

遺伝子編集技術を用いた RNAミサイル療法実用化への開発研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
公衆衛生学
客員研究員
伊藤 達男

2019年9月5日

研究開発項目

研究対象因子： RNA およびRNA結合タンパク質

使用ツール： Cas13/dCas13 RNA 標的システム、RNAウィルスDDS系

標的経路： RNA発現、RNA修飾(エピトランスクリプトーム)周囲イベント、

機能性非コードRNAおよび、エピジェネティクス制御機構

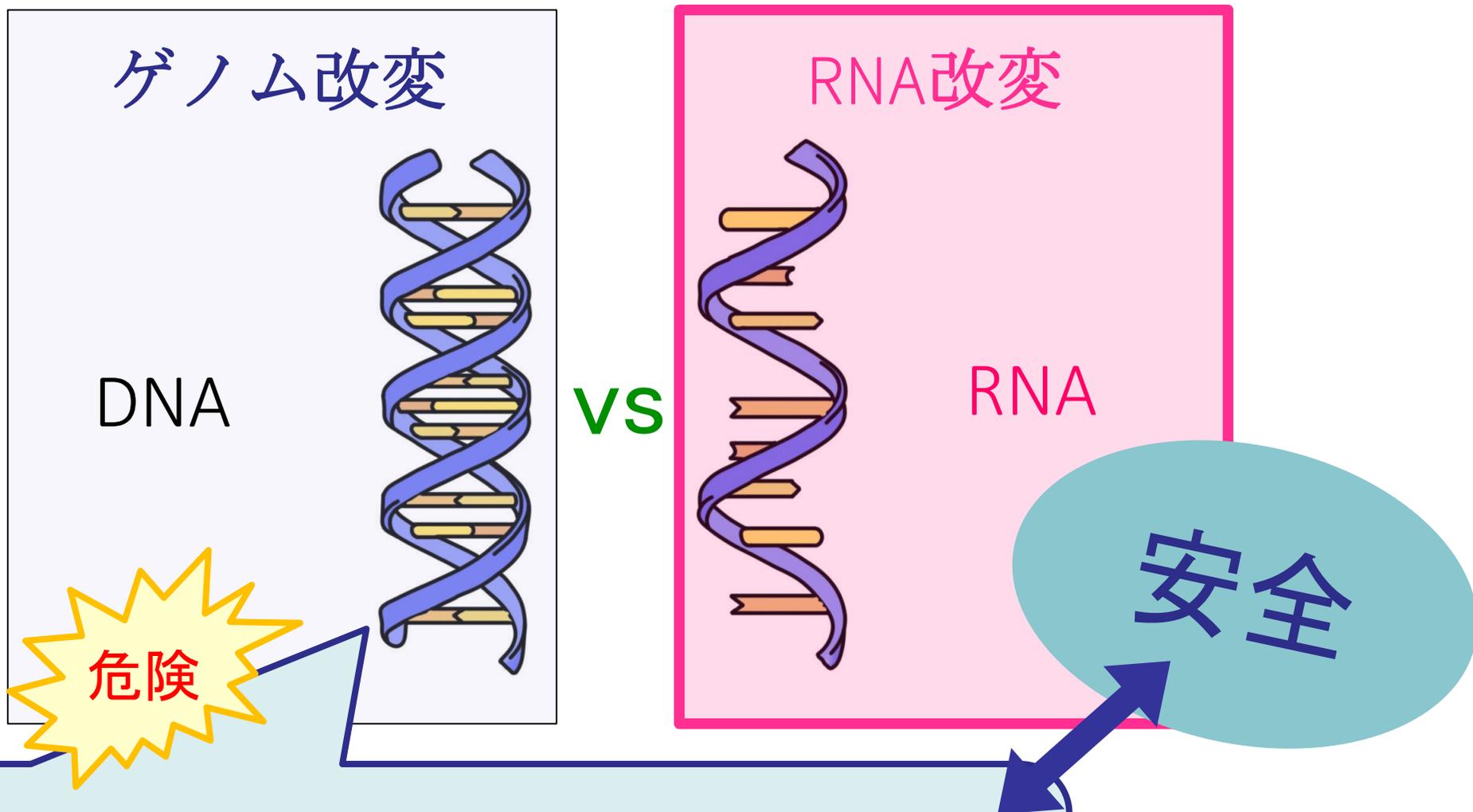
対象疾患： 特異的遺伝子発現難治性(希少)がん

エピトランスクリプトーム関連疾患 (拡張型心筋症、ALS)

RNA研究環境整備： Cas13専用crRNAデザインツールの開発

共同研究機関： ウィルス作成(産総研)、疾患モデル作成、治療試験(岡山大学、名古屋大学、国立がん研究センター)
対象疾患RNA提供、解析(UCSF、スタンフォード大)、crRNAデザイン(早稲田大)

従来技術とその問題点



ゲノム遺伝子改変技術の *in vivo* 利用における問題点

- ・ ゲノムへの侵襲性
- ・ 非特異的な遺伝子編集作用

Cas 13 : Cas 9 システムとのちがい？

- ・ 遺伝安全性

ゲノムの永久的な損傷を避けます。

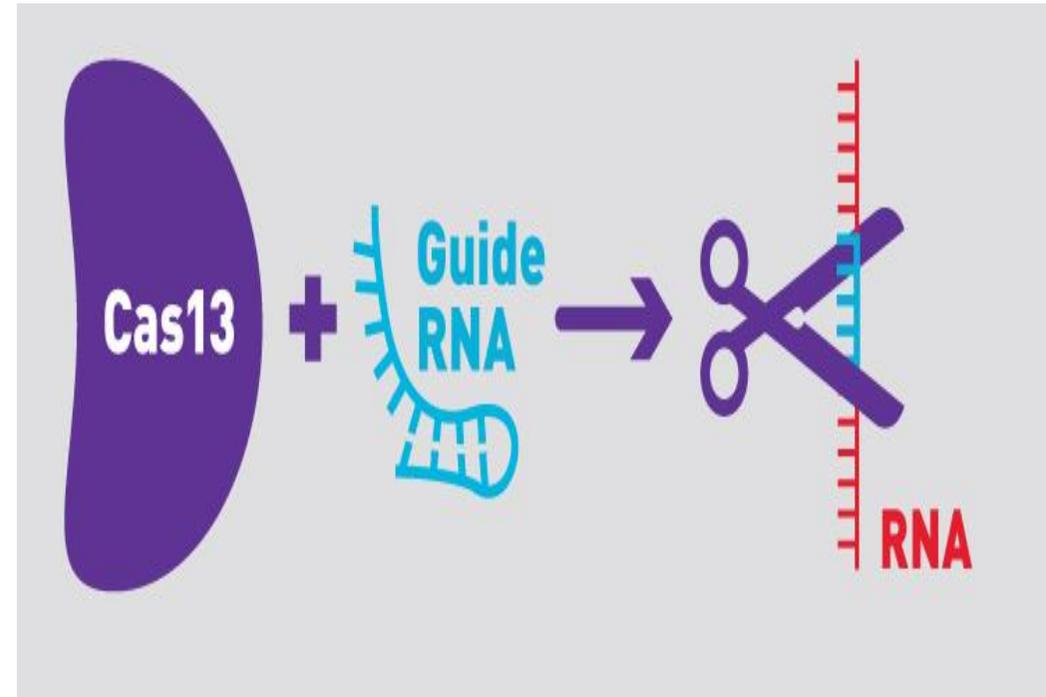
Cas13酵素はDNA切断に関与する活性ドメインを含まないので、直接ゲノムを編集することはできない

- ・ 編集効果は可逆的である

ゲノムのオフターゲットまたは非相同修復を介した予期せぬ組み換えをおこなさい

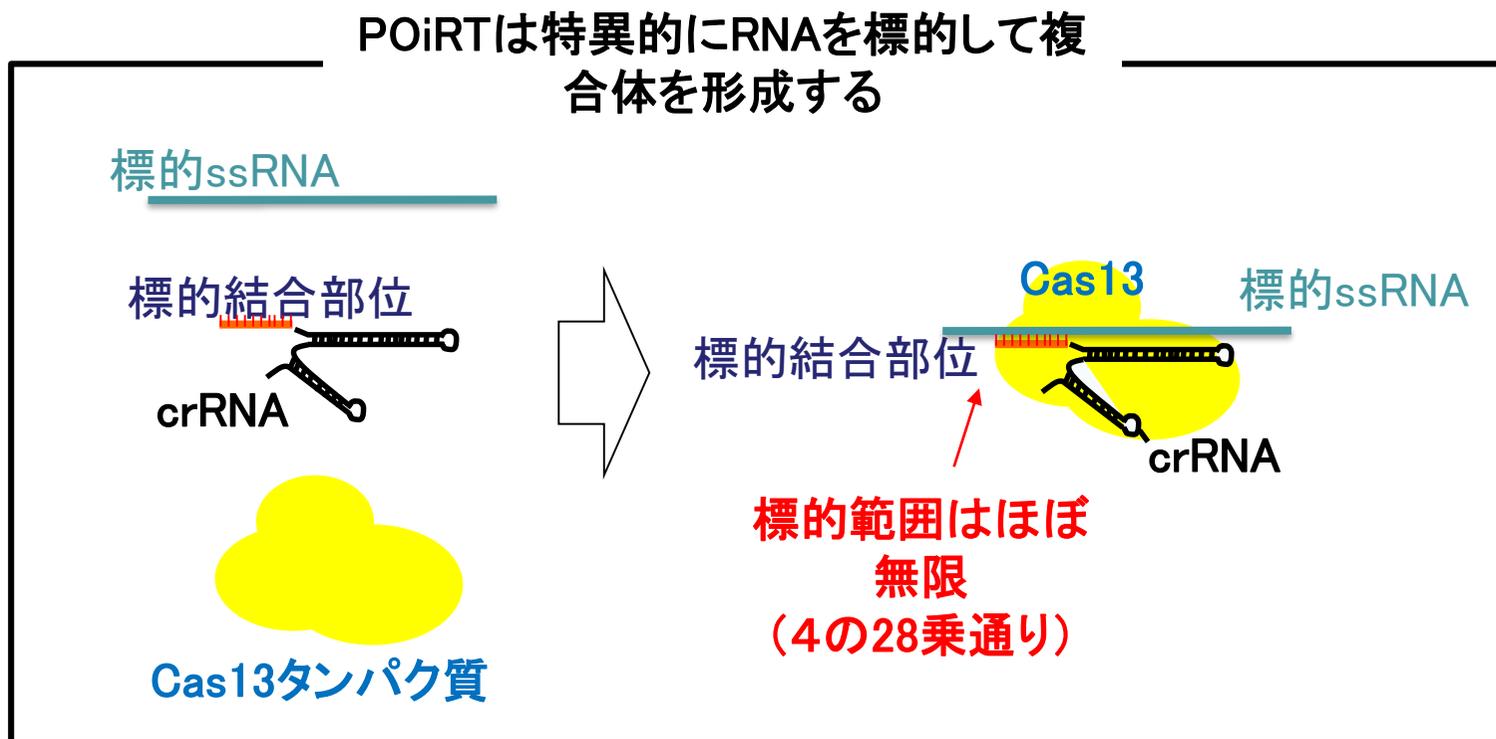
- ・ 静止細胞への適応

RNA編集は、相同組み換え修復（HDR）機構を必要とせず、非分裂細胞においもて使用され得る

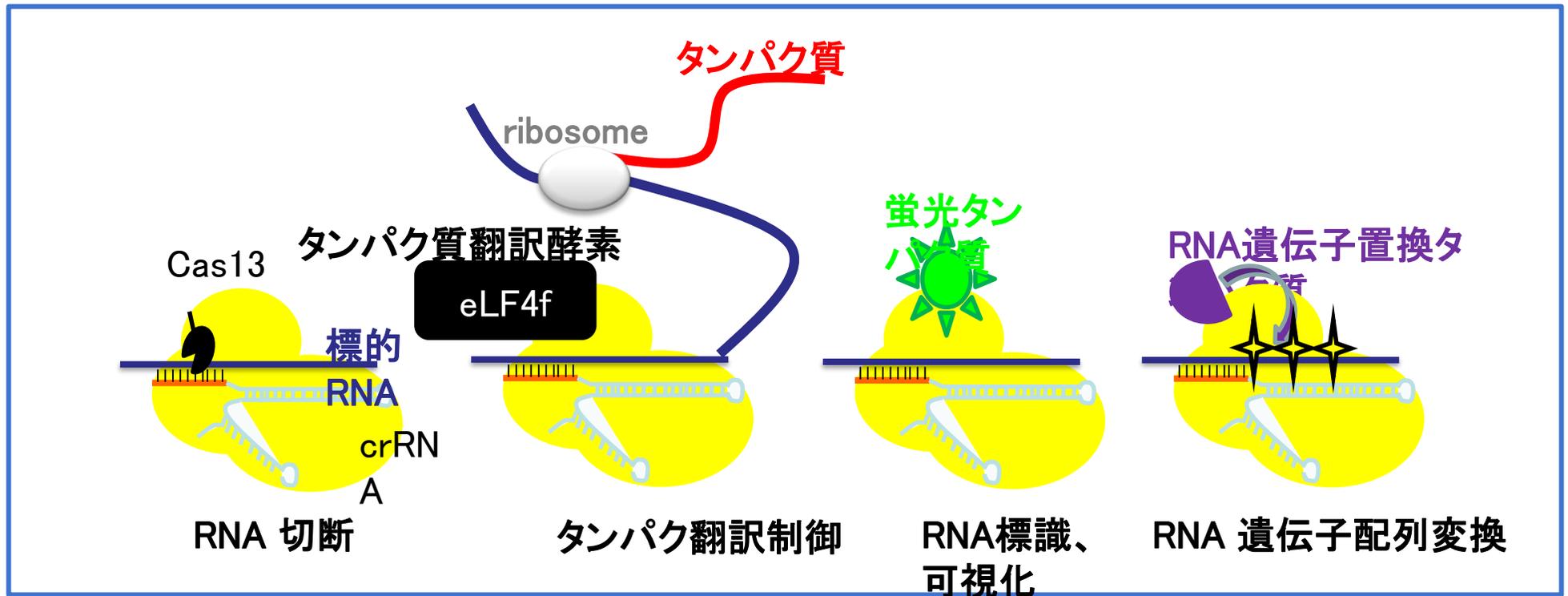


1: ヒト最適化Cas13システムの開発

POiRT基本システム



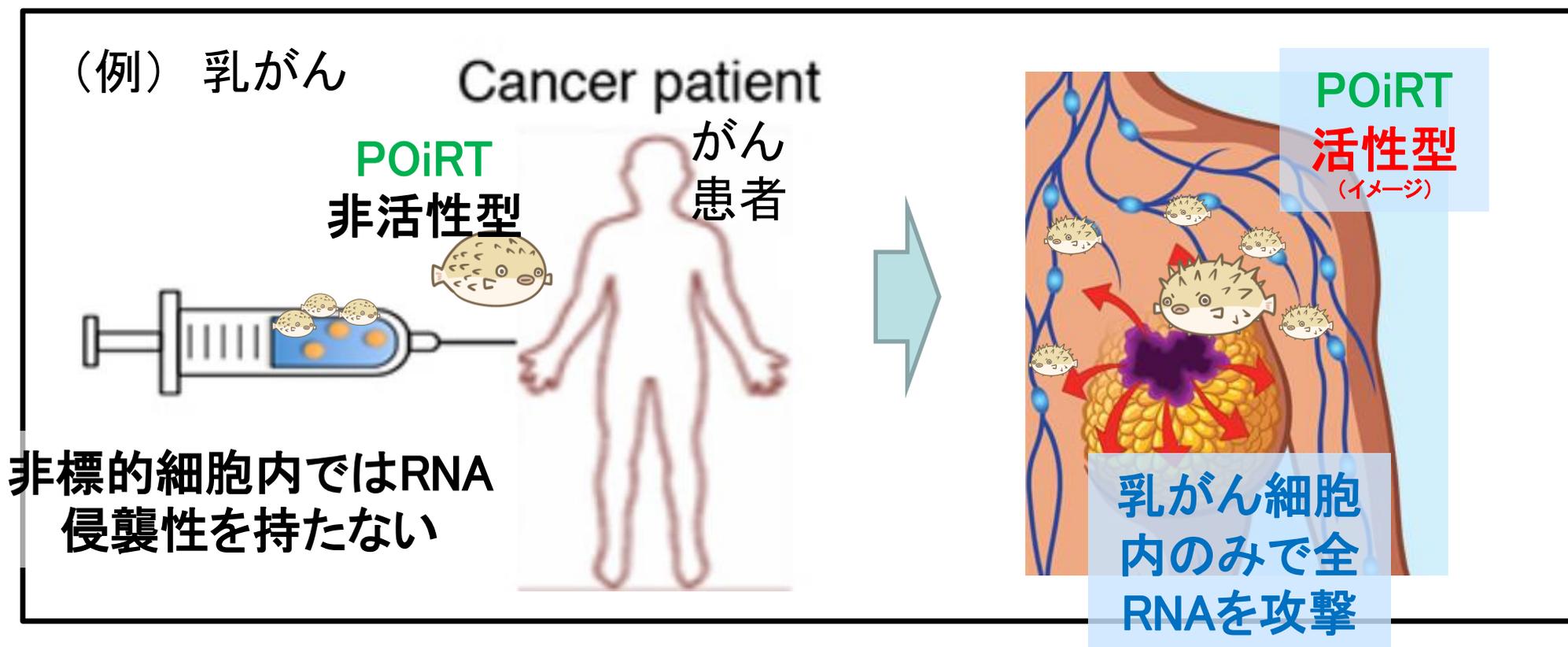
RNA編集で行えること



当該技術の簡略な内容説明

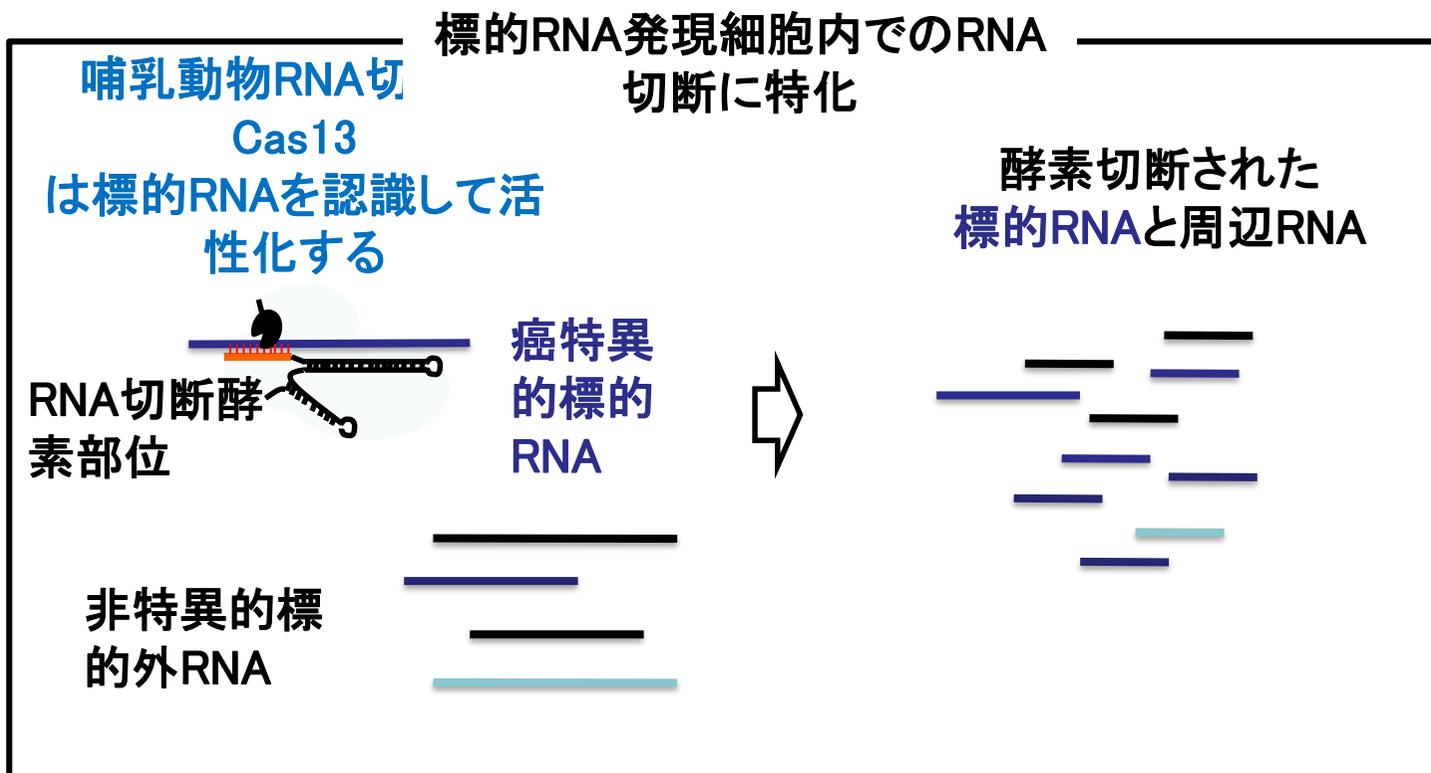
POiRTシステムの抗がん作用

がん細胞に到達するまではRNA侵襲作用を持たないハリセンボン型抗がんタンパク装置



POiRTシステムは、がん細胞認識機能をもつ
微小ハリセンボン型タンパク質ロボットです

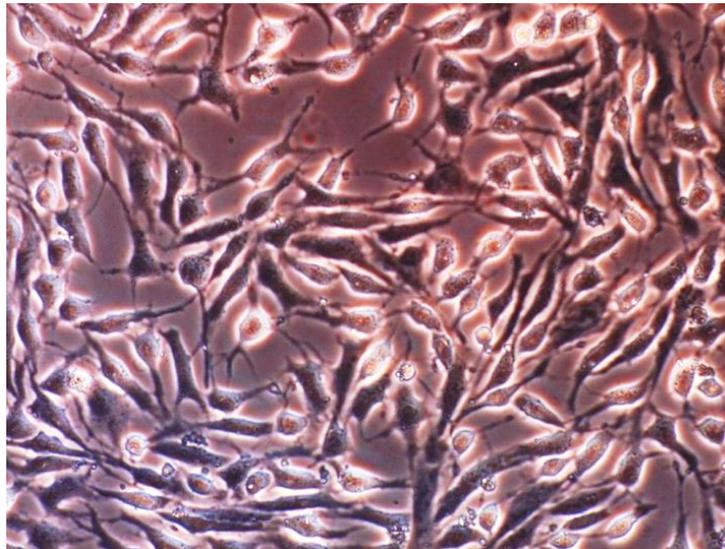
2: 癌細胞における病的遺伝子、 lncRNAの標的化



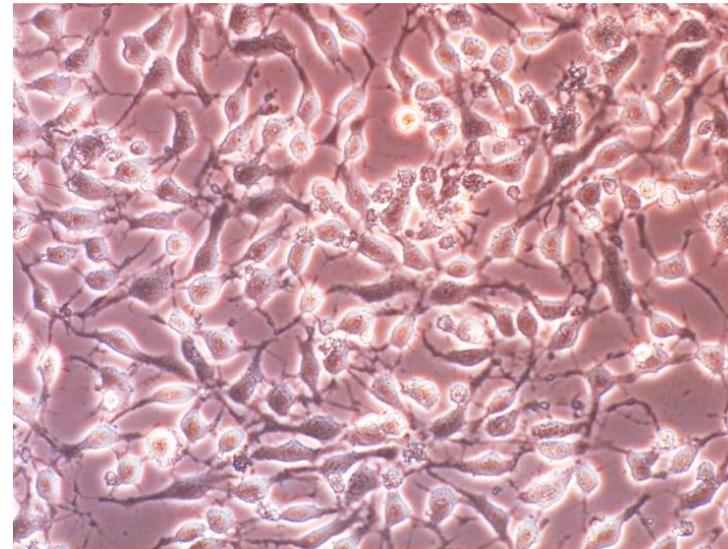
実験1結果:

on target crRNA導入細胞においてのみ
がん細胞死が顕著に確認された

crRNA
off target

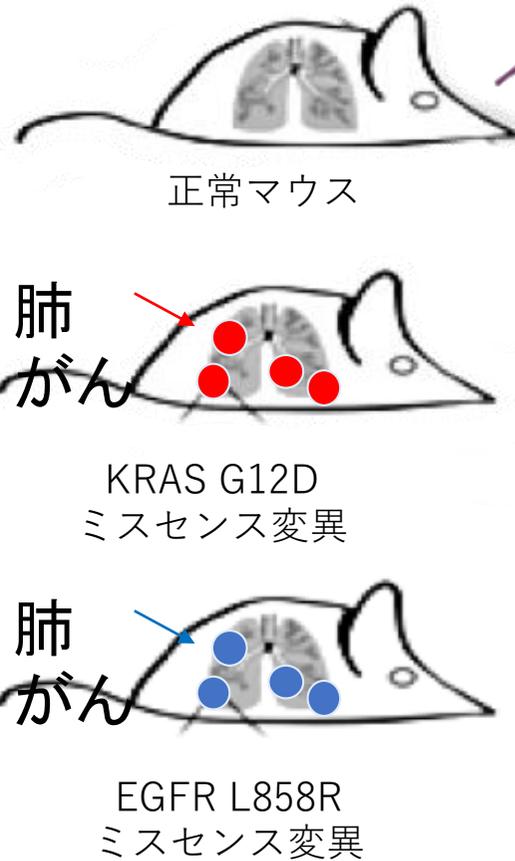


crRNA
On target



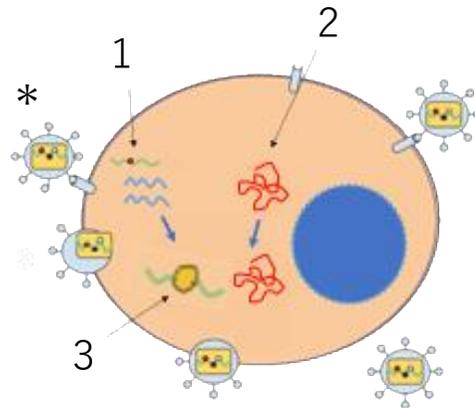
実験計画 : KRASがん治療

肺がんモデル動物



ウイルス治療薬投与

投与経路：
経鼻
経静脈

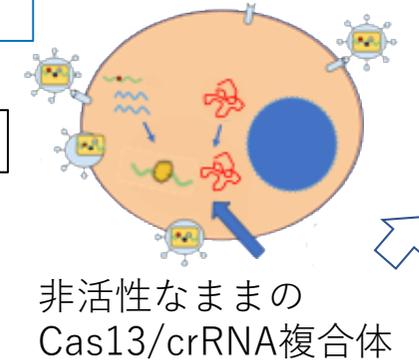


- 1 : Cas13/crRNA 遺伝子情報
- 2 : KRAS mRNA遺伝子
- 3 : Cas13/crRNA複合体
- * : POiRTシステム搭載
センダイウィルスベクター

治療効果

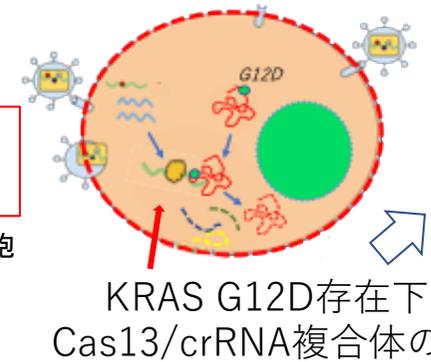
正常マウス

KRAS発現細胞生存
↓
選択的細胞障害なし



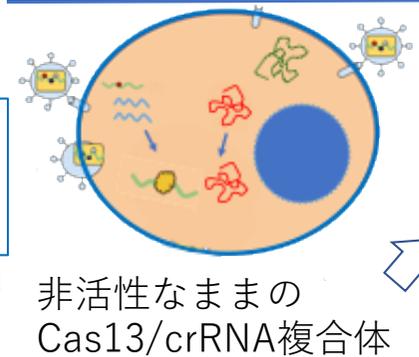
KRAS G12D
マウス

KRAS発現がん細胞
選択的細胞障害
↓
KRAS G12D
選択的治療効果あり

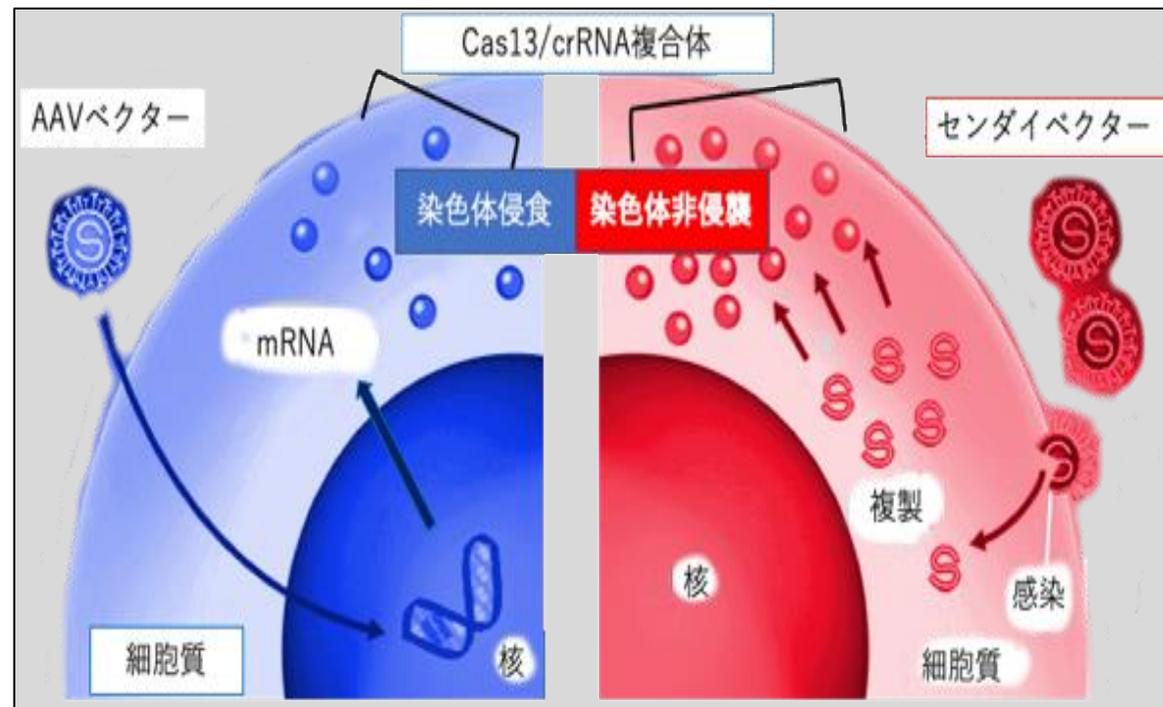


EGFR
L858R
マウス

EGFR発現がん細胞
生存
↓
選択的治療効果なし



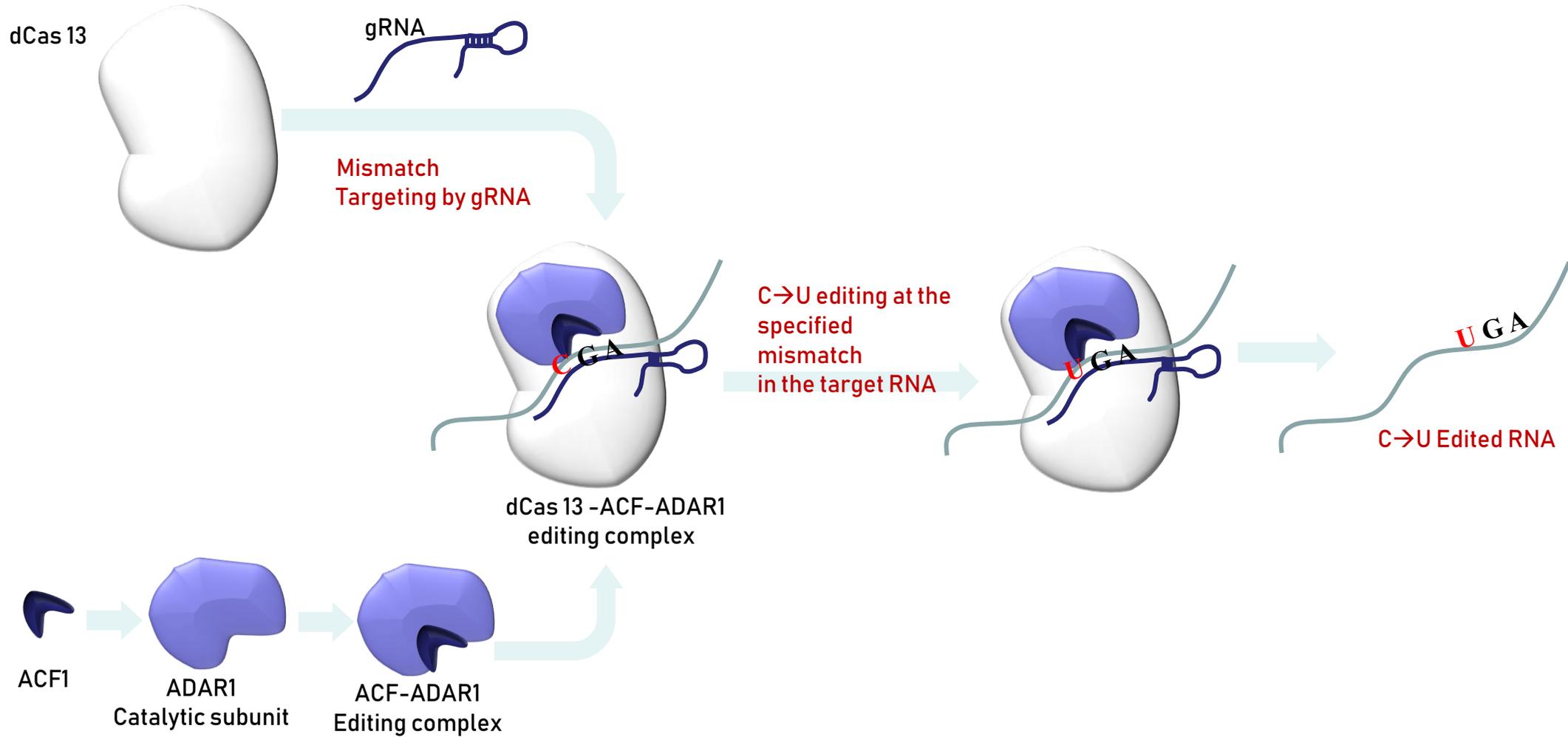
Cas13の臨床適応型ベクターの開発 RNAウィルスの利用



3: Cas RNA書き換えシステムの開発

Tool to target RNA

RNA書き換えを行う、RESCUEシステム

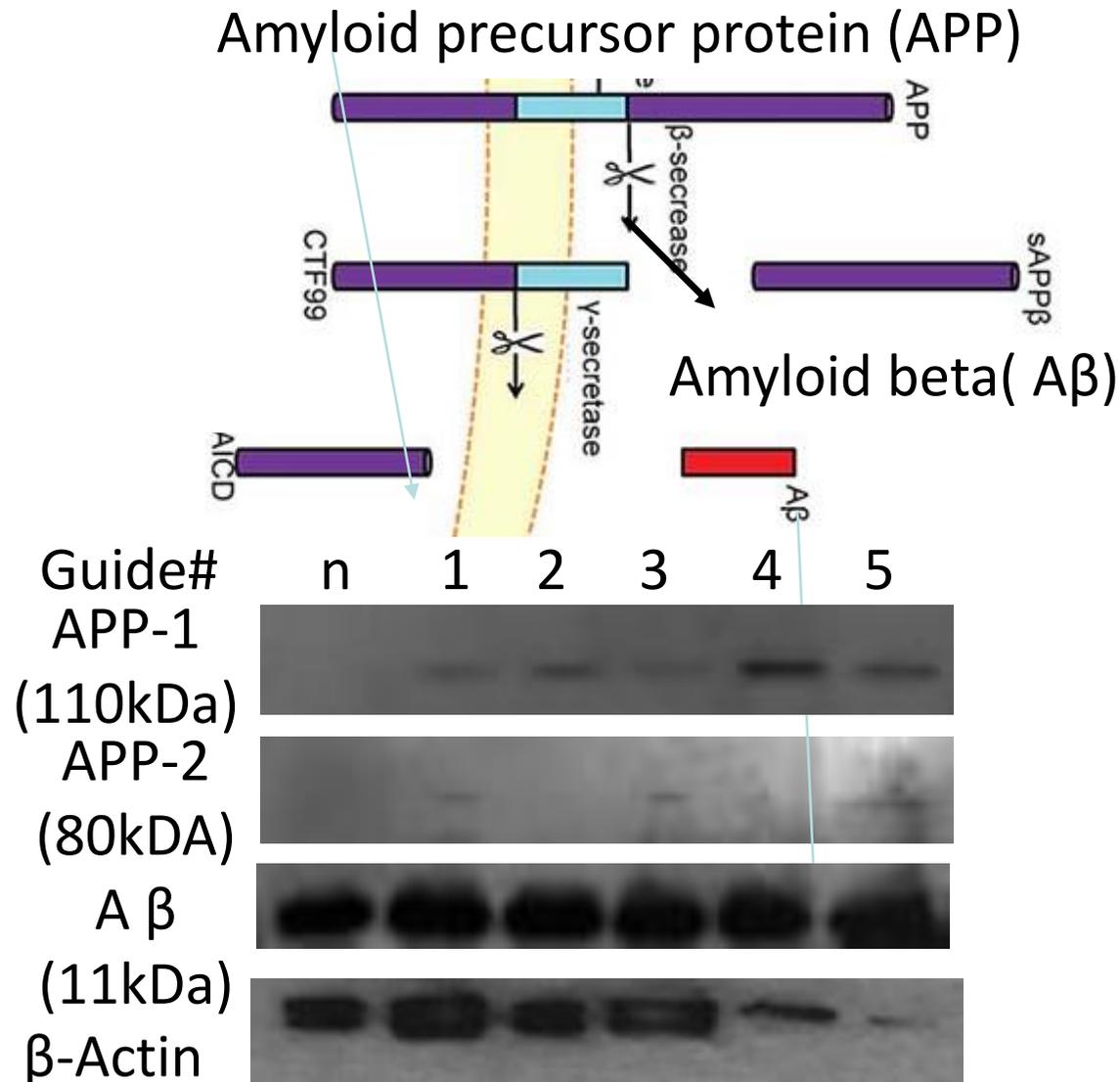


使用例1:

- アルツハイマー病の アミロイドベータ生成
阻害

治療方式: RNA書き換え

アミロイドβ RNAのREUCUE systemによる書き換え



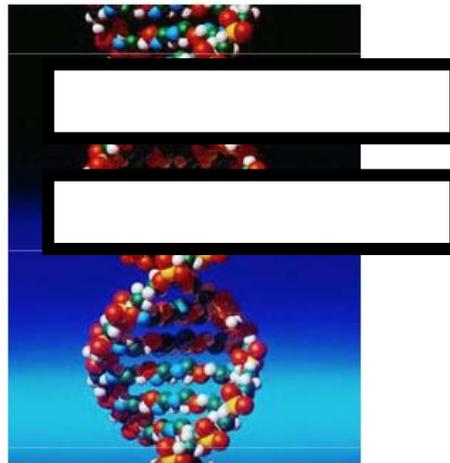
4: Cas 13a-PA転写物追跡システムの開発

Tool to target RNA

CRISPR/Casを用いて技術革新 ネクストブレイクスルーの可能性

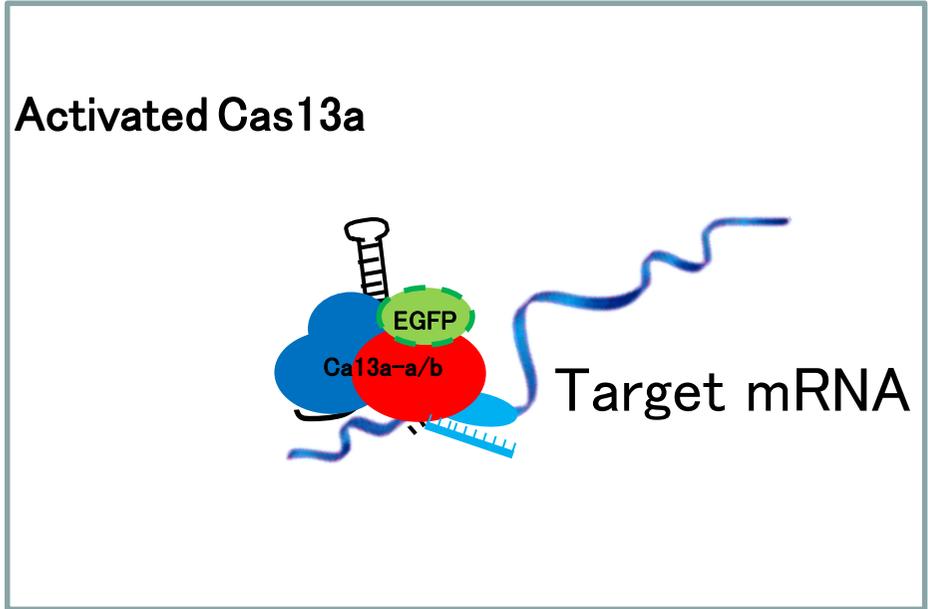
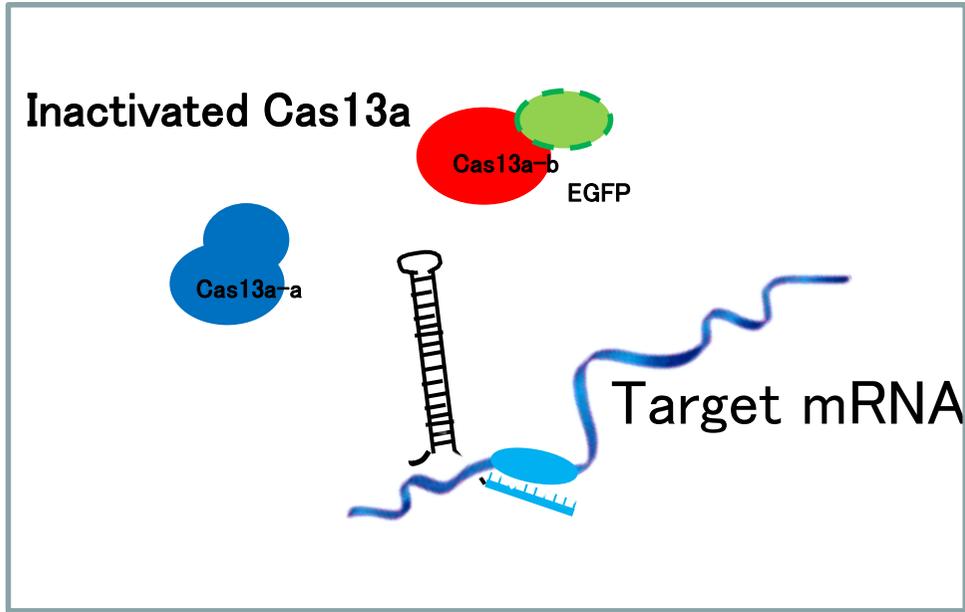


20,000 protein genes
(ENSEMBL.org)

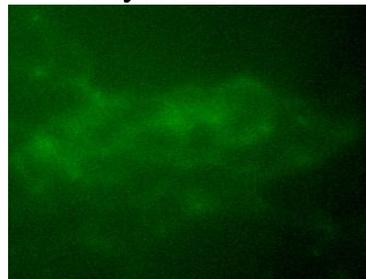


20,500 protein genes
(Clamp et PNAS 2007
104(49):19428-33)

Cas13 スイッチングシステムの開発

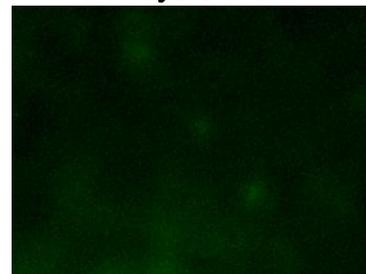


PA system off



GFP-dCas13 do not targeting XIST

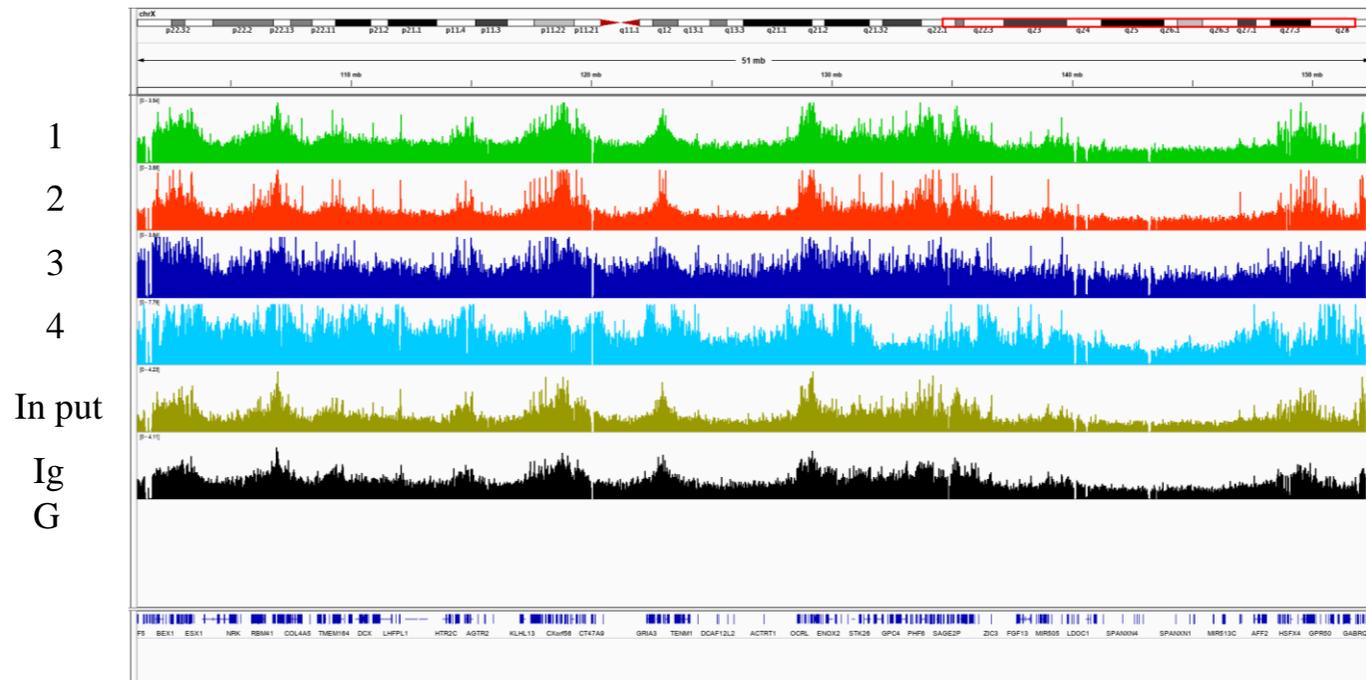
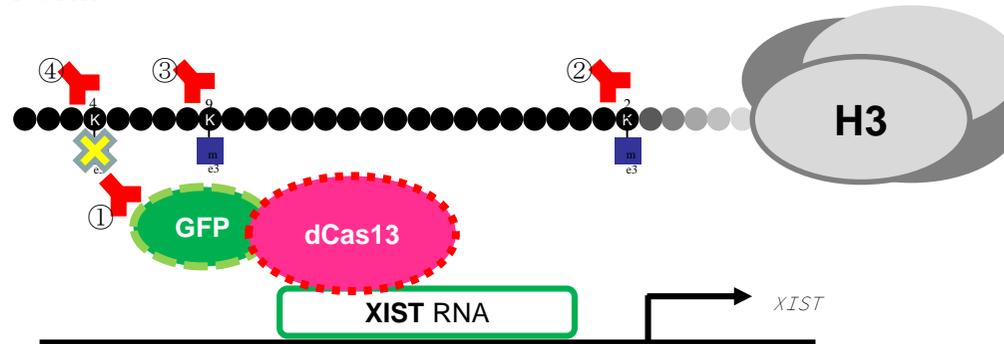
PA system on



GFP-dCas13 targeting XIST(in nucleus)

POiRTシステムの核酸工学研究への利用例

lncRNA ChIP



新技術の特徴・従来技術との比較

- ・ 従来技術の問題点であった、遺伝子侵襲性を改良することに成功した。
- ・ 従来のゲノム遺伝子改変は非特異的遺伝子効果の点で *ex vivo* の使用に限られていたが、一過性発現遺伝子であるRNAを対象とすることで、*in vivo* での遺伝子改変に踏み込むことが可能となった。
- ・ 本技術の広大な適用範囲により、メジャー疾患治療薬と同じ製造ラインで希少疾患治療薬を同時開発することが期待される。

POiRT RNA 編集システムの臨床利用における利点

	POiRT	TALEN/ZFN	RNAi	shRNA	CRISPR/Cas9
生細胞において利用可能	✓	✓	✓	✓	✓
RNA配列への直接編集機能	✓✓	✓✓			✓
標的 (RNA/DNA) 配列特異性	✓✓		✓	✓	
非特異的 RNA選択回避能力	✓✓	✓	✓	✓	
事業化実現時の単価(低価格)	✓		✓	✓	✓

想定される用途

- ・ 本技術の特徴をアンメット・メディカル・ニーズに生かすためには、特異的遺伝子変異をホモ発現したがんの治療薬に適用することが重要と考えられる。
- ・ 上記以外に、疾患原因遺伝子機能編集効果が得られることも期待される。
- ・ また、達成された向RNA性能に着目すると、RNA遺伝子工学といった分野や用途に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- ・ 遺伝子改変技術の *in vivo* 適応デリバリー方法として、ウィルスベクターのプロトタイプまで開発済み。
しかし、ウィルスベクター毒性検証が未解決である。
- ・ 今後、ウィルスベクター毒性について実験データを取得し、投与経路など全身投与に適用するための条件設定を行っていく。
- ・ 実用化に向けて、RNA改変酵素複合体の細胞内取り込み精度を、アデノ随伴ウィルスと同程度まで向上できるように技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- ・ 未解決のウィルスベクター以外の *in vivo* 導入担体の開発については、エクソソーム、リポソーム 技術により克服できると考えている。
- ・ 巨大核酸の生体内投与技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- ・ また、遺伝子治療薬を開発中の企業、核酸研究分野への展開を考えている企業、また核酸のスクリーニングができる企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称 : RNA改変技術の特異的RNA遺伝子対応遺伝子治療応用技術
- ・ 出願番号 : 特願2018-67565
- ・ 出願人 : 岡山大学
- ・ 発明者 : 伊藤達男、東出望花、荻野景規

お問い合わせ先

◆岡山大学 産学連携・技術移転本部

TEL 086-251-8463

FAX 086-251-8467

e-mail sangaku@okayama-u.ac.jp

<http://www.orpc.okayama-u.ac.jp/>

◆岡山大学 医歯薬学総合研究科 公衆衛生学

TEL 086-235-7184

FAX 086-226-0715

e-mail tataito@okayama-u.ac.jp