



新たな選択肢としての エピゲノム編集療法

未来先端研究機構 ウイルスベクター開発研究センター 教授

畑田 出穂

新たな選択肢としてのエピゲノム編集療法についてお話しさせていただきます。はじめにエピゲノム編集についてご説明し、その後、エピゲノム編集がいかんとして、平井先生がお話しされたアデノ随伴ウイルスベクターの弱点、または課題を補うことができるかについてお話しいたします。

エピゲノムとは

エピゲノムというのは遺伝子のスイッチのようなものです。

ヒトには約2万個の遺伝子がありますが、細胞によって遺伝子のオンとオフが微妙に調整され、必要な遺伝子だけが機能しているわけです。これによってヒトは複雑な生命活動を営むことができます。

このように遺伝子配列はそのまゝの状態、遺伝子のオン/オフが制御されることをエピゲノムといいます(図1)。

DNAのメチル化

エピゲノム、すなわちオン/オフの仕組みには、DNAのメチル化というものとヒストンの修飾という

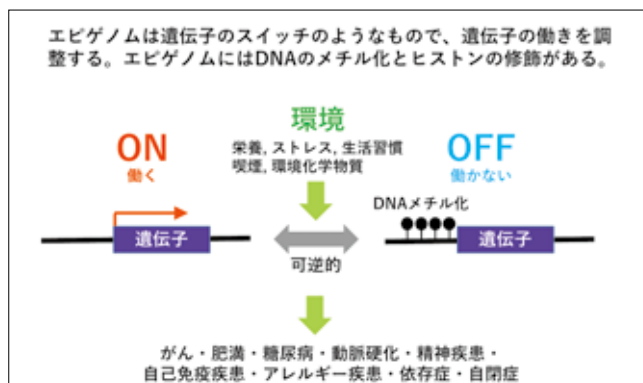


図1 エピゲノムとは

ものがあります。

まず、DNAのメチル化について説明します。DNAのメチル化とは、DNAの塩基のうちシトシン(C)に「メチル基」という化学基が結合した状態のことです。「メチル基」はスイッチ調節のいわば目印です。

生物において遺伝情報はDNA→(転写)→RNA→(翻訳)→タンパク質と伝達されますが、メチル化されると転写できなくなります。つまりスイッチがオフになるわけです。逆に、メチル基が外れる(脱メチル化)と転写できるようになる、すなわち遺伝子のスイッチがオンになります。

エピゲノムは栄養やストレスなど様々な環境の影響を受けて変化をするため、それによってがんや生活習慣病をはじめ様々な疾患を引き起こします(図1)。

双子の間でもメチル化の差

図2は一卵性双生児のメチル化の違いを示しています。双子のペアのメチル化の差がなければ黄色に見え、違いがあれば赤か緑に見えます。

3歳の時点ではほとんどのところが黄色に見えて、メチル化のパターンが非常に似ているということがわかります。しかし50歳になると緑や赤の部分が増えていきます。このように年齢とともに異なる環境に長期間さらされると、双子の間でもメチル化の差が広がっていくことがわかります。

これは、一卵性双生児のうち、一方が健康で、もう一方がSLEという自己免疫疾患を発症した例です。DNAのメチル化の違いを調べると、赤で示したところがSLEの患者で外れています。また、これらの遺伝子には免疫に関連するものが多いことがわかりました。



エピゲノムの異常はがんでも見られます。このように発がんを抑える働きを持つがん抑制遺伝子は、がんによってメチル化されオフになっていることが知られております。

エピゲノム編集法を開発

エピゲノムを操作することができれば、患者の治療に利用できます。

従来、エピゲノムの操作にはアザシチジンなどのDNAメチル化酵素の阻害剤が使われていました。しかし、阻害剤は特異性がないため、標的だけではなく、標的以外のすべての遺伝子のメチル化を外す、すなわちスイッチをオンにしてしまいます。その結果、副作用が生じる問題がありました(図3)。

そこで、特定の遺伝子のエピゲノムだけを操作する技術の開発が必要になるわけです。

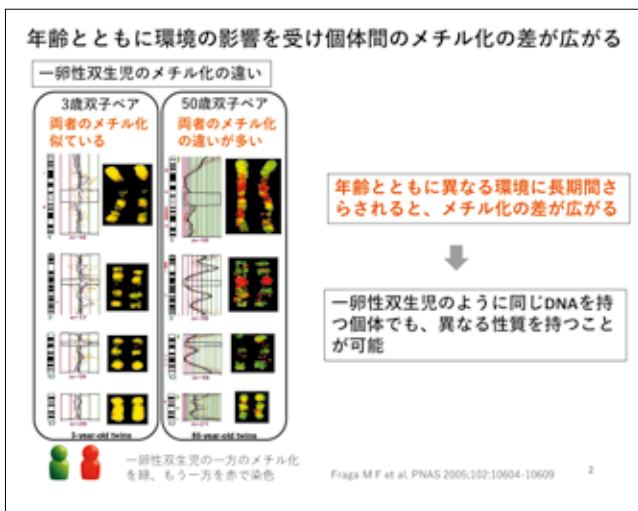


図2 一卵性双生児のメチル化の違い

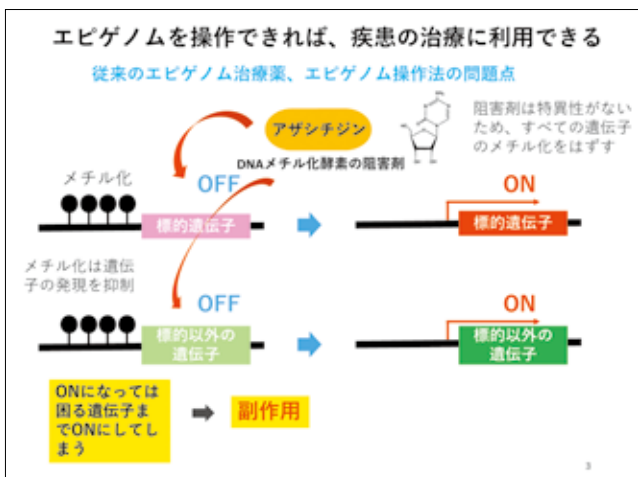


図3 従来のエピゲノム治療薬・操作法の問題点

私たちは、ゲノム編集技術のCRISPR/Cas9(クリスパー キラスナイン)を応用して、特定領域(狙った遺伝子)を脱メチル化して遺伝子をオンにするエピゲノム操作法、すなわちエピゲノム編集法というものを開発いたしました。

私たちはCas9という酵素の変異型、dCas9を使っています。これは狙ったところをはさみで切る代わりにDNAメチル化を外す酵素を呼びこみ、その遺伝子のスイッチをオンにできるのです。非常に便利な技術です。

dCas9はガイドRNAというものを使って標的配列に特異的に結合することができます。そこで、dCas9と脱メチル化酵素であるTETというものを結合させて、それを細胞に導入しました(図4)。

しかし、TETが1つしかないためか、あまり効率が良くありませんでしたので、多くのTETを標的にリクルートする方法を開発いたしました(図4)。そのために、GCN4という非常に短いペプチドと、それにそれを特異的に認識する一本鎖抗体(scFv)を利用しました。scFvは抗体を小型化したミニ抗体のようなものです。

私たちは、dCas9の後ろに複数のGCN4をつけたものと、TETとscFvを融合したものを使い、このように標的に多くのTETをリクルートすることによって、効率的に脱メチル化して遺伝子をオンにすることに成功いたしました。

ではこの方法は本当に特異的に標的のみを脱メチル化しているかということを検証する必要があります。そのことを検証したのがこのスライド(図5)でございます。

脱メチル化は、この標的の近傍の500ベースの範囲でのみ特異的に見られ、周囲では変化は見られませんでした。

また、ゲノム全体を調べてみたところ、この標的、ピンクで示しました標的以外ではほとんど変化がないということがわかり、非常に特異性が高いということが分かりました。

トップ1%論文

以上のことから、先ほどのアザシチジンと違い、エピゲノム編集は治療における安全性が非常に高いと考えられます。

このエピゲノム編集技術に関するわれわれの論文は、インパクトファクター54.9のNature Biotechnology誌に掲載されており、トップ1パーセントの引用論文となっております。

さらに、この技術は日本、米国でも特許をすでに取得しており、EUでも現在出願中でございます。

また、このシステムのプラスミドは世界の547の研究室に分与しております。

エピゲノム編集による疾患の原因の特定

さて、このエピゲノム編集技術は何に用いることができるのでしょうか。この技術を使ってエピゲノムを操作することで、疾患の原因を特定したり、逆方向にスイッチを動かして疾患の治療に利用することが可能です。

エピゲノム編集による疾患の原因の特定についてお話しいたします。

シルバーラッセル症候群という疾患があり、その症状は低出生体重、成長障害、体の非対称性、低血糖などがございます。その原因は、H19という遺伝子が脱メチル化されることが原因だと考えられていました。しかし、これは状況証拠だけで実証されていたわけではございません。

そこで、エピゲノム編集技術を使って、マウスのH19遺伝子を脱メチル化して、シルバーラッセル症候群で見られる症状が再現されるかどうかを検証してみました。

まず、出生体重と成長を見ました。その結果、このように出生体重は非常に低出生体重となり、成長障害も起こっていることがわかります(図6)。

次に、体の非対称性と血糖値を調べました。その結果、エピゲノム編集を行ったマウスでも、左右の手足の長さが違い、体の非対称性が見られることが分かり

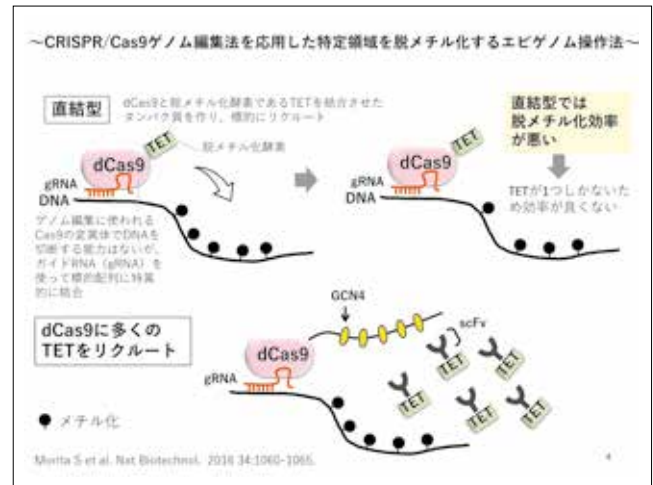


図4 特定領域のエピゲノムを操作して遺伝子を ON にする技術の開発

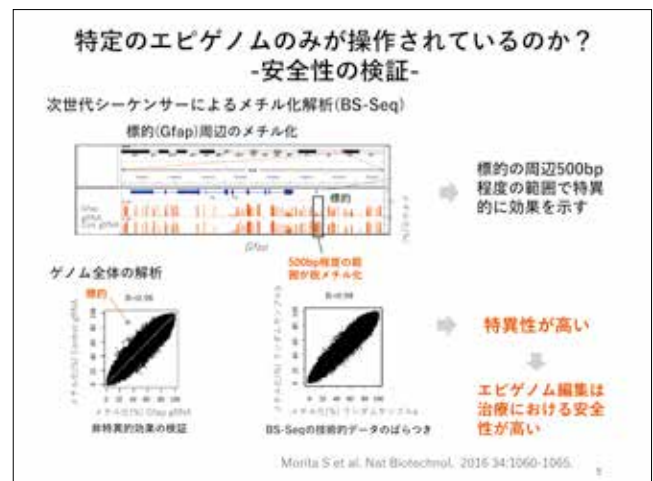


図5 特異的に標的のみを脱メチル化しているかの検証

ました。また、頭負荷試験を行ったところ、エピゲノム編集マウスでは低血糖を示すことが分かりました。

このように、エピゲノム編集マウスでシルバーラッセル症候群の症状が再現できることから、H19遺伝子の脱メチル化がこの疾患の原因であることが証明されました。つまり、エピゲノム編集は疾患の原因遺伝子を特定するために利用することができることがわかりました。

シルバーラッセル症候群はH19遺伝子の脱メチル化により発症することが証明されましたが、現在は逆にこのH19遺伝子のエピゲノム編集でメチル化して治療ができるかどうかということを検証しております。

エピゲノムを利用した治療の利点

このように、エピゲノム編集技術は遺伝病も含め様々な疾患の治療に利用できます。



エピゲノム編集治療は、ゲノム編集治療、核酸医薬、抗体薬と比べていくつかの利点がございます。

ゲノム編集治療はゲノムを直接操作するため効果が永続しますが、ゲノム切断に伴うリスクがあります。特に標的以外の遺伝子を切断するオフターゲット効果による遺伝子変異が懸念されます。

一方、エピゲノム編集はゲノムを切断しないため安全です。

また、アンチセンスやsiRNAなど核酸医薬や抗体薬は、標的のメッセンジャーRNAやタンパク質を抑制することができますが、体内で分解されてしまうために効果が一時的です。そのため、定期的な治療が必要で、医療費の負担や患者のQOLが問題です。それに対して、エピゲノム編集は一度の治療で長く効果を発揮するため、患者のQOLが改善し、医療費負担の軽減が見込まれます。

このように、エピゲノム編集治療は、安全で医療費軽減し、患者のQOLを改善する新たな治療法として注目されております。

AAVベクターを用いた エピゲノム編集

家族性高コレステロール血漿のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたエピゲノム編集治療の例についてご紹介いたします。

PCSK9というタンパクがございますが、これはコレステロール受容体に結合して分解を促進するため、血中コレステロールを上げる働きがあります。

この遺伝子をオフにすることで血中コレステロール量を下げ、家族性高コレステロール血症の治療につながります。

エピゲノム編集システムを搭載したAAVベクターを静脈注射することにより、24週間にわたりPCSK9の量を減らすことができます。

また、血中LDLコレステロール値も70日間にわたって低下していることが確認されました。このように、エピゲノム編集は長期間効果が持続することが証明されました。

遺伝子治療は、遺伝病などにより損傷を受けて不足

しているタンパク質を補うために、ウイルスベクターを使って遺伝子を補充します。

しかし、現在主流のAAVベクターには大きな遺伝子を運べないという問題がございます。

このような場合でも、エピゲノム編集システムを搭載したベクターを使えば、患者の体内に残っている損傷していない遺伝子やオフになっている似た働きをする遺伝子をオンにすることで治療が可能です。

「似た遺伝子」をオンにする エピゲノム編集

似た遺伝子をオンにするエピゲノム編集で治療できる例として、デュシャン型筋ジストロフィーがございます。この疾患は、ジストロフィンという非常に巨大な遺伝子の変異によって引き起こされます。

しかし、筋肉では眠っている、似た働きをするウトロフィンという遺伝子がございますので、それをエピゲノム編集でオンにすることによって治療につながります。

実は、私たち脊椎動物のゲノムには基本的に似た働きをする遺伝子が4つずつあることが分かっておりますので、この戦略は多くの遺伝子に適用可能です。

最後に、まとめでございます。エピゲノム編集治療は安全で医療費削減、患者のQOLを改善する新たな治療法です。エピゲノム編集システムでAAVベクターの弱点を克服できます。

ご清聴ありがとうございました。

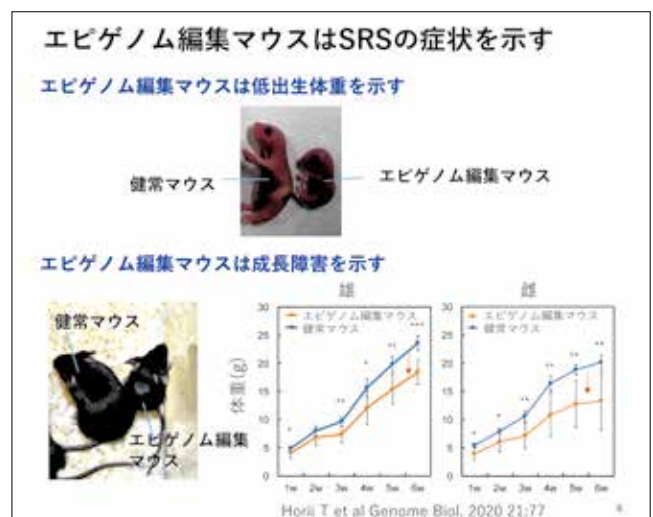


図6 エピゲノム編集マウスの出生体重と成長