

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(医薬品等規制調和・評価研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

補助事業課題名： (日本語) 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 the safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy

補助事業担当者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長 内田 恵理子
所属 役職 氏名： (英語) Eriko Uchida, Head of 1st section, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

実施期間： 平成28年 6月15日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) ゲノム編集を利用した遺伝子治療の安全性評価法の確立とガイダンス案の作成
分担課題名： (英語) Study on development of draft guidance for safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy

補助事業分担者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長 内田 恵理子
所属 役職 氏名： (英語) Eriko Uchida, Head of 1st section, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

II. 成果の概要 (総括研究報告)

ゲノム編集技術は、従来の遺伝子治療技術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り、特に問題となるのが目的外の遺伝子にゲノム編集が生じるオフターゲット効果である。本研究は、目的外の遺伝子に意図せずにゲノム編集が起こるオフターゲット効果及びゲノム編集による目的部位への非意図配列の挿入リスクも含めたオフターゲット効果の安全性評価に関する研究、オフターゲット効果の評価に有効な塩基配列検索技術開発を行い、これらの結果を基に、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ガイダンス案を作成することを目的とする。今年度は以下の結果を得た。

1. ゲノム編集によるオフターゲット効果の実態を確認するため、CRISPR-Cas9法によりゲノム編集を行ったヒトiPS細胞のNGS解析を実施した。全ゲノム解析と比較してエクソーム解析は低コストであったが、発現制御領域や未知遺伝子などがシーケンスの対象とならず、そのような領域のオフターゲット変異を検出するためには全ゲノム解析を実施することが望ましいと考えられた。
2. ゲノム編集iPS細胞では、配列依存的なオフターゲット効果はほとんど確認できなかったため、

より高頻度にオフターゲット変異が導入されるよう、あえてヒトゲノムにおける特異性の低いガイド RNA を設計してゲノム編集を行った。比較のため、iPS 細胞だけでなくゲノム編集効率の高い 293T 細胞についても同一のガイド RNA を用いてゲノム編集を行い、細胞株を樹立した。樹立された細胞株については、平成 29 年度に全ゲノム解析を実施する予定である。

3. ゲノム編集済 iPS 細胞に導入された変異がガイド RNA 配列に依存的なオフターゲット効果によるものかを判断するため、塩基配列検索ソフトウェアの GGGenome を改良し、配列類似性が非常に低い場合でも漏れなく検索できるようにした。研究成果の一部は、既に公開されている GGGenome (<http://GGGenome.dbcls.jp/>) および CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) のサイトを通して誰でも無償で利用できる。
4. CRISPR-Cas9 システムを代表とするゲノム編集は、ゲノムの任意部分を改変することを可能としたが、目的部位以外の位置で意図せず遺伝子変異が起こるオフターゲット効果を持つ。研究開発分担者は、マウス受精卵にゲノム編集を実施した際、およそ 10% のマウスの遺伝子改変目的部位に内在性レトロウイルスやゲノム編集のベクター DNA 断片などの非意図配列が挿入されることを報告している (Ono R., et al., Scientific Reports 2015)。今年度は、ゲノム編集を行ったヒト iPS 細胞においても“非意図配列の挿入”という新たなオフターゲット効果が起こるのかを検証した。

Genome editing technologies, including CRISPR-Cas9 system, are expected to become state-of-the-art technologies for gene therapy. However, there are new safety issues to be discussed before clinical researches. One of the most important safety issues is off-target genome editing. The aim of this study is to evaluate the off-target effects of genome editing technologies including sequence-specific off-target effects and a novel off-target effects “unintentional insertion”, to develop efficient nucleotide sequence search software for safety assessment of genome editing technologies, and based on these studies, to develop a guidance document focusing on safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy. The following results were obtained in FY2016.

1. To analyze genome-wide off-target editing induced by CRISPR-Cas9, we performed next-generation sequencing (NGS) of genome-edited human iPS cell lines. Although whole exome sequencing (WES) was expected as a cost-effective approach, WES could not be used for detecting off-target mutations in regulatory regions or unidentified exons. Therefore, it is recommended to perform whole genome sequencing (WGS) for detecting off-target mutations in those regions.
2. WGS of genome-edited iPS cell lines showed that off-target mutations were almost absent in an individual iPS clone. We thus designed guide RNA (gRNA) sequences with large number of potential off-target sites in order to dissect genome-wide off-target editing, and obtained genome -edited human iPS cells with these gRNAs. In addition, genome-editing of 293T cells with the same gRNAs were also performed for comparison with iPS cells. We are planning to perform WGS of obtained genome-edited iPS and 293T cell lines in FY2017.
3. We also updated our nucleotide sequence search software to enhance the sensitivity of detecting gRNA sequence-specific off-target mutations. The updated software exhaustively lists low-similarity sequence hits. The software was partially implemented in GGGenome (<http://GGGenome.dbcls.jp/>) and CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>). These web servers are freely available to all users.
4. We have previously reported that DNA sequences derived from retrotransposons and vector DNA fragments are captured in the target loci when genome editing are carried out in mouse zygotes (Ono R., et al., Scientific Reports 2015). In this study, we evaluate a novel off target effects, “unintentional insertion”, in genome-edited human iPS cell lines.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 0件）

1. 内田恵理子. 遺伝子治療をめぐる我が国の規制動向、日本臨床 75(5), 795-800 (2017)
2. 内田恵理子,内藤幹彦. 遺伝子治療. **臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬品と再生医療**, 2016, 120-133.
3. 山口照英, 内田恵理子. 遺伝子治療の審査体制と海外動向. **遺伝子医学 MOOK 30**, 2016, 288-296 .

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 遺伝子治療等臨床研究に関する指針について、口頭、内田恵理子、第2回遺伝子細胞治療学会遺伝子治療臨床試験トレーニングコース、2016/7/27、国内.
2. アンチセンス医薬品による相補配列依存的オフターゲット効果に関する研究、ポスター、吉田徳幸, 内藤雄樹, 佐々木澄美, 内田恵理子, 小比賀聡, 内藤幹彦, 井上貴雄、第8回日本RNAi研究会、2016/8/31、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子治療概論－遺伝子治療用製品開発の現状と展望、内田恵理子、横浜市立大学大学院,2016/11/28、国内.
2. ゲノム編集と遺伝子治療、内田恵理子、横浜市立大学大学院、2016/11/28、国内.
3. 遺伝子治療用製品の開発における国内と海外の規制動向－5年間の進展－、内田恵理子、ヒューマンサイエンス振興財団規制動向調査班勉強会、2016/6/16、国内.
4. 遺伝子治療について、内田恵理子、大阪大学第二特定認定再生医療等委員会、2016/5/13、国内.

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金
(医薬品等規制調和・評価研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

補助事業課題名 : (日本語) 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 the safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy

補助事業担当者 (日本語) 小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第5室 室長
第1室 室長

所属 役職 氏名 : (英語) Ryuichi Ono, Section 5, Division of Cellular & Molecular Toxicology,
National Institute of Health Sciences, Section Chief

実施期間 : 平成 28 年 6 月 15 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ゲノムシーケンスによる非意図配列の挿入リスクを含むオフターゲット効果の安全性評価

分担課題名 : (英語) Research on off target effects including unintentional insertions by genome sequencing

補助事業分担者 (日本語) 小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第5室 室長

所属 役職 氏名 : (英語) Ryuichi Ono, Section 5, Division of Cellular & Molecular Toxicology,
National Institute of Health Sciences, Section Chief

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 内田 恵理子 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Double strand break repair by capture of unintentional sequences, an emerging new risk for the leading-edge technology, Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering, 2017/1/10, Breckenridge, USA, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 先端生命科学技術とその安全性に関する研究：様々な分野に应用が期待されるゲノム編集技術、小野竜一、国立医薬品食品衛生研究所一般公開、2016/7/23, 国内

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名 : (日本語) 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 the safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy

研究開発担当者
所属 役職 氏名 : (日本語) 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
データサイエンス共同利用基盤施設
ライフサイエンス統合データベースセンター
特任助教 内藤 雄樹
(英語) Yuki Naito, Project Assistant Professor,
Database Center for Life Science,
Joint Support-Center for Data Science Research,
Research Organization of Information and Systems

実施期間 : 平成 28 年 6 月 15 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究
開発課題名 : (日本語) ゲノム編集の安全性評価に有効な塩基配列検索技術の開発
(英語) Efficient nucleotide sequence search software for safety assessment of genome editing technologies

研究開発分担者
所属 役職 氏名 : (日本語) 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
データサイエンス共同利用基盤施設
ライフサイエンス統合データベースセンター
特任助教 内藤 雄樹
(英語) Yuki Naito, Project Assistant Professor,
Database Center for Life Science,
Joint Support-Center for Data Science Research,
Research Organization of Information and Systems

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・内田恵理子 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. オフターゲット効果の評価に有効な塩基配列検索技術，口頭，内藤雄樹，第 7 回核酸医薬 RS シンポジウム（日本核酸医薬学会 RS セッション）（ニッショーホール），2017/3/15，国内.
2. GGGenome & CRISPRdirect：CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集のためのガイド RNA 設計ウェブサーバ，ポスター，内藤雄樹，坊農秀雅，第 39 回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜），2016/11/30，国内.
3. GGGenome & CRISPRdirect：ゲノム編集のオフターゲット効果を防ぐための塩基配列検索ツール，ポスター，内藤雄樹，坊農秀雅，トーゴーの日シンポジウム 2016（東京大学弥生講堂一条ホール），2015/10/6，国内.
4. GGGenome & CRISPRdirect: web tools for designing CRISPR/Cas9 guide RNA，ポスター，Yuki Naito，Hidemasa Bono，Genome Informatics 2016（Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK），2016/9/20，国外.
5. GGGenome & CRISPRdirect：CRISPR/Cas9 によるゲノム編集のためのガイド RNA 設計ツール，ポスター，内藤雄樹，坊農秀雅，日本ゲノム編集学会第 1 回大会（広島国際会議場），2016/9/6，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし