

2.3.7 ゲノム編集・エピゲノム編集

(1) 研究開発領域の定義

ゲノム編集 (Genome Editing) は、微生物から動物、植物まで原理的には全ての生物種に適用可能なこと、さまざまなタイプの遺伝子改変が可能であることから次世代のバイオテクノロジーと位置づけられている。近年ではDNA切断による編集のみならず、DNA 修飾タンパク質などの機能ドメインとの融合や標識のような新たな技術開発が進展している。特に、DNAやヒストンの修飾酵素のドメインを連結することによって特異的にエピゲノム情報を改変する技術としてエピゲノム編集や二本鎖DNA切断を伴わずに特定の塩基を書き換える塩基編集やプライム編集が注目されている。

(2) キーワード

ゲノム編集ツール、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas12a、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、塩基編集、プライム編集、RNA編集、エピゲノム編集、微生物菌株育種、品種改良、疾患モデル、ゲノム編集治療、CRISPR診断

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ゲノム編集は、人工のDNA切断酵素 (ゲノム編集ツール) を用いて標的遺伝子に塩基配列特異的なDNA二本鎖切断 (Double-Strand Break: DSB) を誘導し、その修復過程を利用して正確に遺伝子を改変する技術である。ゲノム編集の新たな手法を開発した、ジェニファー・ダウドナとエマニュエル・シャルパンティエには2020年のノーベル化学賞が授与されている。

ゲノムは個々の生物がそのDNA上に有する遺伝情報の総体である。ゲノムを自在に改変することが可能になれば、理論的には設計通りの遺伝情報を有する生物を作成することが可能になる。ゲノム編集は、これまで一部のモデル生物に限られた標的遺伝子の改変を全ての生物種を対象として可能にする技術である。実際、簡便なゲノム編集ツールであるCRISPR-Cas9システム (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated protein 9) が開発された2012年以降、さまざまな生物を対象とした精密な遺伝子改変が可能となった。ゲノム編集では、挿入・欠失変異導入により遺伝子機能を欠損させる遺伝子ノックアウト、外来DNAを挿入する遺伝子ノックインや、染色体レベルの改変 (大きな欠失、逆位や転座) も可能である。ゲノム編集を用いた遺伝子改変の成功例は微生物から動物・植物までさまざまな生物種を対象として世界中から報告されており、生命現象の解明を目的とした基礎研究から応用研究まで幅広い展開が期待されている。応用研究としては、機能性物質を効率的に産生する微生物 (微細藻類など) の育種や農水畜産物の品種改良への適用が進んでいる。また医学分野では、iPS細胞や免疫細胞などを用いた細胞治療、ウイルスベクターなどのデリバリー技術を伴う遺伝性疾患の生体内治療などへの応用が始まっている。

DNAを切断する技術に加えて、ゲノム編集の基盤となるDNA塩基配列の特異的な認識・結合システムを活用した技術開発も盛んである。例えば、DNA切断ドメインの代わりにさまざまな機能ドメインを連結した新たな人工因子の作製が進められている。特に、狙った遺伝子座でのエピゲノム (DNAやヒストンのメチル化やアセチル化修飾) の改変、特定の塩基を書き換える塩基編集・プライム編集、DNA標識などへの利用が精力的に行われている。また、CRISPRライブラリーを用いた機能因子のスクリーニング法は、未知の因子の探索に利用される優れた技術であり、疾患関連因子の同定や遺伝子の転写調節領域の探索などの分野で成果が挙げられている。

[研究開発の動向]

ゲノム編集ツールとしては、DNAに特異的に結合するZinc-fingerドメインまたはTranscription

activator-like effector タンパク質由来のドメインを制限酵素 *FokI* の DNA 切断ドメインと連結させたキメラタンパク質の ZFN (Zinc finger nuclease)、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) が開発されてきた。ZFN の作製は高度な技術が必要であったが、TALEN では比較的簡便に任意の塩基配列を切断することが可能となった。加えてオフターゲット切断 (目的以外の DNA の切断) の問題も大きく改善された。しかし、作製方法は依然として複雑であり、全ての研究者が利用できる状況にはなかった。そのような中、2012 年に CRISPR-Cas9 は、新しいゲノム編集ツールとして簡便かつ高効率なゲノム編集技術として彗星のごとく現れた¹⁾。ZFN や TALEN が DNA 認識ドメインとして DNA 結合タンパク質を用いたのに対し、CRISPR-Cas9 は短鎖 RNA (gRNA) をガイドとして DNA 配列を認識するため、gRNA と Cas9 タンパク質を導入するだけでゲノム配列を改変することができるようになり、その簡便さと効率の高さから多くの研究者に衝撃を与え、汎用的なゲノム編集ツールとなった。

CRISPR-Cas9 では標的配列に PAM (Protospacer adjacent motif) とよばれる認識配列が必要であり、これが標的配列を選択する制限となっていた。そのため国内外の研究者は、CRISPR の立体構造情報をもとにしたアミノ酸改変によって、PAM 配列の特異性を変化させた変異体や結合特異性を上昇させた Cas9 変異体の開発を競って進めた。また、新しい Cas タンパク質の探索も精力的に進められており、Cas12a (Cpf1) は PAM の特異性が異なることに加え、分子量が小さいことから遺伝子治療用のベクターに搭載しやすいゲノム編集ツールとして注目されている²⁾。Cas12a による DNA 二重鎖切断は、Cas9 のような blunt end ではなく sticky end になるため、ドナー DNA の挿入を一方向に限定できるという特徴を持つ。さらに小型の Cas14 や CasX、CasΦ (Cas12j)、Cas12f などが報告されており、特に Cas12j は最もコンパクトな Cas タンパク質として期待されている³⁾。また、オフターゲット問題を改善するものとして、切断特異性を高めた CRISPR-Cas9 (HiFi-Cas9) が発表されている⁴⁾。国内では東京大学の濡木らによって開発された SpCas9-NG では、これまでの SpCas9 の PAM (5'-NGG-3') が 5'-NG-3' に改良された⁵⁾。さらに、PAM 配列に依存しない SpRY-Cas9⁶⁾、NRRH、NRCH、NRTN の PAM を認識する SpCas9 も開発され⁷⁾、標的配列の制限がほぼなくなった。

Cas9 や Cas12a などの単一エフェクターの CRISPR システムはクラス 2 に分類されるが、複数のエフェクターからなるクラス 1 の CRISPR についても注目が集まっている。東京大学の真下らは CRISPR-Cas3⁸⁾ を、徳島大学の刑部らは TiD を国産のゲノム編集ツールとして報告している⁹⁾。CRISPR-Cas3 や TiD は、複数のエフェクター複合体で認識する配列長が約 27 bp と長く (CRISPR-Cas9 は約 20 bp)、切断の特異性が高いと同時に DNA を大きく削る。これによって大規模ゲノム欠失が可能なゲノム編集ツールとして期待されている。

これまでのゲノム編集ツールは、基本的に DNA 二本鎖切断 (DSB) に依存しており、非相同末端修復によるノックアウト、相同組換え修復によるノックインが可能ではある。しかしながら、DSB による予期せぬ改変 (中規模欠失など) が問題となっていた。そこで二本鎖 DNA 切断活性を失活させた nCas9 (ニッカーゼ) と DNA の脱アミノ化酵素を連結させることにより、DSB の導入を回避して塩基レベルでの改変を実現する塩基編集 (Base Editing: BE)¹⁰⁾ や Target-AID¹¹⁾ が開発された。BE については C から T への改変を行う CBE や A から T への改変を行う ABE に加え、同時に複数の塩基改変を行う新規の BE が次々と開発されている。

さらに nCas9 と逆転転写酵素を組み合わせ、改変する配列を含む gRNA (pegRNA) を利用して逆転写によって改変する配列をゲノムに挿入するプライム編集 (Prime Editing: PE) が報告された¹²⁾。PE は培養細胞から動物や植物において成功例が報告されている。PE についてはさまざまな改変体が作製され、効率化が進む一方、pegRNA の設計には工夫が必要な面が残されている。

ゲノム編集を介した遺伝子ノックインでは、DSB 修復過程で外来 DNA を挿入する。しかし、この方法で挿入できる外来 DNA の長さには限界があり、数千塩基以上の挿入は困難である。これに対して、ゲノム編集以前から利用されてきたトランスポゼースを利用した新規の CRISPR システムの開発も進行している。これが可能となれば、CRISPR システムで標的配列を選びつつ、長鎖の外来 DNA をトランスポゼースの活性によって挿入することが可能となる。CRISPR システムを伴うトランスポゼース CAST と、dCas12 あるいはクラス 1 の

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

Cascadeと協働させることで、欠失変異の起こらない長鎖 DNA ノックインも報告されている^{13, 14)}。これらゲノム編集技術はDSBを伴わないより安全かつより正確な技術として、特に遺伝子治療などへの利用が期待されている。

エピゲノムは、DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御によって、さまざまな生命現象に関与する重要なシステムである。ゲノム編集は基本的に塩基配列を書き換える不可逆的な改変だが、可逆的に遺伝子の発現だけを制御するエピゲノム編集の技術開発が急速に進められている。dCas9に転写活性化因子VP64や抑制因子KRABなどを融合して、標的遺伝子の転写量を制御するCRISPR activation (活性化) やCRISPR interference (抑制) が報告されている^{15, 16)}。最近では内在性の転写制御因子をdCas9の周囲へ集積、転用する方法も開発されている¹⁷⁾。また、dCas9にDNAメチル化やヒストン修飾を制御する酵素を連結して、標的遺伝子の発現を制御する技術も開発されている¹⁸⁾。転写活性化をより効果的にする方法として、複数の因子を集積するSAMシステムやSunTagシステム、VPRシステムがあり、人工因子を集積することによって数十倍から数百倍の効率化を実現している。さらに、SAMとSunTagを組み合わせたTREEシステムにより複数種類の因子を集積することも可能となっている。

CRISPR-Cas13は、一本鎖RNAに配列特異的に結合して、切断する。この性質を利用して、ヒト細胞で標的遺伝子のmRNAノックダウンができる¹⁹⁾。さらに、ヌクレアーゼ活性を欠失したdCas13とRNA変換酵素ADARを融合させることで、RNA一塩基置換REPAIRが報告された²⁰⁾。さらに内在性のRNA変換酵素を標的RNAに誘導する、RNAオフターゲット編集がほとんどない究極のRNA編集も発表されている²¹⁾。RNA編集はゲノム編集に比べて効果が一過的であり、さまざまな利用で大きなメリットが期待できる。

動物を対象にしたゲノム編集には体外 (*ex vivo*) 法と体内 (*in vivo*) 法がある。例えば、ヒトの造血幹細胞またはリンパ球が標的の場合、細胞を体外に取り出して編集する体外法を適応できる。一方、神経細胞、肝細胞、骨格筋を標的にしてゲノム編集する場合は体内法が適する。ゲノム編集ツールの導入は、体外法ではエレクトロポレーション法によってヌクレアーゼタンパク質を導入し、体内法ではAAVベクター、または脂質ナノ粒子 (lipid nano particle : LNP) を用いてヌクレアーゼ遺伝子を導入するのが主流である²²⁾。疾患モデル動物の治療などにおいて、一過性のヌクレアーゼ発現を可能にするために、デリバリーをタンパク質 (具体的には、Cas9タンパク質とgRNAの複合体) やヌクレアーゼmRNAをLNPの形で送達することが近年注目を集めている。LNPによる送達は、今後肝臓のゲノム編集については主流になると思われる。実際に高効率に肝臓のゲノム編集が可能である²³⁾。動物体内で異種タンパク質Cas9が発現し続けると、Cas9に対する免疫反応が惹起され、その発現細胞は免疫拒絶されることが想定され、標的以外のDNAを切断するオフターゲットのリスクが高まるかもしれない。各種導入法によるCas9の細胞内残存時間を比べると「AAV」mRNA」タンパク質」となる。Cas9の発現をなるべく短期間で済ませるという観点では、タンパク質の形での導入が最もよいと言える。タンパク質導入法としてはエレクトロポレーションが一般的であるが、最近、レンチウイルスベクター外殻を使ってヌクレアーゼタンパク質を運ぶベクターが開発された²⁴⁾。

植物においては (作物の品種改良など)、アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え技術によって、一旦ヌクレアーゼ遺伝子をゲノムDNA中に挿入するのが一般的であるが、発現カセットを除くためには戻し交雑が必要となり煩雑である。そのため、ヌクレアーゼタンパク質とRNAの複合体をプロトプラスト (細胞壁を除いたもの)²⁵⁾ や成長点に導入する方法によって、外来DNAの導入を経ることなく新品種を作出する方法が開発されている²⁵⁾。

ヌクレアーゼによるDNA切断部位に遺伝子を導入する遺伝子ノックイン技術としては、広島大学が開発した20塩基対程度のマイクロホモロジーアームを利用したPITCh法²⁶⁾ や大阪大学が開発したssONA (single-stranded oligodeoxynucleotide) を介して長鎖DNAを挿入する2H2OP法²⁷⁾ などが知られている。また、理研とアメリカ・ソーグ研究所は、NHEJ (non-homologous end joining) 修復経路を利用した効率のかつ正確なHITI法を開発している²⁸⁾。この手法は相同組換え活性が低い非分裂細胞においてはノックインが困難であった点を克服すると共に、挿入する断片の方向を制御できる優れた方法である。さらに集積技術

を利用して修復因子を効率的に作用させる LoAD システムによる培養細胞での同時複数遺伝子座へのノックインが報告されている²⁹⁾。

ゲノム編集技術の応用という観点では、以下のような動きが見られる。

微生物では、モデル微生物でのゲノム編集技術確立に加えて、産業用微生物・細胞を用いた高機能物質生産、微細藻類の脂質生産量を向上によるバイオ燃料生産など応用分野を指向した研究開発が進められている。これらの分野では、CRISPR-Cas9によって改変のPOC検証を行いつつ、産業向けに使いやすいゲノム編集技術（使用料が比較的安価）へ置き換える傾向が見られる。

農業におけるゲノム編集の応用としては、米国では米国農務省がゲノム編集による外来遺伝子の挿入を伴わない遺伝子ノックアウトで作出された作物は遺伝子組換え体に相当しないとの見解を示しており、CRISPR-Casにより褐色化の原因遺伝子に変異を導入したマッシュルームなど複数の品種が既に作出されている。さらに、オレイン酸を豊富に含む大豆がTALENを使って作出され、その大豆油は既に上市されている。中国でもゲノム編集を用いた育種が積極的に進められている。農作物に加えて、ブタ、ウシ、家禽における耐病性付与を指向した育種が世界中で進められている。遺伝子ノックアウトにより新しい品種を作出する動きは今後益々盛んになると予想されるが、国によってその規制レベルには違いが見られる。米国農務省はゲノム編集によって遺伝子機能を失わせただけの場合には遺伝子組換え作物に相当せず、規制は必要ないとの見解を示した。一方、EU 最高裁判所は通常の遺伝子組換え作物と同じ規制で取り扱うべき、との判決を下している。日本では、ゲノム編集によって生じた欠失変異については、ゲノム編集ツールの発現に使われた導入核酸が残存していないことが証明できれば、遺伝子組換え生物から除外できることが示されている。サナテックシード社からはGABAを高蓄積するトマトが2021年に上市され、苗木の販売も行われている。

水畜産物におけるゲノム編集の応用は日本がリードしている。リージョナルフィッシュ社は、肉厚のマダイと成長の早いトラフグをCRISPR-Cas9を用いて作出し、既に上市している。

遺伝性疾患の研究に向けて、米国 NIH は培養細胞や動物において疾患モデルを網羅的に作成するプロジェクトを2021年に開始した。

疾患治療に向けた研究が欧米や中国を中心に進められている。例えば、高チロシン血症のモデルマウスを用いて、CRISPRシステムとssODNを静脈注射することによって原因遺伝子の一塩基変異を修正することが証明された。国内における疾患治療研究例としては、血友病BモデルマウスにおいてAAVベクターを用いてCas9を肝臓細胞で発現させるゲノム改変が可能であることが示されている。その他にもさまざまな遺伝性疾患動物モデルに対する非臨床PoCの取得が進み、単に二本鎖DNA切断に伴ったノックアウトの手法を用いた治療法に加えて、特定の塩基を修飾する塩基編集の技術応用も実臨床に進んでいる。近年注目すべき治療モデルとしては、マウスモデルで早老症の塩基編集による治療が報告されている³⁰⁾。

ゲノム編集を利用した遺伝子治療は、*in vivo* 治療と *ex vivo* 治療に分けられる。*in vivo* 治療は、体内に直接ゲノム編集ツールを導入する方法で血友病やムコ多糖症の臨床試験が進められ、さらにはトランスサイレチンアミロイドーシスの臨床試験では有望な成績が報告されている。最近、米国を中心にCRISPRを使ったレーバー先天性黒内障の臨床試験が開始された。さらに2021年、トランスサイレチン型アミロイドーシスの治療をCRISPRシステムの静脈注射によって可能とする報告がなされ、世界中を驚かせた³¹⁾。一方、*ex vivo* 治療としては、HIV感染における共受容体であるCCR5遺伝子を破壊したT細胞を作製して、感染者へ移植する臨床試験や免疫チェックポイント因子（PD-1など）を破壊したT細胞を移植する臨床試験が、米国と中国でがん治療として実施されている。造血器悪性腫瘍を標的としたキメラ抗原受容体T細胞製剤（CAR-T細胞）は、患者自身のT細胞が十分採取できないことや製剤の準備に時間がかかる欠点があった。ゲノム編集で他人のCAR-T細胞が移植片対宿主病（GVHD）を引き起こさないように工夫した、いわゆるUniversal CAR-T細胞の開発の勢いは凄まじい。βサラセミアや鎌状赤血球症に対する造血幹細胞BCL11Aを標的としたゲノム編集治療も有望な成績が報告されている。今後、造血幹細胞の遺伝子治療はレンチウイルス

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

スベクターが主体であったが、ウイルスゲノムの染色体への挿入リスクを考慮すると、今後はゲノム編集治療が第一選択になることも期待される。国内では疾患治療に向けたゲノム編集を用いた臨床研究に大きな進展は見られないが、CAR-T細胞やTCR-T細胞を、ゲノム編集を用いて作製する取り組みが進行している。

ヒト受精卵でのゲノム編集の基礎研究は、中国と英国、米国を中心に進められている。中国で3倍体の受精卵を用いた研究が行われ、その後、CRISPR-Cas9を用いたヒト正常胚でのゲノム編集によって、ヒト初期発生に必要な遺伝子や受精などに関わる遺伝子の機能解析などが進行中である。ヒト受精卵でのゲノム編集を臨床応用することは、中国の事件があったものの世界的に禁止することが確認されている。しかしながら、ロシアの研究者がCRISPR-Cas9を利用したゲノム編集ベビーを作製する計画を発表するなど注意が必要である。日本では、文部科学省からヒト受精卵にゲノム編集技術などを用いる研究に関して、「ヒト受精卵に遺伝情報改変技術等を用いる研究に関する倫理指針」が制定され、基礎研究目的については審査を経て研究することが認める方針を示している。

CRISPRに関連した注目技術としてCRISPRライブラリーを用いた機能因子のスクリーニングがあげられる³²⁾。目的の生物の全遺伝子に網羅的に対応したガイドRNAを発現するレンチウイルスベクターライブラリーを作製、培養細胞へ感染させることにより、遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを得ることが可能である。これをスクリーニングに用いることでがん化に関わる遺伝子を同定するといった利用が行われている³³⁾。この方法は、さまざまな生命現象の解明に貢献すると期待され、創薬におけるターゲット因子のスクリーニングでは複数の因子を同時に絞り込むことも可能である。

CRISPR-Casシステムは、環境中の核酸検出にも利用可能であることが示されている。Cas13は標的RNAに結合して、蛍光レポーターRNAを切断、検出することができる（SHERLOCK）³⁴⁾。Cas12aはDNAに結合して非特異的に一本鎖DNAを切断する（DETECTR法）³⁵⁾。日本からはCas13とマイクロチップ技術を組み合わせたRNA迅速診断法（SATORI法）³⁶⁾、Cas3を利用したCONAN法が報告されている³⁷⁾。これらCRISPR診断技術は、新型コロナウイルスの迅速診断薬POCT（医療現場で行うリアルタイム検査）として開発が進められている。

【論文・特許動向】

- ・ 領域全体の論文数は10年間で10倍に急増している。
- ・ 論文数と高被引用論文数では、米国、中国、欧州の順で競っている。米国の研究機関からの論文が上位を占めているが、フランスの研究機関からの論文も6位と10位となっている。日本の論文数は中国、米国、ドイツ、英国に次いで5位である。
- ・ 特許ファミリー件数は10年間で20倍に増加している。中国の特許ファミリー件数のシェアが2021年に米国を抜いて首位となった。日本は中国、米国、韓国、ドイツに次いで5位である。
- ・ Patent Asset Indexのシェアでは、米国が圧倒的な力を示している。MIT、Broad Institute、Harvardなど研究機関や遺伝子治療関連スタートアップの貢献が大きい。

（4）注目動向

【新展開・技術トピックス】

・ ゲノム編集ツールの新規開発

CRISPR-Cas9が現在広く使われているが、PAM配列の制限や特異性、ベクターを利用する際のサイズの問題などが指摘されている。そこでCas9と異なる新しいCasヌクレアーゼの開発が世界中で進行している。日本からは、ほぼPAM配列に依存しないSpCas9-NGが報告された⁵⁾。さらにNRRH、NRCH、NRTHのPAMを認識するSpCas9も開発され⁷⁾、鎌状赤血球症の塩基編集の治験に使用されている。Doudnaらのグループからはメタゲノム解析で見つかった小型のCasΦによるゲノム編集が報告された³⁾。また、日本からCas9の特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3やTiDによるゲノム編集が報告された^{8, 9)}。さらにさまざ

またCas12の発見も進んでおり、小型Casはベクターへの搭載が容易なため、注目すべきゲノム編集ツールである。一方、その切断活性は従来のSpCas9よりも弱く、切断活性の増強が期待される。小型のCas12fが切断活性を認めるのは、ダイマーとして機能するためであることが構造解析により示され³⁸⁾、このグループ内でさらに小さなAsCas12fの構造解析は、ゲノム編集活性の高い変異型タンパク質のデザインを可能にした³⁹⁾。また、ブリッジRNAが橋渡しするリコンビナーゼによる組換えメカニズムが構造解析によって解明され、新たなツールとしての期待がされている⁴⁰⁾。

・DSBを介さないゲノム編集技術（塩基編集とプライム編集）

ゲノム編集によるDSBは目的以外のDNA切断が避けられない。また、切断部位における大欠失や染色体転座のリスクが指摘されている。そこでDSBを伴わないゲノム編集が開発されている。塩基編集技術のBase EditingやTarget AIDに続き、nCas9に逆転写酵素を連結させることにより、DNAの標的部位に設計した遺伝情報を直接書き込む新たなゲノム編集法Prime Editingが開発された¹²⁾。この反応機構が立体構造解析によって明らかになり、さらなる改良が期待される⁴¹⁾。国内では、谷知江らによってA>G,C>Tの両編集を可能とするTarget-ACEが報告された⁴²⁾。また、CRISPR-CasシステムとトランスポザンCASTの協働¹³⁾やタイプI Cascadeとの協働¹⁴⁾により、DSBを導入することなくドナーDNAを標的ゲノムに挿入可能にした。さらに、CRISPR-Casシステム、逆転写酵素、セリンインテグラーゼとの協働により、DSBなしで36kbもの配列が挿入可能となった⁴³⁾。

・エピゲノム編集

エピゲノム編集技術では、転写調節領域への結合・制御やゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾を超えて、内在性の転写制御因子をゲノム領域に集積・転用する方法が開発されている^{17, 44)}。ソーク研究所はmdx欠損DMDモデルマウスにおいてユートロフィン増強発現により病態改善に成功し⁴⁵⁾、筋ジストロフィーモデルマウスでは、ラミニン相同遺伝子の活性化による病態改善に成功した⁴⁶⁾。脆弱X症候群患者由来iPS細胞において脱メチル化によるFMR1遺伝子のエピゲノム編集治療を報告している⁴⁷⁾。

・RNA編集

タイプVI CRISPR-Cas13を利用したヒト/植物細胞でのRNAノックダウン、RNA一塩基置換が進められている。中国では疾患モデルマウスにおいてCas13d/CasRxによりグリア細胞を神経細胞にリプログラムすることで神経細胞の修復に成功している⁴⁸⁾。さらにシンプルに、RNAにより内在性ADARを標的部位に集積することで、CRISPRを使わないRNA編集も報告された⁴⁹⁾。また、日本からはCas7-11によるRNA編集技術が報告され、ヒト細胞でのRNAノックダウンが可能であることが示された⁵⁰⁾。

・RNA編集活性とプロテアーゼ活性を有する新しいCRISPR

タイプIII-E CRISPR複合体はリボヌクレアーゼ活性とプロテアーゼ活性の両方を有することが複数のグループから報告された⁵¹⁾。これらの結果は、新規のRNA誘導型のRNAターゲティングとタンパク質ターゲティングとしての技術開発が期待できる。

・CRISPR診断（核酸検出技術）

ゲノム編集技術を利用して、微量の核酸を検出する技術が開発され注目されている。臨床現場で特殊な装置を必要とせず、血液や尿に含まれるウイルスや細菌を由来とする核酸、さまざまな疾病のバイオマーカー核酸を短時間、高感度に検出するPOCT技術として利用さえる。米国からCas12aを使ったDETECTR³⁵⁾、Cas13のSHERLOCK³⁴⁾、日本からはCas13とマイクロチップ技術を組み合わせたSATORI法³⁶⁾、Cas3を利用したCONAN法が報告されている³⁷⁾。これらのCRISPR検査法はPCR検査法とほぼ同等のCOVID-19検出感度を持ち、新たな新型コロナウイルス迅速診断薬として期待されている。また、米国と日本から、Cas7-11-Csx29によるRNA誘導型Protease（Craspaseなど）の報告が立て続けになされ、Protease活性を指標とした核酸検出技術が確立するのは時間の問題である^{37, 52)}。これらのCRISPR診断技術の実用化にむけて、米国ではシャーロック・バイオサイエンス社、マンモス・バイオサイエンス社などのベンチャー企業が設立され、大手医療機器メーカーとの共同研究なども盛んに実施されている。

・ゲノム編集による遺伝子治療

CRISPR-Cas9を利用した臨床研究は2016年以降進められ、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスにおいては、脂質ナノ粒子 (LNP) にCas9 mRNAを搭載し、TTR遺伝子座をノックアウトする*in vivo* ゲノム編集治療が行われた。Cas9 mRNA搭載LNPの投与によって80%以上の血中トランスサイレチンの低下をもたらす驚くべき結果が得られた⁵³⁾。さらに、 β サラセミアと鎌状赤血球症に対して、*BCR11A*をノックアウトする*ex vivo* ゲノム編集治療が行われた。*BCR11A*は胎児ヘモグロビン (HbF) の発現抑制因子であり、 β ヘモグロビン異常の上記疾患において、*BCR11A* ノックアウトした造血幹細胞の移植によって、成人でも効果的なHbFの発現が得られ、貧血の改善を認めた⁵⁴⁾。

遺伝子ノックイン治療の世界初の実施例は、2018年サンガモ・セラピューティクス社がZFNを利用して行ったムコ多糖症に対するものであった。AAVベクターを用いて、正常遺伝子を肝細胞のアルブミン遺伝子プロモーター下流に導入し、導入遺伝子の大量発現を狙った。安全性は許容範囲であったものの、長期の有効性は確認されなかった⁵⁵⁾。既に同社のパイプラインから削除されている。また、CRISPR-Cas9を用いたレーバー先天性黒内障の臨床試験が米国を中心に開始された (BLRILLIANCE 試験)。2022年11月のプレスリリースでは14症例中に3名に視力改善が認められたが、標的とする患者が想定よりも少なく、参加登録を一時中止している。

塩基編集による疾患治療も治験が開始されている。ビーム・セラピューティクス社では鎌状赤血球症の疾患特異的変異について、塩基編集で非病変変異に修復する手法を開発し⁵⁶⁾、2022年11月に臨床試験に最初の患者を登録したことをプレスリリースした。この試験ではCas9はPAMとしてCACCを認識する改変型Cas9を利用している。さらに、2022年にバーブ・セラピューティクス社では家族性高コレステロール血症の患者を対象に塩基編集でスプライス部位を*in vivo* ゲノム編集する手法⁵⁷⁾を用いた治験がニュージーランドで開始された。

CAR-T細胞におけるゲノム編集の応用は最も精力的に研究開発が行われている分野である。現行のCAR-T療法は、造血器悪性腫瘍の患者末梢血からの製造に4～5週間を要するため、その間の病勢コントロールが難しいこともある。また、繰り返す化学療法により十分なT細胞が得られないこともある。そのため健常人ドナーからのCAR-T細胞を利用するUniversal CAR-Tの概念が登場した。初期はTALENを用いてT細胞受容体とCD52をノックアウトする手法で行われ⁵⁸⁾、2症例への投与で白血病細胞の消失が認められた。その後、Universal CAR-Tの効果はCALM試験、PALL試験などでも評価された⁵⁹⁾。Universal CAR-Tは、通常のCAR-Tよりも治療効果の持続時間が短いことが指摘されている。現在は、CRISPRの応用や他の遺伝子を標的とした方法も検討されている。ゲノム編集に伴いT細胞の染色体転座が一定の割合で生じることが示唆されており、安全性を高めるために塩基編集によるCAR-Tも開発され⁶⁰⁾、2022年には白血病患者への投与が行われた⁶¹⁾。

・ゲノム編集食品

ゲノム編集技術により遺伝子ノックアウトした品種改良は実用段階にある。筑波大学はGABAを通常のトマトの約15倍多く含むトマトを開発した。農研機構は収量の多いイネを開発した。近畿大学と京都大学は筋肉量の多いマダイを開発した。高GABAトマトや肉厚マダイは2021年に上市された。

・その他

抗生剤濫用による耐性菌増加問題に対して、自治医科大学はCRISPR-Cas13aをバクテリオファージに搭載し、特定の遺伝子を持つ細菌を狙い撃ちでき人間に無害な新しい殺菌技術を開発した⁶²⁾。米国ではCRISPR-Cas9によってステロイド受容体をノックアウトしてステロイド抵抗性に改変した殺ウイルスTリンパ球が作成された⁶³⁾。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

・戦略的イノベーション創造プロジェクト (SIP第3期、2024～2028年度)

府省連携 SIP「スマートバイオ産業・農業基盤技術」として、2014年度から農水畜産物のゲノム編集技術開発、標的遺伝子探索、有用品種作出、社会実装の検討が行なわれた。第2期プロジェクトとして、複数形質の同時改変によるゲノム編集農作物の開発、DNAの精密な書き換えを可能とするゲノム編集技術の開発などが行なわれた。第3期プロジェクトでは、「豊かな食が提供される持続可能なフードチェーンの構築」として植物性タンパク質(大豆)の育種基盤構築と栽培技術確立が志向されている。

・AMED 先端的生物創薬等基盤技術開発事業 (2019～2023年度)

立体構造解析から Cas9 のコンパクト化、高活性化、PAM 改変などが実施され、デリバリー技術を中心サービスとしたモダリス株式会社(2020年に IPO)を生み出した、革新的バイオ(2014-2019年度)の次期開発事業プロジェクト。安全な遺伝子治療を目指した万能塩基編集ツールの創出、次世代 CAR-T 細胞療法の開発など遺伝子治療に向けた研究開発が主体。

・JST 共創の場形成支援プログラム (COI-NEXT、2020～2021年度育成型、2022～2023年度本格型)

ゲノム編集とデジタルトランスフォーメーション(DX)技術を組み合わせた産学連携研究のコンソーシアムを形成し、ゲノム編集基礎技術開発、微生物での改変、動物や植物での改変などのテーマを設定し、データ駆動型のゲノム編集育種を目指している。

・NIH Somatic Cell Genome editing (SCGE) (1億9,000万ドル)(米国) 2nd Phase 2023-2027

体細胞治療実現に向けて必要な各技術の開発。金額は年間 20-50 万ドル。

・DAPRA Safely Inhibiting Gene Editors B-SAFE 2024-2026 (米国)

Gene drive など、安全保障の側面が強い研究開発が進められた Safe gene プロジェクトに続き、ゲノム編集調節因子を探索するプロジェクトが開始された。

・Horizon Europe (欧州)

ゲノム編集技術の鎌状赤血球症や農業分野への応用に関するプログラムが開始された。

ゲノム編集技術研究の軸足は大学から企業に移りつつあり、米国ではゲノム編集によりオレイン酸を多く含む大豆が世界初のゲノム編集食品として上市されている。医療分野では、クリスパー・セラピューティクス社、エディタス・メディシン社、インテリア・セラピューティクス社が設立され、それぞれ10億ドル以上の資金を調達し、疾患治療法の開発を中心とした研究を進めている。塩基編集を基盤技術として2018年に設立されたビーム・セラピューティクス社は、2019年に米ナスダック市場に新規上場(IPO)を果たした。中国では、政府主導でゲノム編集研究を推進しており、医療や農業に力を注いでいる。

ZFNを用いたゲノム編集治療では、AIDSに対する世界初の実施例が発表されてから既に数年が経過した。サンガモ・セラピューティクス社はZFNとAAVベクターを利用した血友病とムコ多糖症の治験を行ったが、期待される結果は得られず、現在は開発が中断している。ZFNを利用した鎌状赤血球症の治験は進行中である。CRISPR-Cas9を用いた治療では、CRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するCRISPRセラピューティクス社が2019年11月、遺伝性血液疾患(β サラセミアと鎌状赤血球症)に対して治験を実施中である。CRISPRセラピューティクス社と同じくCRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するエディタス・メディシン社が2019年8月、遺伝性眼疾患の*in vivo*ゲノム編集治療としては世界初となる治験を行なうための患者の募集を開始した(現在、中断中)。インテリア・セラピューティクス社は、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスを標的とした*in vivo*ゲノム編集治療の良好な結果を得ている。ビーム・セラピューティクス社は塩基編集による鎌状赤血球症、バーブ・セラピューティクス社は家族性高コレステロール血症の塩基編集治療を開始した。ゲノム編集技術のCAR-T細胞療法への応用、特にUniversal CAR-Tの開発は驚くべきスピードで進んでいる。ルーカス・バイオサイエンス社はさまざまな細菌感染症に対するIND申請を終了し、一部は臨床試験が行われている。英国のUniversity College LondonとGOSHのグループにより、T細胞急性

2.3

俯瞰区分と研究開発領域 基礎基盤

リンパ性白血病に対するゲノム編集技術のCAR-T細胞療法への応用がなされた⁶¹⁾。

(5) 科学技術的課題

ゲノム編集技術に関する課題は複数あげられるが、まずは、国産ゲノム編集ツールの開発が重要である。日本からはCas9特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3によるゲノム編集が報告された⁸⁾。しかしながら効率、改変体、小型化、*in vivo*ゲノム編集などの点では、長年研究が重ねられてきたクラス2のCas9、Cas12より遅れている。今後も国内プロジェクトにおいて基盤ツール開発を継続的に進め、国産の改変技術（遺伝子ノックイン技術など）やデリバリー技術と融合することが、国産ゲノム編集技術を発展させる上で重要である。

今後、遺伝子治療などに利用されるためには、オフターゲット変異をなくしたより安全、より正確なゲノム編集技術が必要である。この部分でも日本は米中に後れを取っている。特に米国では、ゲノムを切断しない編集、Base Editor、Prime Editor、Casトランスポゾンなどさまざまなゲノム編集技術が登場している。また、標的遺伝子の転写調節領域に結合することで遺伝子発現を調節したり、ゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾によるエピゲノム編集が進められており、すでに前臨床段階におけるモデル動物でのエピゲノム編集治療が報告されている。日本でもTarget-AIDやDNA脱メチル化編集が報告されているが、エピゲノム編集のさらなる研究開発が必要である。

さらにゲノム編集ツールを制御する技術も必要になるだろう。細菌の免疫系であるCRISPR-Casシステムに対抗するためにファージがCas活性を阻害するタンパク質としてAnti-CRISPR (Acr) が発見された⁶⁴⁾。Acrは、CRISPR-Casの3段階の免疫応答（獲得、発現、阻害）のそれぞれを阻害し、またCRISPRのタイプごとに異なるため多くの種類（約2,500候補遺伝子）が存在する⁶⁵⁾。実際にAcrタンパク質を使って、細胞、植物、動物でゲノム編集の制御可能であることが報告されている。別の方法としては、光や化学物質によるゲノム編集/エピゲノム編集制御技術の開発も進められている。基礎研究から応用研究、遺伝子治療まで、これらゲノム編集制御技術が必要とされている。

ゲノム編集を利用した一塩基置換や数十塩基挿入、相同組換えを利用したノックインの効率化、実用化が進められ、より効率的、より正確なゲノム編集ができるようになってきた。一方で大規模ゲノム領域、染色体レベルでの編集という意味では、さらなる研究開発が必要である。細胞内におけるDNA損傷修復メカニズムの解明、修復機構因子の集積、相同組換え効率のさらなる向上が求められる。細胞周期や細胞分化状態に合わせた異なるゲノム編集技術や方法が求められている。ヒストン解析、染色体解析、1細胞解析、機械学習AIなどの新規解析技術と組み合わせた基礎研究が重要である。

さまざまな生物におけるゲノム編集技術の開発はまだ必要とされている。植物のCasタンパク質RNPを用いた、より効率的な品種改良が重要である。動物受精卵においては、ブタ、サルなどのより大きなモデル動物においては、100%ノックアウト、ノックイン動物の作製が求められる（同一個体中にゲノム編集された細胞とされなかった細胞が混在する、いわゆるモザイク問題の解決）。今後はゲノム編集を利用することにより、ヒト遺伝子を置換したヒト化動物の研究開発が進められるだろう。

ゲノム編集技術は、遺伝子改変とは異なる用途にも利用されている。前述の核酸検出薬としてのCRISPR診断法は代表的なものといえる。新型コロナウイルスを含む新興感染症の診断薬として、ウイルスゲノムが解読できればすぐに診断薬を開発できるというメリットが挙げられる。さらには微量サンプルにおいて一塩基変異を判別できる（感度と特異度が高い）ことから、がんの超早期発見（リキッドバイオプシー）としても期待されている。パネル技術と組み合わせることで、網羅的な感染ウイルスの検出⁶⁶⁾、核酸だけでなく細菌やタンパク質の検出も可能になっている。環境中の核酸モニタリング技術として研究開発が進められている。一方、POCTにむけた核酸の迅速検出を実現するため、マイクロリアクターとCRISPR技術を組み合わせることで、活性化したCRISPR-Casを1分子単位で検出し、標的核酸の個数を10分以内でデジタル定量することが可能となった³⁶⁾。デジタル定量により、核酸検出の感度・時間・変異識別能の向上や複数種の核酸の同時診断を可能にする学際的な研究も進められている。欧米では、情報科学との有機的な連携により、Cas7-11や

phage由来のCasなど⁶⁷⁾、核酸検出に用いることができるCRISPRシステムが続々と発見されており、今後は、それらの新規Casとナノテクを融合させたより汎用性の高い核酸検出技術が開発されるであろう。

テープレコーダーのようにDNAを記録媒体として利用する研究(DNA writer)も行われている。GESTALT法をゼブラフィッシュ受精卵に利用することで、成体各器官の細胞系譜を明らかにすることができた⁶⁸⁾。そもそもCRISPR-Casは細菌に感染するファージウイルスの一部配列をCRISPRアレイに記憶するシステムであり、Cas1-Cas2を利用して馬が走る数秒の映像をDNAに記録保存する事に成功している⁶⁹⁾。さまざまな生体反応や細胞間相互作用の解明、生体全体の細胞系譜解析など時空間的解析への利用が期待される。

(6) その他の課題

産学連携においては、ゲノム編集ツールの特許が大きな問題となる。特にCRISPR-Cas9については、企業がこの技術を利用するためには複数の特許権者へ多額の使用料を支払う必要があるようである。そのため、大企業がこの技術を利用することを控える傾向にあり、国内での産業開発力が低下している。この問題を解決する方法は、国産技術の開発であるが、ベンチャー企業が特許料を払いつつ、新しい技術を開発する後押し(国策としての推進)が必要となる。国産技術での巻き返しは見られるが、国プロや産業界からの支援は必須である。

2019年、各国でゲノム編集により作出された作物の取り扱い方針が決まった。植物について、南米諸国や日本、オーストラリアなどは、外来遺伝子などが残存していないことが確認されれば規制対象外とする。一方、南アフリカは、ゲノム編集を遺伝子組換えとして取り扱い、イギリスや中国も同様に扱いつつ、簡易な規制になっている。これはリスク評価の結果ではなく法律条文の解釈の結果であった。EUについて、2023年に、20ヌクレオチドまでの挿入や置換、任意のサイズの欠失、また、その植物の育種に使われる遺伝子プール内の遺伝子の一定制約下での挿入や置換を、新しいカテゴリーの操作として扱い、その産物を組換え体として扱わない、という提案がなされた。ニュージーランドにおいても扱いの変化の提案があり、今後の動向が注目される。ゲノム編集動物について、日本では、基本的に厚労省に届出、安全性確認、公表を経て流通される。また、遺伝子組換えに該当しないノックアウトなどの作物は基本的に食品表示基準の対象外となっている。米国では、動物も植物も、ゲノム編集動植物は、FDAやEPAの管轄であれば、ルールにのっとった個別案件ごとの審査が必要である一方、USDA管轄であれば、ルールの範囲内であれば当局による審査は必要とされない。本邦と諸外国との基準の統一化、グローバル競争に見合った考えが必要とされる。

中国ではゲノム編集したヒト受精卵から双子が誕生して、世界中の科学者から非難を浴びた。ヒト受精胚でのゲノム編集は、世界各国で基本的に中止されており、基礎研究においてその目的に応じて受精胚までの研究が認められている。2020年7月厚生労働省と文部科学省の合同部会は、ゲノム編集技術を使ってヒトの受精卵を改変し、遺伝性疾患の原因解明や治療法を探る基礎研究を進める上での指針案を了承した。併せて不妊治療に役立てる目的に限り、提供された精子と卵子から新たに受精卵を作り、ゲノム編集で改変する基礎研究に関する別の指針案も了承した。いずれの指針案も今後、意見公募などを経て指針となる。一方、ゲノム編集で改変した受精卵を母胎に戻す臨床研究については、安全性や倫理面の課題から、厚労省の専門委員会が法制化を含め規制強化の必要性を提言する報告書をまとめている。

また、ゲノム編集技術の社会受容ためには技術の安全性を示し、市民を交えて議論することが急務である。一般社団法人日本ゲノム編集学会および関連団体において、社会受容に向けた活動を活発にしていけることが重要である。

人材育成については、産業界からゲノム編集技術を使いこなせる人材の輩出を強く求められている。2018年JSTの卓越大学院プログラムにおいて広島大学の「ゲノム編集先端人材育成プログラム」が採択され、基礎研究者、治療開発者、産業技術開発者の育成を進めている。このような教育システムを産学連携のもとに展開し、産業利用に必要な技術を開発する人材、安全性評価をできる人材、ベンチャー企業家を育成するこ

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

とが必要である。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	↗	・ 小型 Cas9 や PAM の制約を回避する SpCas9-NG の開発に成功した。 ・ クラス 1 の CRISPR-Cas3 によるヒト細胞におけるゲノム編集に成功し、日本発ゲノム編集基盤技術として知財も確保された。 ・ 脱アミノ化酵素と nCas9 を利用した一塩基置換酵素 Target-AID に続いて、標的配列の C→T および A→G の異種塩基置換を起こす Target-ACEmax が開発された。 ・ エピゲノム編集：dCas9 を利用して標的遺伝子の働きを ON にする新技術（TREE システム）が開発されている。 ・ マウス胚におけるエピゲノム編集によって標的遺伝子の DNA 脱メチル化に成功した。 ・ CRISPR ライブラリーを利用した細胞増殖遺伝子、がん遺伝子、エピゲノム修飾などの探索が進展。 ・ ゲノム編集の共同研究論文数で日本の研究者が世界で 2 位と 5 位に入る⁷⁰⁾。 ・ タイプ III-E CRISPR 複合体はリボヌクレアーゼ活性とプロテアーゼ活性の両方を有することを発表した⁷¹⁾。 ・ RNA 誘導型 Protease である Craspase が発見された。
	応用研究・開発	○	→	・ 農水畜産物（イネ、トマト、キノコ、ジャガイモ、ニワトリ、ブタ、ウシ、マダイ）でのゲノム編集が進展している。 ・ Cas13 とマイクロチップ技術を組み合わせた RNA 核酸および新型コロナウイルスの高感度・迅速技術の開発が進展している。 ・ Cas3 を用いた新型コロナウイルスの検出技術の開発が進行する。 ・ エピゲノム編集技術を用いて動物実験においてヒト疾患の治療に成功している。 ・ iPS 細胞、免疫 T 細胞、疾患モデル動物を用いて、血友病、表皮水疱症、筋ジストロフィーなどの治療法開発、再生医療に向けた研究が進展している。 ・ Cas3 を基本特許としたベンチャー企業 C4U が設立され、2022 年 8 月には住友ファーマとの共同研究が締結された。 ・ エディットフォース社が 2022 年 7 月に田辺三菱製薬とのライセンス契約を締結した。 ・ アンジェス社が 2020 年に米エメンド社を買収した。 ・ モダリス社がエピゲノム編集による先天性筋ジストロフィー 1A 型の治療開発を進めている。

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

米国	基礎研究	◎	↗	・基礎研究の全ての分野で世界トップの水準を維持し、技術レベルをさらに向上させている。 ・新規の小型 Cas Φ が開発され、遺伝子治療での送達が可能ツールと期待される。 ・ヒストンのセロトニン化という新しい概念がエピゲノム編集によって解明された⁷²⁾。 ・オフターゲットの少ない HiFi-Cas9 が開発された。 ・CRISPR にトランスポゾン転移酵素をつなげたゲノム編集ツールが開発された。 ・n・ickase-Cas9 に逆転写酵素を融合させたゲノム編集ツールが開発された。 ・アミノ進化による Cas ヌクレアーゼ変異体開発が進み、PAM レス Cas9 (Science 誌) など多くの改変体が報告されている。 ・デアミナーゼを利用した Base Editing、標的に自在に塩基改変できる Prime Editing、ノックイン技術として Cas トランスポゾン、など、DSB を伴わないゲノム編集技術が次々と報告されている。 ・ゲノム編集の DNA 記録媒体としての利用、体細胞系譜追跡など新しい利用方法が開発されている。 ・RNA 誘導型 Protease である Craspase が発見された。 ・Cas と逆転写酵素、セリンインテグラーゼを融合させた PASTE 法の開発 (DSB を伴わず 36kb の配列を挿入可能)。 ・Phage 由来の Cas が発見された。
	応用研究・開発	◎	↗	・微生物での有用菌株育種、農水畜産物の品種改良、遺伝子治療への応用など、全ての分野での開発で世界トップレベルであり、大学機関、大手企業、ベンチャー企業、寄付財団などの密接な連携により、さらなる研究開発力の向上が進められている。クリスパー・セラピューティクス社、エディタス・メディシン社、インテリア・セラピューティクス社、ビーム・セラピューティクス社など多数のベンチャー企業が農作物開発、産業エネルギー開発、ヒト疾患治療法などの最先端研究開発を進めている。 ・CRISPR/Cas9、Cas12a、Cas13 さらに CRISPR 関連の基盤技術および応用技術知財の多くを確保している。 ・TALAEN での高オレイン酸大豆の作出と産業利用が進んだ。 ・<i>in vivo</i> と <i>ex vivo</i> のゲノム編集治療を積極的に進める。<i>in vivo</i> ゲノム編集治療としてレーバー先天性黒内障、トランスサイレチンアミロイドシス、サラセミア・鎌状赤血球症) の臨床試験が開始された。 ・<i>in vivo</i> 塩基変種治療 (鎌状赤血球症) の治験が予定されている。 ・ZFN、CRISPR を使ったゲノム編集治療、より安全なエピゲノム編集治療の研究開発治験が進められている。FDA には 30 以上の治験が登録され、遺伝子治療研究をリードしている。 ・新規核酸検出技術 (Sherlock 法および DETECTR 法) が開発され、新型コロナウイルス POCT 診断薬として開発されている。

欧州	基礎研究	○	→	・ CRISPR-Cas9 でのゲノム編集によって哺乳類培養細胞で大規模な欠失や染色体の再編が誘導されることを示した。 ・ ゲノム編集技術を利用して、遺伝子スクリーニング、遺伝子の機能解析など生物学的な基礎研究が目立つ。 ・ 幹細胞においてゲノム編集によるさまざまな変異（インデル変異や大規模欠失、染色体再編）を検出する CAST-seq が開発された⁷³⁾。
	応用研究・開発	○	→	・ がん治療のターゲットをゲノムワイドに探索する研究成果が報告されている。 ・ TALEN の基本特許を有するセレクトイス社が CAR-T 細胞作製など牽引している。米国企業や大学と連携して、ゲノム編集治療を進めている。 ・ 巨大製薬会社によるサラセミアなどの先天性遺伝性疾患に対する遺伝子治療への応用研究が進んでいる。 ・ 植物のゲノム編集において、台木から CRISPR の RNP を接木へ送達することによって、遺伝子組換えを回避した方法を発表している⁷⁴⁾。 ・ ドイツ・メルク社は米国から CRISPR-Cas9 特許を取得して、科学研究支援、遺伝子治療開発プログラムを推進している。 ・ イギリスの GOSH、University College London のグループにより、T 細胞急性リンパ性白血病に対するゲノム編集技術の CAR-T 細胞療法への応用がなされた。 ・ 塩基編集による改変 universal CAR-T が急性白血病患者 1 例に投与された。 ・ universal CAR-T の B 細胞腫瘍に対するに関する臨床試験の結果が公表された。
中国	基礎研究	○	→	・ CRISPR ゲノム編集関連の研究論文数が増えており、自国雑誌への成果報告も多数あるが、最先端の研究がメジャー誌にも掲載されてきている。 ・ ゲノム編集ツールや遺伝子ノックインなどの技術開発の論文も発表が顕著に増加している。 ・ CRISPR-Cas9 を用いた植物でのゲノム編集関連の論文数を多数発表している。 ・ マウス個体でのエピゲノム編集（Mecp2 の DNA メチル化）で、自閉症スペクトラムの表現型を示した。 ・ 複数の小型 Cas に関する開発が急ピッチで進んでいる。
	応用研究・開発	◎	↗	・ 国策としてゲノム編集による技術開発と新品種開発を進めている（年間数十億から数百億円の研究費）。ただ、ゲノム編集ツールや手法に中国独自のものは少ない。 ・ 農作物の品種改良で研究成果が見られる。Chinese Academy of Sciences を中心として農作物（イネ、トウモロコシ、小麦、大豆など）研究が進展している。特にプライム編集での農作物開発で多くの成果が見られる。 ・ 多様な動物にゲノム編集技術を応用している。イヌ、マウス、ラット、ブタ、ウサギなどのゲノム編集動物作製を進め、特にサルの大規模なコロニーを対象とする実験を進めている。 ・ 治療に向けた研究も活発である。CRISPR を利用した T 細胞での PD1 遺伝子破壊によるがん治療の臨床試験が進行中である。 ・ ゲノム編集によって作製したサルの体細胞からクローンサルを誕生させた。

韓国	基礎研究	○	→	- ゲノム編集研究を先導してきたソウル国立大学は、高い質の論文を発表している。 - dCas9やCas12aを利用して一塩基置換 Base Editorを開発した。 - CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用の検出技術（Digenome-Seq 法）やクロマチン解析（DIG-seq）を開発している。 - TALE デアミナーゼによるミトコンドリアのゲノム編集技術開発に成功⁷⁵⁾。
	応用研究・開発	△	→	- 農水畜産物での品種改良技術開発に力を入れている。植物での Cas タンパク質 RNP を利用した遺伝子組換えを介さないゲノム編集が報告されており、塩基改変技術を利用した植物ゲノム改変にも成功している。 - 新しいツール開発やオフターゲット作用の検出サービスなどを提供している。ToolGen 社がモンサント社とライセンス契約を結んで研究開発を進めている。 - Base Editing や Prime Editing を利用した微生物や植物、幹細胞での標的遺伝子を進めている。

（註1）フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

（註2）現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている ○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない ×：特筆すべき活動・成果が見えていない

（註3）トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

参考文献

- 1) M. Jinek, et al., “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, *Science* 337, no.6096 (2012): 816-821. doi: 10.1126/science.1225829
- 2) B. Zetsche, et al., “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system”, *Cell* 163, no.3 (2015): 759-771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
- 3) P. Pausch, et al., “CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor”, *Science* 369, no. 6501 (2020): 333-337. doi: 10.1126/science.abb1400
- 4) CA. Vakulskas, et al., “A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells”, *Nat. Med.* 24, no.8 (2018): 1216-1224. doi: 10.1038/s41591-018-0137-0
- 5) H. Nishimasu, et al., “Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space”, *Science* 361, no. 6408 (2018): 1259-1262. doi: 10.1126/science.aas9129
- 6) RT. Watson, et al., “Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants”, *Science* 17;368(6488) (2020): 290-296. doi: 10.1126/science.aba8853.
- 7) SM. Miller et al., “Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs”, *Nat Biotechnol* 38(4): (2020) 471-481. doi: 10.1038/s41587-020-0412-8.
- 8) H. Morisaka, et al., “CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells”, *Nat. Commun.* 10, no.1 (2019): 5302. doi: 10.1038/s41467-019-13226-x
- 9) K. Osakabe, et al., “Genome editing in plants using CRISPR type I-D nuclease”, *Commun Biol* 3, no.1 (2021):648. doi: 10.1038/s42003-020-01366-6.
- 10) NM. Gaudelli, et al., “Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage”, *Nature* 551, no.7681 (2017): 464-71. doi: 10.1038/nature24644
- 11) K. Nishida, et al., “Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems”, *Science* 353, no. 6305 (2016): aaf8729. doi: 10.1126/science.

aaf8729

- 12) AV. Anzalone, et al., “Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA”, *Nature* 576, no.7785 (2019): 149-57. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4
- 13) J. Strecker, et al., “RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases”, *Science* 365, no. 6448 (2019): 48-53. doi: 10.1126/science.aax9181
- 14) SE. Klompe, et al., “Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration”, *Nature* 571, no.7764 (2019): 219-25. doi: 10.1038/s41586-019-1323-z
- 15) LA. Gilbert, et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”, *Cell* 154, no.2 (2013): 442-451. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044
- 16) LS. Qi, et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, *Cell* 152, no.5: 1173-1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
- 17) AM. Chiarella, et al., “Dose-dependent activation of gene expression is achieved using CRISPR and small molecules that recruit endogenous chromatin machinery”, *Nat. Biotechnol.* 38, no.1: 50-55. doi: 10.1038/s41587-019-0296-7
- 18) S. Morita, et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions”, *Nat. Biotechnol.* 34, no.10 (2016): 1060-5. doi: 10.1038/nbt.3658
- 19) OO. Abudayyeh, et al., “RNA targeting with CRISPR-Cas13”, *Nature* 550, no. 7675 (2017): 280-284. doi: 10.1038/nature24049
- 20) DBT. Cox, et al., “RNA editing with CRISPR-Cas13”, *Science* 358, no.6366 (2017): 1019-1127. doi: 10.1126/science.aag0180
- 21) T. Merkle, et al., “Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides”, *Nat. Biotechnol.* 37, no.2 (2019): 133-138. doi: 10.1038/s41587-019-0013-6
- 22) J. van Haasteren, et al., “The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing”, *Nat. Biotechnol.* 38, no.7 (2020): 845-855. doi: 10.1038/s41587-020-0565-5
- 23) JD. Finn et al., “A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent in vivo genome editing”, *Cell Rep* 27;22(9): (2018) 2227-2235. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.014.
- 24) P. Gee, et al. “Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping”, *Nat. Commun.* 11, no.1 (2020): 1334. doi: 10.1038/s41467-020-14957-y
- 25) Y. Osakabe, et al., “CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine”, *Nat. Protoc.* 13, no.12 (2018): 2844-2863. doi: 10.1038/s41596-018-0067-9
- 26) T. Sakuma, et al., “MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems”, *Nat. Protoc.* 11, no.1 (2018): 118-133. doi: 10.1038/nprot.2015.140
- 27) K. Yoshimi, et al., “ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes”, *Nat. Commun.* 7 (2016): 10431. doi: 10.1038/ncomms10431
- 28) K. Suzuki, et al., “In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration”, *Nature*. 540, no.7631 (2016): 144-149. doi: 10.1038/nature20565
- 29) S. Nakade, et al., “Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system”, *Nat. Commun.* 9, no.1 (2018): 3270. doi: 10.1038/s41467-018-05773-6
- 30) LW. Koblan et al., “In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in

- mice”, *Nature* 589(7843): (2021) 608-614. doi: 10.1038/s41586-020-03086-7.
- 31) JD. Gillmore, et al., “CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis”, *N Engl J Med*. 385, no.6 (2021): 493-502. doi: 10.1056/NEJMoa2107454
- 32) O. Shalem, et al., “Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells”, *Science* 343, no.6166 (2014):84-87. doi: 10.1126/science.1247005.
- 33) FM.Behan, et al., “Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens”, *Nature* 568, no.7753 (2019):511-516. doi: 10.1038/s41586-019-1103-9.
- 34) JS. Gootenberg, et al., “Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2”, *Science* 356, no.6336 (2017): 438-42. doi: 10.1126/science.aam9321
- 35) JS. Chen, et al., “CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity”, *Science* 360, no. 6387 (2018): 436-9. doi: 10.1126/science.aar6245
- 36) H. Shinoda et al., “Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis”, *Commun Biol* 26;5(1): (2022) 473. doi: 10.1038/s42003-022-03433-6.
- 37) K. Yoshimi, et al., “Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3”, *medRxiv*. (2020): 1-30. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.20119875>
- 38) SN. Takeda et al., “Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme”, *Mol Cell* 4;81(3): (2021) 558-570.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2020.11.035.
- 39) T Hino, et al., “An AsCas12f-based compact genome-editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis”, *Cell*, Volume 186, Issue 22, 2023, Pages 4920-4935.e23, doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.031.
- 40) Durrant, M.G., Perry, N.T., Pai, J.J. et al. Bridge RNAs direct programmable recombination of target and donor DNA. *Nature* 630, 984-993 (2024) . <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07552-4>
- 41) Shuto, Y., Nakagawa, R., Zhu, S. et al. Structural basis for pegRNA-guided reverse transcription by a prime editor. *Nature* 631, 224-231 (2024) . <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07497-8>
- 42) RC. Sakata et al., “Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations”, *Nat Biotechnol* 38(7): (2020) 865-869. doi: 10.1038/s41587-020-0509-0.
- 43) MTN. Yarnall et al., “Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases”, *Nat Biotechnol* (2022) Nov 24. doi: 10.1038/s41587-022-01527-4.
- 44) A. Kunii, et al., “Three-Component Repurposed Technology for Enhanced Expression: Highly Accumulable Transcriptional Activators via Branched Tag Arrays”, *CRISPR J* 1, no.5(2018):337-347. doi: 10.1089/crispr.2018.0009
- 45) HK. Liao, et al., “In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation”, *Cell* 171, no. 7 (2017):1495-1507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>
- 46) DU. Kemaladewi, et al., “A mutation-independent approach for muscular dystrophy via upregulation of a modifier gene”, *Nature* 572, no.7767 (2019): 125-130. doi: 10.1038/s41586-019-1430-x
- 47) XS. Liu, et al., “Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene”, *Cell* 172, no.5 (2018): 979-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.012>

- 48) HB. Zhou, et al., “Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice”, *Cell* 181, no.3 (2020): 590-603. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.024
- 49) L. Qu, et al., “Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs”, *Nat. Biotechnol.* 37, no.9 (2019): 1059-1069. doi: 10.1038/s41587-019-0178-z
- 50) K. Kato et al., “Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex”, *Cell* 185(13): (2022) 2324-2337.e16. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.003.
- 51) T. Hui & JP. Dinshaw, “A type III-E CRISPR Craspase exhibiting RNase and protease activities”, *Cell Research* 32 (2022) :1044-1046. doi: 10.1038/s41422-022-00739-2.
- 52) C. Hu et al., “Craspase is a CRISPR RNA-guided, RNA-activated protease”, *Science* 16;377(6612): (2022) 1278-1285. doi: 10.1126/science.add5064.
- 53) JD. Gillmore et al., “CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis”, *N Engl J Med* 385(6): (2021) 493-502. doi: 10.1056/NEJMoa2107454.
- 54) H. Frangoul et al., “CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia”, *N Engl J Med* 384(3): (2021) 252-260. doi: 10.1056/NEJMoa2031054.
- 55) P. Harmatz et al., “First-in-human in vivo genome editing via AAV-zinc-finger nucleasesform uropolysaccharidosis I/II and hemophilia B”, *Mol Therapy* 30(12): (2022) 3587-3600.
- 56) GA. Newby et al., “Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice”, *Nature* 595(7866): (2021) 295-302. doi: 10.1038/s41586-021-03609-w.
- 57) K. Musunuru et al., “In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates”, *Nature* 593: (2021) 429-434.
- 58) W. Qasim et al., “Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells”, *Sci Transl Med* 25;9(374): (2017) eaaj2013. doi: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
- 59) R. Benjamin et al., “Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies”, *Lancet* 12;396(10266): (2020) 1885-1894. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32334-5.
- 60) C. Diorio et al., “Cytosine base editing enables quadruple-edited allogeneic CART cells for T-ALL”, *Blood* 140(6): (2022) 619-629. doi: 10.1182/blood.2022015825.
- 61) University College London プレスリリース: <https://www.ucl.ac.uk/news/2022/dec/world-first-use-base-edited-car-t-cells-treat-resistant-leukaemia> (2023年1月15日にアクセス)
- 62) K. Kiga, et al., “Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria”, *Nat. Commun.* 11, no.1 (2020): 2934. doi: 10.1038/s41467-020-16731-6
- 63) R. Basar, et al., “Large-scale GMP-compliant CRISPR-Cas9-mediated deletion of the glucocorticoid receptor in multivirus-specific T cells”, *Blood Advances* 4, no. 14 (2020): 3357-3367. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001977
- 64) J. Bondy-Denomy, et al., “Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system”, *Nature* 493, no.7432 (2013): 429-432. doi: 10.1038/nature11723
- 65) AB. Gussow, et al., “Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families” *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020): 3784. doi: 10.1038/s41467-020-17652-0
- 66) CM. Ackerman, et al., “Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13”, *Nature*

- 582, no. 7811 (2020): 277-82. doi: 10.1038/s41586-020-2279-8
- 67) B. Al-Shayeb et al., “Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors”, *Cell* 185(24): (2022) 4574-4586.e16. doi: 10.1016/j.cell.2022.10.020.
- 68) A. McKenna, et al., “Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing”, *Science* 353, no.6298 (2016): aaf7907. doi: 10.1126/science.aaf7907
- 69) S.L. Shipman, et al., “CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria”, *Nature* 547, no.7663 (2017): 345-349. doi: 10.1038/nature23017
- 70) Y. Huang, et al., “Collaborative networks in gene editing”, *Nat. Biotechnol.* 37, no.10 (2019): 1107-1109. doi: 10.1038/s41587-019-0275-z
- 71) K. Kato, et al., “RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease”, *Science* 378, no.6622(2022):882-889. doi: 10.1126/science.add7347
- 72) Y.E. Loh, et al., “Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3”, *Nature* 567, no.7749 (2019): 535-539. doi: 10.1038/s41586-019-1024-7
- 73) G. Turchiano, et al., “Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq”, *Cell Stem Cell* 8, no.6 (2021):1136-1147.e5. doi:10.1016/j.stem.2021.02.002.
- 74) L. Yang, et al., Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nat Biotechnol* (2023). doi: 10.1038/s41587-022-01585-8.
- 75) S.I. Cho, et al., “Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases”, *Cell* 185, no.10 (2022):1764-1776.e12. doi: 10.1016/j.cell.2022.03.039.

2.3

俯瞰
区分と
基礎
基盤
研究
開発
領域