

個別化医療に向けた オリゴ核酸の可能性

Potential of Oligonucleic Acids for Personalized Medicine

間世田 英明
HIDEAKI MASEDA

国立研究開発法人 産業技術総合研究所バイオメディカル部門(上級主任研究員)
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Biomedical Research Institute (Chief Senior Researcher)

KEYWORD ▶ オリゴ核酸 個別化医療 ゲノム編集薬

個別化医療とは

01

個別化医療とは、同じ疾患の患者に対して一律に同じ治療を行うのではなく、患者の遺伝子、ライフスタイル、環境などの多様な要因を評価し、それに基づいて個々に適した治療法を選択する医療のことを指す。疾患の診断を早期且つ精密に行うことができ、副作用のリスクを最小限に抑えながら、より効果的な治療が可能となるため、将来の医療の基盤になるものと考えられている。また、個別化医療によって得られる情報を活用することで、新しい治療法の開発や医療費の削減に繋がることも期待されている。

個別化医療では、ゲノム・遺伝子の解析技術がいままで以上に重要な役割を果たすことになる。解析技術の拡充はもとより、ゲノムに紐付けられた様々な技術革新、思いっただけでも4つのプラットフォームの構築(データプラットフォーム、アルゴリズムプラットフォーム、コミュニケーションプラットフォーム、セキュリティプラットフォーム)、規制および法律などの取り決め、核酸を基本とする薬の安全性の評価法の拡充とそれに関わるガイドラインの作成など、種々の枠組みの構築が必要となる。当然、そこに携わる医療従事者・研究者などの拡充・教育も合わせて必要と予想されることから、産学官のより親密な連携が求められる。

- データプラットフォーム:患者の健康データを収集、管理、分析するためのプラットフォーム。これには、電子カルテや遺伝子解析のデータなど、患者の健康に関連するデータを収集するためのシステムが含まれる。
- アルゴリズムプラットフォーム:データを分析し、適切な診断や治療法を提案するためのアルゴリズムを開発提供するプラットフォーム。これには、機械学習や人工知能の技術を利用して、個々の患者の状態に応じた最適な治療法を提供するシステムが含まれる。
- コミュニケーションプラットフォーム:医療従事者、患者、家族、およびケアコーディネーターなどの間でのコミュニケーション

ンを促進するためのプラットフォーム。これには、テレヘルスやモバイルアプリケーション、オンラインプラットフォームが含まれる。

- セキュリティプラットフォーム:個人情報の保護や、医療データの安全な共有に関するプラットフォーム。これには、データ暗号化やアクセス制御の仕組みが含まれる。

個別化医療に必要な技術と治療薬

02

個別化医療の実現・実施に必要な技術革新とはどのようなものがあるであろうか?

- 次世代シーケンサーのデータを用いて患者の遺伝子情報を解析する技術。
- 個人の生体情報をプロファイリングするために必要な血液中のタンパク質、代謝物、ホルモンなどを測定する技術。
- 大量の生体情報データを処理するためのバイオインフォマティクス技術。遺伝子変異の解析やバリエーション、生体情報プロファイルの構築などが行われる。
- 大量の遺伝・生体情報データを総合的に分析する技術。個人の遺伝・生体情報プロファイルから最適な治療方針の推論が可能になる。
- 遺伝・生体情報プロファイルから、疾患の発症や進行に関わる生物学的プロセスを解明する技術。個人に合った精度の高い疾病発症予防・疾病進行制御も可能になる。

これらの技術の進歩と組み合わせによって個別化医療の精度や効果が向上し、患者の遺伝子情報や生体情報プロファイルを基にした、より効果的な治療が実施されていくものと期待される。治療の実施に当たっては、個別化医療に対応可能な特に以下に分類される薬の開発と技術の拡充を進める必要がある。

- **核酸医薬品:** DNAやRNAを標的として、遺伝子の発現を制御することで疾患の治療を目指す医薬品。具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA (small interfering RNA)、miRNA (micro RNA) などが挙げられる(図1)。
- **遺伝子治療薬(ゲノム編集薬を含む):** 遺伝子进行操作することによって疾患を治療する治療薬。一般的に、疾患の原因となる異常な遺伝子の修正、削除、置換、あるいは正常遺伝子を補うことによって治療効果を発揮する。修正においては、

特にCRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins) やTALEN (transcription activator-like effector nuclease) といったゲノム編集技術を用いてゲノムに直接変更を加えるゲノム編集薬もこの一部として考えられる(図1、2)。

- **ファーマコゲノミクス薬:** 患者の遺伝子情報を基に、薬の代謝能力や副作用リスクを予測し、最適な用量(投与量や投与頻度など)を決定し投与する薬。
- **免疫療法薬:** 患者の免疫細胞を活性化させる薬。例えばがん細胞を攻撃する治療薬など。免疫チェックポイント阻害剤など、免疫システムを活性化させてがん細胞を攻撃する薬剤もこの分類に含まれる。

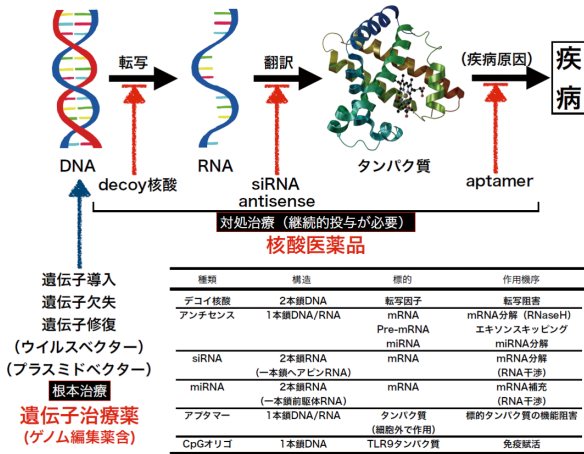


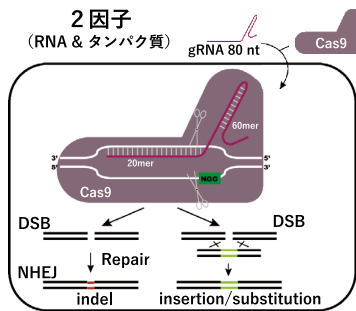
図1 核酸医薬品と遺伝子治療薬

核酸薬の種類と作用機序 03

多くの核酸医薬品と遺伝子治療薬(特にゲノム編集薬)は、DNAやRNAのオリゴ核酸から構成される核酸薬である。その標的は患者のDNAやRNAであり、ゲノム情報を活用することで個々の患者に応じてカスタマイズすることができる。即ち、患者のゲノム配列を解析し、変異や異常が認められた特定の遺伝子を修正するための核酸薬が個別に設計されるのである。このアプローチのメリットは非常に大きく、患者のゲノム情報に基づいているため、副作用のリスクを低く抑えながら治療薬の効果を最大限発揮させることができ、より効果的な治療を行うことが可能となる。さらに、一般的な医薬品とは異なり本体が核酸であることから、原料や合成プロセスを画一化することができ、その物性に由来する副作用は極めて画一的でバリエーションが少ない。臨床試験や安全性試験のコストが大幅に軽減されるため、一般的な医薬品と比べて核酸薬はその開発コストを低く抑えることができる。このような観点からも、核酸薬はまさに個別化医療の要となる治療薬と言える。

核酸医薬品とゲノム編集薬は核酸薬である点において共通であるが、適応範囲、作用機序、安全性においては大きな相違がある。

CRISPR-Cas9 法



ST (Sense strand Technology) 法

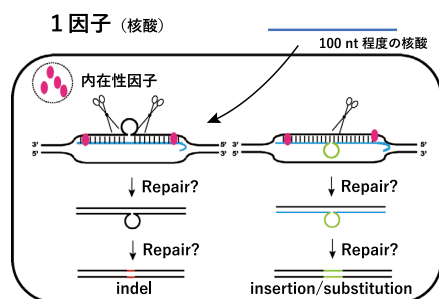


図2 CRISPR-Cas9法とST法

- **適用範囲:** 核酸医薬品は、DNAやRNAを利用して、がんやウイルス感染症などの様々な疾患の治療に用いられる。一方、ゲノム編集薬は、CRISPR-Cas9などの技術を利用して、先天性疾患など遺伝子異常に起因する疾患の治療に主に利用される。

- **作用機序:** 核酸医薬品の多くは、遺伝子の発現を制御することで治療効果を発揮する。一方、ゲノム編集薬は、遺伝子の塩基配列を直接修正することで疾患を根本的に治療する。核酸医薬品は永続的に投与を続ける必要があることがほとんどであるが、ゲノム編集薬は治療効果が確認されればそれ以降投与の必要はない。

■ 安全性: 核酸医薬品には、副作用として免疫反応や炎症が起こることがある。一方、ゲノム編集薬にはオフターゲットや不完全な遺伝子修復による予期しない影響が懸念される。

このように核酸医薬品とゲノム編集薬は、どちらも最先端の医薬品技術であり、遺伝子进行操作して疾患を治療することを目的としているが、それぞれ明確に異なる位置付けの治療薬である。繰り返しになるが核酸医薬品は、DNAやRNAなどの核酸分子を用いた医薬品であり、遺伝子を直接的に修正することはしない。代表的な核酸医薬品としてはmRNAワクチンやRNAi医薬品などが挙げられる。mRNAワクチンは、遺伝子情報を含むmRNAを生体内に接種し、生体内の免疫システムを利用して抗原(免疫源)を産生する。RNAi医薬品は、RNA干渉によって遺伝子の発現を抑制し、がんや遺伝性疾患などの治療に応用されている。一方、ゲノム編集薬は、治療において非常に革新的な方法であり、多くの研究が進んでいるが、まだ臨床応用は限定的であり、安全性や倫理的問題が議論されている段階である。核酸医薬品もゲノム編集薬も革新的な技術であり、今後の医薬品開発の進展が切望されている。以下に、この二つの医薬品の現状についてさらに詳細に記載する。

核酸医薬品の現状と実用性

04

COVID-19のパンデミックは、大きな医療革命を起こした。核酸医薬品の一つであるmRNAワクチンの緊急使用承認・許可が行われ、欧米をはじめ多くの人々に迅速に投与された結果、COVID-19が引き起こす重篤化を極めて効果的に抑制することに成功した。同時に、人種を超え、核酸医薬品の安全性はもとより、利便性・迅速性についても広く認知されるに至った。周知のように、今回ワクチンとして真っ先に開発された核酸医薬品は、新型コロナウイルスの構造タンパク質をコードするmRNAを生体内に接種し、体内で抗原となる異種タンパク質を産生させ、新型コロナウイルスの感染前に体内に抗体を予め産生させておくものであった。この成功はワクチンとしてのmRNAの利用を加速的に促進した。国立医薬品食品衛生研究所のホームページ¹⁾には、感染予防用のmRNAワクチンとがん治療用として開発されているmRNAワクチンがまとめられている¹⁾。驚いたことに、感染予防用72種・がん治療用12種と、従来の開発ペースをはるかに超えてmRNAワクチンの開発が進んでいることがわかる。核酸医薬品の用途はワクチンとしての利用がその最たるものとなった。COVID-19が流行する以前には、mRNAワクチンは核酸医薬品開発においてマイナーな部類に入っていた。COVID-19以前に開発が進められていた核酸医薬品の多くは、投与核酸の配列とターゲットとなるDNAやRNAの配列の相補性を利用して、問題となる遺伝子由来のタンパク質の発現を制御しようとするものがほとんどであった。mRNAワクチン同様に、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ²⁾の中に日米欧で承認された核酸医薬品がまとめられている。ぜひ

一読していただきたい。COVID-19以前から利用され、すでに17種の核酸医薬品が承認されていることがわかる。ヒト一人の全ゲノム配列決定に対する費用がすでに10万円程度、しかも一日で決定できる時代になっている昨今、遺伝子解析技術が進み、遺伝子変異と疾病の原因が紐付けされていき、DDS(Drug Delivery System)などの開発が進めば、多くの核酸医薬品が実治療に利用されていくことは疑いようがない。医療改革、特に個別化医療が進んでいくことは揺るぎないものである。そして、今回のパンデミックがもたらしたmRNAワクチンの緊急使用承認・利用のように、薬や技術の利用と需要は社会情勢の予想できない変化とともに突然にやってくる。その恩恵を患者が遺憾なく享受し、現状の素晴らしい医療システムを維持していくためには、核酸医薬品の原料の製造および管理・輸送システムの構築や、核酸医薬品の各種グレード評価と用途に合わせた品質管理、当該技術分野の開発者・研究者・医師の教育と確保を早急に行うことが必要である。

もう一つの核酸薬:ゲノム編集薬

05

核酸医薬品は上記のように生命の設計図を書き換えるものではないことから、安全性を担保しやすいという利点がある。一方で、原因となる遺伝子をダイレクトに書き換えるわけではないため、基本的に投与を続ける必要があり、対処薬としての性質が強いと言える。しかし、2020年ノーベル化学賞の受賞対象になったCRISPR-Cas9(図2)をはじめとするゲノム編集の技術は、問題となる遺伝子を直接改変する治療法であることから、根本治療の要素が高く、治療回数の観点では患者への負担が比較的少ない治療であると言える。CRISPR-Cas9をはじめとするゲノム編集法については優れた総説・書籍・解説³⁾がいくつも存在しているので、それを参照していただきたい。核酸医薬品に続いて間違いなく必要とされる次世代の技術である。しかし、核酸医薬品と同様に実治療に利用するためにはいくつかの問題点をクリアする必要がある。まず、最も大きい問題は目的以外の箇所を改変してしまうオフターゲットである。ゲノム編集法の代表的立場にあるCRISPR-Cas9法を例にあげると、その構成要素は、細菌由来のCas9タンパク質とターゲットを認識するためのgRNA(guide RNA)である(実際には核内で遺伝子編集を行う必要があるため、Cas9タンパク質にはその生物で機能する核移行シグナルが多くの場合付与されている)。それらを細胞あるいは個体に導入することで、ターゲットサイトの改変・編集を行う。ターゲットサイトの認識には80 merからなるgRNAを利用することが多いが、その80 merの内、20 merがターゲット認識を担い、残りの60 merがCas9との複合体形成に使われる。種々の研究結果から示されているように、この認識に関わる20 merがターゲットサイトと配列が似ているゲノム上の別の箇所に結合すると、不幸にして意図しない編集が起こってしまう。これがオフターゲットである。オフターゲットが起こった細胞を治療では除く必要があり、配列の決定に伴うクローン化やなんらかの形態変化をセルソー

ターなどで検出して分離する。また、治療にあたっては、仮にオフターゲットを生じさせない革新的技術が構築されたとしても、Cas9タンパク質が細菌由来であることから、当然個体への投与 (*in vivo*) においては異種タンパク質と認識され、抗体産生が促され、免疫学的問題が生じてしまう。現時点ではゲノム編集薬を哺乳類の個体に直接利用することは不可能に近く、細胞治療・細胞移植などでの利用 (*ex vivo*) に限定されている。*ex vivo* 治療が不可能な疾患に対して *in vivo* 治療を行うためには、革新的な技術開発 (オフターゲットが限りなく少なく、異種由来のタンパク質を利用しないゲノム編集法) が求められ、開発が進んでいる。次章では、著者らが取り組み、最近マウス個体内での *in vivo* ゲノム編集に成功した、核酸のみによるゲノム編集法 (Sense-strand Technology:ST) について概説する。

オリゴ核酸のみを利用するゲノム編集法: ST法など 06

ST法とは、オリゴ核酸のみを導入してゲノム編集をする方法である。緑膿菌の抗生物質耐性獲得機構の解析から見出された、ほぼ全ての生物が有すると考えられる自己ゲノム編集機構を応用した技術であり、上記システムをmimicした100 mer程度の一本鎖オリゴ核酸を編集したいターゲットサイト用に調製し、細胞に導入することによって行われる (図2)。まだまだ解析すべき点は残されているものの、現時点ではオフターゲットがほぼ観察されておらず、*in vivo* での遺伝子治療に利用できる可能性を十分に秘めている。そのメカニズムは、CRISPR-Cas9法に代表される異種生物由来のヌクレアーゼを導入する従来のゲノム編集法と根本的に異なり、導入オリゴ核酸を介した修復により行われていると推察されている。全てのサイトで高効率に行えるとは言い難い (CRISPR-Cas9でも同様) が、ターゲットによっては、ヒト細胞を用いた実験において導入から正確な編集までを最高で数%程度で行えるところまで改良が進んでいる。

本節冒頭にも触れたように、ST法の開発のきっかけとなったのは緑膿菌の抗生物質耐性獲得機構の解析にある^{4,6)}。緑膿菌は医療現場において極めて注視すべき細菌の一つであり、水があればどこにでも存在する環境常在菌であるばかりか、免疫力の低下した患者に度々感染する日和見感染症の原因菌である。本菌は元来抗生物質に耐性を示すが、厄介なことに抗生物質に曝露されると容易にさらなる耐性化を果たしてしまう。このような急激な耐性の獲得は本菌が有する耐性獲得機構の巧みさにあることがわかっている。この耐性獲得機構は、外膜の透過障壁性と様々な薬剤を排出するRND型の異物薬物排出トランスポーターの発現による⁷⁾。本菌はゲノム中に12種のRND型異物薬物排出トランスポーターを有しており、どれか一つでも高発現すれば多剤耐性化を果たす^{7,8)}。野生株ではMexAB-OprMポンプのみを中程度レベルで発現しており、一般的な細菌よりも抗生物質に対して耐性を示す。残りの11種に関しては、(発現の揺らぎや一過的条件で発現することもあるが) 通常発現が抑制されサイレ

ントな状態にあり、MexAB-OprMを含めてレギュレーター遺伝子の変異により高発現化し、種々高度多剤耐性化を果たす。その中の一つにMexEF-OprNを高発現する *nfxC* 変異株がある。この株は、臨床でしばしば現れる変異株であるが、この耐性獲得機構が非常にユニークである。著者らが解析を続け見出した自己ゲノム編集機構により、ゲノム中の遺伝子が存在しない領域に正のレギュレーター *mexT* 遺伝子を作り出すことで、通常サイレントなMexEF-OprN異物薬物排出トランスポーターの高発現を促し、本菌を多剤耐性株へと誘導する。その後の解析から、この自己ゲノム編集機構はある特徴的な構造を形成する遺伝子配列が自ら特殊な核酸を作り出し、その核酸を介してターゲットサイト (遺伝子領域) を書き換え、遺伝子を作りだしたり壊したりして環境に適応しようゲノムを意図的に変化させていることがわかった。その後、解析をさらに続け、この核酸を人工的にデザインしてゲノム編集を人為的に起こさせることに成功した。すなわち、100 mer程度のオリゴ核酸を細胞に導入するだけで遺伝子をデザイン通りに編集できることを明らかにし、本手法をST法と名付けて基本の知財の獲得を果たした⁹⁻¹²⁾。繰り返しになるが、本法の特徴は100 mer程度の核酸を導入するだけでターゲットサイトのゲノム編集を行える点にあり、タンパク質成分を導入する必要がない。本機構に必要なタンパク質因子はほぼ全ての生物が有していると考えられ、実際、ST法は細菌でもマウスでもヒト細胞でも起こすことが可能であった。少々機構が異なるようであるが、オリゴ核酸のみで編集が可能な方法としてオリゴヌクレオチド誘発突然変異導入技術 (Oligonucleotide Directed Mutagenesis:ODM法) がある。これらの方法は、導入したタンパク質成分に対して抗体が産生される *in vivo* 治療や、塩基置換に代表されるゲノム・遺伝子改変に特に有用であると思われ、さらなる改良が楽しみな技術である。なお、ODM法に関しても、編集の効率を高めるさまざまな取り組み、投与核酸への修飾や *extra* 配列の導入によるループ化などの工夫が行われている。また、ST法の研究開発を行う中で、本手法では全くゲノム編集が起こらない領域が存在することも明らかになった。面白いことに、その領域ではゲノム編集を妨げる因子の存在が疑われ、その因子をタンパク質成分の導入なしに、単純な核酸によって除くことにも成功した。その結果、全く編集を起こせない領域においても、比較的高頻度で編集を可能にすることにも成功している。さらに、ST法を基盤技術として近年設立されたベンチャー企業の Nexspirial株式会社¹³⁾は、マウス個体に対してST法でゲノム編集を行い、効率こそまだ低いもののターゲットサイトの正確な編集に成功している。実用化に向けて安全性の確認などを詳細に検討しているところであるが、*ex vivo* による遺伝子治療では効果・治療が期待できない希少疾患などへの治療に光明を指すものとして大いに期待されている。技術は日進月歩であり、その有効性や優位性から今後ますますゲノム編集法の利用・改良が行われ、近い将来、幾つものゲノム編集の手法の中から用途に合わせて選択できるようになると期待される。

ゲノム編集法、特にCRISPR-Cas9法はその知財のほぼ全てが海外のものとなっているが、今回紹介したST法や徳島大学 刑部敬史教授・東京工業大学 刑部祐里子教授らが開発したTiD法¹⁴⁾は本国オリジナルのゲノム編集技術である。今後の医療の一端をゲノム編集法が担う可能性はとて高いと思われ、安全性が担保されればオリゴ核酸のみによる遺伝子治療の実用が進んでいくものと思われる。その実現のためには、安全性の確認はもとより、オリゴ核酸の種々の実用に即した品質評価法の確立が必須であると思われる。そして、核酸医薬品を含めゲノム編集法で利用するオリゴ核酸の需要は拡大の一步を辿ることは疑いようがなく、国策としての供給体制の充実とそのプラットフォームの確立が急務となる。法整備を含め、産学官の協調・連携を早急に進めていく必要がある。

一方、オリゴ核酸自体は自動合成機と原料さえあればどのような配列であっても自由に合成することができる。上記のガイドラインに従ったグレードの核酸を合成できる合成機を開発することで、近い将来より身近に核酸薬による個別化医療などが進んでいくと想像される。その場合、on site(薬局でなくとも、公民館、コンビニ、はたまた患者の自宅)で自分に合った核酸薬の入手が可能になると信じており、これにより医師のいない地域であっても、ポツンと一軒家であっても、インターネットとのコラボレーションによって安価で患者ファーストな個別化治療が進む未来が訪れることを著者は夢見ている(図3)。高齢化社会が進む特に本国においては、まさに核酸薬の存在は医療システムの維持発展に必須な技術の一つであると思われ、これは世界共通のシステムの構築に向けてまさに本国が先導して進めていく問題であると感じてやまない。

参考文献

1. 国立医薬品食品衛生研究所, 感染症予防用 mRNA ワクチンの臨床開発状況, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section3-2.pdf> (参照 2023-04-03)
2. 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html> (参照 2023-04-03)
3. 山本卓. ゲノム編集の歴史と基礎 https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/CT_251_01.pdf THE CHEMICAL TIMES. 2019, 1, 3-6.
4. H. MASEDA, H. YONEYAMA, and T. NAKAE. Assignment of the Substrate-Selective Subunits of the MexEF-OprN Multidrug Efflux Pump of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44, 3, 658-664.
5. H. Maseda, K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 192, 1, 107-112.
6. H. Maseda, M. Uwate, and T. Nakae. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 2010, 311, 1, 36-43.
7. C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warren, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000, 406, 959-964.
8. Y. Ichise, T. Kosuge, M. Uwate, T. Nakae, and H. Maseda. Complete Genome Sequence of Pseudomonas aeruginosa Strain 8380, Isolated from the Human Gut. Genome Announc. 2015, 3, 3, e00520-15.
9. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 6899564 号, 優先日 20160812.
10. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 6952315 号, 優先日 20160812.
11. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 7029741 号, 優先日 20160812.
12. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 7078946 号, 優先日 20160812.
13. Nexuspiral 株式会社 <https://nexuspiral.co.jp/> (参照 2023-04-03)
14. K. Osakabe, N. Wada, T. Miyaji, E. Murakami, K. Marui, R. Ueta, R. Hashimoto, C. Abe-Hara, B. Kong, K. Yano, and Y. Osakabe. Genome editing in plants using CRISPR type I-D nuclease. Commun. Biol. 2020, 3, 648.

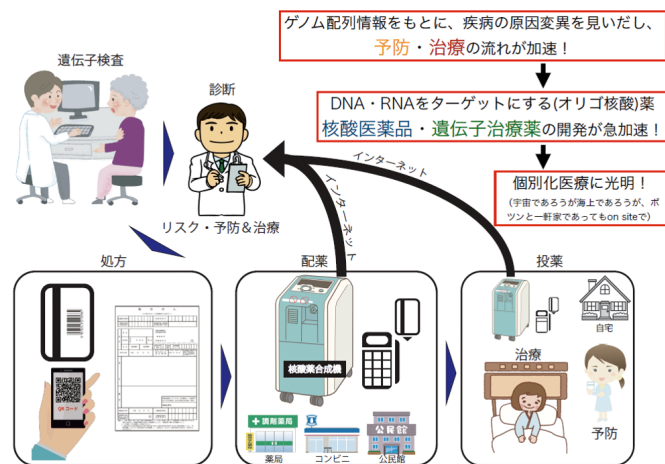


図3 核酸薬が導く将来の医療