

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) In vivo ゲノム編集を利用した遺伝子治療用製品の安全性評価に関する研究  
(英語) Study on safety assessment of gene therapy products used for in vivo genome editing

研究開発実施期間: 令和元年7月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 内田 恵理子  
(英語) Eriko Uchida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 主任研究官  
(英語) Senior Researcher, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products,  
National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

### 1. 研究開発の背景と目的

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療は、目的とする遺伝子の破壊や異常遺伝子の修復、部位特異的遺伝子導入など、従来の遺伝子治療では実現できない治療が可能な次世代遺伝子治療として期待されている。しかし、ゲノム編集は従来の遺伝子治療とは異なる安全性上の課題がある。特に問題とされるのが、ゲノム編集により目的外の遺伝子を改変してしまうオフターゲット効果である。また、ゲノム編集の標的部位に DNA 二本鎖切断が生じることにより、目的外の非意図配列が挿入するリスクや、染色体レベルでの変異（転座や逆位、欠失など）が起きることも報告されている。ゲノム編集技術を利用した遺伝子治療の臨床開発は海外ではこの数年急増し、*ex vivo* ゲノム編集だけでなく、*in vivo* ゲノム編集の臨床開発も始まっている。研究開発代表者らは、これまでAMED「ゲノム編集を利用した遺伝子治療用製品の安全性評価に関する研究」において、「*ex vivo* ゲノム編集細胞の安全性評価に関するガイドライン案」の作成を行ってきた。しかし *in vivo* ゲノム編集の安全性評価ガイダンスは欧米を含めてまだ存在しない。ゲノム編集は特定の DNA 配列を認識して遺伝子改変をおこなうため、ゲノム配列の異なる動物を用いた安全性評価は原理的に困難である。また、*in vivo* でのゲノム編集後、個体から細胞を取り出してオフターゲット変異等を解析することは実質不可能である。以上の観点から、*in vivo* ゲノム編集の安全性評価は、「ヒト」を対象とした評価法（ヒトゲノムを対象とした *in silico* 解析やヒト細胞を用いた解析等）が必要であり、ゲノム編集を行った個体の組織の評価ではなく、「ゲノム編集の手法のリスク」を評価することになる。しかし、安全性評価法の確立を念頭において実施された研究は乏しく、想定される評価法でどの程度個体におけるリスク（＝意図しないゲノム改変）を評価できるかは不明である。

そこで、本研究では、ゲノム編集による「オフターゲット変異」と「オンターゲット変異（切断サイトに目的外の挿入等が生じる変異）」について、評価法の候補となる *in silico* 解析、セルフリー解析（試験管内切断）ならびにセル解析（細胞内切断）を行った結果と、個体レベル（*in vivo*）でのゲノム編集の解析結果を比較することにより、個体における意図しないゲノム改変が *in silico* 解析やセルフリー解析などの手法でどの程度予測できるかを検討する。この結果を基に *in vivo* ゲノム編集の安全性評価法を確立するとともに、「*In vivo* ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品の安全性評価に関する考慮事項」をとりまとめる。

### 2. 研究開発の成果

#### （1）ゲノム編集ツールの設計とゲノム編集用 AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクターの作製

1) 標的遺伝子として肝臓で発現する遺伝子を対象に、ヒトおよびマウスに共通な配列を標的とするガイド RNA を設計した。セルフリー解析以降においてオフターゲットサイトの評価をさまざまな視点から行えるよう、あえてオフターゲット候補サイトの多いガイド RNA が含まれるように選択したガイド RNA について、DNA 切断効率、細胞での変異導入効率、標的遺伝子等を指標に、3 種類のガイド RNA を選定した。

2) *in vivo* ゲノム編集では、編集効率などを考慮し、AAV ベクターでゲノム編集用のガイド RNA と Cas を発現させることとした。Cas としては、ゲノム編集で汎用される SpCas9 は遺伝子サイズが大きいいため、サイズの小さい SaCas9 を用いることとし、1) で選択した 3 種類のガイド RNA と SaCas9 を発現する AAV ベクターと、SaCas9 のみを発現するコントロール AAV ベクターの計 4 種類の AAV8 ベクターを作製した。

#### （2）オフターゲット部位の評価

1) *in vivo* ゲノム編集のオフターゲット候補部位の予測・評価法の確立を念頭に、モデルとなるゲノム編集システムを用いて、インシリコ解析、セルフリー解析、セル解析及びマウス個体での解析までの一連の解析を実施した。

2) *in silico* 解析として、短い塩基配列を正確に見落としなく検索可能な GGGenome (<https://GGGenome.dbcls.jp/>) を用いて、ヒトゲノム配列に対しガイド RNA と部分的に相補する配列のうち、SaCas9 の PAM 配列 (NNGRRT,

NNGRRN) に隣接している部位を検索することによってオフターゲットサイトの予測を行った。また、これと同じ精度の *in silico* 解析を簡便に行えるよう、ガイド RNA 設計ソフトウェアである CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) について、従来の SpCas9 および本研究で扱う SaCas9 に加え、さまざまな Cas9 のバリエーションや Cas12a (Cpf1) 向けのガイド RNA を設計できるようにするなど、新しいゲノム編集技術に対応できるように改良した。GGGenome と CRISPRdirect は Web で公開しており、一般に広く利用可能である。

3) セルフリー解析のうち、Digenome-seq は、細胞から抽出したゲノムを CRISPR-Cas システムで切断後、全ゲノム解析を行うことによりオフターゲット切断部位を見出す方法である。Digenome-seq で全ゲノムデータから切断部位を見出すには Digenome-run という解析ソフトが用いられているが、論文の条件では切断部位ではない箇所が誤って検出される偽陽性が多かったことから、切断部位を正しく検出できるように解析フローを改良した解析ソフトを新たに開発した。

4) Digenome-seq、SITE-seq、CIRCLE-seq の 3 種類のセルフリー解析を実施し、結果を比較した。その結果、SITE-seq や CIRCLE-seq はゲノム DNA の切断部位を濃縮後して検出するため検出感度は Digenome-seq より高いが、真の切断点と偽陽性の判別が困難であること、CIRCLE-seq は DNA を環状化する工程の効率が非常に悪く、解析が困難になりやすいという欠点があること、上記 2 法と比較して、Digenome-seq は感度が劣るが、検出される切断点の信頼性が高いという特徴を明らかにした。

5) インシリコ解析とセルフリー解析の結果の比較により、SpCas9 と SaCas9 を用いたゲノム編集において、オフターゲット変異の予測・評価の際、どの程度まで不一致のある配列を評価すべきか、評価すべき配列の特徴を明らかにした。

6) セル解析及び *in vivo* 解析として、作製した AAV ベクターを用いてヒト及びマウス培養細胞のゲノム編集とゲノムシーケンス解析、ヒト肝細胞キメラマウス及び正常マウス個体のゲノム編集と、回収した肝細胞より得られたゲノム DNA のシーケンス解析を実施した。*in vivo* 解析の結果とセル解析等の結果との相関性に関する検討を今後実施する。

### (3) オンターゲット部位の評価

#### 3-1 長鎖の挿入

1) プラスミドベクターや Cas9 mRNA を用いた CRISPR/Cas9 によるマウス受精卵のゲノム編集では 10% を超えるマウスでオンターゲット部位に非意図挿入が起こることを既に報告している。今回、Cas9 タンパク質を利用してゲノム編集を行ったところ、オンターゲット部位で非意図配列の挿入が確認されたことから、Cas9 の導入方法には関係なく、DNA 二重鎖切断が起こるとオンターゲット部位に非意図配列の挿入が一定の確率で起こることを明らかにした。

2) CRISPR/Cas9 発現 AAV ベクターを培養細胞に感染させてゲノム編集を行い、オンターゲットリスクの評価を行ったところ、オンターゲット部位に非意図配列の挿入が高頻度で確認された。また、次世代シーケンサーを利用したアンプリコンシーケンス解析により、AAV ベクター DNA の挿入が確認された。これらの結果より、AAV ベクターを利用したゲノム編集では、オンターゲットサイトに非意図配列の挿入が高頻度で起こること、その頻度はガイド RNA の配列もしくは対象遺伝子に依存することを明らかにした。

3) AAV ベクターを用いてゲノム編集を行った細胞において、次世代シーケンサーを利用せずに、AAV ベクターに対する複数の Taqman プローブを利用したデジタル PCR を行うことで、より簡便に AAV ベクター由来 DNA の挿入を検出することに成功した。また、デジタル PCR を用いることで、オンターゲット部位への AAV の挿入率を正確に検出可能なこと、AAV DNA には挿入しやすい領域としにくい領域があることが判明した。以上の結果から、AAV ベクターを利用した *in vivo* ゲノム編集の場合、デジタル PCR を利用することで、AAV の挿入を高感度に検出することが可能と考えられる。

#### 3-2 染色体異常の評価

ゲノム編集によって引き起こされるオンターゲット部位の変異のうち、染色体異常を網羅的、かつ迅速に解析する手法として、間期核にも適用可能な dual-color FISH の開発、最適化を行った。まず最適な dual-color-FISH probe の設計を行い、正常細胞での確実な評価が可能なプローブの要件を明らかにした。そのプローブを用いて染色体異常の検出可能であることを確認した。さらに自動スキャンニングのアルゴリズムを設定し、自動で 1,000 細胞以上の迅速な解析条件を設定した。また採取した細胞を増殖させることなく解析が可能であることも明らかにし、in vivo ゲノム編集におけるオンターゲット変異の検出手法としての dual-color FISH の有用性を確認できた。

#### (4) In vivo ゲノム編集製品の安全性評価に関する考慮事項

本研究班でのこれまでの研究結果及び文献調査等により得られた情報を基に、in vivo ゲノム編集におけるオフターゲット及びオンターゲット変異の予測・評価法を構築した（一部、継続して検討を実施中）。今後、さらなる研究結果も踏まえ、「In vivo ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品の安全性評価に関する考慮事項」をとりまとめる。

The purpose of this study is to compare the results of in silico analysis, cell-free analysis (in vitro cleavage), and cell analysis (intracellular cleavage) with those of in vivo analysis (individual level) for off-target and on-target site mutations by in vivo genome editing. Based on these results, we will establish a safety evaluation method for in vivo genome editing and compile considerations for the safety assessment of gene therapy products using in vivo genome editing technology.

## 1. Evaluation of off-target sites

1) With a view to establishing a method for predicting and evaluating off-target candidate sites for in vivo genome editing, we conducted a series of analyses, including in silico analysis, cell-free analysis, cell analysis, and analysis in individual mice, using a model genome editing system.

2) in silico analysis : Using GGGenome (<https://GGGenome.dbcls.jp/>), which can accurately search short sequences without missing sequences, we predicted off-target sites by searching for guide RNAs and partially complementary sequences to the human genome sequence that are adjacent to the SaCas9 PAM sequences (NNGRRT, NNGRRN). Off-target sites were predicted by searching for sites adjacent to SaCas9 PAM sequences (NNGRRT, NNGRRN) among sequences partially complementary to the guide RNA for the genome sequence. To facilitate in silico analysis with the same accuracy, CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>), a guide RNA design software, has been developed to search not only general-purpose SpCas9, but also SaCas9, which is used in this study, and other arbitrary Cas PAM sequences. GGGenome and CRISPRdirect are available on the web and widely available to the public.

3) Digenome-seq is a method to find off-target cleavage sites by whole genome analysis after cleaving genomes extracted from cells using CRISPR-Cas system. Digenome-run software is used to find cleavage sites in whole genome data by Digenome-seq. However, under the conditions described in the paper, false positives were frequently observed. Therefore, we developed a new analysis software with an improved analysis flow to correctly detect the cleavage sites.

4) From the results of in silico analysis and cell-free analyses, we clarified the characteristics of sequences that should be evaluated when predicting and evaluating off-target mutations in genome editing using SpCas9 and SaCas9.

5) We compared the data obtained by the three cell-free analysis methods and clarified the characteristics such as reliability and sensitivity of the detection results by each method.

## 2 . Evaluation of on-target mutation

### 1) Large insertion

AAV with guide RNA and SaCas9 was infected to cultured human cells to evaluate “on-target risk”. As a result, it was confirmed that unintended AAV vector fragments were frequently inserted into the on-target site with amplicon sequence analysis using the next-generation sequencer. These results clearly demonstrate that in genome editing using AAV vector, insertion of unintended AAV vector fragments occurs frequently at the on-target site.

### 2) Chromosome abnormality

Dual-color FISH prove has been developed and applied to analyze the chromosomal abnormality in genome-editing cells. Furthermore, a new algorithm to automatically judge the chromosomal abnormality has been also developed, resulting this rapid analysis enable to detect the on-target effect caused by genome editing.

Based on these results and information obtained from literature surveys and other sources, we have established a method for predicting and evaluating off-target and on-target mutations in in vivo genome editing (some studies are still ongoing).

Based on the results of further research, we will compile considerations for the safety evaluation of gene therapeutic products using in vivo genome editing technology.