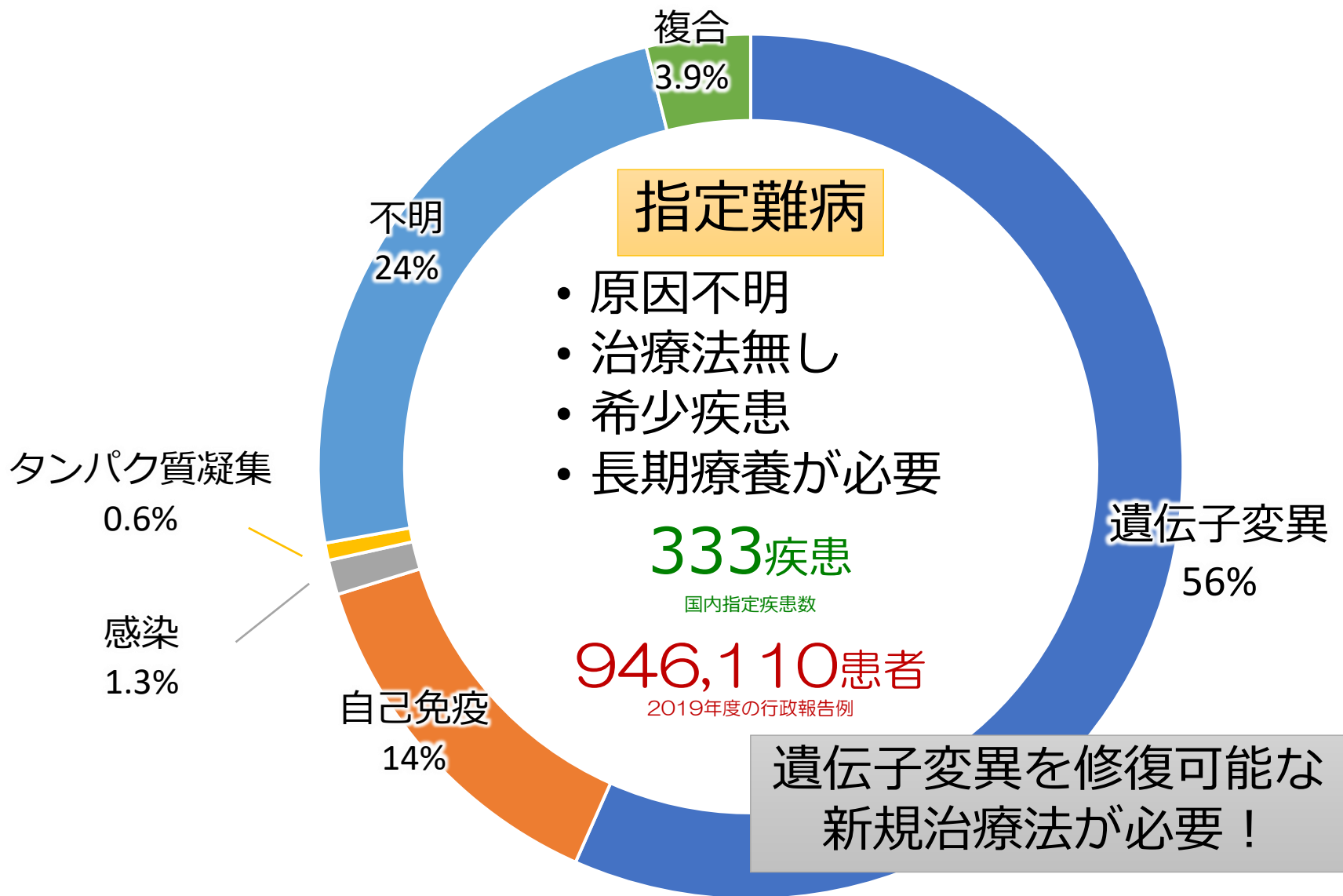


2022年6月28日(火) 11:30～11:55
オンライン開催

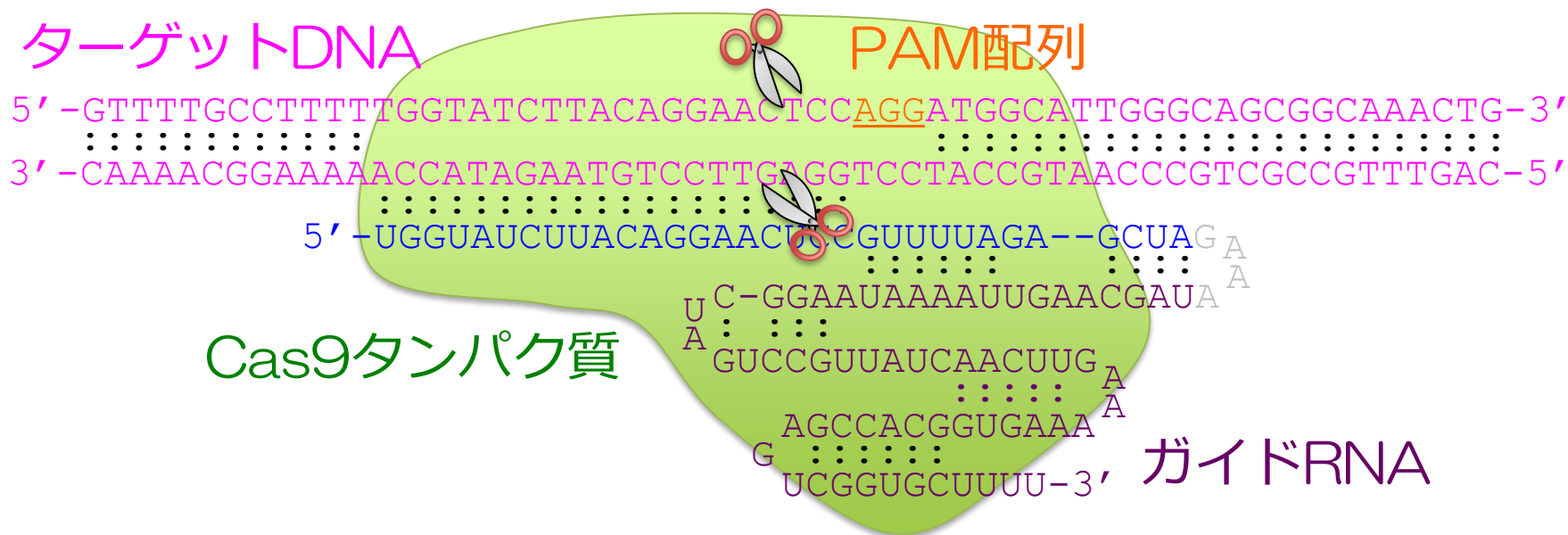
ゲノム編集酵素を安全に効率よく 生体組織に送達できる NanoMEDICウイルス様粒子システム

京都大学 iPS細胞研究所 臨床応用研究部門
主任研究員/准教授 堀田 秋津

堀田研究室のVision



DNAのハサミ CRISPR-Cas9



クリスパー:

細菌で発見された、RNA依存性DNA切断システム
2020年にノーベル化学賞を受賞

如何に患者骨格筋へ届けるか？

体重の4割は骨格筋 ⇒ 効率的な細胞への送達技術が必要

 多くのグループはAAVベクターを使用

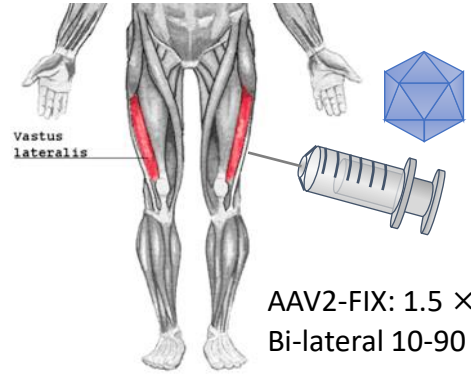


モデル動物	送達	参考論文
<i>mdx</i> mouse	卵注入	Long C. et al., Science, 2014
<i>mdx</i> mouse	AAV9	Tabebordbar M. et al., Science, 2016
<i>mdx</i> mouse	AAV8	Nelson CE. et al., Science, 2016
<i>mdx</i> mouse	AAV9	Long C. et al., Science, 2016
<i>mdx</i> mouse	Adeno	Li X. et al., Mol. Ther, 2016
<i>mdx^{4cv}</i> mouse	AAV6	Bengtsson et al., Nat Commun, 2017
<i>mdx50</i> mouse	AAV9	Amoasii L et al., Sci Trans Med, 2017
Ex23 indel mouse	AAV2/9	Koo T et al., Mol Ther, 2018
ΔE50-MD dog	AAV9	Amoasii L et al., Science, 2018
Δ52hDMD/ <i>mdx</i> mouse	AAV9	Duchêne BL et al., Mol Ther, 2018
<i>mdx44</i> mouse	AAV9	Min YL et al., Sci Advances, 2019
ΔEx50-Dmd-Luc mouse	AAV9	Amoasii L et al., Nat Commun, 2019
DMDΔ52 pig	AAV6	Moretti A et al., Nat Med, 2020

AAVベクターの課題

(AAV: アデノ随伴ウイルスの略)

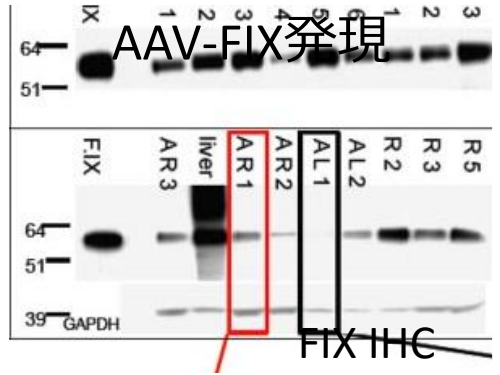
血友病B患者



AAV2-FIX: 1.5×10^{12} vg/site
Bi-lateral 10-90 sites into Vastus lateralis

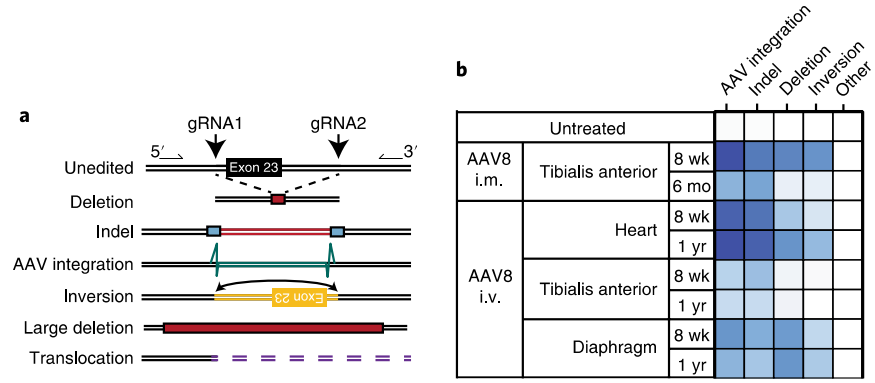


年オーダーの長期持続発現

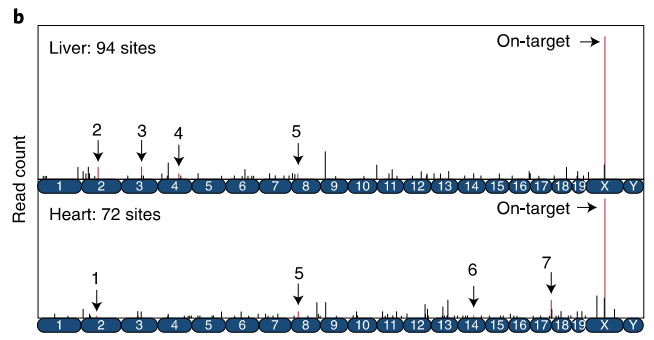


[Buchlis G et al., Blood, 2012]

AAV-Cas9ベクターをマウスに投与



AAVベクター断片がゲノムに挿入

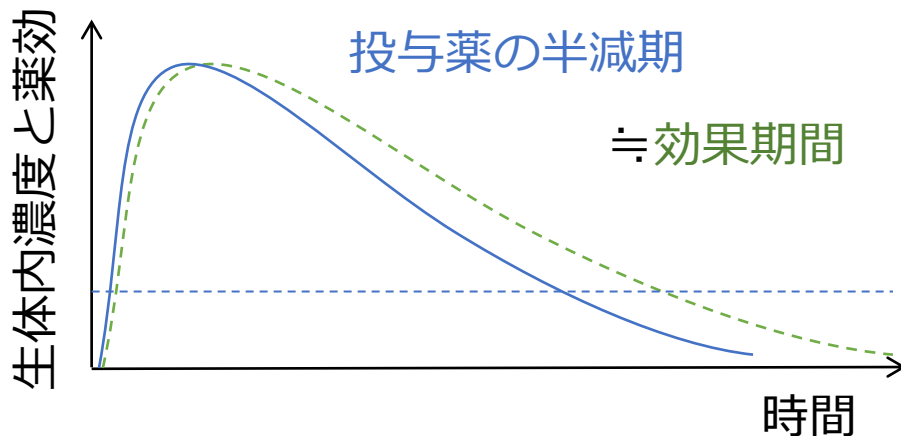


[Nelson CE et al., Nature Med, 2019]

AAVベクターに変わる、一過性の送達技術が必要

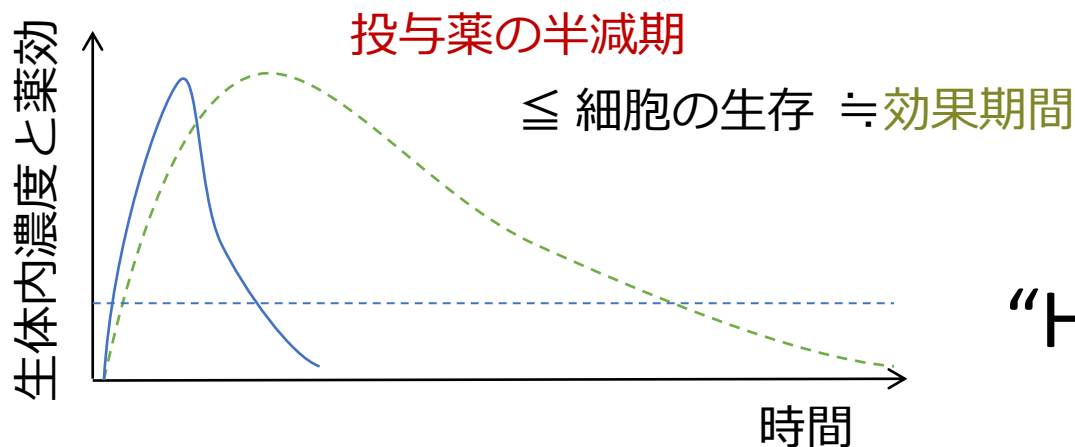
ゲノム編集の新コンセプト: 半減期

今までの薬剤



“Hit & Stay”

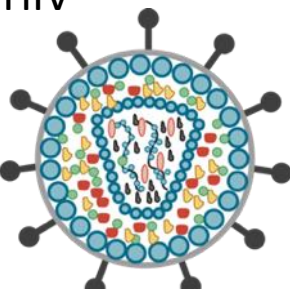
ゲノム編集薬、ワクチン



“Hit & Away”

独自の一過性送達システム開発

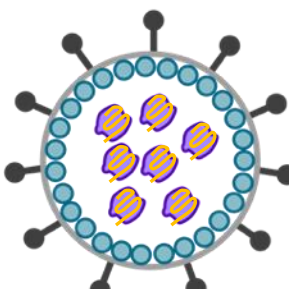
HIV



▶ ウイルス

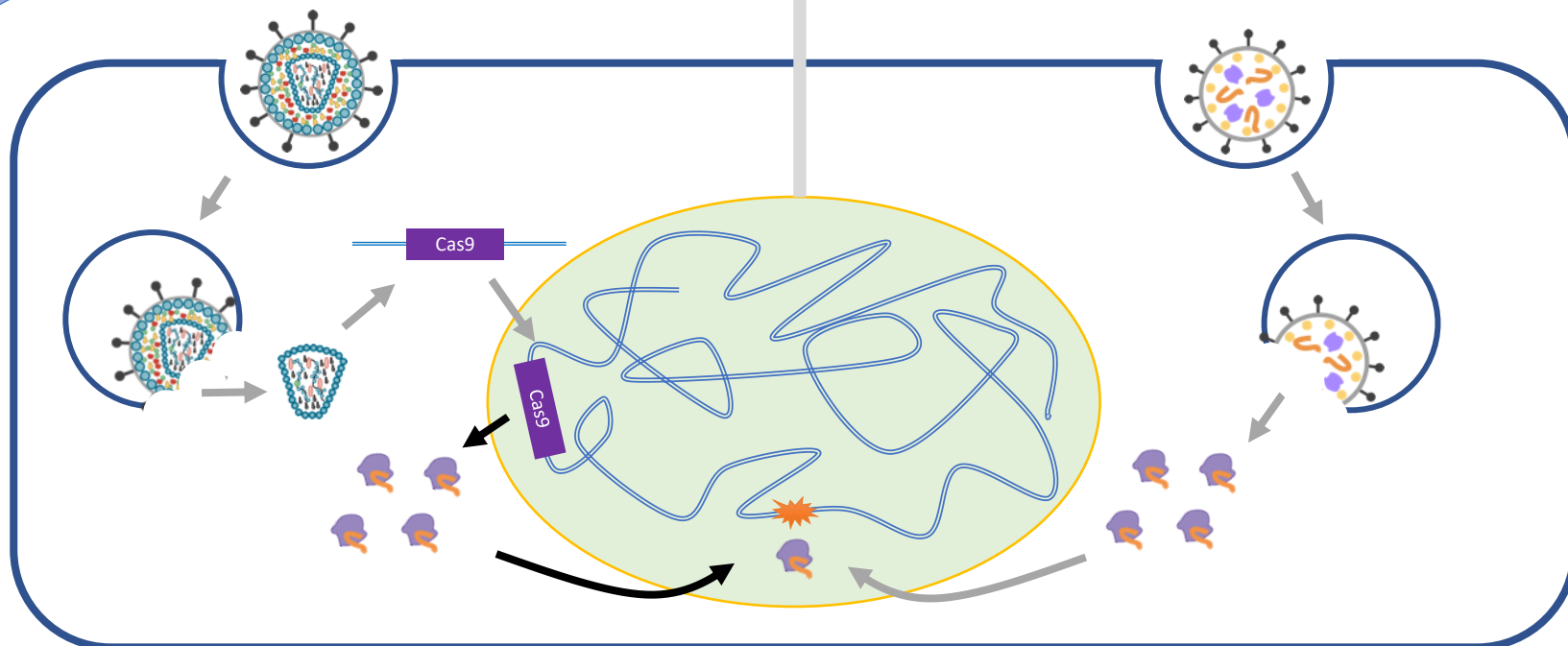
- ・ ウイルスゲノムあり
- ・ 持続長期発現

▶ ウイルス様粒子 (VLP)

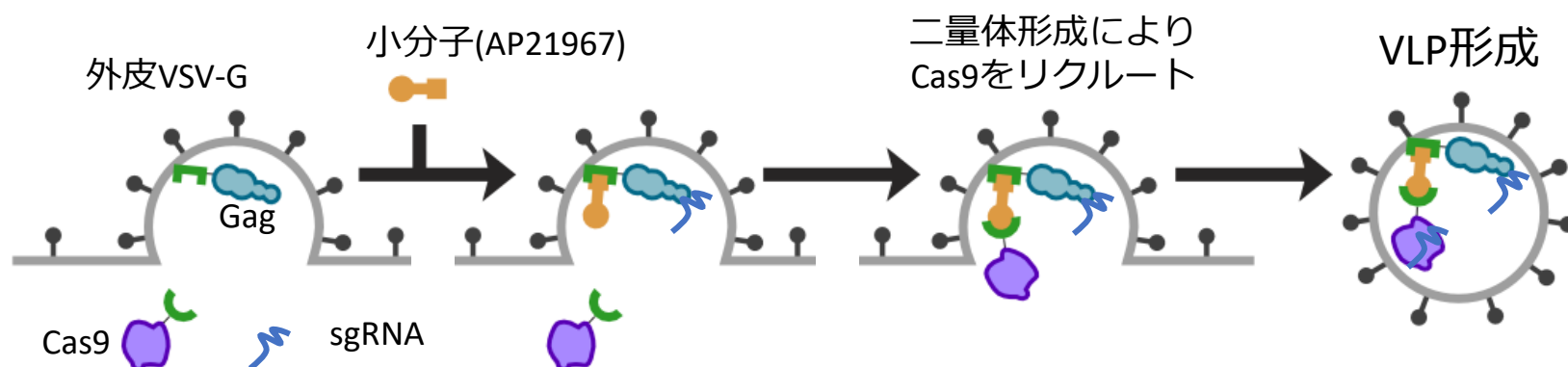


- ・ ウイルスゲノムなし
- ・ 一過的発現

AAV



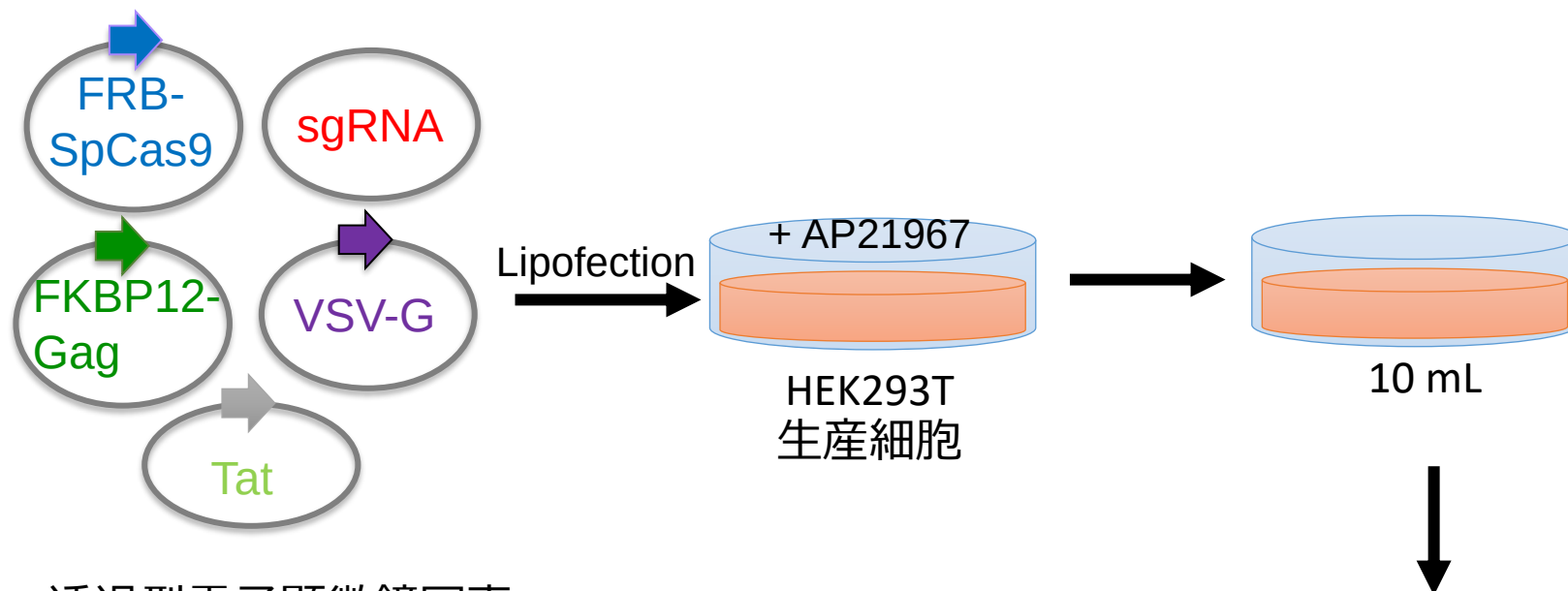
薬剤依存性Cas9内封・放出技術



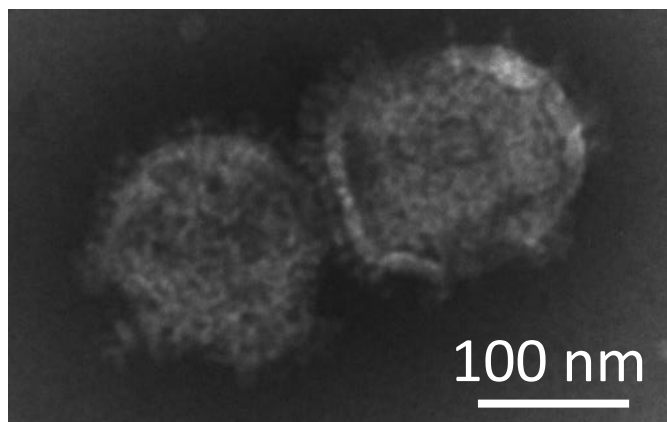
NanoMEDIC

Membrane-derived
Extracellular vesicles for
Delivery of macromolecular
Cargo

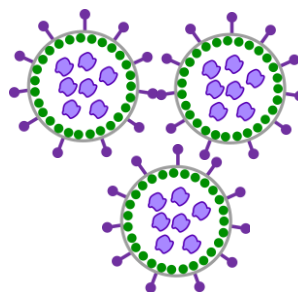
シンプルなNanoMEDIC作製方法



透過型電子顕微鏡写真



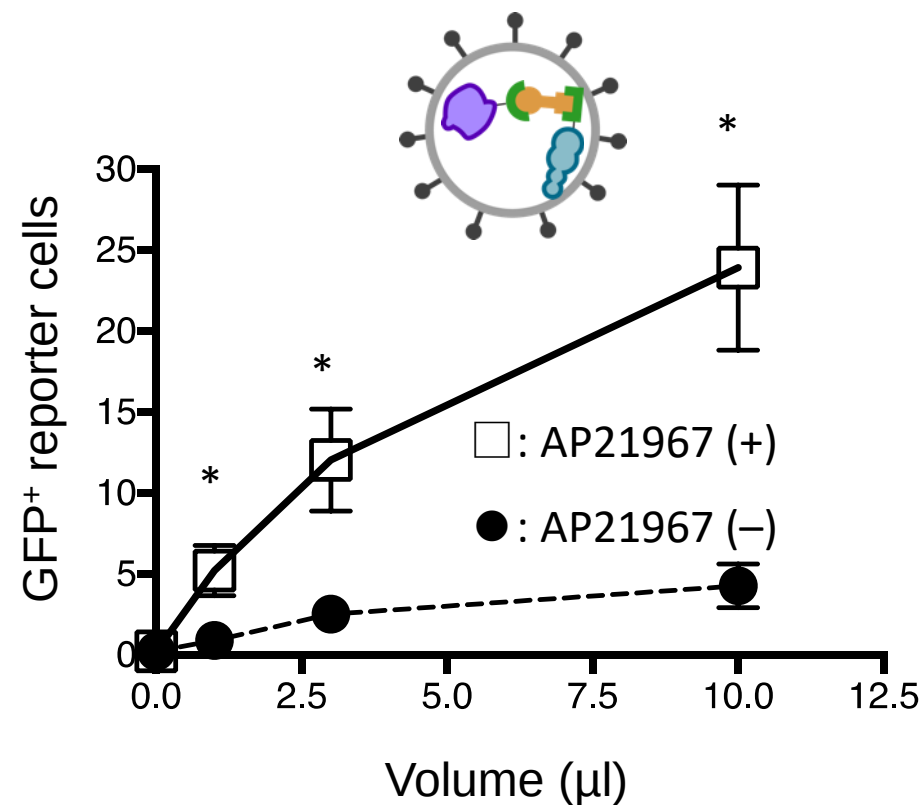
NanoMEDIC VLPs



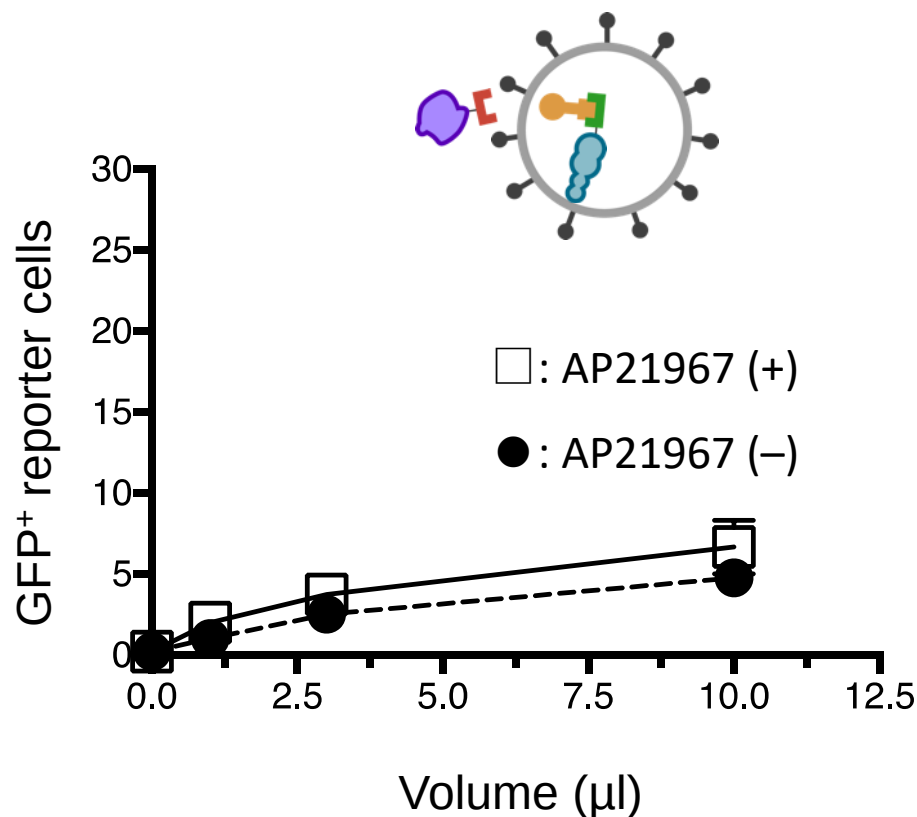
~120 μ L

化合物依存的Cas9送達を確認

(ii) FRB-SpCas9



(iii) FRB^{Mut}-SpCas9

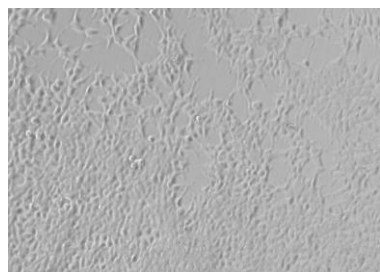


FRB^{Mut}: AP21967結合ドメインに点変異を持つ

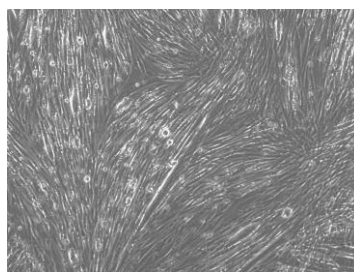
骨格筋細胞への導入



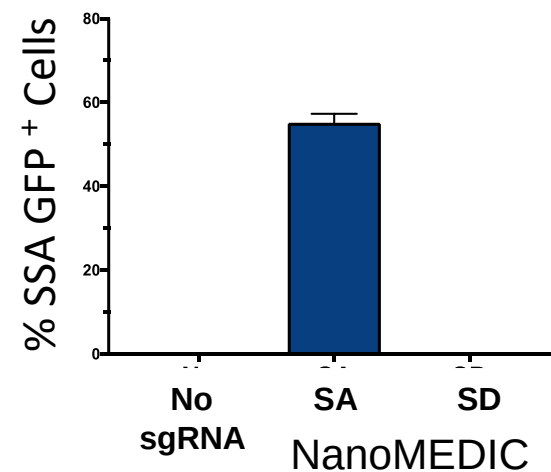
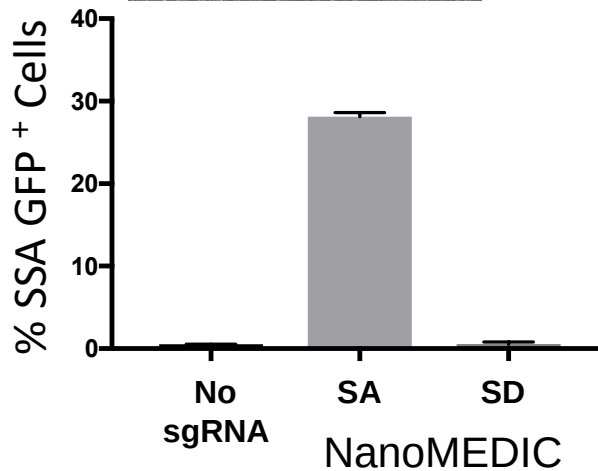
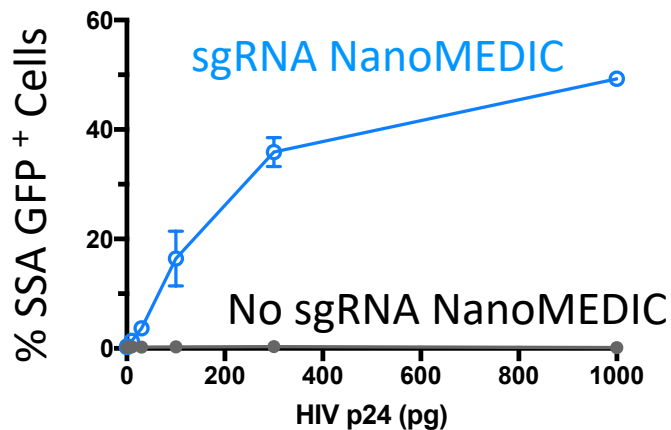
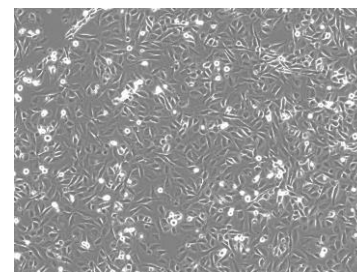
HEK293T



C2C12
マウス筋芽細胞



Hu5
ヒト筋芽細胞

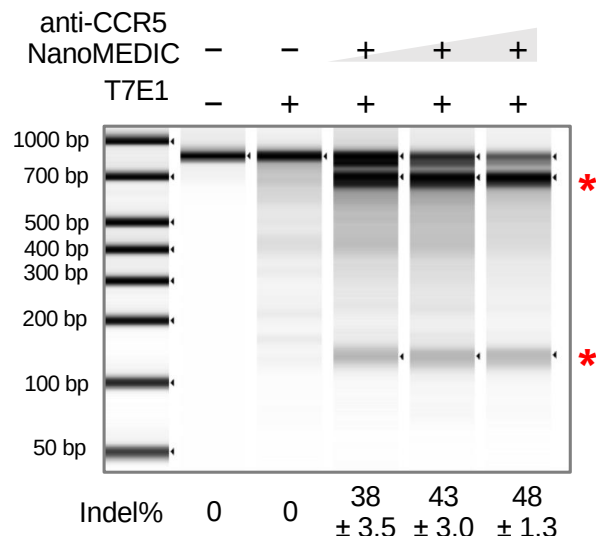


様々な細胞種へと送達可能

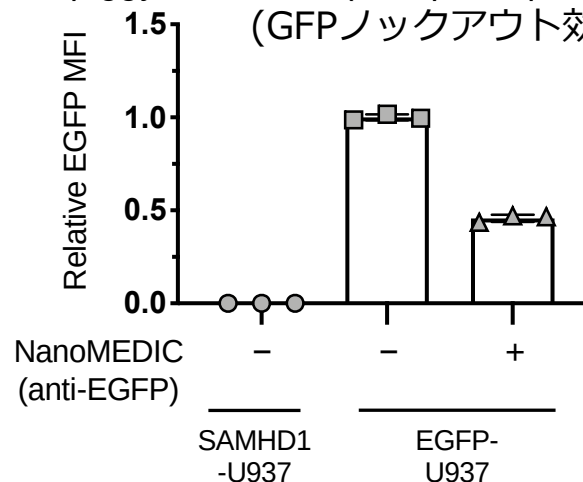
Jurkat (T細胞由来白血病)細胞

U937単球細胞

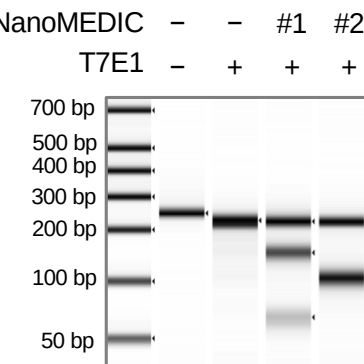
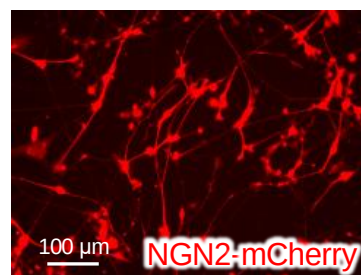
A Jurkat (T lymphocyte) cells



B U937 (monocyte) cells + piggyBac-EGFP (multiple copies) (GFPノックアウト効率)



C Cortical neurons differentiated from iPSCs



iPS細胞由来神経細胞

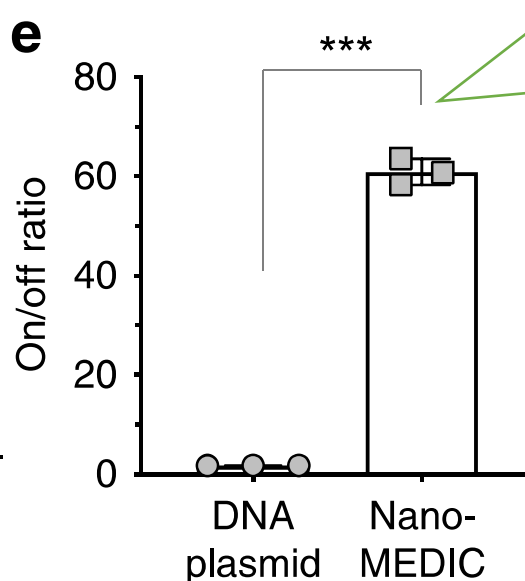
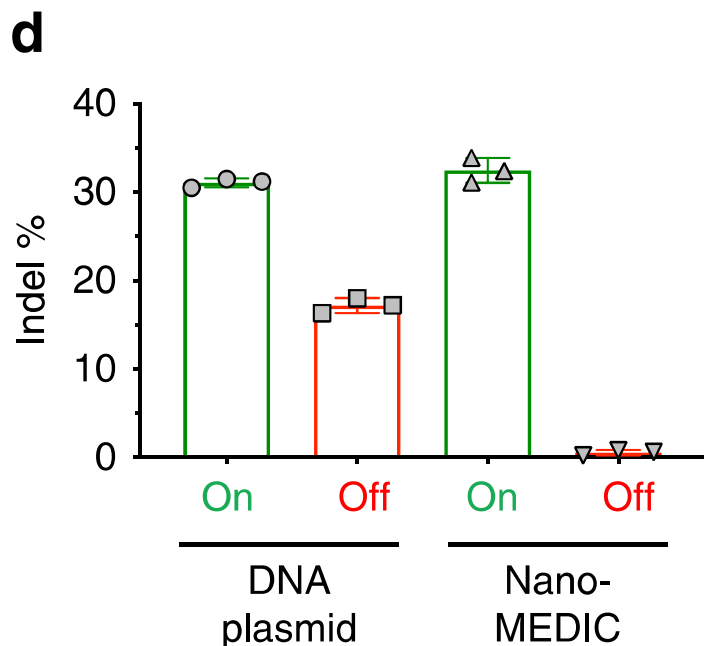
% Indels 0 0 29 ± 6.7 30 ± 5.7

NanoMEDICによりゲノム編集の オフターゲット変異リスクを低減可能

c

VEGFA	Sequence	PAM
sgRNA	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTG	NGG
On-target	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTG	TGG
Off-target	tGTGgGTGAGTGTGTGCGTG	aGG

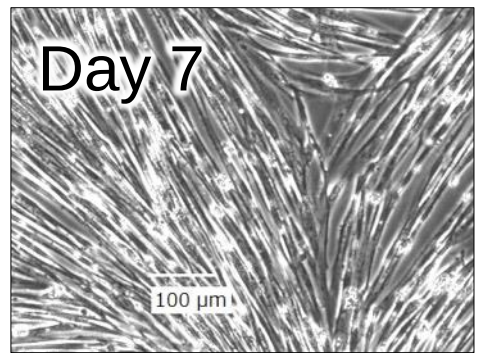
敢えてオフターゲットリスクの高いgRNAで検証



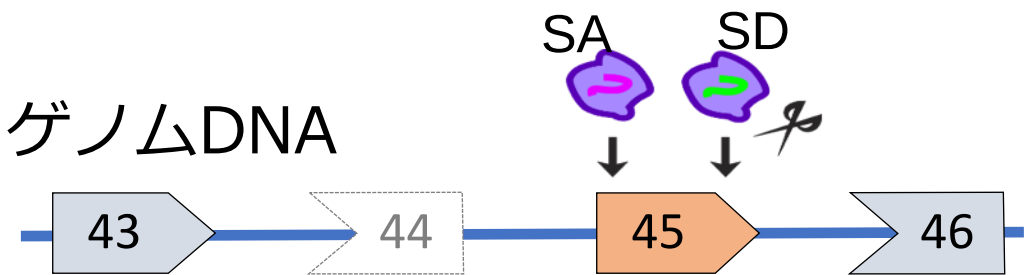
1週間程度発現が持続するプラスミドベクターと比べ、オフターゲット切断リスクは低い

DMD患者iPS細胞で修復確認

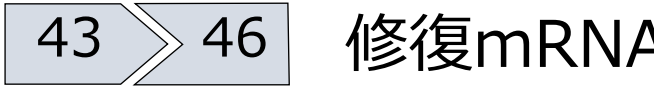
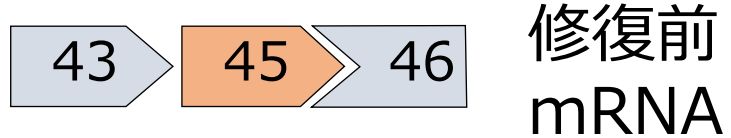
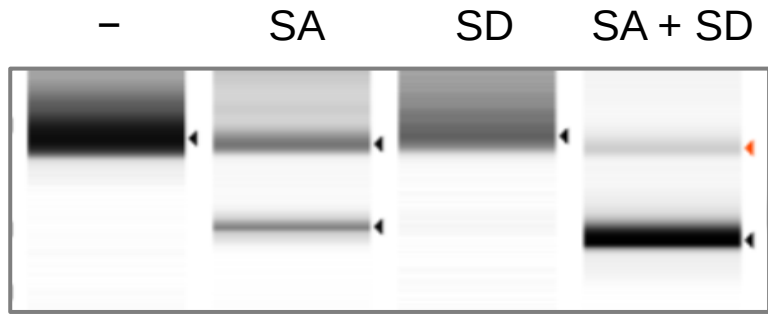
患者iPS細胞を骨格筋細胞へ分化



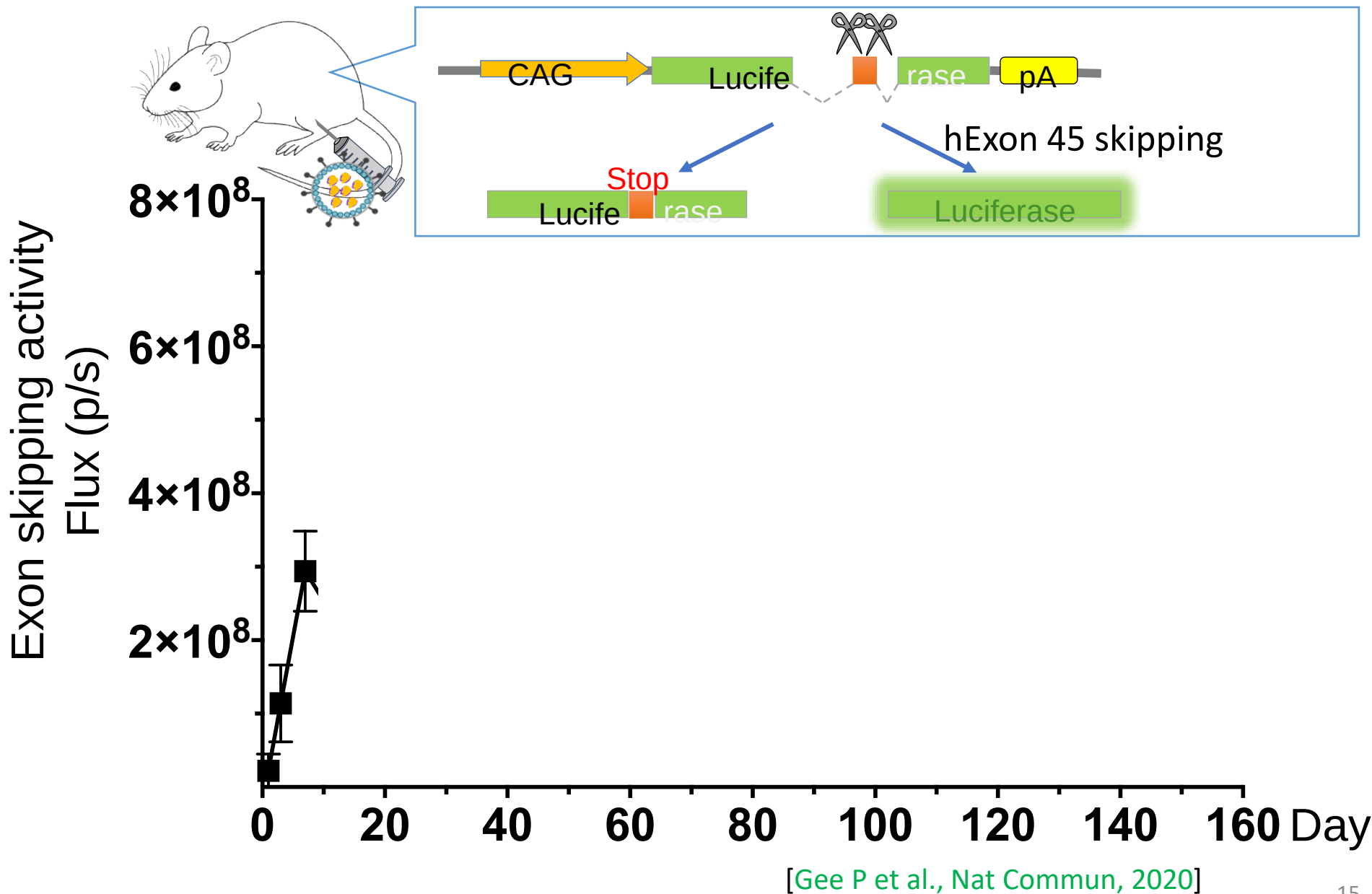
標的エクソンを切除



切断箇所



一度の投与で長期にゲノム編集効果が持続



NanoMEDIC技術のまとめ

- 効率的かつ安全なタンパク質形態でのCRISPR-Cas9送達
- 骨格筋などの生体内組織へ送達してゲノム編集を誘導
- レンチウイルスベクターと同様の製造ライン

従来のAAVベクターやレンチウイルスベクターと比較して

- 極めて短期間(数日以内)の作用
- オフターゲット変異リスクが低い
- 組換えウイルスも発生しづらい

想定される用途

- 遺伝子変異疾患や遺伝子改変が有効な疾患に対する治療薬
- モデル生物や非モデル生物を用いたin vivoゲノム編集研究
- ワクチン

実用化に向けた課題

- 筋ジストロフィーモデルマウスでPoCを取得済み。但し、他の疾患や骨格筋以外には未実施。
- cGMPレベルでの製造方法が未確立。

企業への期待

- 骨格筋以外の疾患に興味をお持ちの企業。
- 疾患モデル動物をお持ちの企業。
- 臨床用ウイルスベクター製造に興味や経験をお持ちの企業。
- 技術供与、共同研究、どちらも大歓迎です。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ウイルス様粒子及びその使用
- 出願番号 : PCT/JP2019/027708
- 出願人 : 国立大学法人 京都大学
- 発明者 : 堀田 秋津、Gee Peter

お問い合わせ先

iPSアカデミアジャパン株式会社
ライセンス部 藤城 修平

T E L 075-754-0625

F A X 075-761-3577

e-mail license@ips-ac.co.jp