

## 炎症・免疫制御におけるゲノム編集（ゲノム医療）

# ゲノム編集 2.0 時代の精密遺伝子治療

相田知海<sup>1~4</sup>

<sup>1</sup>McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology,

<sup>2</sup>Stanley Center for Psychiatric Research, Broad Institute of MIT and Harvard,

<sup>3</sup>MIT Japanese Posdocs/PhD students/Professionals Network (MIT-JPN), <sup>4</sup>J-Broadies.

### はじめに

アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャー RNA (mRNA) ワクチン、CAR-T、ウイルスベクター、そして clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) ゲノム編集と、ここボストンはバイオテックゴールドラッシュに沸いている。なかでも CRISPR によるゲノム編集はバイオ業界のゲームチェンジャーとして大きな期待を集めている。本稿ではとくに遺伝子治療に焦点をあて、精密化する技術革新（ゲノム編集 2.0）とボストンスタートアップ企業群による臨床展開を紹介する。

### 1. CRISPR—栄光と挫折

2012年のCRISPRゲノム編集発明以降の熱狂は、昨年 of Emmanuelle Charpentier と Jennifer Doudna のノーベル賞受賞で頂点に達し、そして終焉に向かいつつある。ゲノム編集に伴うさまざまな副作用が気づきつぎと明らかになったのだ。まず CRISPR = ゲノム編集ではない。分子のハサミと表現される CRISPR の役割は、あくまで標的 DNA 部位の切断であり、切断されたゲノムの編集自体は細胞の DNA 修復機構により実行される。

つまりゲノム編集は細胞任せで制御不能の現象である。DNA 二本鎖切断により、切断部位への indel 挿入によるノックアウト、または修復ドナー DNA 存在下で相同組換えによるノックインが起こるものの、編集結果は調べるまでわからない（古典的ゲノム編集、**図 1**）。類似配列まで切断するオフターゲット問題に加え、近年は DNA 二本鎖切断に伴う染色体の交差や大規模欠損、ヘテロ接合性消失、染色体破砕や切断部位へのベクターの組込みなど、オンターゲット問題が気づきつぎと明らかになっている<sup>1)</sup>。実際、先行する Allogene Therapeutics の TALEN を用いた古典的ゲノム編集 CAR-T 治療は、血球低下と染色体異常 CAR-T 発生のため、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) により停止に追い込まれた（ゲノム編集との因果関係は現時点で不明<sup>2)</sup>）。CRISPR ゲノム編集による遺伝子治療の普及には、これらの不確実性の排除が必須であろう。

### 2. ゲノム編集 2.0

編集を制御して精密な改変を実現するゲノム編集 2.0 が現在の主流になりつつある。ゲノム編集 2.0 は、不活化 Cas タンパクを標的への接続手段

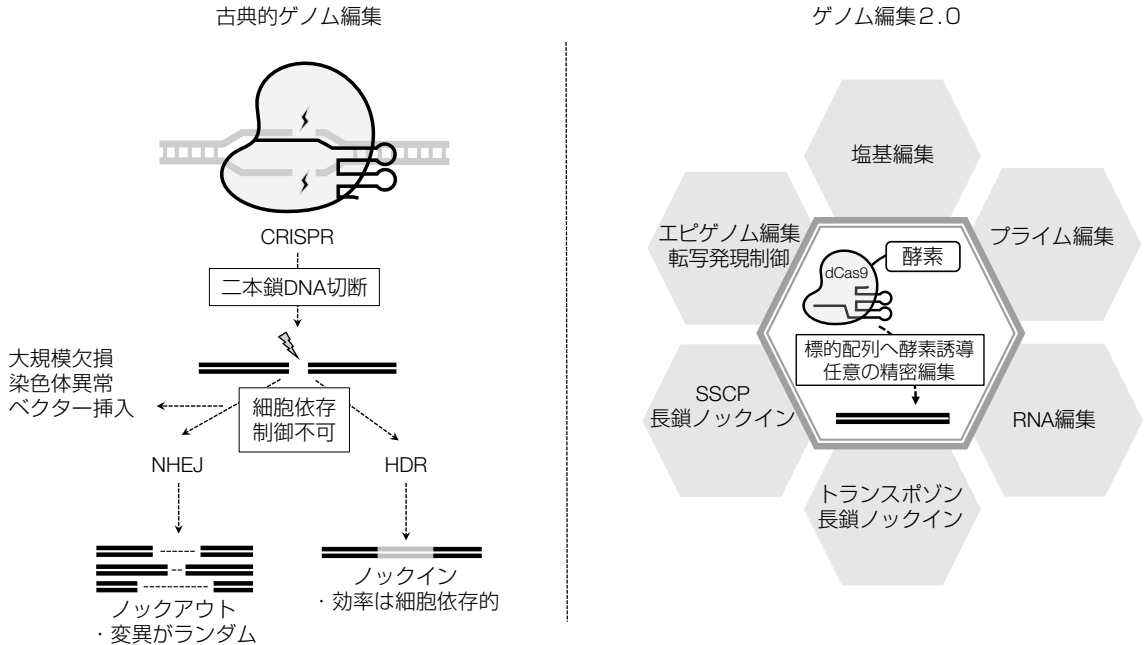


図 1. 古典的ゲノム編集とゲノム編集 2.0

NHEJ : non-homologous end-joining, HDR : homology-directed repair, dCas9 : dead-Cas9, SSCP : single-stranded DNA-annealing proteins

(中出翔太ほか, 2020<sup>3)</sup>より改変引用)

として用い、ゲノム編集自体は DNA 二本鎖切断に依存せず、Cas に融合した多様な酵素が予測可能かつ制御可能な形で実行する(図 1)<sup>3)</sup>。最も成功したゲノム編集 2.0 は、DNA 二本鎖切断および修復ドナー DNA なしで標的塩基を直接書き換える塩基編集であろう。DNA 切断活性をもたない dead-Cas9(dCas9)または Cas9-nickase(nCas9)に脱アミノ化酵素を融合、標的部位のシトシンをチミンまたはグアニンに、アデニンをグアニンに直接変換する。これを上回る可能性をもつプライム編集は、逆転写酵素を nCas9 に融合、ガイド RNA 末端に付加された配列を鋳型として、任意の編集を標的ゲノムに逆転写反応で書き込んでいく。塩基置換、欠失、挿入とすべての編集様式に対応する万能手法である<sup>4)</sup>。さらに CRISPR と協働するトランスポゼースは、DNA 二本鎖切断および相同組換え非依存に長鎖 DNA のノックインを可能にした。転写制御、エピゲノム編集、ゲノ

ム高次構造編集、ゲノムイメージング、RNA 塩基編集と、ゲノム編集 2.0 は大きく広がっている。

### 3. CRISPR 医療の幕開け

2019 年以降、続々と古典的 CRISPR を基盤とした第一世代ゲノム編集の臨床試験が開始されており、めざましい成果をあげている(図 2)<sup>1)5)</sup>。昨日までの不治の病が今日には CRISPR で治る病気になったのである。

最初の成功は鎌状赤血球症と  $\beta$  サラセミアであった。CRISPR Therapeutics は、転写抑制因子 BCL11A の赤血球特異的エンハンサーを CRISPR で破壊することで、胎児性ヘモグロビンの  $\gamma$ -グロビンの発現を回復させた。編集効率は 80% に達し、*ex vivo* で編集された自家 CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞を移植された患者は輸血不要となり、さらに鎌状赤血球症患者では血管閉塞症が消失、根本的な治療に成功した<sup>6)</sup>。治療を受けた最初の鎌状赤血球症患者

開発主体	治療薬	対象疾患	標的遺伝子	原理	開発段階
CRISPR Therapeutics	CTX001	鎌状赤血球症 βサラセミア	<i>BCL11A</i>	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> ゲノム編集により、 <i>BCL11A</i> の赤血球特異的エンハンサーを破壊、胎児型ヘモグロビンの発現回復	第 I / II 相
Intellia Therapeutics	NTLA-2001	トランスサイレチンアミロイドーシス	<i>TTR</i>	LNP を介した <i>in vivo</i> ゲノム編集により <i>TTR</i> を減少	第 I / II 相
Editas Medicine	EDIT-101	レーバー先天黒内障 10 型	<i>CEP290</i>	AAV を介した <i>in vivo</i> ゲノム編集により <i>CEP290</i> イントロン変異の破壊、 <i>CEP290</i> の発現回復	第 I / II 相
Intellia Therapeutics	OTQ923 HIX763	鎌状赤血球症	<i>BCL11A</i>	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> ゲノム編集により、 <i>BCL11A</i> の赤血球特異的エンハンサーを破壊、胎児型ヘモグロビンの発現回復	第 I / II 相
Editas Medicine	EDIT-301	鎌状赤血球症 βサラセミア	<i>HGB1/ HGB2</i>	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> ゲノム編集により、 <i>HGB1/HGB2</i> プロモーター改変、胎児型ヘモグロビンの発現回復	第 I / II 相 (鎌状赤血球症)
Locus Biosciences	LBP-EC01	尿路感染症	細菌ゲノム	Cas3 改変バクテリオファージを用いた病原性細菌除去	第 II 相
Sichuan University Chengdu MedGenCell	PD-1 欠損 T 細胞	非小細胞がん	<i>PD-1</i>	PD-1 欠損 T 細胞による非小細胞がん治療	第 I 相
University of Pennsylvania	NYCE T 細胞	多発性骨髄腫 骨肉腫	<i>PD-1/ TRAC/ TRBC</i>	PD-1/内在性 T 細胞受容体 (TRAC/TRBC) 欠損 NY-ESO-1 CAR-T による多発性骨髄腫、骨肉腫治療	第 I 相
Graphite Bio	GPH101	鎌状赤血球症	β-グロビン	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> ゲノム編集により、β-グロビン遺伝子変異を相同組換えで修復、成人型ヘモグロビンの発現回復	2021 年 第 I / II 相予定
UCSF, UCLA, UC Berkeley	CRISPR SCD001	鎌状赤血球症	β-グロビン	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> ゲノム編集により、β-グロビン遺伝子変異を相同組換えで修復、成人型ヘモグロビンの発現回復	2021 年 第 I / II 相予定
Excision Bio-Therapeutics	EBT-101	HIV	HIV ゲノム	AAV を介した <i>in vivo</i> ゲノム編集により HIV ゲノム除去	2021 年 第 I / II 相予定
BEAM Therapeutics	BEAM-101 BEAM-102	鎌状赤血球症 βサラセミア	β-グロビン	自家 CD34 <sup>+</sup> 造血幹細胞の <i>ex vivo</i> 塩基編集により、β-グロビン遺伝子変異を修復して成人型ヘモグロビンの発現回復、またはプロモーター改変により胎児型ヘモグロビンの発現回復	2022 年 第 I / II 相予定
Verve Therapeutics	VERVE-101	家族性高コレステロール血症	<i>PCSK9</i>	LNP を介した <i>in vivo</i> 塩基編集により <i>PCSK9</i> を不活化、血中コレステロール濃度低下	2022 年 第 I / II 相予定
Prime Medicine	-	鎌状赤血球症 テイ-サックス病 プリオン病ほか	-	プライム編集による遺伝子治療、詳細未公表	-

図 2. CRISPR 遺伝子治療

グレーはゲノム編集 2.0 企業

TTR: トランスサイレチン (transthyretin), AAV: アデノ随伴ウイルスベクター (adeno-associated virus), LNP: 脂質ナノ粒子 (lipid nano particle)

(Sheridan C, 2021<sup>1)</sup>, Mullard A, 2020<sup>5)</sup>より改変引用)

者 Victoria Gray の劇的な回復はメディアで広く報じられ CRISPR がもたらした革命を世に知らしめた。進行中の第 I / II 相試験では計 20 名以上の患者が参加しており、いずれも劇的な治療成果が認められている<sup>7)</sup>。この成功は、CRISPR が難治疾患を制圧した第一歩として歴史に記録され、同時に基礎研究を迅速に臨床展開するためのスタートアップとボストンのバイオエコシステムの重要性を示した。

つづいて生体内での直接 CRISPR ゲノム編集 (*in vivo* ゲノム編集) も大きな成功を収めた。Intellia Therapeutics は、致死性疾患トランスサイレチンアミロイドーシスの患者に、原因のトランスサイレチン遺伝子を標的とした Cas9 mRNA と sgRNA を coronavirus disease 2019 (COVID19) mRNA ワクチンと同様の脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle : LNP) を介して静脈注射し、トランスサイレチンの血中タンパク質濃度をおよそ 90% 減少させることに成功した<sup>8)</sup>。この初の *in vivo* ゲノム編集の劇的な成功は、*ex vivo* ゲノム編集での細胞移植に伴うリスクを回避し、かつ一回の静脈注射で生涯つづく根本治療が得られる点で、CRISPR Therapeutics の成功をも上回る歴史的偉業といえる。これらは第 I 相試験のゲノム編集効率とトランスサイレチンの血中タンパク質濃度減少の途中報告であり、臨床症状改善の続報が待たれる。

Editas Medicine も、アデノ随伴ウイルスベクター (adeno-associated virus : AAV) を介した *in vivo* ゲノム編集によるレーバー先天黒内障 10 型 (Leber's congenital amaurosis : LCA10) の治療に取り組んでいる<sup>9)</sup>。これは LCA10 の原因となる CEP290 遺伝子の変異のうち、*de novo* スプライドナーサイトを形成する高頻度のイントロン点変異を網膜内に注射した CRISPR で除去し、正常な LCA10 の発現を回復させるものである。最初期に設立された CRISPR スタートアップではあるが、自社製品の開発には時間がかかっている印象

を受ける。第 I 相試験の初期解析 6 名の結果によると、安全性が確認され、成人低用量 2 名と成人中用量 3 名のうち中用量 2 名で、最高矯正視力、感度および/あるいは歩行試験の改善が認められた<sup>10)</sup>。この結果を受けて株価は暴落した。8 年かけてこの程度か、という厳しい市場の評価であった。対象が神経変性疾患であることも困難の一因であろう。高用量および小児の治験結果が待たれる。

#### 4. 精密 CRISPR 医療へ

これら初期の臨床試験は予想以上のきわめて大きな成功を収めた。一方、これらは DNA 二本鎖切断を用いる古典的ゲノム編集であり、予期せぬゲノム改変を誘導する可能性がある<sup>1)</sup>。それがたとえ低頻度であろうとも、とくに *in vivo* では、中長期的に重大な副作用を誘導する可能性があり、その検出や対処も容易でない。このためゲノム編集 2.0 のスタートアップ各社が、制御可能でより精密な遺伝子治療の開発を進めている (図 2)。これらは 2022 年から臨床試験に入り、急速に第一世代の CRISPR 遺伝子治療に取って代わると予想される。

BEAM Therapeutics は、塩基編集を用いた鎌状赤血球症と  $\beta$  サラセミアの遺伝子治療開発を進めている。90% 程度まで塩基編集効率を高め、原因となる  $\beta$  グロビンの遺伝子変異自体の修復、または  $\gamma$  グロビンプロモーターへの多型導入による活性化について前臨床試験を進めている。

Verve Therapeutics は *in vivo* 塩基編集による、野心的な心疾患予防法を開発している。塩基編集による PCSK9 遺伝子の不活化により血中コレステロール値を低下させ、冠動脈疾患を予防する。塩基エディター ABE mRNA と PCSK9 sgRNA を LNP でサルに投与したところ、PCSK9 タンパクは 90% 減少、血中コレステロール値は 60% 減少、これらが少なくとも 8 ヶ月継続、という大成功をおさめた<sup>11)</sup>。この結果は、ABE の単回投与で冠動脈疾患リスクの生涯にわたる大幅な低減が可能に

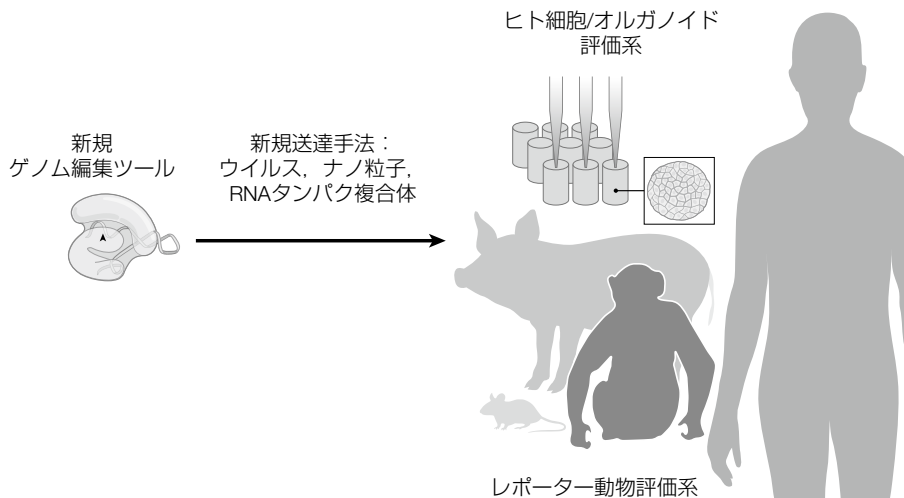


図 3. NIH 体細胞ゲノム編集計画

The United States National Institutes of Health (NIH) 体細胞ゲノム編集 somatic cell genome editing (SCGE) 計画は、CRISPR ゲノム編集を用いた遺伝子治療を加速するための、ゲノム編集ツール開発、送達手法開発、および評価系開発からなる基盤を構築する。遺伝子治療自体の開発は、SCGE の目的とせず、スタートアップがになる。日本人では筆者とマサチューセッツ総合病院の森實隆司教授が SCGE に参画している。

(Saha K *et al.*, 2021<sup>15)</sup>より改変引用)

なるという、非常に重要な意味をもつ。

## おわりに

CRISPR ゲノム編集遺伝子治療の実現と普及には、ゲノム編集手法自体の発展に加えて、種々の関連ブレークスルーが必要である。第一に送達技術があげられる。肝臓はすでに LNP 技術が確立されているが、たとえば脳は非常に困難である。AAV などのウイルスベクターは有用であるが、搭載可能な遺伝子サイズに制限があり、ゲノム編集ツールの小型化が重要である。つぎにゲノム編集ツールに対する免疫応答がある。サルに ABE を投与した場合、1 回目の投与で抗 ABE 抗体が誘導され、2 回目の投与では ABE が完全に不活化される<sup>12)</sup>。ゲノム編集評価のための霊長類動物モデルの重要性も急速に高まっている。たとえば、マウスモデルではみられなかった遺伝子治療の重篤な有害事象が、霊長類モデルで報告されている<sup>13)</sup>。中国、日本、筆者らのアメリカの各グループが遺

伝子改変霊長類モデル作出を進めている<sup>14)</sup>。最後に、アメリカ国立衛生研究所(national institutes of health: NIH)はゲノム編集の臨床展開を加速するため国家プロジェクト Somatic Cell Genome Editing(SCGE) Consortium<sup>15)</sup>を設立、上述のブレークスルー実現をめざしている(図 3)。

## 文献

- 1) Sheridan C: CRISPR therapies march into clinic, but genotoxicity concerns linger. *Nat Biotechnol* **39**: 897-899, 2021
- 2) Allogene Therapeutics reports FDA clinical hold of AlloCAR T trials based on a single patient case in ALPHA2 trial. (<https://ir.allogene.com/news-releases/news-release-details/allogene-therapeutics-reports-fda-clinical-hold-allo-car-t-trials>)
- 3) 中出翔太ほか: ゲノム編集 2.0. 医学のあゆみ **273**: 725-737, 2020
- 4) 相田知海ほか: ゲノム編集 “プライム” タイムへようこそ. *実験医学* **39**: 1194-1200, 2021

- 5) Mullard A : Gene-editing pipeline takes off. *Nat Rev Drug Discov* **19** : 367-372, 2020
- 6) Frangoul H *et al* : CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* **384** : 252-260, 2021
- 7) Vertex and CRISPR therapeutics present new data in 22 patients with investigational CRISPR/Cas9 gene-editing therapy, CTX001™ at European hematology association annual meeting. (<http://www.crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/vertex-and-crispr-therapeutics-present-new-data-in-22-patients-with-greater-than-3-months-follow-up-post-treatment-with-investigational-crispr-cas9-gene-editing-therapy-ctx001-at-european-hematology-association-an>)
- 8) Gillmore JD *et al* : CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* **385** : 493-502, 2021
- 9) Maeder ML *et al* : Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med* **25** : 229-233, 2019
- 10) Editas Medicine announces positive initial clinical data from ongoing phase 1/2 BRILLIANCE Clinical trial of EDIT-101 For LCA10. (<https://ir.editasmedicine.com/news-releases/news-release-details/editas-medicine-announces-positive-initial-clinical-data-ongoing>)
- 11) Musunuru K *et al* : *In vivo* CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature* **593** : 429-434, 2021
- 12) Rothgangl T *et al* : *In vivo* adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol* **39** : 949-957, 2021
- 13) Keiser MS *et al* : Toxicity after AAV delivery of RNAi expression constructs into nonhuman primate brain. *Nat Med* DOI : 10.1038/s41591-021-01522-3, 2021
- 14) Aida T *et al* : The dawn of non-human primate models for neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Genet Dev* **65** : 160-168, 2020
- 15) Saha K *et al* : The NIH somatic cell genome editing program. *Nature* **592** : 195-204, 2021