

効率的なゲノム編集を可能とする脂質ナノ粒子の開発

～ゲノム編集治療への貢献に期待～

ポイント

- ・ゲノム編集治療の実現に欠かせない脂質ナノ粒子の製剤設計方法を確立。
- ・RNPの脂質ナノ粒子への効率的な搭載と細胞内でのRNPのリリースの両立の重要性を解明。
- ・CRISPR-LNPの静脈内投与により肝臓遺伝子の80%以上のノックアウトを達成。

概要

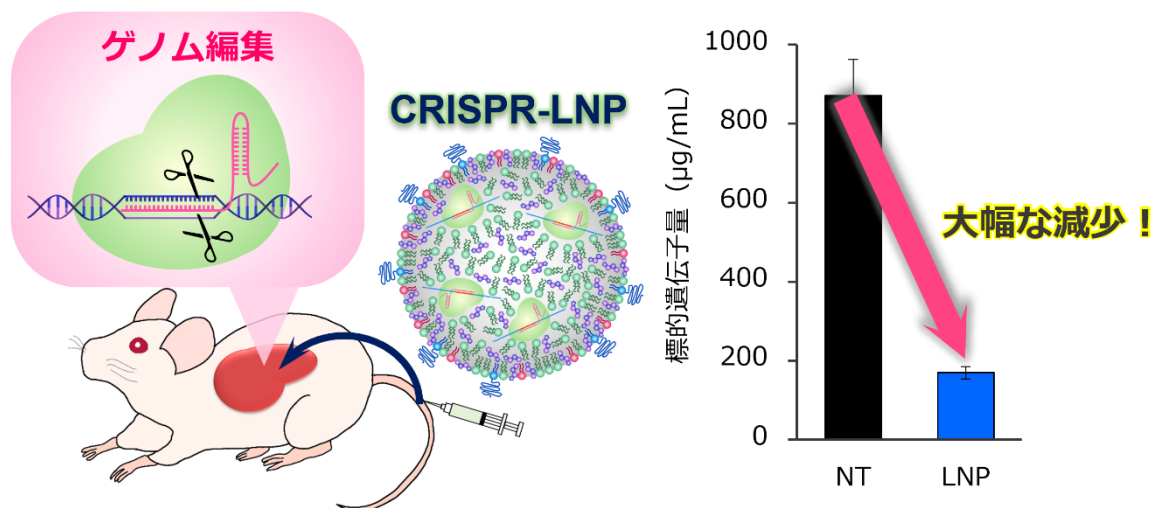
北海道大学大学院薬学研究院の佐藤悠介助教、原島秀吉教授、同大学大学院生命科学院修士課程の小沼はるの氏の研究グループは、効率的なゲノム編集^{*1}を可能とする脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticles: LNPs^{*2}）の開発に成功しました。

2020年にノーベル化学賞の対象となった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}）を一本鎖オリゴDNA（ssODN^{*6}）と複合体化させ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、細胞質内送達後のRNPのssODNからのリリースに着目し、最適なssODNの設計方法を確立しました。また、最適化されたCRISPR-LNPの静脈内投与により、肝臓遺伝子の80%以上のノックアウトを達成しました。今回開発された最適ssODN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、2023年2月10日（金）公開のJournal of Controlled Release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実施されました。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3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となります。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、一本鎖オリゴDNA(ssODN)をRNPと複合体化させ、RNPに強い負電荷を付与することで、正に帯電した脂質との静電的相互作用によりRNPを効率的にLNPへ封入した製剤(CRISPR-LNP)の開発に成功しています。しかし、ssODNを用いた戦略では、LNPの製造過程だけではなく、細胞内移行後のRNPの状態、すなわちRNPがssODNからリリースされ標的ゲノムDNAに結合できるかにも着目する必要があります。そこで研究グループは細胞内でのRNPのリリースに着目し、最適なssODNの設計方法の確立を試みました。

【研究手法】

gRNAに対する様々な相補率(0-100%)を示すssODNを設計しました。各ssODNとRNPから作製されるLNPのゲノム編集効率を比較することで、最適なssODN配列の設計方法の確立を目指しました。

【研究成果】

研究グループはまず、gRNAに対して様々な相補率を示すssODNを設計し、RNPと各ssODNの複合体(RNP-ssODN)からLNPを作製しました(図1)。その結果、gRNAと相補鎖を形成が期待されないssODNでは、比較的粗大で不均一なLNPが形成されました。従って、RNPとssODNが複合体を形成することは、粒子径が制御された均一なLNPを得る上で重要であることを見出しました。

次に、各ssODNを用いて得られたLNPのゲノム編集効率を比較するため、標的遺伝子がコードするトランスサイレチン(TTR)タンパク質の血清中濃度を定量しました。その結果、ssODNの相補率と標的タンパク質濃度はU字曲線を示すことが明らかとなりました(図2)。相補率の低いssODNは、LNP製造時のRNP-ssODN複合体形成が十分でなく、サイズ制御のできない不均一なLNPが形成さ

れるため、ゲノム編集効率が低下します。一方、相補率の高い ssODN は、細胞内で RNP が ssODN からリリースされず、RNP の標的 DNA への結合が阻害されるため、ゲノム編集効率が低下します。したがって、高いゲノム編集効率の実現には、CRISPR-LNP 製造時の RNP-ssODN 複合体の形成と細胞内での RNP のリリースの両立が重要であることが示唆されました。

研究グループは、最も高いゲノム編集効率を示した中間の相補率の ssODN (medium-ssODN) と相補率の高い ssODN (high-ssODN)、低い ssODN (low-ssODN) について、各温度での RNP との複合体形成を検証しました。その結果、生体内温度 (~40°C) では、medium-ssODN は大部分が RNP から解離しているのに対し、high-ssODN は RNP と完全に結合していることが判明しました(図 3)。RNP の 50%が ssODN と複合体を形成している温度を融解温度 (Tm) とすると、high-ssODN の Tm 値は 62°C、最も高いゲノム編集効率を示した medium-ssODN の Tm 値は 32°Cであることが分かりました。従って、CRISPR-LNP 製造時 (25°C以下) では RNP と複合体を形成し、細胞内 (37°C付近) では RNP をリリースできる Tm 値 (25°C~30°C付近) の ssODN が最適であることを見出しました。

次に、RNP-ssODN 複合体形成が、RNP の標的 DNA に対する切断効率に与える影響を調べました。生体内温度を模倣した 37°Cにおいて、標的 DNA と RNP-ssODN を反応させ、RNP による標的 DNA の切断効率を評価しました。その結果、medium-ssODN は low-ssODN と同等の切断効率を示すのに対し、high-ssODN は切断効率が有意に低下しました(図 4)。一方、medium-ssODN が RNP と複合体を形成する 15°Cで反応させたところ、medium-ssODN の切断効率が有意に低下しました(図 4)。従って、効率的なゲノム編集のためには、RNP が ssODN からリリースされることが必須であることを見出しました。以上のことから、製造時の RNP-ssODN 複合体の形成と細胞内での RNP のリリースの両立を実現する最適な ssODN の設計方法として、Tm 値を 25°C~30°Cに制御するという方法を確立しました(図 5)。

最後に研究グループは、最適化した CRISPR-LNP を連日投与することにより、血清中 TTR タンパク質濃度を 80%以上減少させることに成功しました(図 6)。

【今後への期待】

本研究成果である ssODN の最適設計方法は、あらゆる gRNA に対して最適な相補率を決定することができる設計方法であり、他の RNP 送達キャリアにも適用できる汎用性の高い戦略であると考えられます。そのため、現在の RNP 送達における課題である搭載効率の低さや生体内での安定性の低さに対する有用なアプローチの一つとなり、安全性の高い CRISPR/Cas RNP 送達技術の発展とゲノム編集治療への実用化に繋がることが期待されます。

論文情報

論文名 Lipid nanoparticle-based ribonucleoprotein delivery for in vivo genome editing (in vivo ゲノム編集を目指した脂質ナノ粒子ベースの RNP 送達)
著者名 小沼はるの¹、佐藤悠介²、原島秀吉²、(¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院薬学研究院)
雑誌名 Journal of Controlled Release (薬物送達学の専門誌)
DOI 10.1016/j.jconrel.2023.02.008
公表日 2023年2月10日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 助教 佐藤悠介 (さとうゆうすけ)

T E L 011-706-3734 F A X 011-706-3734 メール y_sato@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/nano/>

北海道大学大学院薬学研究院 教授 原島秀吉 (はらしまひでよし)

T E L 011-706-3919 F A X 011-706-3734 メール harasima@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/mirai/>

<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/nano/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

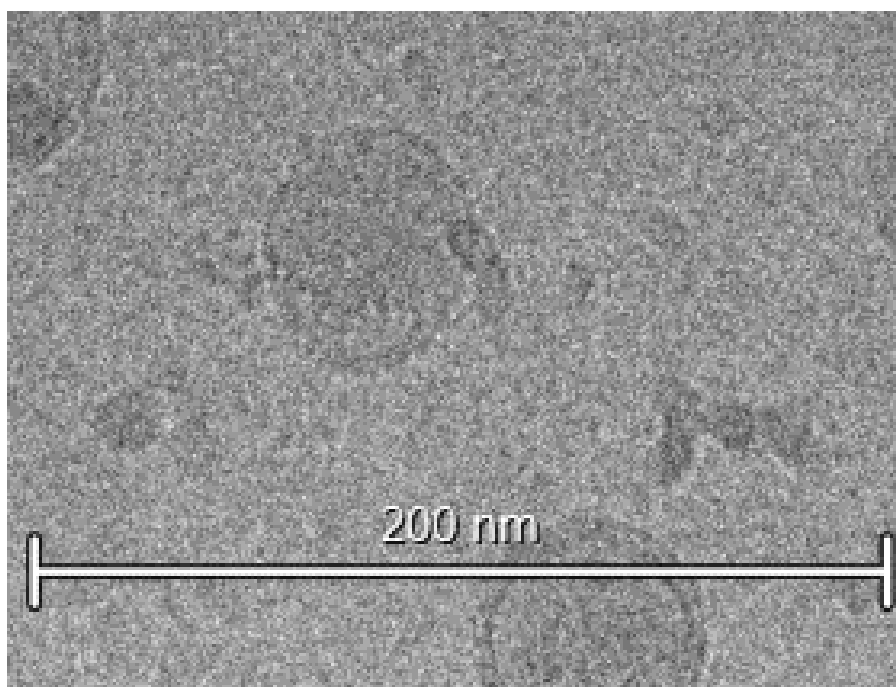


図 1. CRISPR-LNP の cryo-TEM 観察

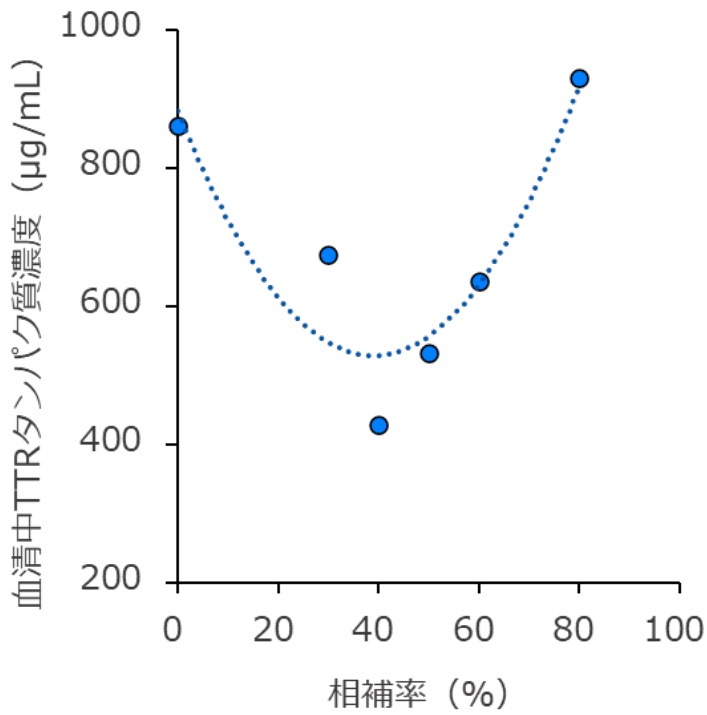


図 2. ssODN と相補率とゲノム編集効率

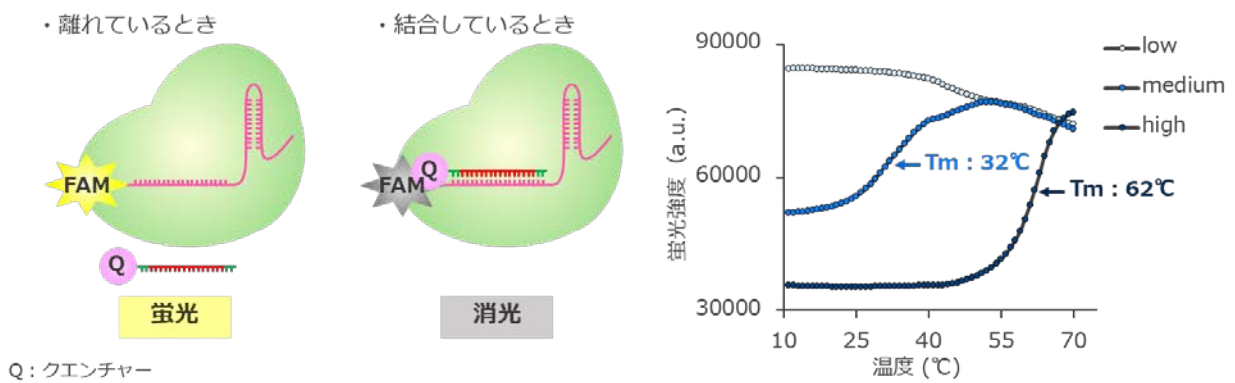


図 3. RNP-ssODN 複合体の温度依存性の検証

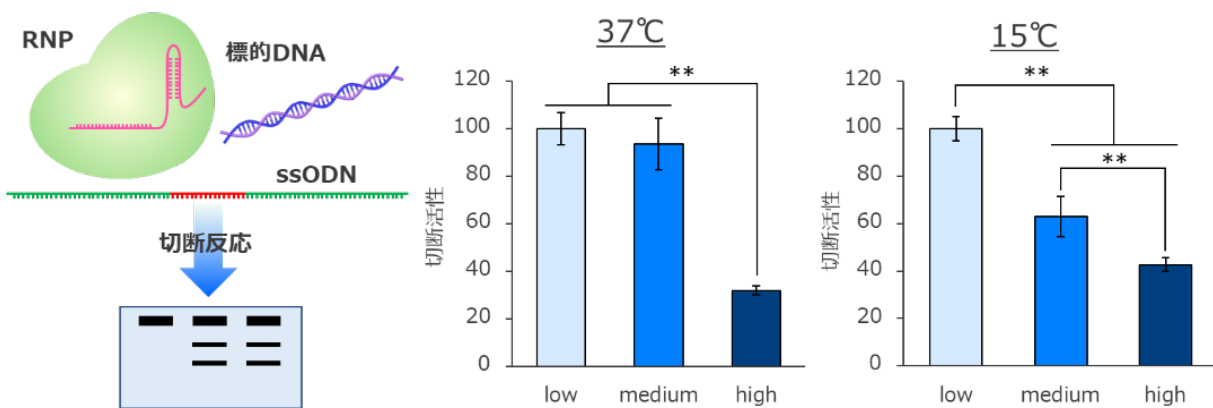


図 4. RNP-ssODN 複合体は切断活性を阻害する

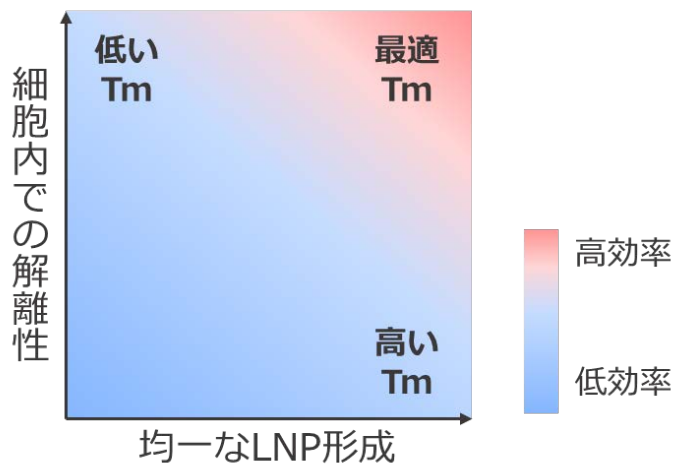


図 5. 最適 ssODN の設計方法

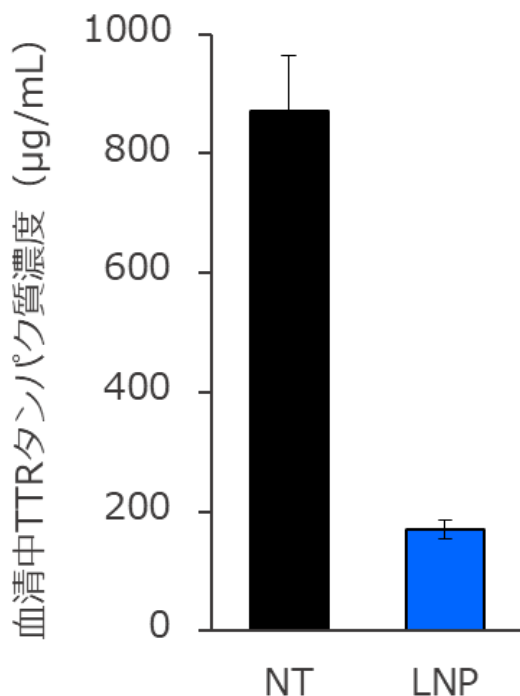


図 6. CRISPR-LNP の連日投与によるゲノム編集

【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 ssODN … 一本鎖の短いDNAのこと。