

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17855

研究課題名（和文）パーソナルゲノム治療にむけたPrime Editingゲノム編集データベース構築

研究課題名（英文）The establishment of the Prime Editing database for personalized genetic medicine

研究代表者

中前 和恭（Nakamae, Kazuki）

広島大学・ゲノム編集イノベーションセンター・共同研究講座助教

研究者番号：00882995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：助成期間内において、ゲノム編集の標的領域あるいは非標的領域の個別シーケンス解析系の検討、さらに配列検索プログラムやPrime Editing活性予測システムの構築を実施した。非編集標的領域の個別シーケンス解析系では、RNAシーケンシングデータからパーソナルゲノムで生じた非標的領域の変異導入の痕跡とその表現型への影響力を予測するパイプライン「DANGER analysis」を構築した。これら成果を組み合わせたWebデータベースツール「PrimeMe Designer」を構築するために「<https://www.primeme-designer.com>」上でウェブシステムの公開準備を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、計算予測からPrime Editingによる治療可能性が高い病原変異をゲノムワイドにプロファイリングし、患者が保有するユニークな変異シーケンス情報を考慮する個別シーケンスシステムの構築とその実証を目的とした。

本助成によって構築された「DANGER analysis」はゲノム編集によってゲノム編集を治療として受ける患者で発生しうる生物学的な影響を予測することができる。

また、Webデータベースツール「PrimeMe Designer」では利用者個人の遺伝子情報から安全なゲノム編集ツールの設計情報をシームレスに得ることができると期待される。

研究成果の概要（英文）：We established individual sequence analysis systems for targeted and non-targeted sites of genome editing, as well as the sequence search program and the Prime Editing activity prediction system. We constructed the "DANGER analysis" pipeline, which predicts off-target effects and their impact on phenotypes.

To combine these achievements into a web database tool, we prepared to launch the web system on "<https://www.primeme-designer.com>" for "PrimeMe Designer."

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 Prime Editing オフターゲット RNAシーケンシング ナノポアシーケンシング

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

ゲノム編集をはじめとした高精度な遺伝子改変技術の発展に伴い、患者細胞に遺伝子治療を施すパーソナルゲノム医療が現実的になりつつあった。そのような中で新規ゲノム編集技術 Prime Editing では病原変異全体(約 30 万件)の 80%以上を正確に治療できることが期待されていた。しかし、Prime Editing による確度の高い治療戦略を立てるための情報インフラはなく、臨床応用研究の前には障壁が存在していた。

2. 研究の目的

本研究では、計算予測から Prime Editing による治療可能性が高い病原変異をゲノムワイドにプロファイリングし、その成果をデータベースとして公開し、なおかつナノポアシーケンスによるユニークな変異シーケンス情報を考慮することが可能な個別シーケンスシステムの構築とその実証を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、採択までの準備期間と、採択された後の 3 年間(コロナ禍により一年延長)で下記の項目を実施した。

【準備期間ならびに 2021 年度実施内容】

まず最初に Prime Editing の検証とパーソナルゲノム情報を取得するためのナノポアシーケンス解析系の検討を行った。

Prime Editing においては、まず先行研究で有効性が確認されていた RNF2 遺伝子座に着目して、ラボ内で再現実験を行うとともに導入条件の最適化を実施した。最適化の結果、先行研究よりも小スケールで同程度の効率で正確な配列改変が可能な実験系を確立した。また既存の解析ツールを応用した効率測定系や効率予測に利用するパラメーター計算スクリプトを構築し、これらが実際の Prime Editing において非常に有効であることを確認した。

さらに従来の Prime Editing よりもより効率化された PEmax や、epegRNA、および dual-pegRNA のシステムを導入し、これらを組み合わせることでさらに高効率化できることを確認するとともに、HCT116 細胞株を使った実証実験の中にも取り入れた。

ナノポアシーケンス解析系では、計画していたように HCT116 細胞株がもつ MLH1 遺伝子座の Homozygous SNP(rs63750198)を対象に、ナノポアシーケンスを実施し、十分な精度で検出可能か検証した。長鎖シーケンス用に最適化した条件で周辺配列 20 kb の PCR 増幅産物をナノポアシーケンサーに供したところ、90%以上の率で SNP 配列の検出に成功し、本シーケンス解析系での有用性を確認した。また解析ソフトを吟味し、実際のシーケンスデータを使った検証から、既存ソフトウェアで対応できないポイントをあぶり出し、システムの細かな仕様策定を行った。

【2022 年度実施内容】

前年度に行ったナノポアシーケンス解析系の検討を踏まえて、データベース構築に伴う各種プログラムの構築を実施した。

まずヒトのリファレンスゲノムに対して SpCas9 が設計可能な箇所のアノテーションマップを作成した。アノテーションマップの作成においては他グループが報告している『Crisflash』を利用し、トラックとして扱える形にデータ加工した。また、ナノポアシーケンスで読んだ HCT116 細胞のユニークゲノム配列の一部をリファレンスゲノムに置換するプログラムも構築し、細胞ゲノムのユニーク変異を反映するシステムの実装の基盤を構築した。

Prime Editing においては、申請者が構築したゲノム編集解析プラットフォーム『MaChIAto』を Docker イメージ化して環境に依存せず特徴量計算が実施できるよう再実装するとともに、先行研究で報告された Prime Editing 予測モデル『DeepPE』についてもローカル環境内での実装に成功した。このモデルは特徴量算出プログラムが公開されていないため、通常ローカル環境での実装は困難であったが、申請者側で特徴量算出プログラムを再現し、それをインプットとして用いた予測で相関がみられることを確認した。『MaChIAto』の特徴量計算と『DeepPE』の活性予測を活用することで精度の高い Prime Editing 活性予測の実現を狙った。

【2023 年度実施内容】

2021 年度に行ったオンターゲット領域のナノポアシーケンス解析系の検討と 2022 年度に行ったデータベース構築に伴う各種プログラムの構築を踏まえて、オフターゲット領域の個別シーケンスに向けたより発展的なパイプラインを構築した。オフターゲット領域の個別シーケンス

として、RNA シーケンシングデータからパーソナルゲノムで生じるオフターゲットとその表現型への影響力を予測するパイプライン『DANGER analysis』を構築した。これにより全ゲノムシーケンシングを実施することなく、簡易的に患者ゲノム内のオフターゲットをゲノムワイドにプロファイリングすることができるようになった。Prime Editing においては、PE4 や PE5 といった次世代型の Prime Editing ツールでの検討や ABE といった Base Editing などの類似ツールでの検討も実施した。

上記の変異プロファイリングシステム系や Prime Editing/Base Editing 編集技術、また前年度検討したゲノム検索システム系や活性予測システム系の成果を組み合わせた Web データベースツール『PrimeMe Designer』を構築するために『<https://www.primeme-designer.com>』上でウェブシステムの公開準備を進めた。

4．研究成果

助成期間内において、ゲノム編集の標的領域あるいは非標的領域の個別シーケンス解析系の検討、さらに配列検索プログラムや Prime Editing 活性予測システムの構築を実施した。非編集標的領域の個別シーケンス解析系では、RNA シーケンシングデータからパーソナルゲノムで生じた非標的領域の変異導入の痕跡とその表現型への影響力を予測するパイプライン「DANGER analysis」を構築し、これについては国際学術誌「Bioinformatics Advances」にて報告を行った（引用 1）。

これら成果を組み合わせた Web データベースツール「PrimeMe Designer」を構築するために「<https://www.primeme-designer.com>」上でウェブシステムの公開準備を進めた。

本研究では、計算予測から Prime Editing による治療可能性が高い病原変異をゲノムワイドにプロファイリングし、患者が保有するユニークな変異シーケンス情報を考慮する個別シーケンスシステムの構築とその実証に取り組んだ。

本助成によって構築された「DANGER analysis」はゲノム編集によってゲノム編集を治療として受ける患者で発生しうる生物学的な影響を予測することができる。

また、Web データベースツール「PrimeMe Designer」では利用者個人の遺伝子情報から安全なゲノム編集ツールの設計情報をシームレスに得ることができると期待される。

引用 1: Nakamae, K., & Bono, H. (2023). DANGER analysis: risk-averse on/off-target assessment for CRISPR editing without a reference genome. *Bioinformatics Advances*, 3(1), vbad114.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1 . 著者名 Kazuki Nakamae, Mitumasa Takenaga, Shota Nakade, Akinori Awazu, Naoaki Sakamoto, Takashi Yamamoto, Tetsushi Sakuma	4 . 巻 NA
2 . 論文標題 Detailed profiling with MaChIAto reveals various genomic and epigenomic features affecting the efficacy of knock-out, short homology-based knock-in and Prime Editing	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 bioRxiv	6 . 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.06.27.496697	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1 . 著者名 Nakamae Kazuki, Bono Hidemasa	4 . 巻 3
2 . 論文標題 DANGER analysis: risk-averse on/off-target assessment for CRISPR editing without a reference genome	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Bioinformatics Advances	6 . 最初と最後の頁 vbad114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bioadv/vbad114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 Kazuki Nakamae
2 . 発表標題 Computational Resources for Industrial Application of Genome Editing
3 . 学会等名 JAACT2023（招待講演）（国際学会）
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 中前 和恭
2 . 発表標題 ゲノム編集の安全性評価ソフトウェアの開発 安心してゲノム育種に取り組める社会を目指して
3 . 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2023年

1．発表者名 中前和恭
2．発表標題 DANGER Analysis：表現型への影響を評価する新規オフターゲット解析ツール
3．学会等名 日本ゲノム編集学会 第8回大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 Kazuki Nakamae
2．発表標題 Sequence-based parameters contributing to the efficiency and accuracy of MMEJ-assisted knock-in and Prime Editing
3．学会等名 FASEB: The Genome Engineering Conference: Cutting-edge Research and Applications (国際学会)
4．発表年 2022年

1．発表者名 Kazuki Nakamae
2．発表標題 Sequence-based parameters contributing to the efficiency and accuracy of MMEJ-assisted knock-in and Prime Editing
3．学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4．発表年 2022年

1．発表者名 中前和恭
2．発表標題 Sequence-based parameters contributing to the efficiency of MMEJ-assisted knock-in and Prime Editing
3．学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4．発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Nakamae
2. 発表標題 Sequence-based parameters contributing to the efficiency of MMEJ-assisted knock-in and Prime Editing
3. 学会等名 CSHL meeting: GENOME ENGINEERING: CRISPR FRONTIERS (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>MaChIAto公開ページ https://machiatopage.github.io</p> <p>MaChIAtoソースコード https://github.com/KazukiNakamae/MaChIAto/</p> <p>MaChIAto Dockerイメージ配布ページ https://hub.docker.com/r/kazukinakamae/machiato</p> <p>DANGER analysisソースコード https://github.com/KazukiNakamae/DANGER_analysis</p> <p>DANGER analysis 広島大学プレスリリース https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/79088</p> <p>DANGER analysis 広島大学プレスリリース(英語版) https://www.hiroshima-u.ac.jp/en/news/79417</p> <p>PrimeMe Designer https://www.primeme-designer.com [®]PrimeMe Designer (https://www.primeme-designer.com)については公開に向けて準備を進めており、現状は準備ページのみ閲覧可能となっている。</p>

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
---------	---------