

光操作に基づく医療技術の創出

研究代表者：東京大学 佐藤 守俊

【基本構想】

本プロジェクトは、光操作に基づいて新たな医療技術を創出することを目的としている（図1）。医薬品として用いられる分子（化合物、ペプチド、抗体、酵素など）や細胞、ウイルス等は、いったん生体の中に入ってしまうと、その働きを生体の外からコントロールするのが極めて困難である。このことが、薬効が高く副作用が低い優れた医薬品を開発する上での大きなハードルとなっている。本プロジェクトでは、乗用車に取り付けられたアクセルやブレーキのように、生体の中に入った医薬品の働きを光で、特に、生体組織の透過性が極めて高い長波長の光で自由自在に操作するための、一般性・汎用性の高い基盤技術を開発する。さらに、この基盤技術を用いて、ゲノムの働きを光刺激でコントロールしたり、がん細胞を光刺激で破壊することで、革新的なゲノム治療やがん治療を実現する新たな技術を開発する。ゲノム治療については、生体組織に光を照射して変異遺伝子の塩基配列を正確に書き換えることができるようになったり、生体組織の遺伝子の発現を自由自在に光照射でコントロールできるようになれば、今までに治療法がなかった様々な難病（遺伝子疾患）の治療に大きく貢献し、アンメット・メディカル・ニーズに応えることが可能になる。DNAを標的とした光操作技術に加えて、RNAを標的とした光操作技術（RNAの転写レベルの光操作技術）を開発できれば、ゲノム治療の安全性をさらに高めるだけでなく、ゲノム治療の適用範囲を大幅に拡張できる。このような生体（*in vivo*）におけるゲノムの光操作だけでなく、例えば、人工多能性幹細胞（iPS細胞）のゲノムDNAの塩基配列を、光で正確に書き換えることができるようになれば、遺伝子疾患を有する患者への再生医療にも大きく貢献できると考えている。またがん治療についても、本プロジェクトで開発する技術は、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治療技術よりも大幅に薬効を高めるためのアイデアを導入しても安全性を担保できるのが大きな特長である。本プロジェクトで開発する技術により、今まで治療法がなかった難病の治療に加えて、長波長の光照射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大きく貢献することが期待される。

1. 研究目的

蛍光タンパク質の実用化を契機として、1990年代以降、光を使ったバイオイメージング技術が世界中の研究室で利用されるようになった。しかし、ライフサイエンスにおける光技術の将来は、必ずしもバイオイメージングに限定されない。光を使って生命現象を「見る」だけでなく、それらを光で「操る」ことができるとしたら、ライフサイエンスや医療はどうなるだろう？例えば、細胞内シグナル伝達を光で操作できるようになれば、代謝、分泌、細胞増殖、細胞分化、細胞死等の生命機能を自由自在にコントロールできるようになるかもしれない。ゲノムの塩基配列を光で自由自在に書き換えたり、遺伝子のはたらきを自由自在に制御できるようになったらどうだろう？光が得意とする高い時間・空間制御能をもってすれば、狙った time window でのみ、狙った生体部位でのみ、生命現象をコントロールできるかもしれない。さらには、疾患の新しい治療法として役立つかもしれない。このような未来を実現すべく、研究代表者らは新技術の開発を行ってきた。

生命現象の光操作を実現する上で、研究代表者らが最も重要と考えたのは、操り人形と言えばヒモとか棒に相当する基盤技術の開発である。植物や菌類のように光を利用して生きている生物は、光受容体と呼ばれるタンパク質を持

っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化したり、別のタンパク質と結合したりすることにより情報を伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク質の構造変化や結合といった力学的シグナルとして出力できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、反応速度が遅いなどの問題を抱えていることが多い。研究代表者らは糸状菌の一種であるアカパンカビ（*Neurospora crassa*）が持っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミノ酸変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能を付与したりするなどして、Magnet システムと名付けた光スイッチタンパク質を開発した（図2）（参考文献1）。Magnet システムは、青色の光を照射すると互いに結合し、光照射をやめると解離するタンパク質のペアである。

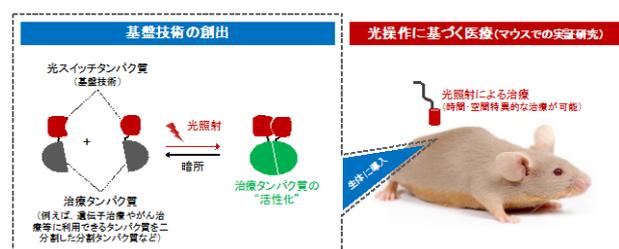


図1. 光操作に基づく医療技術の概念図。

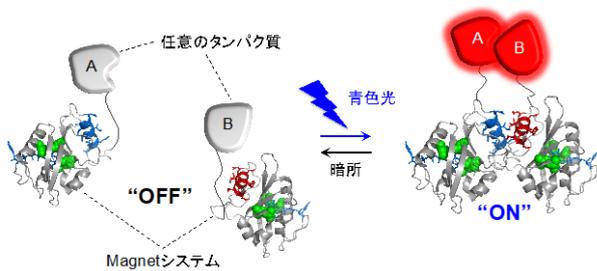


図2. 研究代表者が先行研究で開発した青色光スイッチタンパク質“Magnet システム”。青色光に反応して二量体を形成し、暗所に戻ると単量体に戻る。任意のタンパク質 A・B を連結することにより、その結合・解離を光照射の ON/OFF でコントロールできる。

Magnet システムにタンパク質 A とタンパク質 B を連結すれば、A と B の結合・解離を青色光のオン・オフでコントロールすることができる。この Magnet システムの特長を利用することで、光で指令を与えて、酵素などのあらゆるタンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるようになった。

例えば、Magnet システムを様々なゲノムエンジニアリングツール（ゲノム編集で利用される CRISPR-Cas9 システムなど）と組み合わせ、多様な光操作技術を開発してきた。これにより、光が得意とする高い空間・時間制御能に基づいて、生体組織の中の狙った部位や狙ったタイミングで、ゲノム DNA の塩基配列を書き換えたり（参考文献 2、3）、ゲノムにコードされた遺伝子の組換えを実行したり（参考文献 4）、ゲノム遺伝子の発現を自由自在に操作できるようになった（参考文献 5）。さらに最近では、ゲノムエンジニアリングツールに限らず、がん治療に応用可能なタンパク質の光操作にも Magnet システムを展開している。例えば、腫瘍溶解性ウイルスのゲノム RNA を複製する RNA ポリメラーゼに Magnet システムを組み込んで、光照射でウイルスの増殖を自由自在に光操作することにより、生体内で効率よくかつ安全にがん細胞を破壊できる光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスを開発した（参考文献 6）。このような研究代表者の一連の研究は、基礎生命科学を革新する強力なリサーチツールを提供するとともに、既存の治療技術とは全く異なる、次世代の治療技術（ゲノム治療、がん治療など）につながる可能性を秘めている。

上述のゲノムの光操作技術や光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスはいずれも、研究代表者が開発した光スイッチタンパク質“Magnet システム”に立脚している。Magnet システムは、光操作のためのツールを我々が制御するための「アクセル」や「ブレーキ」であり、様々な生命現象の光操作を実現する極めて汎用性の高い基盤技術として位置付けることができる。しかし、Magnet システムは生体組織透過性が比較的低い青色光を使って制御する光スイッチタンパク質である。このため、Magnet システムを組み込んだ光操作技術では、生体外からの光照射で効率よく操作可能な部位は皮膚や筋肉、肝臓の腹側など、生体表面から近い組織・器官に限定されてしまい、青色光が届きにくい生体深部に位置する臓器や骨の中の骨髄、頭蓋骨に覆わ

れた脳などの操作が困難なことが明らかになりつつある。このような Magnet システムの特性は、光操作技術を次世代の治療技術として応用する上での大きな制約となると考えられる。従って、本プロジェクトでは、Magnet システムに代わる新たな基盤技術として、生体組織透過性が極めて高い長波長の光照射でコントロール可能な光スイッチタンパク質を創出し、これを新たなゲノム治療技術とがん治療技術に展開することを目的とする。プロジェクト 1 年目となる 2020 年度は、以下の各項目を重点項目として開発研究を実施した。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発
- (2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

2. 研究成果

以下に挙げるのは、2020 年度の具体的な研究成果である。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

上述のように、青色光はヘモグロビンに吸収されてしまうため、生体組織での透過性が低い。一方、650 nm から 800 nm の光はヘモグロビンに吸収されず、生体組織透過性が高いことが知られている。このため、この波長領域で利用できる光スイッチタンパク質の開発ニーズは極めて高い。この観点から、光合成細菌が有する近赤外光受容体とその結合タンパク質が、近赤外光スイッチタンパク質として注目を集めている。研究代表者らは、前述のゲノム遺伝子の光活性化システムで利用した Magnet システムをこの近赤外光スイッチタンパク質で置き換えてみたところ、この近赤外光スイッチタンパク質には致命的な欠点があることが明らかになった。その詳細を以下に述べる。

研究代表者らが開発したゲノム遺伝子の光活性化システムは、CRISPR-Cas9 システムを利用しており、次のような動作原理となっている（図 3）。Cas9 の 10 番目のアミノ酸と 840 番目のアミノ酸位変異を導入して DNA 切断活性を欠損させた変異体（Cas9^{D10A/H840A}; dCas9）とガイド RNA の複合体を、ゲノム遺伝子の上流に結合させておく。この

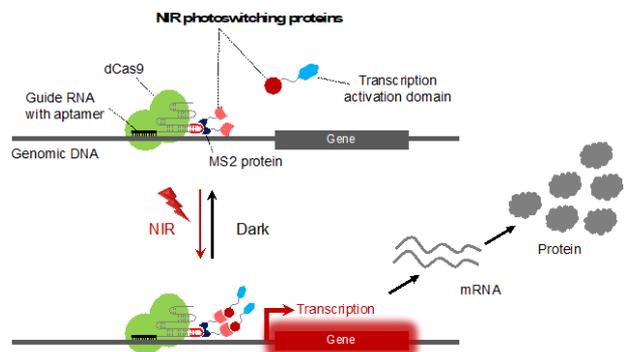


図3. ゲノム遺伝子の光活性化システム（CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system; CPTS）の原理図。

ガイド RNA には、MS2 タンパク質が結合するアプタマー配列が挿入してある。MS2 タンパク質と光スイッチタンパク質の一方を繋ぎ、もう一方の光スイッチタンパク質には転写活性化因子を繋いでおく。こうすることで、光照射によって光スイッチタンパク質を結合させた時のみ、転写活性化因子をゲノム遺伝子直上に近接させて、遺伝子活性化を誘起させることができる。ここに近赤外光スイッチタンパク質を導入したところ、光照射を行なった場合のみならず、暗所に保持した場合においても遺伝子活性化を誘起することが明らかになった。Magnet システムを利用した場合にはこの暗所での活性化は観察されなかったことから、近赤外光スイッチタンパク質を導入した場合に観察された活性化は、近赤外光スイッチタンパク質の暗所での結合活性（リーク活性）に原因があると考えられる。近赤外光スイッチタンパク質を導入した遺伝子活性化システムのリーク活性は非常に高いため、光照射を行なっても、僅かに 1.6 倍しか遺伝子活性化を誘起できない。理想的な光スイッチタンパク質は、光を照射した時のみに、光操作を実現できるというものである。しかし、現状の近赤外光スイッチタンパク質のように、暗所でも高いリーク活性を持つことは、光照射を行う前から活性化が起こっていることを意味しており、この性質は光操作の基盤技術としては致命的な欠点となる。

そこで、研究代表者らは近赤外光スイッチタンパク質にアミノ酸変異を導入することで暗所でのリーク活性を低減させることを目的に研究を行なった。さまざまな変異体を作製し、それぞれの変異体をゲノム遺伝子の光活性化システムに導入して、光照射条件と暗所条件での比較を行った。その結果、現時点で、暗所リーク活性を野生型の 10 分の 1 に低減させることに成功している。このように近赤外光スイッチタンパク質の改良版を導入した遺伝子活性化システムを NIR-CPTS (CRISPR-Cas9-based photoactivatable

transcription system by near-infrared light) と名付けた。

上述の変異体のスクリーニング実験では、生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を遺伝子活性化のレポーターとして用いた。次に、実際に細胞の核内に折りたたまれパッキングされたゲノム遺伝子に対しても、NIR-CPTS が使用可能かどうかを検討した。その結果、ASCL1 遺伝子をターゲットしたガイド RNA を用いたところ、NIR-CPTS は、暗所でのリーク活性がほとんど見られず、光照射によって 193 倍の遺伝子活性化を誘導できることがわかった（図 4a）。ガイド RNA として HBG1 遺伝子をターゲットした場合も、暗所でのリーク活性が見られず、光照射によって 1,366 倍もの遺伝子活性化を誘導できることがわかった（図 4b）。このように、細胞核内の実際のゲノム遺伝子に対しても近赤外光スイッチタンパク質の改良版を用いた NIR-CPTS は、光照射依存的に非常に効率よく遺伝子活性化を起こせることがわかった。NIR-CPTS によるゲノム遺伝子活性化は、光照射を開始して 90 分後には、18 倍にまで上昇する（図 5a）。また、光照射を止めると、NIR-CPTS による遺伝子活性化は停止し、ガイド RNA でターゲットしたゲノム遺伝子の mRNA 量は暗所の時のレベルまで戻っていく（図 5b）。これは、近赤外光スイッチタンパク質の改良版が暗所時には可逆的に解離していくという性質を保持していることを示している。CRISPR-Cas9 の最大の特長は、様々な遺伝子をターゲットするガイド RNA を同時に用いて、様々な遺伝子を同時にコントロールすることである。NIR-CPTS においても、多種類のゲノム遺伝子を同時に光活性化できるかどうか検討した。その結果、4 種類のゲノム遺伝子（ASCL1 遺伝子、HBG1 遺伝子、MYOD1 遺伝子、IL1R2 遺伝子）をそれぞれターゲットす

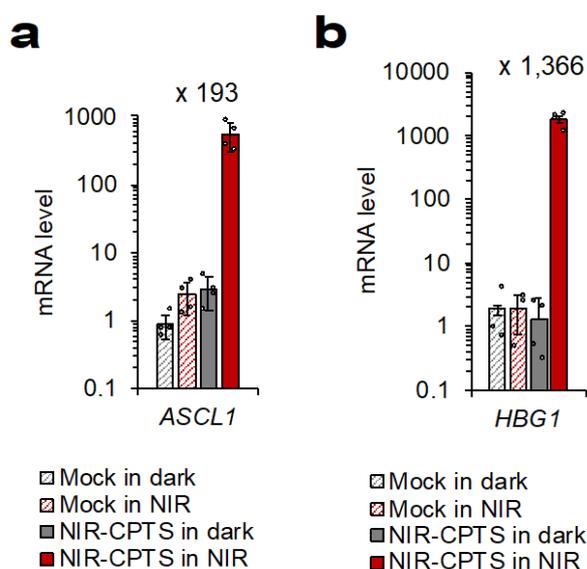


図 4. NIR-CPTS によるゲノム遺伝子の光活性化。ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293T 細胞) のゲノム遺伝子 (ASCL1 遺伝子 (a)、HBG1 遺伝子 (b)) を光照射 (NIR) によって活性化した。暗所条件下 (dark) でのリーク活性は、対照群 (Mock; ガイド RNA を入れていない群) と同程度に低い。

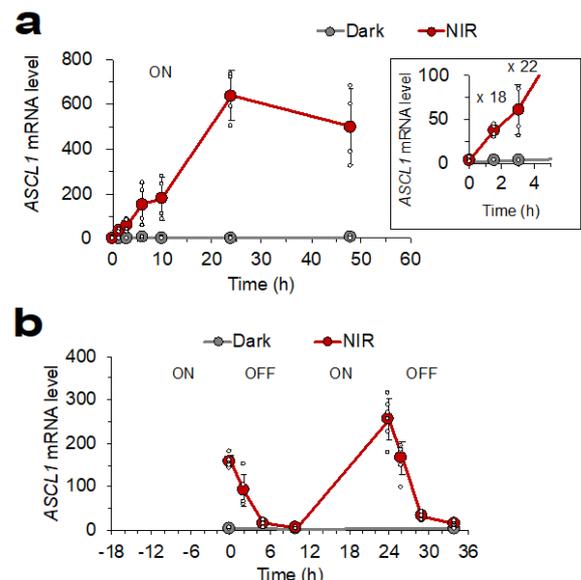


図 5. NIR-CPTS による光活性化の時間変化。(a) 光照射 (NIR) を開始して 90 分後には、暗所条件下 (Dark) の 18 倍の活性上昇を起こすことができる。(b) 光照射 (NIR) を止めると、NIR-CPTS の活性化も止まる。また、再び光照射を行うと、NIR-CPTS は再び活性化する。

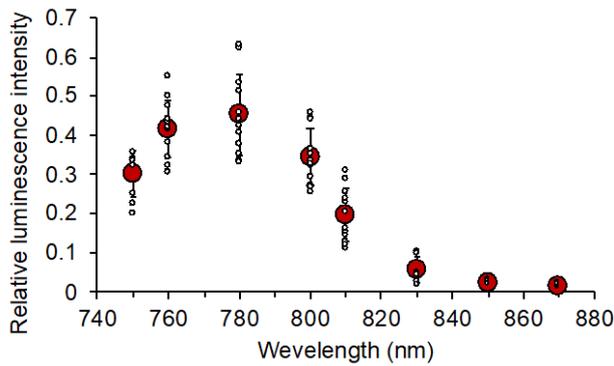


図 6. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波長光でも光活性化できる。

るガイド RNA を同時に用いて、これらの遺伝子を同時に光刺激で活性化できることがわかった。

上述のように、650 nm から 800 nm の光は生体組織透過性が高い。近赤外光スイッチタンパク質の改良版の波長依存性を、NIR-CPTS の遺伝子活性化を指標として調べたところ、当該システムは、780 nm が最適の波長であり、800 nm でも十分な遺伝子活性化を誘導できることがわかった (図 6)。そこで研究代表者らは、NIR-CPTS を用いてマウスの生体 (*in vivo*) で遺伝子活性化を制御できるかどうか調べた。まず、hydrodynamic tail vein injection 法でマウスの肝臓に NIR-CPTS を導入した。マウスへの光照射は、生体外から LED パネルを使って行なった (図 7)。このような非侵襲的な光照射方法でも、マウス肝臓において、レポーター遺伝子の活性化を誘起することができた (図 8a)。さらに、NIR-CPTS を用いて、マウスのゲノムにコードされた遺伝子 (*ASCL1* を例に) を非侵襲的な光照射で活性化することも明らかになった (図 8b)。このように、研究代表者らは、開発した近赤外光スイッチタンパク質の改良版の特性を、NIR-CPTS というゲノム遺伝子の活性化技術として評価した。その結果、近赤外光スイッチタンパク質の改良版は生体内でも光操作の基盤技術として利用できることがわかった。プロジェクト 2 年目となる 2021 年度は、近赤外光スイッチタンパク質への変異導入を継続して実施し、さらに光制御能が向上した光スイッチタンパク質として完成させたいと考えている。

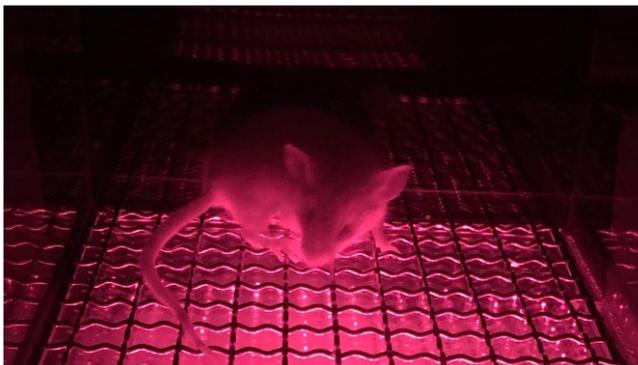


図 7. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。

(2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

研究項目 (1) の光スイッチタンパク質は、光合成細菌の細胞の中で実際に使われている天然のタンパク質を改変して開発する光スイッチタンパク質である。研究項目 (2) では、研究項目 (1) とは全く異なり、進化分子工学的手法に基づいて、全く新しい長波長の光スイッチタンパク質を開発することを目標とする。進化分子工学的手法に基づいて、全く新しいタンパク質相互作用に基づいて光スイッチタンパク質を開発することにより、天然のタンパク質相互作用のデメリットを克服するような、新たな光スイッチタンパク質が開発できるとの期待を持ってこの研究項目 (2) を遂行している。光スイッチタンパク質は、様々な光操作技術を開発する上での基盤技術となる。研究項目 (1) (2) により、質の高い長波長の光スイッチタンパク質を開発することが、光操作に基づく医療技術を創出する上での鍵となる。

研究項目 (2) では、進化分子工学的手法に基づいて、全く新しい長波長の光スイッチタンパク質の開発を行っている。この光スイッチタンパク質は、近赤外光を受容するドメインとその結合タンパク質からなっている。当該光受容ドメインとして様々な選択肢がある中で、研究代表者らは研究項目 (1) とは別の細菌由来の赤色光受容体を選択した。これは、赤色光受容体の光反応特性や暗反転のキネティクスが非常に優れており、かつ光照射依存的な構造変化に関する知見が十分に蓄積しているためである。結

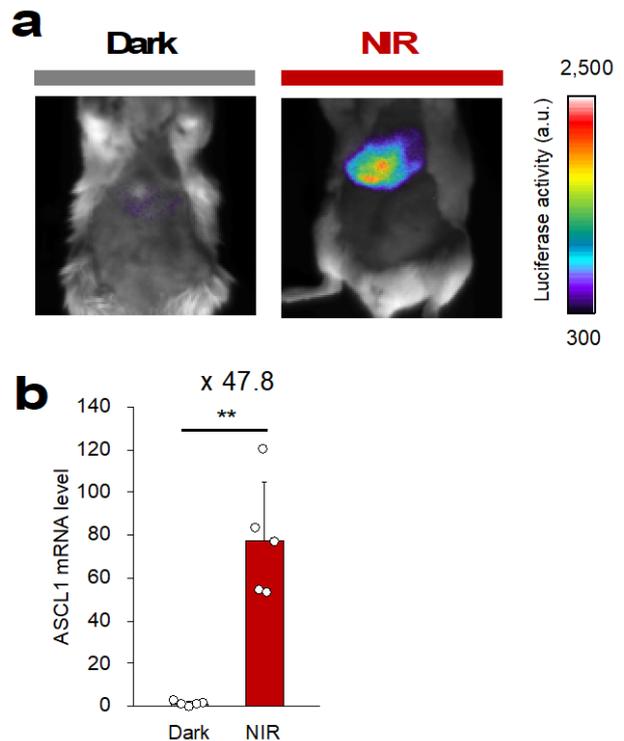


図 8. (a) NIR-CPTS を導入したマウス肝臓における生物発光レポーター遺伝子の光活性化。(b) NIR-CPTS を導入したマウス肝臓におけるゲノム遺伝子 (マウス *ASCL1* 遺伝子) の光活性化。

合タンパク質としては、ペプチドに加えて様々な分子を検討し、選んだ分子に対してランダム変異を導入することで、赤色光受容体に対して光照射依存的に結合する変異体を選抜した。選抜した分子に対して、さらに二次的なスクリーニングや更なる変異導入等を導入した結果、光照射依存的に赤色光受容体に強く結合する分子を開発することができた。現在、この赤色光スイッチタンパク質（赤色光受容体と結合分子のペア）を、研究項目（1）の場合と同様に、遺伝子発現の光操作技術に導入して評価を行なっている。現在までに、この進化分子工学に基づく新しい赤色光スイッチタンパク質が、暗所での反応性をほとんど示さず、極めて高い光制御能することが明らかになっている。

3. 今後の展望

研究項目（1）および研究項目（2）の光スイッチタンパク質を完成させることが2021年度の大きな目標となる。上述のように、研究項目（1）および研究項目（2）の新たな光スイッチタンパク質を遺伝子発現の光操作技術に導入して、ゲノムにコードされた任意の遺伝子の働きを自由自在にコントロールする技術の創出し、マウスの生体（*in vivo*）で十分な検証を行うことを目指している。一方で、最も重要なのは、光スイッチタンパク質が極めて一般性が高く、様々な光操作技術を実現できる基盤技術（core technology/platform technology）になり得ることであると研究代表者らは考えている。そして、光スイッチタンパク質によって、幅広い創薬モダリティを大きく革新できると考えている。この観点から、戦略的研究シーズ育成事業の開始と共に、様々な研究グループと共同で、様々な創薬モダリティに光操作技術を導入するための研究を実施している。その範囲は、ゲノム編集医療や遺伝子治療、腫瘍溶解性ウイルス療法のような「遺伝子医療」に限定されない。2022年度以降は、この様に幅広く展開する探索研究の結果を踏まえて、事業としてより大きな価値を持つ技術を絞り込み、光操作に基づく医療技術として、社会実装に向けて非臨床研究、臨床研究を進めていくことが重要と考えている。さらに、光スイッチタンパク質は、医療技術としてのみならず、幅広い分野に応用可能と考えているため、光スイッチタンパク質を用いたさらなる応用展開についても開拓したいと考えている。

【参考文献】

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins” *Nat. Commun.*, **6**, 6256 (2015).
2. Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima and M. Sato, “Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing” *Nat. Biotechnol.*, **33**, 755-760 (2015).
3. Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, “A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation” *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 882-888 (2019).
4. F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa and M. Sato, “A photoactivatable Cre-*loxP* recombination system for optogenetic genome engineering” *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 1059-1064 (2016).
5. Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto and M. Sato, “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation” *Nat. Methods*, **14**, 963-966 (2017).
6. M. Tahara, Y. Takishima, S. Miyamoto, Y. Nakatsu, K. Someya, M. Sato, K. Tani and M. Takeda, “Photocontrollable mononegaviruses” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11587-11589 (2019)

業 績

【原著論文】

1. T. Takao, M. Sato and T. Maruyama
Optogenetic regulation of embryo implantation in mice using photoactivatable CRISPR-Cas9
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **117**, 28579-28581 (2020).

【総説】

1. 佐藤守俊「光操作に基づくゲノムのリプログラミング技術の創出」, 医学のあゆみ, 2020年, 第275巻, 1号, p21291-21296.

【口頭発表】

1. 佐藤守俊「生命の設計図を書き換えるゲノム編集」, 岡山県立笠岡高校科学講演会, 2020年11月6日
2. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」, 名古屋大学大学院工学研究科講演会, 2020年11月20日
3. 佐藤守俊「生命の設計図を書き換えるゲノム編集」, 里庄町立志式特別講演, 2021年1月27日
4. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科特別講演, 2021年2月9日
佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」, 欧州製薬団体連合会 (EFPIA Japan), 2021年2月26日
佐藤守俊「細胞をデザインする光操作技術」, 第9回 LINK-J オンライン・ネットワーク・トーク, 2021年2月26日
5. 中嶋隆浩, 佐藤守俊「近赤外光スイッチタンパク質によるゲノム遺伝子活性化システム」, 日本化学会第101春季年会, 2021年3月20日

【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件