

シンポジウム | イノベーション共創プログラム (CIP) : バイオ医薬品の最前線を支えるスマートケミストリー

📅 2025年3月26日(水) 13:05 ~ 15:40 🏢 [E]F402(第2学舎 4号館 [4階] F402)

[[E]F402-1pm] バイオ医薬品の最前線を支えるスマートケミストリー

座長、シンポジウム関係者：世古 信三、千葉 明

低分子医薬品では満たされなかったニーズを満たす新時代の医薬品として期待される。抗体医薬や核酸医薬そして細胞などのバイオ医薬品の新薬ト市が近年急増している。今回は、抗体医薬・ADC、核酸医薬に加え、昨年度のアナケートで要望の多かったゲノム編集やmRNA医薬に関する講演も盛り込みました。本セッションでは、これらバイオ医薬品の開発・生産をガラス生体材料や技術に関する化学とバイオ医薬品の安全性評価や社会実装に関して議論します。

本セッションは午前、午後、夕刻に実施されます。

聴講後の[アナケート](#)へのご協力をお願いいたします。

🎤 日本語 🎤 依頼講演

13:05 ~ 13:40

[[E]F402-1pm-01]

CRISPR-Cas3ゲノム編集技術の応用に向けた開発

○小堀 峻吾¹ (1. C4U株式会社)

🎤 日本語 🎤 依頼講演

13:40 ~ 14:15

[[E]F402-1pm-02]

精密な遺伝子改変を志向したゲノム編集技術への細胞機能の利用

○野村 渉¹ (1. 広島大学)

14:15 ~ 14:30

[1E_F40204-07-3add]

インキュベーションタイム

🎤 日本語 🎤 依頼講演

14:30 ~ 15:05

[[E]F402-1pm-03]

化学を基盤とするmRNA医薬製造技術の開発

○阿部 洋¹ (1. 名古屋大学)

🎤 日本語 🎤 依頼講演

15:05 ~ 15:40

[[E]F402-1pm-04]

分子ディスプレイ細胞によるバイオ医薬品デザイン

○門之園 哲哉¹ (1. 東京科学大学)

CRISPR-Cas3 ゲノム編集技術の応用に向けた開発

(C4U 株式会社¹) ○小堀 峻吾¹

Development of Cas3 genome editing technology for application (¹ C4U Corporation)

○Shungo Kobori¹

Genome editing technology is a technique to alter the characteristics of an organism's by cutting specific region of the genome and rewriting the genome. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), a type of nuclease responsible for such cleavage, is extremely versatile in that it can target any sequence designed by the experimenter and has revolutionized genome editing. CRISPR-Cas3 is a family of enzymes classified as Type I, and the most familiar microorganism, *Escherichia coli*, also possesses Cas3. CRISPR-Cas3 has helicase activity, which Cas9 does not have, and thus can continuously cleave the genome and induce large deletions. In addition, CRISPR-Cas3 has been shown to have a very low off-target effect, which is a major obstacle in practical applications. In this presentation, the features of the CRISPR-Cas3 system and its potential for industrial applications will be presented.

Keywords: Genome editing; CRISPR; Gene therapy

ゲノム編集技術とは、生物のゲノムに対して特定の箇所を切断し、ゲノムを書き換えることで特性を変化させるものである。その切断を担うヌクレアーゼの一種が Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) であり、実験者が設計した任意の配列を標的とすることができる点において、非常に汎用性が高くゲノム編集において革新をもたらした。CRISPR システムには最も一般的に用いられている Cas9 の他、様々な種類があり CRISPR-Cas3 もその一つである。CRISPR-Cas3 は、Type I に分類される酵素群であり、最も身近な微生物である大腸菌も Cas3 を所持している。CRISPR-Cas3 は Cas9 にはないヘリケース活性を持っているため、ゲノムを連続的に切断することが可能あり、大きな欠損を誘導できるという特徴がある。また実用上の大きな障害となるオフターゲット効果が極めて低いことがわかっている。今回は CRISPR-Cas3 システムの特徴とともに、産業応用への可能性について紹介したい。

精密な遺伝子改変を志向したゲノム編集技術への細胞機能の利用

(広大院医系科学) ○野村 渉

Genome Editing Technology Using Cellular Functions for Precise Genetic Modification
(Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University) ○Wataru Nomura

Genome editing has paved the way for highly efficient gene correction toward the next generation gene therapy. CRISPR-Cas9 has been developed for genetic modification of a variety of organisms. In human gene therapy applications, the low efficiency of homologous recombination in genome editing and off-target effects are critical issues that must be resolved for safer use. In homologous recombination, the target sites are modified precisely as per the donor sequences. Homologous recombination is known to be predominant in the S/G2 phases of cell cycle. There are several applications that utilize small molecules to control genome editing activity in cells to repress off-target effects or increase homologous recombination. However, it is difficult to apply these methods to in vivo therapy. We have developed “cell cycle-dependent genome editing” to control genome editing without the help of small molecules and found that it can solve the above critical issues.

Keywords : *Anti-CRISPR; Cell Cycle; CRISPR-Cas9; Genome Editing; Homologous Recombination*

CRISPR-Cas9 を利用したゲノム編集技術は生物種を問わず遺伝子改変を高効率に行える技術として発展してきている。特にヒトを対象とした遺伝子治療においても *ex vivo* での鎌状赤血球症の治療法は FDA 承認を得ており、ヒト体内 (*in vivo*) でのゲノム編集法も開発が進んでいる。標的遺伝子における特異的な遺伝子切断にはゲノム編集ツールが機能するが、切断後の修復過程は細胞内因子に依存する。修復過程には非相同末端結合 (Non-homologous End Joining; NHEJ) と相同組み換え (Homology-directed Repair ; HDR) が存在する。NHEJ は効率が高いが、標的配列における数塩基の挿入や欠失 (Indel) が様々に起こる。それに対して HDR では標的周辺の配列と新たに導入する配列を有するドナー遺伝子をゲノム編集の際に同時に細胞に導入することで、低効率ではあるが標的箇所に正確に新しい配列を有する細胞が得られる。HDR は S/G2 期に優位になるため、薬剤で細胞周期を停止させる手法などが報告されている¹⁾。これらの手法は培養細胞では有効な手段となるが、*in vivo* での利用は困難なことが容易に予測できる。また、薬剤による細胞への影響も考慮する必要がある。

CRISPR-Cas システムは細菌や古細菌が有している防御システムであり、ファージの侵入時に発動する。それに対するカウンター分子として様々な anti-CRISPR がプロファージから発見されている。CRISPR-Cas システムのヒト細胞におけるゲノム編集への応用は化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の Cas9 (SpCas9) が最初に報告され、最も汎用されている。SpCas9 を強力に阻害する anti-CRISPR として AcrIIA4 が知られている。我々は、『細胞周期』と『anti-CRISPR (AcrIIA4)』に着目し、HDR 反応効率の向上を試みた。S/G2 期において SpCas9 を活性化するために、G1 期に細胞

核内に集積し、S/G2 期に分解される Cdt1 と AcrIIA4 の融合タンパク質 (AcrIIA4+Cdt1) をゲノム編集時に利用することで G1 期では SpCas9 が阻害され、S/G2 期ではゲノム編集活性が回復すると考えられた。解析の結果、HDR 効率が向上することに加えて、オフターゲット作用の抑制も見られることが明らかとなった²⁾。この手法では薬剤や光刺激などを用いることなく細胞周期に依存してゲノム編集活性を制御することが可能であるため、*in vivo* での正確なゲノム編集への応用も可能であると考えて研究を進めている。また、CRISPR-Cas システムは SpCas9 以外にも多数発見されており、ヒト細胞のゲノム編集への応用が進められている。それらに対する anti-CRISPR も同様に存在するため、非常に高い拡張性も期待される。また、Cas9 側の機能と組み合わせることでより正確なゲノム編集も可能になることも明らかとなってきた^{3,4)}。

本手法において AcrIIA4+Cdt1 が細胞周期依存的に核内への集積と分解を繰り返していることは確認されていたが、実際にゲノム編集活性も制御していることを確かめることは困難であった。そこで転写活性制御を中心としたエピゲノム編集に利用される人工転写活性化因子の dCas9-VPR を Cas9 に代替して用い、蛍光タンパク質の発現制御によって細胞周期依存性を検討した⁵⁾。dCas9 はヌクレアーゼの活性中心に変異が導入 (D10A/H840A) されており、DNA 結合機能だけを保持している。VPR は強力な転写活性化ドメイン (VP64-p65-Rta) であり、dCas9-VPR がプロモーター領域に結合するようガイド RNA を設計した。蛍光観察により AcrIIA4+Cdt1 と転写活性の指標となる蛍光レポーターの発現を解析した結果、それらの発現は負の相関を示しており、AcrIIA4+Cdt1 の分解から蛍光レポーターが最大値を示すまでの時間差が約 5 時間程度であり、蛍光タンパク質のクロモフォア形成に要する時間などを考慮すると AcrIIA4+Cdt1 による dCas9-VPR の活性制御が細胞周期に応じて起こることが示唆されたと考えられる。

本講演ではこれらの結果に加え、細胞機能を利用するスマートケミストリーの可能性やゲノム編集技術の開発動向なども紹介する。

- 1) Molecular Switch Engineering for Precise Genome Editing. D. Matsumoto, W. Nomura, *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32, 639-648.
- 2) A Cell Cycle-dependent CRISPR-Cas9 Activation System Based on an Anti-CRISPR Protein Shows Improved Genome Editing Accuracy. D. Matsumoto, H. Tamamura, W. Nomura, *Commun. Biol.* **2020**, 3, 601.
- 3) Cas9-Geminin and Cdt1-fused Anti-CRISPR Protein Synergistically Increase Editing Accuracy. D. Matsumoto, K. Kishi, E. Matsugi, Y. Inoue, K. Nigorikawa, W. Nomura, *FEBS Lett.* **2023**, 597, 985-994.
- 4) SpCas9-HF1 Enhances Accuracy of Cell Cycle-dependent Genome Editing by Increasing HDR Efficiency, and by Reducing Off-target Effects and Indel Rates. D. Matsumoto, E. Matsugi, K. Kishi, Y. Inoue, K. Nigorikawa, W. Nomura, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2024**, 35, 102124.
- 5) Cell Cycle-dependent Regulation of CRISPR-Cas9 Repetitive Activation by Anti-CRISPR and Cdt1 Fusion in the CRISPRa System. K. Kishi, K. Nigorikawa, Y. Hasegawa, Y. Ohta, E. Matsugi, D. Matsumoto, W. Nomura, *FEBS Lett.* **2024**, *in press*.

化学を基盤とする mRNA 医薬製造技術の開発

(名大院理¹・糖鎖コア²) 阿部洋^{1,2}

Development of chemistry-based mRNA drug manufacturing technology (¹*Graduate School of Science, Nagoya University*, ²*iGCORE*) Hiroshi Abe^{1,2}

During the coronavirus crisis, mRNA vaccines have demonstrated their effectiveness, leading to increased interest in mRNA therapeutics. However, current mRNA vaccines were granted emergency use authorization, highlighting several challenges that need to be addressed for their broader application. Specifically, advancements in delivery technology and improvements in mRNA stability and translational efficiency are critical challenges. The delivery methods for nucleic acid drugs, such as RNA interference and antisense oligonucleotides, have been under development for some time, and some of this knowledge has been adapted to mRNA therapeutics. In addition, many researchers are actively working on unique mRNA delivery systems. On the other hand, in terms of mRNA stability and translational function, progress has been limited due to the reliance on biological techniques for large-molecule mRNA manufacturing, resulting in little development in molecular design approaches. The amount of protein synthesized from mRNA depends on its stability and translational efficiency. We have identified a methodology that enhances both stability and translational efficiency through chemical modifications and higher-order structural designs, introducing a novel molecular design strategy. Furthermore, we have developed a new method, called PureCap, to produce capped mRNA with high purity. Here, we report on these recent advancements.

Keywords : mRNA, Cap, synthesis, translation

コロナウイルス禍において mRNA ワクチンがその効果を発揮し、mRNA 医薬への注目が高まっています。しかし、現在の mRNA ワクチンは緊急承認を受けており、今後、汎用化を進めるためには解決すべき課題がいくつかあると認識されています。特に、①デリバリー技術と、②mRNA の安定性および翻訳効率の向上が重要な課題として挙げられます。①のデリバリー法は、RNA 干渉やアンチセンス核酸などの核酸医薬のデリバリー技術として以前から開発されており、これらのノウハウが mRNA 医薬にも応用されています。また、多くの研究者が独自の mRNA デリバリー法の開発に取り組んでいます。一方、②の mRNA の安定性や翻訳機能に関しては、巨大分子である mRNA の製造方法が主に生物学的手法に限られているため、分子設計法の開発がほとんど進んでいません。mRNA からのタンパク質合成量はその安定性や翻訳効率に依存しています。我々は、mRNA の安定性と翻訳効率の双方を向上させる方法論として、化学修飾や高次構造設計を mRNA に適用することで、翻訳サイクルの効率を向上させることを見出し、独自の分子設計法を提案してきました。さらに、キャップ化 mRNA を高純度で製造できる新しい手法「PureCap 法」を開発しました。これらの最近の成果について報告します。

1. *Nature Communications* 14(1) 2657-2657 2023. We have identified a methodology that enhances

分子ディスプレイ細胞によるバイオ医薬品デザイン

(Science Tokyo¹) ○門之園 哲哉¹

Biologics Design using Molecular-Displaying Cells

(¹*School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*) ○Tetsuya Kadonosono¹

Current biologics include monoclonal antibodies, antibody-drug conjugates (ADCs) that combine antibodies with small-molecule drugs, bispecific T-cell engagers (BiTEs) that utilize the antigen-binding domains of antibodies, and chimeric antigen receptor (CAR) T cells. These biologics are clinically used as molecular-targeted drugs for the treatment of various diseases, including cancer. A key feature of these drugs is their high specificity and efficacy, achieved through strong binding to antigens. However, excessively high antigen affinity has been reported to cause severe side effects or reduce therapeutic efficacy.

To address these issues, there is growing interest in developing high-performance biologics by optimizing antigen affinity using machine learning. However, technologies that enable the simultaneous characterization of candidate molecules, which serve as training data for machine learning, are still under development. In this presentation, I will introduce recent our research to develop technologies for analyzing epitope and antigen-affinity of numerous candidate molecules using a mammalian molecular display system.

Keywords : *Biologics Design; Molecular Display System; Machine Learning; Epitope; Antigen Affinity*

現在のバイオ医薬品の代表的なモダリティとして、抗体、抗体に低分子薬物を付加した抗体薬物複合体 (ADCs)、抗体の抗原結合ドメインを利用した二重特異性 T 細胞誘導抗体 (BiTEs)やキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞)などが開発されており、がんを始めとする様々な疾患の分子標的治療薬として用いられている。これらのバイオ医薬品はいずれも抗原に強く結合することで、高い特異性と薬効を発揮することが特徴であるが、抗原親和性が強すぎる場合には重篤な副作用が発生したり、薬効が低下したりすることが報告されている。

そのため機械学習を活用した抗原親和性の最適化により、高性能なバイオ医薬品を開発することが期待されている。しかし現時点では、機械学習の教師データとなる多数の候補分子の特性を一括取得する技術は開発段階にある。そこで本講演では、我々が開発を進めてきた哺乳類細胞ディスプレイシステムを活用する、候補分子のエピトープや抗原親和性の一括解析技術^{1,2)}を紹介する。

- 1) Antibody-guided design and identification of CD25-binding small antibody mimetics using mammalian cell surface display. K. See, T. Kadonosono*, K. Miyamoto, T. Tsubaki, Y. Ota, M. Katsumi, S. Ryo, K. Aida, M. Minegishi, T. Isozaki, T. Kuchimaru, S. Kizaka-Kondoh, *Sci. Rep.* **2021**, 11 (1), 22098.
- 2) Epitope binning for multiple antibodies simultaneously using mammalian cell display and DNA sequencing. N. Lin, K. Miyamoto, T. Ogawara, S. Sakurai, S. Kizaka-Kondoh, T. Kadonosono*, *Commun. Biol.* **2024**, 7, 652.