院の佐藤悠介助教、原島秀吉教授、同大学大学院生命科学院修士課程の小沼はるの氏（研究当時）の研究グループは、ゲノム編集^{*1}用脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticles: LNPs^{*2}）の大幅な効率の改善に成功しました。

2020年にノーベル化学賞の受賞対象となったCRISPR/Casシステム^{*3}は、多様な難治性疾患に対する根本的治療戦略として期待されています。しかしながら、その医薬品応用のためにはゲノム編集ツールを標的組織だけに安全かつ効率的に送達する技術が必要不可欠となります。

LNPは薬物の体内動態を制御する技術（Drug delivery system: DDS^{*4}）の一つです。研究グループはこれまでに、CRISPR/Cas9タンパク質-RNA複合体（ribonucleoprotein: RNP^{*5}）をLNPに封入した製剤（CRISPR-LNP）の開発に成功しています。

今回、研究グループは、CRISPR-LNPの主要な構成成分であるイオン化脂質^{*6}に着目し、RNP送達に適した分子構造の最適化を図りました。最適イオン化脂質を用いて製造されたCRISPR-LNPの一度の静脈内投与により、肝臓遺伝子の98%以上のノックアウトを達成しました。また、最適イオン化脂質は優れた生分解性を示し、CRISPR-LNPは高い安全性を有することが示されました。今回開発された最適イオン化脂質の設計に基づいたCRISPR-LNPのゲノム編集治療への実用化が期待されます。

なお、本研究成果は、2024年9月20日（金）公開のiScience誌に掲載されました。



本研究の概要図

【背景】

ゲノム編集技術は、標的の遺伝子だけを選択的に破壊・修復・改変できる技術であり、1回の投与により永続的な効果をもたらすことができます。2020年にノーベル化学賞の受賞対象となったゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムは、標的配列の認識を担うgRNAと標的配列の切断を担うCas9タンパク質との複合体(ribonucleoprotein: RNP)から成ります。gRNAの配列を変更することによって様々な標的遺伝子の改変を行うことができるため、設計や実験方法の簡便さから、多くの研究者の間でその利用が広まりました。しかしながら、ゲノム編集治療の実現には、ゲノム編集ツールを標的組織や細胞だけに安全かつ効率的に送達する技術が必要不可欠となります。

脂質ナノ粒子(Lipid Nanoparticles: LNPs)は、薬物の体内動態を制御する技術(Drug delivery system: DDS)の一つで、COVID-19に対するワクチンにも採用されています。2021年には、LNPを用いたCRISPR/Casゲノム編集治療法の最初の臨床試験が開始され、現在は第三相臨床試験が進められており、その実用化が期待されています。CRISPR/Casシステムの送達方法としては、DNA、mRNA、あるいはRNPとして送達する三つの方法に分けられます。DNAやmRNAとして送達させる方法では、標的細胞内でCas9タンパク質を産生した後、Cas9タンパク質とgRNAが出会い、RNPを形成する必要があります。そのため、ゲノム編集が起こるまでに多くの過程が必要です。また、長期間にわたるCas9タンパク質の産生は、標的ゲノム領域以外でのゲノムDNA切断(オフターゲット切断)が起きてしまう可能性が高まるとされています。一方で、RNPとして送達する方法では、細胞に取り込まれた後は、核に移行するという過程のみでゲノム編集を行うことができます。加えて、RNPが細胞内に存在する時間はとても短いので、オフターゲット切断が起こるのを低減することができます。

RNP送達によるゲノム編集の実現が有望視される一方で、送達効率の低さや実用的な製造方法の確立が課題となっています。研究グループはこれまでに、独自のRNPの製剤化技術の開発を進め、すでにRNP内封LNP製剤(CRISPR-LNP)を開発し、マウス肝臓における標的遺伝子ノックアウトの誘導に成功しています。しかし、RNPを効率的に送達するためのLNP構成脂質、特に最も主要な成分であるイオン化脂質の最適化は行われておらず、RNP送達効率に課題が残されていました。そこで研究グループは既存のイオン化脂質を基にした構造最適化を試みました。

【研究手法】

イオン化脂質の疎水性分岐足場構造に着目し、総炭素数と分岐位置を系統的に変更したイオン化脂質ライブラリーを設計しました。各イオン化脂質を用いて作製されるCRISPR-LNPのゲノム編集効率を比較することで、最適なイオン化脂質の同定を目指しました。

【研究成果】

研究グループはまず、分岐足場構造の異なる13種の新規イオン化脂質を合成しました。各イオン化脂質を用いてmRNA内封LNP製剤を作製し、粒子径や製剤の安定性などの物性面及びmRNA導入効率を指標に6種のイオン化脂質に絞り込みました。選定された8種のイオン化脂質を用いてCRISPR-LNPを製造し、肝臓特異的に発現するトランスサイレチン(TTR)タンパク質をコードする遺伝子を標的としてゲノム編集効率を比較しました。その結果、いずれの新規イオン化脂質も既存のイオン化脂質と同等以上の優れたゲノム編集効率を示しました。イオン化脂質の構造に着目したところ、疎水性分岐足場部分の総炭素数が比較的少なく、また、分岐位置が遠位であるほど優れたゲノム編集効率を示すことが明らかになりました。そこで、優れたゲノム編集の誘導が予測される周辺の化学構造を有するイオン化脂質を新たに7種合成し、それらのゲノム編集効率を調べました。その結果、

期待通りに7種のイオン化脂質は全て優れたゲノム編集効率を示し、その中のCL4F11_ζ-2(ζ)というイオン化脂質は最も高いゲノム編集効率を示したことから、最適なイオン化脂質として同定しました(図1)。

次に、ζ含有 CRISPR-LNP の投与量依存的なゲノム編集効率を調べました。その結果、最大投与量である2 mg RNP/kgにおいて標的 TTR タンパク質が98%以上抑制されました(図2)。この値は既に承認済みの TTR 遺伝子を標的とする短鎖二本鎖 RNA (short interfering RNA; siRNA) 製剤において確認された80~85%を大幅に超える値であり、治療効果を得るのに十分であると考えられます。また、最適化前のイオン化脂質を含有する CRISPR-LNP と比べてゲノム編集効率を約10倍向上させることに成功しました。また、ζ含有 CRISPR-LNP を単回投与してから TTR タンパク質をモニタリングした結果、12週間後も抑制効果が持続していることが確認されました(図3)。肝臓中のゲノム DNA を取り出し、標的 TTR 遺伝子領域の編集割合を次世代シーケンスにより解析したところ、約80%のゲノム DNA の編集が認められました(図4)。また、既に臨床で用いられている LNP 3 製剤に採用されている各イオン化脂質とのゲノム編集効率を比較したところ、ζは著しく高い効果を示すことが明らかになりました(図5)。

続いて、ζ含有 CRISPR-LNP をマウスに静脈内投与してから経時的にζの残存量を定量したところ、標的臓器である肝臓と次に移行量の多い脾臓においてζが迅速に排除されることが明らかになりました(図6)。イオン化脂質の分岐足場構造は搭載薬物の効率的な送達と LNP 製剤の安定性の向上に寄与する一方で、立体的な嵩高さによる内因性のエステラーゼの認識性が低いため生分解性に乏しいという課題がありました。イオン化脂質は生体にとっては異物であり、高濃度で長時間暴露されると生体に悪影響を与えるリスクが生じるため、生分解性は重要な特性の一つと考えられます。ζは分岐位置がエステラーゼの基質となるエステル結合から距離が離れており、エステラーゼによる認識を阻害しなかったとために優れた生分解性を示したと考えられます。

最後に、ζ含有 CRISPR-LNP を単回投与した後の血液生化学及び病理学的検査により毒性を評価したところ、いずれの項目も目立った変化は認められず、ζ含有 CRISPR-LNP の優れた安全性が示されました。

【今後への期待】

本研究成果はイオン化脂質の設計により RNP 送達効率を飛躍的に向上可能であることを示し、その設計指針の一端を明らかにしました。構築した CRISPR-LNP は安全性に優れると共に、肝臓において十分なゲノム編集効率の誘導が可能であることから、肝臓を標的臓器とした代謝性疾患等に対する治療薬としての実用化が期待されます。また、本研究により得られたイオン化脂質の設計指針を基に、より優れた脂質分子の設計や、肝臓外組織や細胞を標的とした CRISPR-LNP の開発に繋がることが期待されます。

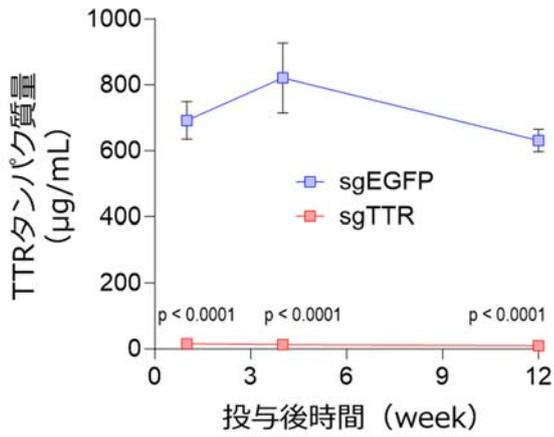


図 3. ζ含有 CRISPR-LNP によるゲノム編集効果の持続性

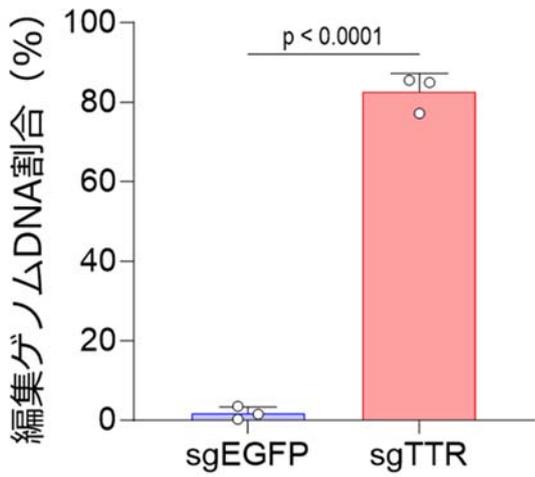


図 4. ζ含有 CRISPR-LNP による標的ゲノム DNA 領域の編集割合

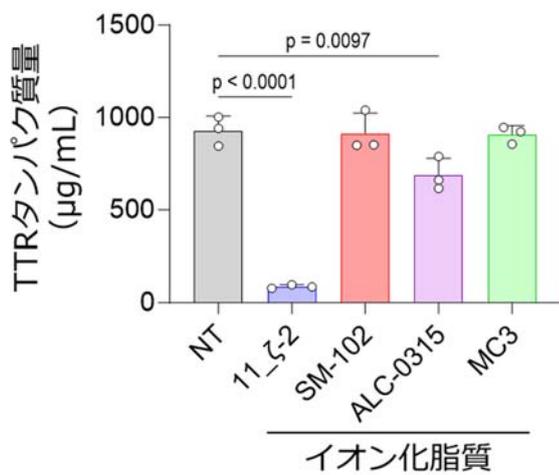


図 5. 市販イオン化脂質とのゲノム編集効率の比較

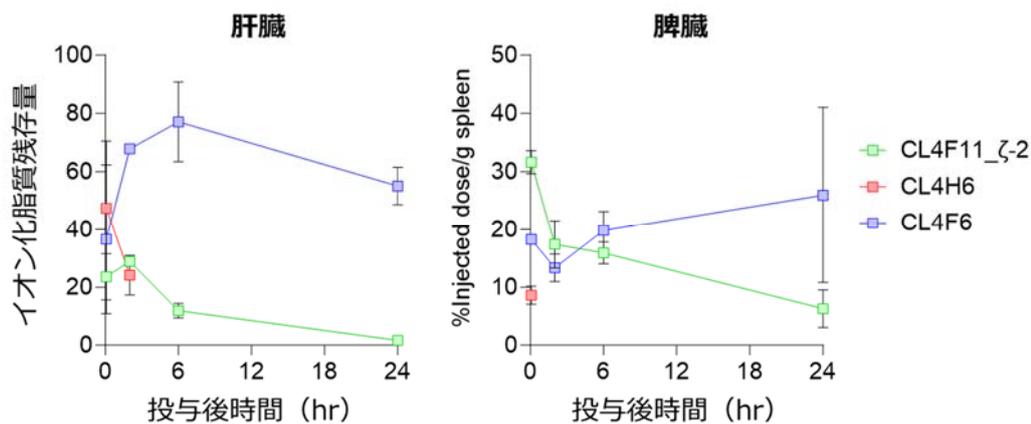


図 6. ζ の臓器内残存量の時間推移

【用語解説】

- * 1 ゲノム編集 … 遺伝情報が保存されているゲノムDNA上の特定の塩基配列を狙って操作する技術のこと。
- * 2 LNP … 複数種の脂質を主成分とする直径数十nmから数百nmのナノ粒子のこと。
- * 3 CRISPR/Casシステム … 標的遺伝子を簡便かつ安価に改変できるゲノム編集ツール。sgRNAが特異性、Cas9タンパク質が遺伝子の切断を担う。
- * 4 DDS … Drug delivery systemの略語。薬物の体内動態を量的・空間的・時間的に制御する手法のこと。薬効の最大化と副作用の低減が期待される技術。
- * 5 RNP … 核酸とタンパク質の複合体のこと。
- * 6 イオン化脂質 … LNP の最も主要な構成脂質であり、pH の低下に応答して電気的中性から正電荷へ変化する特性を示す。RNP の搭載や細胞質への送達に非常に重要な成分。