

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20255

研究課題名（和文）ゲノム編集に伴い意図せず編集されうる塩基配列条件の解明

研究課題名（英文）Elucidation of potential sequences that can be unintentionally edited as a result of genome editing

研究代表者

山下 拓真（Yamashita, Takuma）

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・研究員

研究者番号：10866528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：近年、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集技術の治療応用が期待されているが、標的配列と類似した配列を切断することによる目的外の部位での変異（オフターゲット変異）が安全性の観点から問題となっている。そこで本研究ではCas9による切断がどのような配列で起こりうるか評価した。その結果、標的と数塩基までのミスマッチを含む配列や、Cas9が認識するPAM配列が典型的な配列でない場合にも切断されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、ゲノム編集に伴うオフターゲット変異候補部位の予測評価の際には、ガイドRNAとの相補性を指標に、非典型的なPAM配列も含めて評価する必要があることが示された。現在利用されているオフターゲット変異予測プログラムではこのような配列が考慮されていない場合があり、起こりうるオフターゲット変異を見逃してしまう可能性に注意が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, genome editing technology using the CRISPR-Cas9 is expected to be used for therapeutic applications. However, off-target mutations caused by cleavage of sequences similar to the target sequence are a safety concern. In this study, we evaluated the sequences that can be cleaved by Cas9. The results showed that Cas9 can cleave sequences that contain mismatches of up to a few bases with the target sequence and that the PAM sequence recognized by Cas9 is not a canonical sequence.

研究分野：レギュラトリーサイエンス

キーワード：ゲノム編集 オフターゲット変異 CRISPR-Cas

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、欧米では複数の遺伝子治療用製品が承認されてきており、日本でも初めてとなる遺伝子治療用製品が2019年3月に承認されるなど、遺伝子治療はすでに現実のものとなってきている。さらに、最近では CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術が登場し、遺伝子を導入することしかできなかった従来の遺伝子治療とは異なり、ゲノム DNA の配列を自由に変更することであらゆる遺伝性疾患に適用可能な究極の遺伝子治療が可能となることが期待されている。しかしながら、ゲノム編集の治療応用については、安全性の観点から、標的配列と類似した配列を持つ目的外の部位で変異が起こるオフターゲット変異が問題となっており、がん抑制遺伝子の変異によりがん化を起こす可能性などが懸念されている。安全なゲノム編集治療を実現するためには、オフターゲット変異の予測が重要であるが、現状ではオフターゲット変異を起こす条件について情報が不十分であり、オフターゲット変異を予測することは困難である。

2. 研究の目的

CRISPR-Cas9 システムでは、ガイド RNA と呼ばれる 1 本鎖 RNA と Cas9 タンパク質の複合体が標的配列を認識し切断することで変異を誘発する。ガイド RNA は 20 塩基程度の相補的な配列に結合し、Cas9 タンパク質はその隣に存在する PAM 配列と呼ばれる数塩基の特定配列を認識している。オフターゲット変異については、ガイド RNA とある程度の相補性を有する配列で起こると考えられ、従来の研究によって、PAM 配列から離れた位置のミスマッチが許容されやすいことが示されてきているものの、明確な塩基配列条件は明らかではない。以上を踏まえ、本研究は、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集によるオフターゲット変異を起こす塩基配列条件を明らかにすることを目的として研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ガイド RNA の設計・調製

適当な標的配列に対してガイド RNA を設計した場合に、例えば 2 塩基のミスマッチを持つような配列はヒトゲノム上に 1 つ程度しか存在しない計算である。このように、通常、ガイド RNA を設計した場合、数塩基のミスマッチを持つような配列数は限られてしまうため、解析を行うために十分なデータが得られなかった。

そこで本研究では、BLAST のような従来の配列検索ソフトウェアでは不可能であった短い配列をもれなく検索可能なソフトウェアである GGGenome を用いて、特異性の低い配列を意図的に設計することで、多数の配列を同時に解析した。この方法により、ミスマッチを含む配列を通常の 1000 倍以上の数評価することができる。

(2) SaCas9/ガイド RNA によるゲノム DNA 切断

ヒト 1 倍体細胞である HAP1 細胞から抽出したゲノム DNA に対して、(1)で選定したガイド RNA と SaCas9 の複合体を作用させ、高速シーケンス解析により切断点を検出する。検出には、切断された点が DNA 断片の末端になることを利用して検出を行った（図 1）。

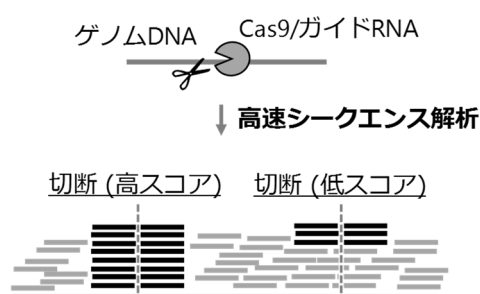


図 1. ゲノム DNA 切断点の検出法

(3) 切断されうる塩基配列条件の解析

(2)で検出された各切断部位について、Digenome-run のスコアを指標に、切断効率を評価する。GGGenome を用いて配列を分類し、ガイド RNA と相補的にならない箇所の数、位置、種類による切断効率の違いを解析することで、切断されうる塩基配列条件を検証した。

4. 研究成果

(1) ガイド RNA の設計

上述のように、GGGenome を用いて、特異性の低い配列を意図的に設計した。その結果、一般的なガイド RNA の計算値（ヒトゲノムをランダムな塩基の並びと考えた際の、各数のミスマッチを含む配列数の期待値）と比較して 1000 倍以上、ヒトゲノム上に数塩基のミスマッチを有する配列が存在するような、特異性の低いガイド RNA を設計できた（図 2）。

ミスマッチ数	1	2	3
通常配列	0	1	24
ガイドRNA1	1721	30176	187200
ガイドRNA2	1102	4595	27677

×1000～

図 2. 設計したガイド RNA と数塩基のミスマッチを含むヒトゲノム上の配列数

(2) ガイド RNA の調製・選定

設計したガイド RNA (11 種類) をそれぞれ調製し、Staphylococcus aureus 由来 Cas9 (SaCas9) との複合体が標的配列を持つ DNA 断片を切断する効率を評価した (図 3)。標的配列の切断効率および非特異性を指標に、ガイド RNA を 2 種類選定した。

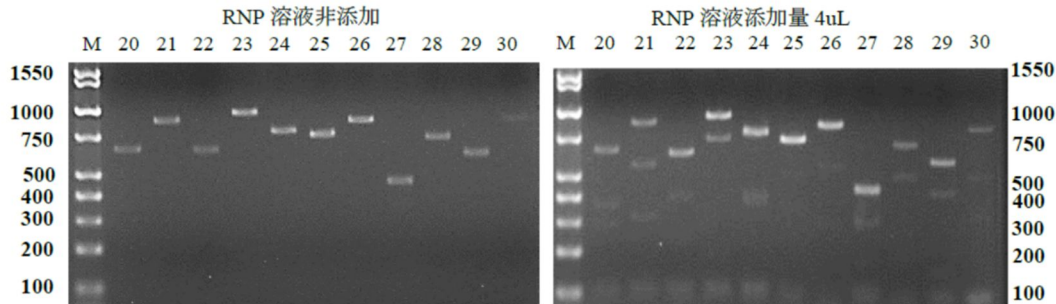


図 3. SaCas9/ガイド RNA の複合体による標的配列切断の確認

PCR によりゲノム DNA から標的領域を増幅し、これに SaCas9/ガイド RNA 複合体 (RNP) を作用させ、RNP を添加した際にのみ現れる切断された短鎖 DNA のバンドを検出した。

(3) SaCas9/ガイド RNA 複合体によるゲノム DNA の切断

ヒト 1 倍体細胞である HAP1 細胞から抽出したゲノム DNA に対して、選定したガイド RNA と SaCas9 の複合体を作用させた。リアルタイム PCR により標的部位での切断効率を測定したところ、95% 以上が切断されていた。続いて高速シーケンス解析によりオフターゲット変異部位の検出を行ったところ、用いた両配列で、ガイド RNA と完全相補となる標的部位以外に 2000 か所以上の配列が切断されていた。

(4) オフターゲット切断部位の配列の解析

検出されたオフターゲット切断部位をガイド RNA との不適合箇所数 (d (Distance)) (図 4) により分類した。その結果、検出された切断点のほとんどが標的配列から 1-4 塩基のミスマッチを有する配列であることが分かった。そこで、まず SaCas9 の認識する典型的な PAM 配列 (5'-NNGRR-3'; R は A または G) を持つ配列について、各 d の配列が、ヒトゲノム中に存在するうちの程度が切断されていたかを評価した。その結果、どちらのガイド RNA にも共通して、切断割合は d が増加するほどに低下したが、d=3 の配列でも比較的高い割合で切断されていた。また、ミスマッチ以外の不適合箇所を含む配列は極端に切断されにくい傾向が示された (ただし、切断が起こらないわけではない)。

続いて、SaCas9 の認識する典型的な PAM 配列 (5'-NNGRR-3') を持たない配列についても同様に評価した。PAM 配列が典型的な場合と比較して切断割合は低かったが、それでもなお d=0 や 1 のガイド RNA との相補性が高い部位では高い割合で切断が起こっていた。また、d が高いほど切断されにくい、ミスマッチ以外の不適合箇所が存在すると切断されにくいという傾向は PAM が典型的な配列の場合と同様であった。

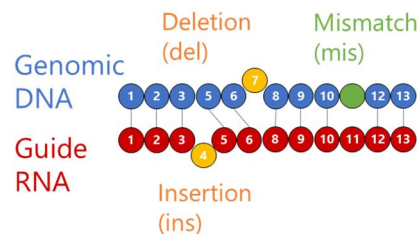


図 4. 不適合箇所数の指標: Distance

図に示す 3 種類の不適合箇所の合計を Distance とし、切断配列を分類した。

(5) 考察及び成果の位置づけ

上記の結果から、SaCas9 によるオフターゲット切断は、d=4 までの配列で十分起こりうること、典型的な PAM 配列を持たない配列でも起こりうるということが明らかになった。したがって、オフターゲット変異部位の予測・評価を行う際には、非典型的な PAM 配列を有する配列も含めて、ヒトゲノム上に存在する標的配列との類似配列を評価する必要があることを示した。特に、オフターゲット部位の予測を行う in silico のソフトウェアについては、ソフトウェアによっては PAM 配列の不一致やミスマッチ以外の不適合箇所を考慮しないものも存在するため、このようなソフトウェアを用いるとオフターゲット変異部位を見逃してしまう可能性があることに注意が必要と考えられる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 山下 拓真，内藤 雄樹，山本 武範，吉田 徳幸，内田 恵理子，井上 貴雄
2．発表標題 SaCas9を利用したゲノム編集によって生じるオフターゲット変異候補部位の解析
3．学会等名 日本薬学会第142年会
4．発表年 2022年

1．発表者名 山下 拓真，内藤 雄樹，山本 武範，吉田 徳幸，井上 貴雄，内田 恵理子
2．発表標題 CRISPR-Cas9ゲノム編集を利用した遺伝子治療によるオフターゲット変異候補部位の網羅的解析
3．学会等名 日本薬学会第141年会
4．発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------