

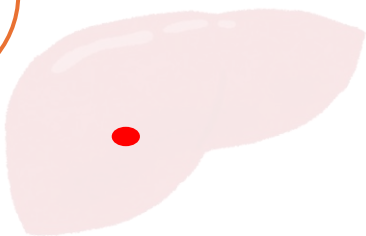
HITI法を利用した生体内バイオ医薬品分泌・持続発現系の構築

大阪大学 基礎工学研究科 教授 鈴木啓一郎

非相同末端結合（NHEJ）を利用したHITI法により、従来の相同組換え（HDR）では困難だった非分裂細胞や終末分化細胞への遺伝子導入が可能となります。本技術では、HITI法に適した分泌型発現カセットを構築し、生体内におけるバイオ医薬品の持続的な産生を実現しました。特に、ドナーDNAには特定のシグナルペプチド配列と切断配列を組み合わせることで、標的部位への効率的な挿入と正確な分泌制御を両立しています。これにより、遺伝子治療やドラッグデリバリーへの応用が期待されるほか、標的細胞における分泌タンパク質の長期発現を可能にする研究用試薬としての活用も見込まれます。ここでは、Exendin-4（Exe4）を例に、系のValidationを行っています。

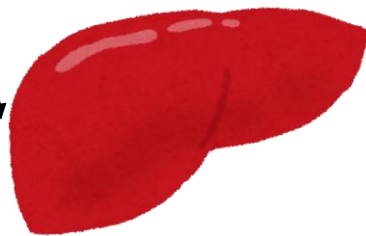
バイオ薬の体内産生・分泌による次世代治療モダリティ

LNP



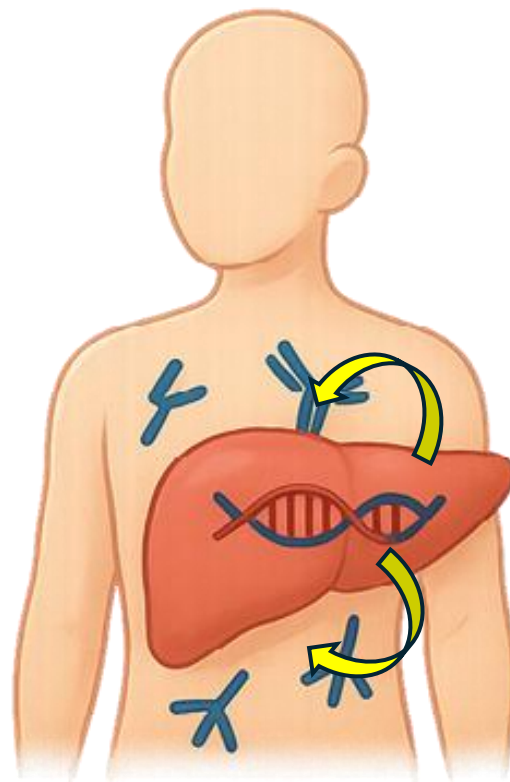
HDR法では臓器を構成する0.1%の細胞にしか遺伝子を導入できない*。

*HDRは分裂期にある特定の細胞にしか起こらない



HITI法では、制限なく臓器に遺伝子を導入できる。

HITI法は細胞周期非依存



臓器にバイオ薬産生遺伝子を効率よく組み込む

↓
肝臓で持続的にバイオ薬産生する

↓
バイオ薬を肝細胞から効率よく分泌する

↓
バイオ薬が末梢血を介して体中に拡散される

↓
**生体内で自己治療
長期的予防・治療**

これらを可能にする技術として、
HITI法・分泌シグナル・ペプチド切断配列
からなるカセットが重要

【出願番号 K20250050】

HITI法とは

変異修復方法

従来のノックイン法

HITI法

(Homology-Independent Targeted Integration)

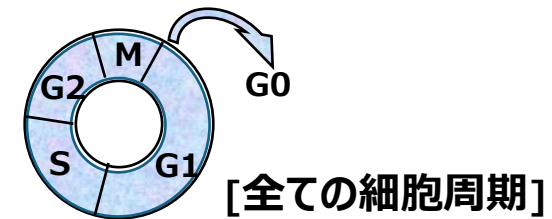
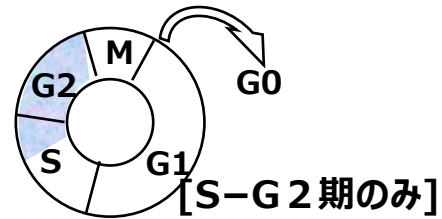
利用する修復経路

相同組換え修復
(HDR)

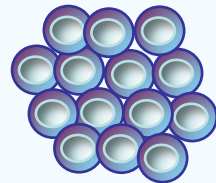
非同末端結合
(NHEJ)

Suzuki et al, *Nature* 2016

細胞周期

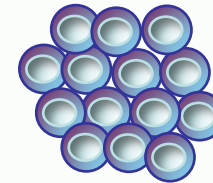


変異修復可能な細胞種



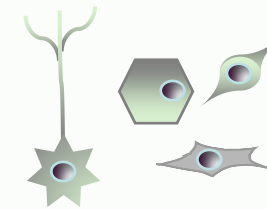
分裂細胞
(0.1%)

一部の生体内細胞



分裂細胞
(0.1%)

+



非分裂細胞
[神経細胞・心筋細胞など]
(99.9%)

ほとんどの生体内細胞

➤ HITI法：細胞種や細胞周期に依存せず遺伝子導入が可能

HITI法の特徴

変異修復方法

従来のノックイン法

HITI法

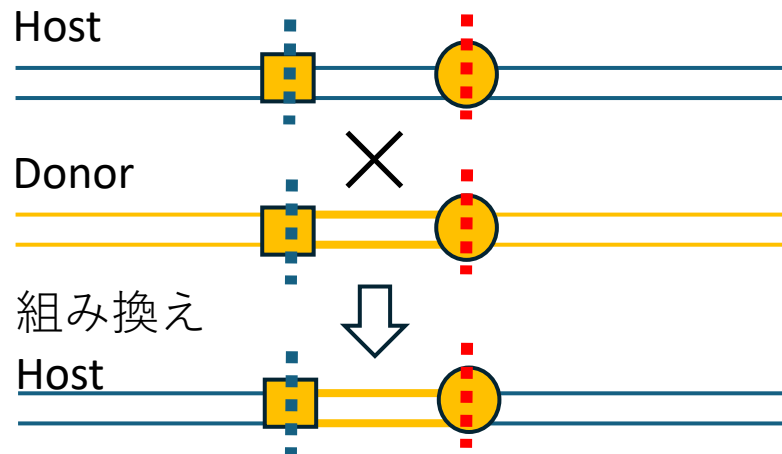
利用する修復経路

相同組換え修復 (HDR)

非同末端結合 (NHEJ)

Suzuki et al, *Nature* 2016

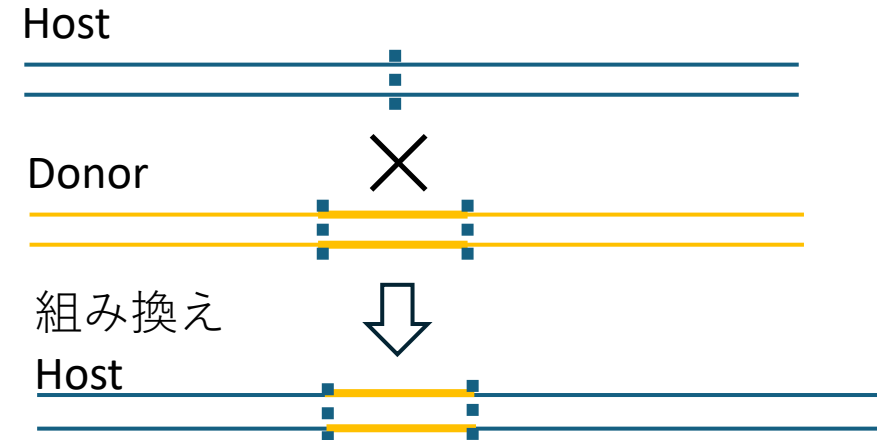
模式図



CRISPR-Cas9システムを用いたHDRでは、ドナー配列の両端に相同配列を設けることで、特定の場所に正確に目的配列を挿入できる。

■●：相同配列

⋮⋮：切断サイト

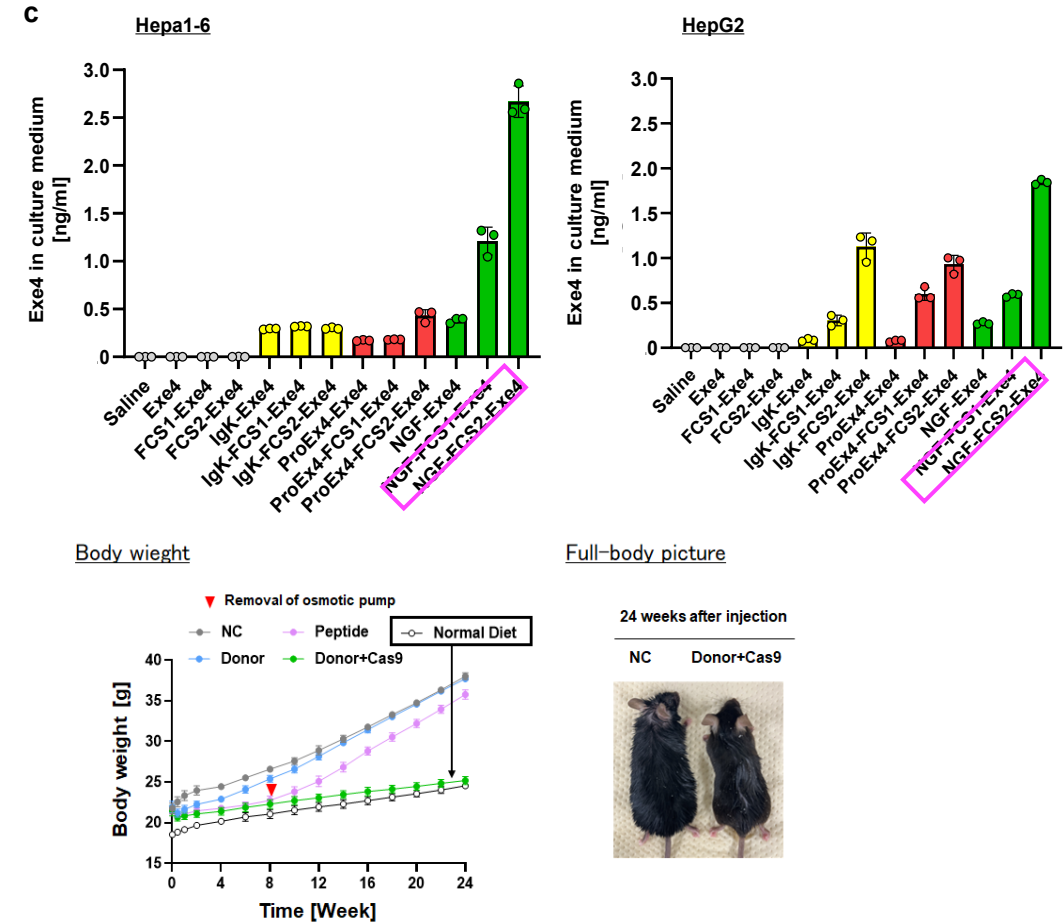
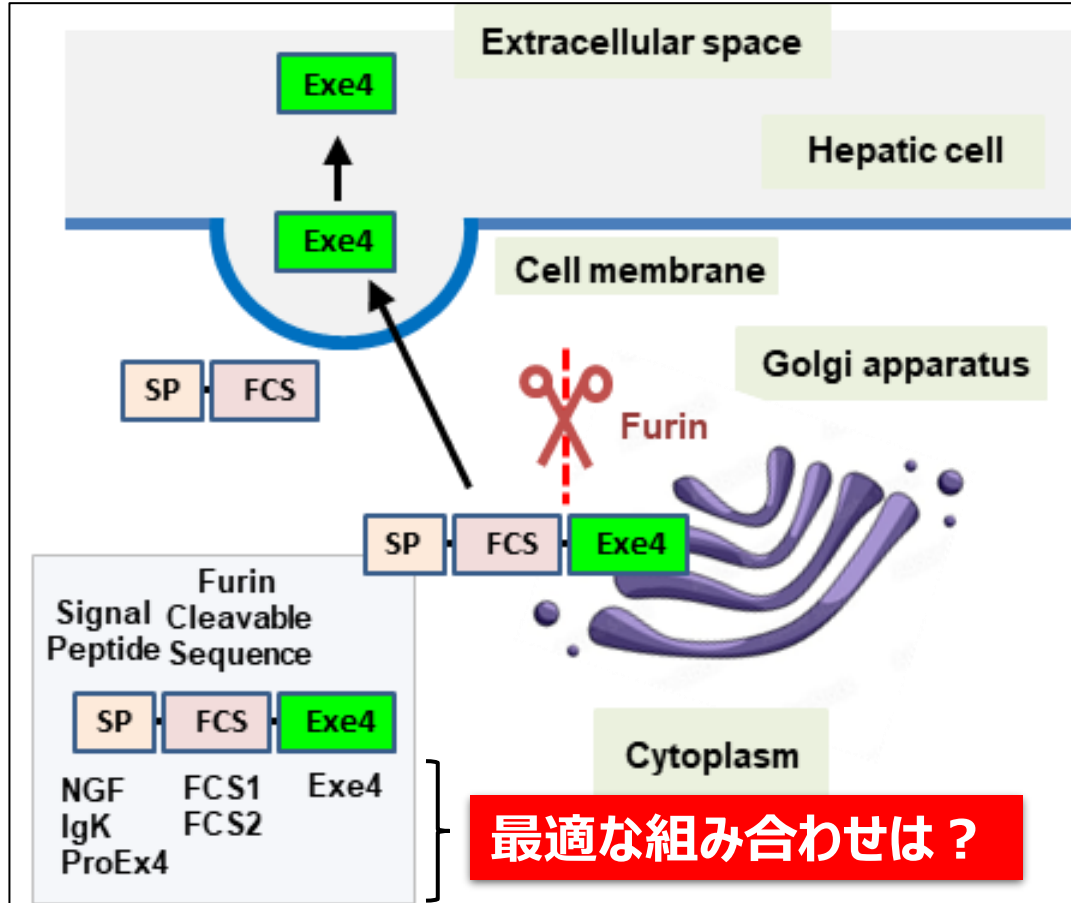


HITIでは、CAS9依存の平滑末端を利用してドナー配列を挿入し、ガイドRNAにより挿入位置を指定します。さらに、正しい組換えが起こった後に再切断されないよう、ドナー配列内に特別な配列設計が施される。

⋮⋮：切断サイト

➤ ドナー配列を工夫することにより、効率よく目的タンパクを分泌

バイオ薬の体内産生・分泌による次世代治療モダリティをご提案



【関連文献】

- Samson, S. L., Gonzalez, E. V., Yechoor, V., Bajaj, M., Oka, K., Chan, L. Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in diet-induced obesity mouse model. *Molecular Therapy* 16, 1805-1812 (2008).
- Parsons, G. B., Souza, D. W., Wu, H., Yu, D., Wadsworth, S. G., Gregory, R. J., Armentano, D. Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Therapy* 14, 36-48 (2007).
- DiPasquale, G., Dicembrini, I., Raimondi, L., Pagano, C., Egan, J. M., Cozzi, A., Cinci, L., Loreto, A., Manni, M. E., Berretti, S., Morelli, A., Zheng, C., Michael, D. G., Maggi, M., Vettor, R., Chiorini, J. A., Mannucci, E., Rotella, C. M. Sustained Exendin-4 secretion through gene therapy targeting salivary glands in two different rodent models of obesity/type 2 diabetes. *PLoS One* 7, e40074 (2012).

Hirose J et al, *Commun Med* 5, 269 (2025)

- ✓ NGF-FCS2で最も効率の良い分泌を確認
- ✓ 培地中Exe4は合成ペプチド品と同等の生物活性を有する。
- ✓ Vivoでも薬効を確認