

オフターゲット変異の解析と課題

東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト
プロジェクトリーダー
宮岡 佑一郎

2016年 10月5日 日本学会議

Overview

単一細胞株を用いる場合

ゲノムを編集したiPS細胞の医療応用など

細胞集団を用いる場合

生体内／外ゲノム編集による医療応用など

Overview

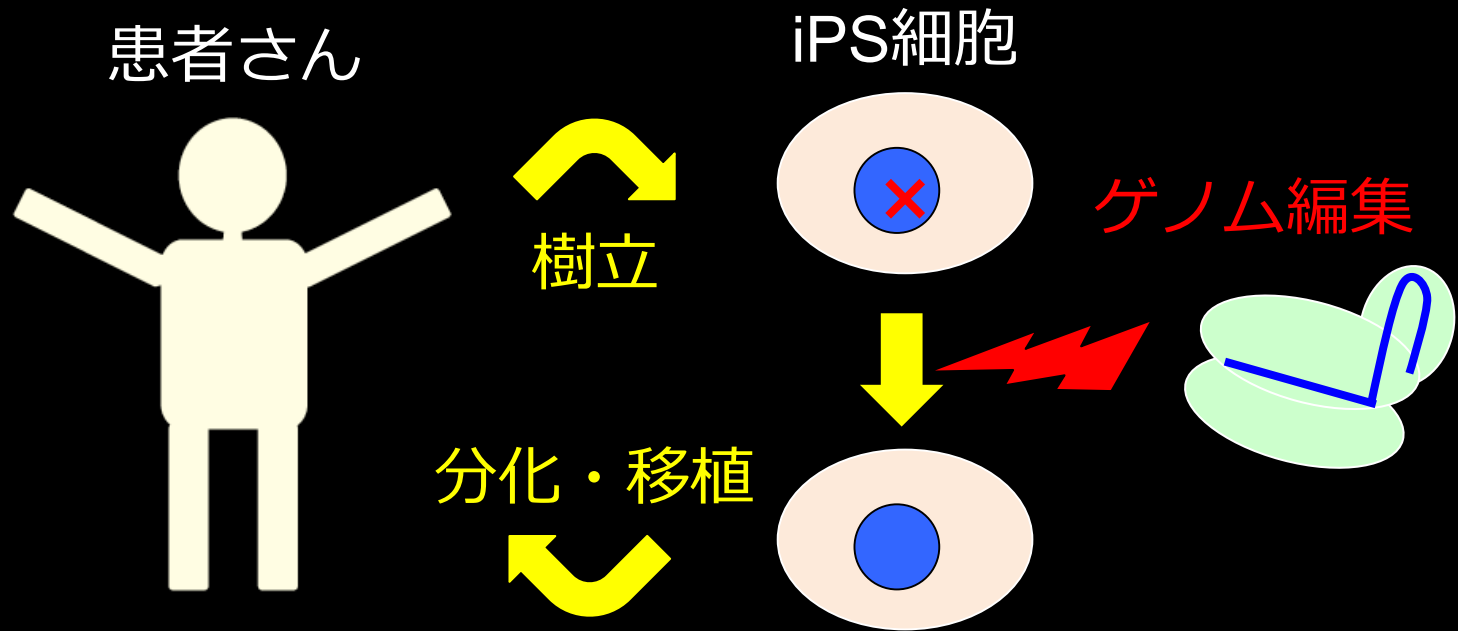
単一細胞株を用いる場合

ゲノムを編集したiPS細胞の医療応用など

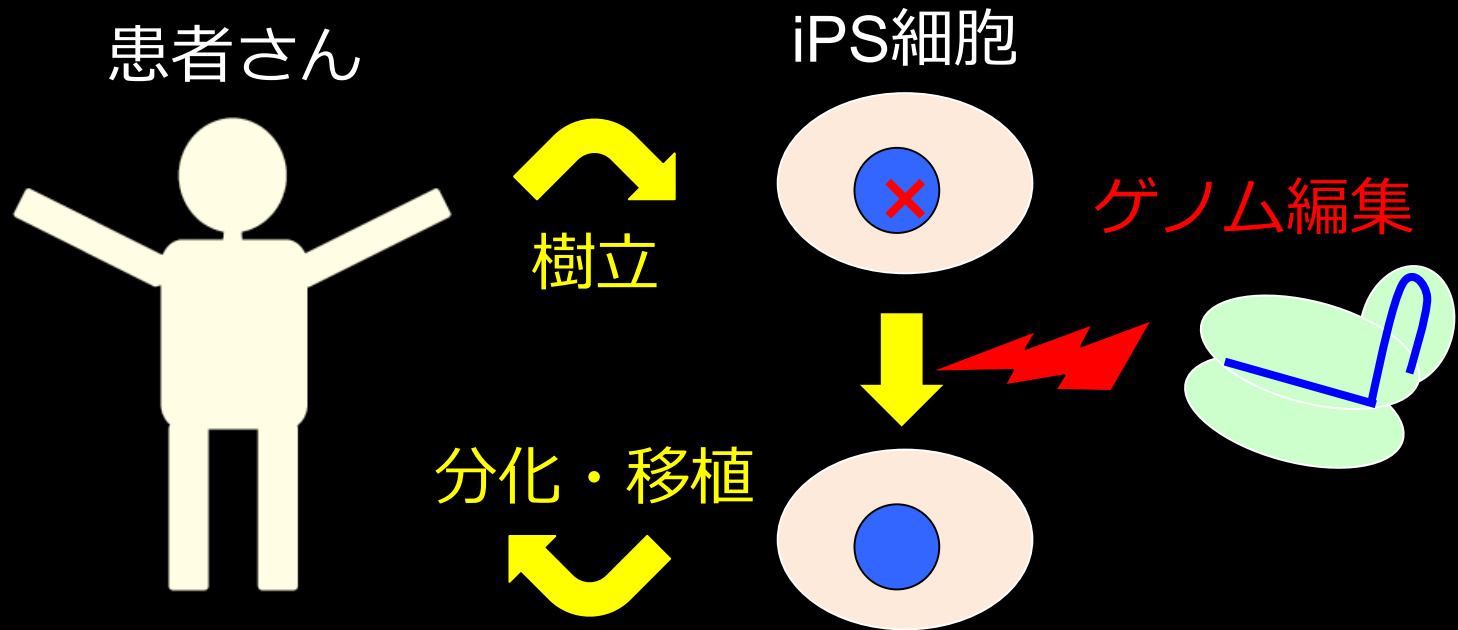
細胞集団を用いる場合

生体内／外ゲノム編集による医療応用など

ゲノムを編集した単一細胞株の移植



ゲノムを編集した単一細胞株の移植



細胞株としてクローニングされた場合

↓
全ゲノム解析

加齢黄斑変性のiPS細胞移植治療の基準

2014年9月に理研CDBの高橋政代先生を中心に実施

- (1) 残存プラスミドの否定
全ゲノムシーケンス、定量PCR、キャプチャーシーケンス
 - (2) SNPアレーによるコピーナンバー解析
 - (3) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子変異、構造異常解析
 - (4) メチローム解析
- (京都大学 山中先生の発表より)

ほぼ同等の基準となると予想される

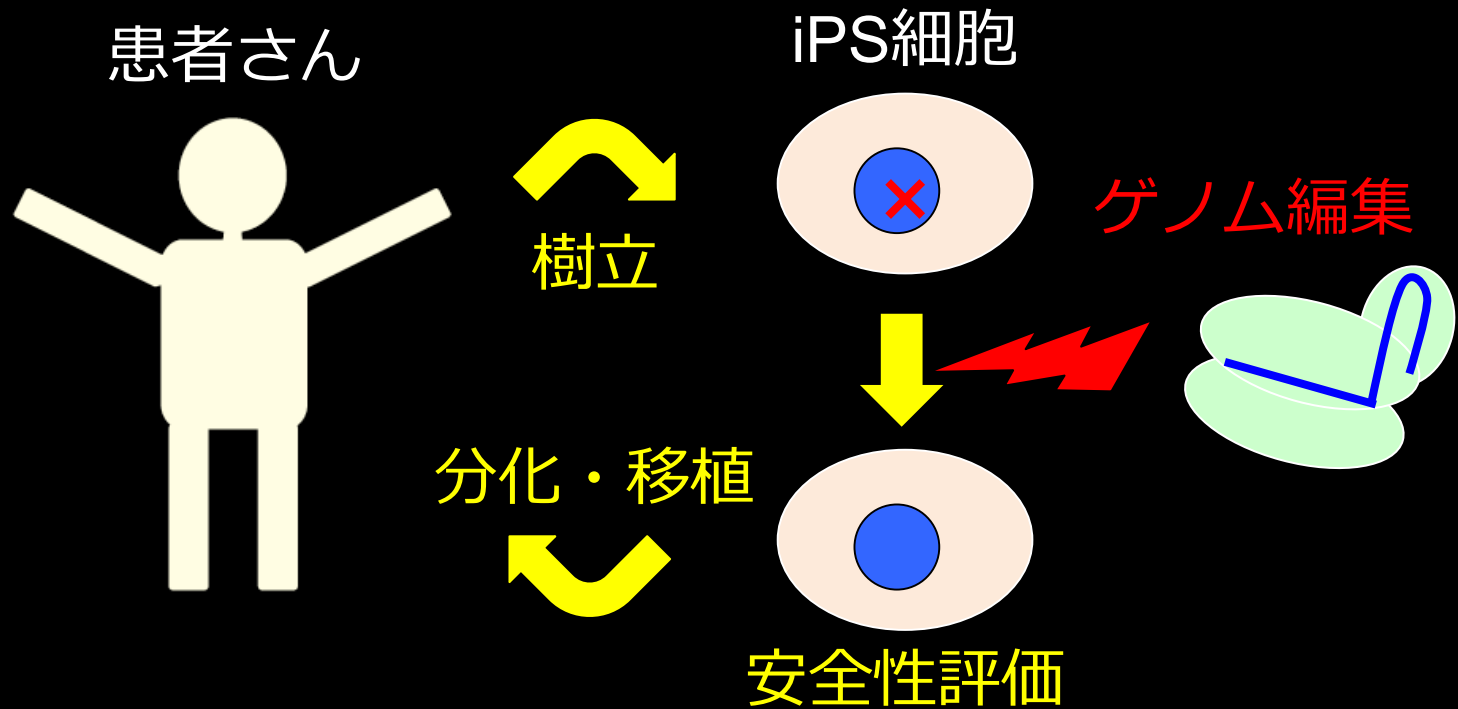
- (1) 残存プラスミドの否定（ゲノム編集ツールのベクター）
全ゲノムシーケンス、定量PCR、キャプチャーシーケンス
- (2) SNPアレーによるコピーナンバー解析
- (3) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子変異、構造異常解析
- (4) メチローム解析

ほぼ同等の基準となると予想される

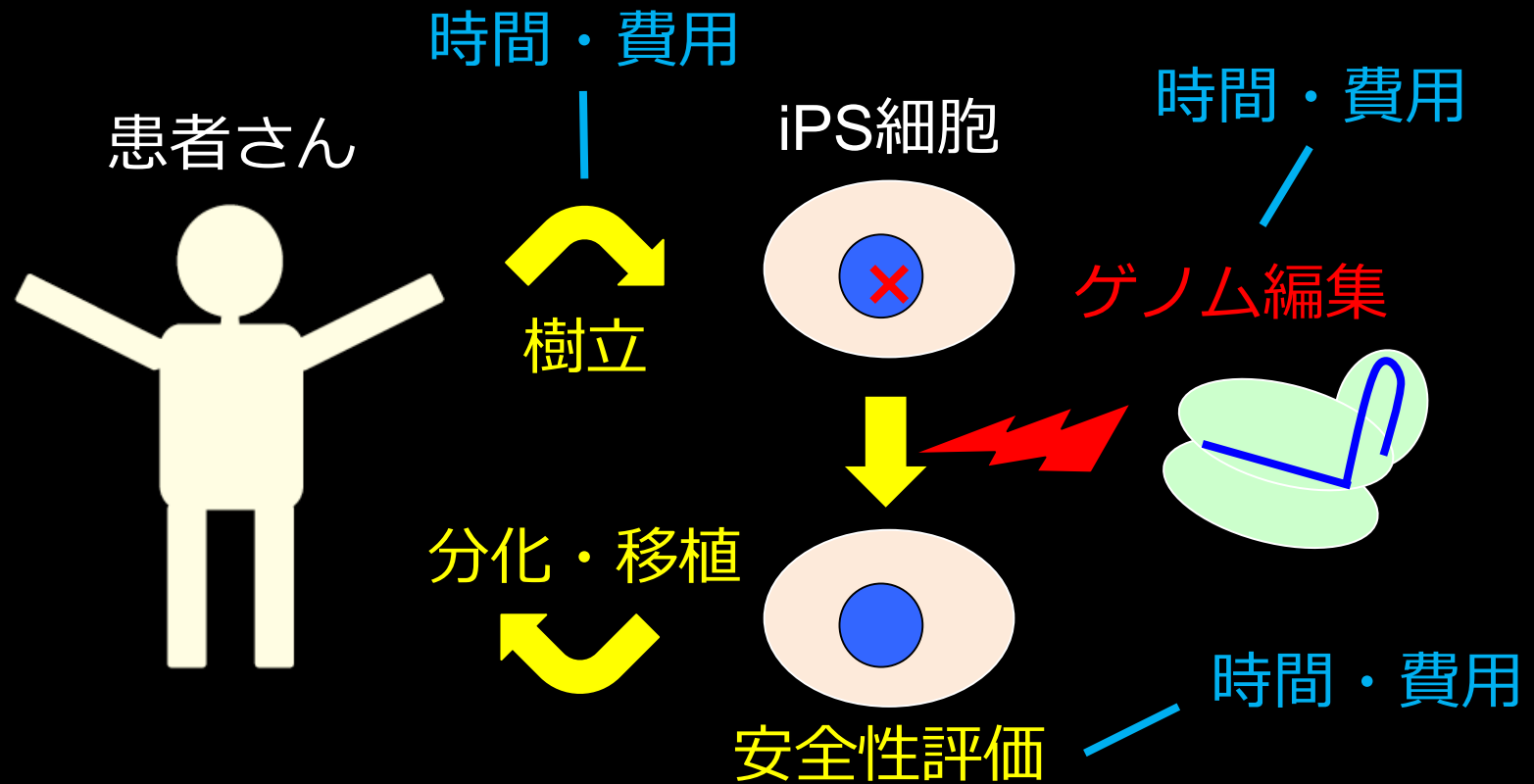
- (1) 残存プラスミドの否定（ゲノム編集ツールのベクター）
全ゲノムシーケンス、定量PCR、キャプチャーシーケンス
- (2) SNPアレーによるコピーナンバー解析
- (3) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子変異、構造異常解析
- (4) メチローム解析

これらの基準を満たせば、臨床治験は可能と推測される

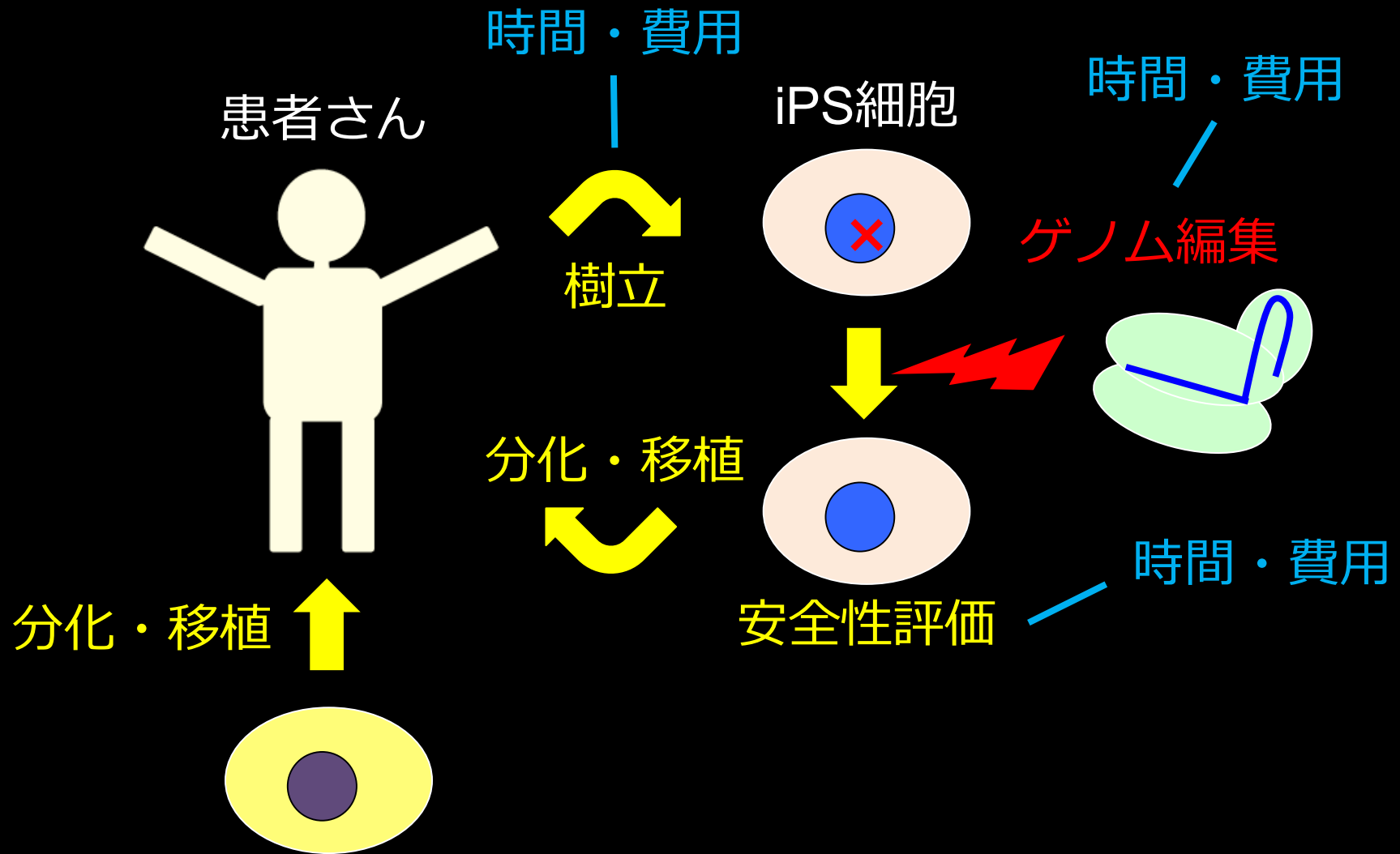
細胞移植治療をめぐる状況



細胞移植治療をめぐる状況



細胞移植治療をめぐる状況



HLAホモ接合体 (スーパードナー) iPS細胞
(京都大学 iPS細胞研究所)

Overview

単一細胞株を用いる場合

ゲノムを編集したiPS細胞の医療応用など

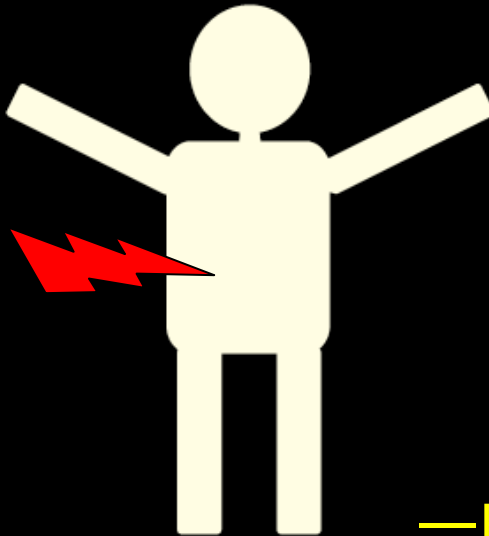
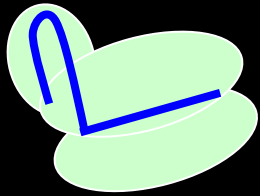
細胞集団を用いる場合

生体内／外ゲノム編集による医療応用など

生体内・生体外ゲノム編集による治療

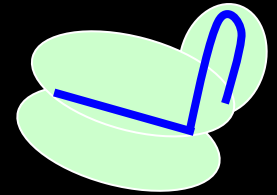
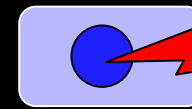
患者さん

生体内
ゲノム編集



一時的な細胞の
採取と再投与

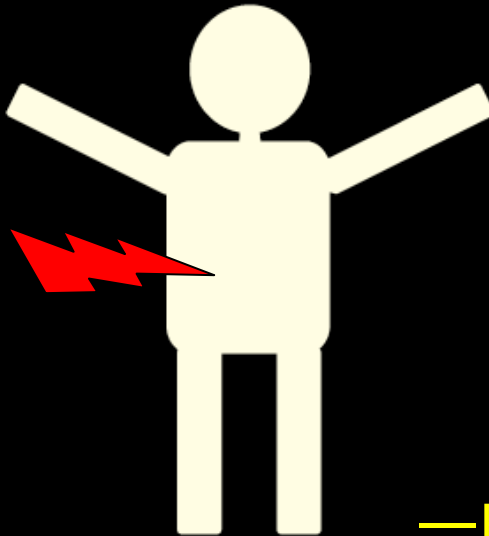
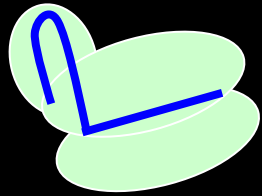
生体外
ゲノム編集



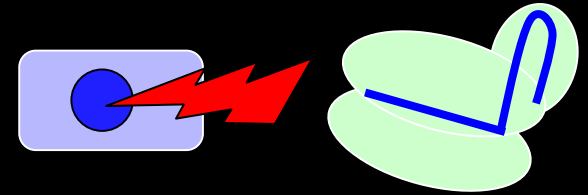
生体内・生体外ゲノム編集による治療

患者さん

生体内
ゲノム編集



生体外
ゲノム編集



一時的な細胞の
採取と再投与

細胞集団として治療に用いられる場合



編集の正確性を評価するための
明確な基準はまだ定まっていない

二層のゲノム編集の正確性

[illegible]

二層のゲノム編集の正確性

レベル1: ゲノムの狙った箇所だけを編集する

[illegible]

二層のゲノム編集の正確性

レベル1: ゲノムの狙った箇所だけを編集する

[illegible]

元の配列

AGGGC CGGG



望んだ置換

AGGGTCTGGG

望んでいない置換

AGGG**A**CGGG

欠失

AGGG--GGG

插入

AGGGTAGCGG¹⁷

二層のゲノム編集の正確性

レベル1: ゲノムの狙った箇所だけを編集する

[illegible]

レベル2: 狙った編集だけを導入する

元の配列
AGGGC CGGG



望んだ置換
AGGG**T**CGGG

望んでいない置換
AGG GAC GGG

欠失
AGGGG

插入
ACGGTAGGGG

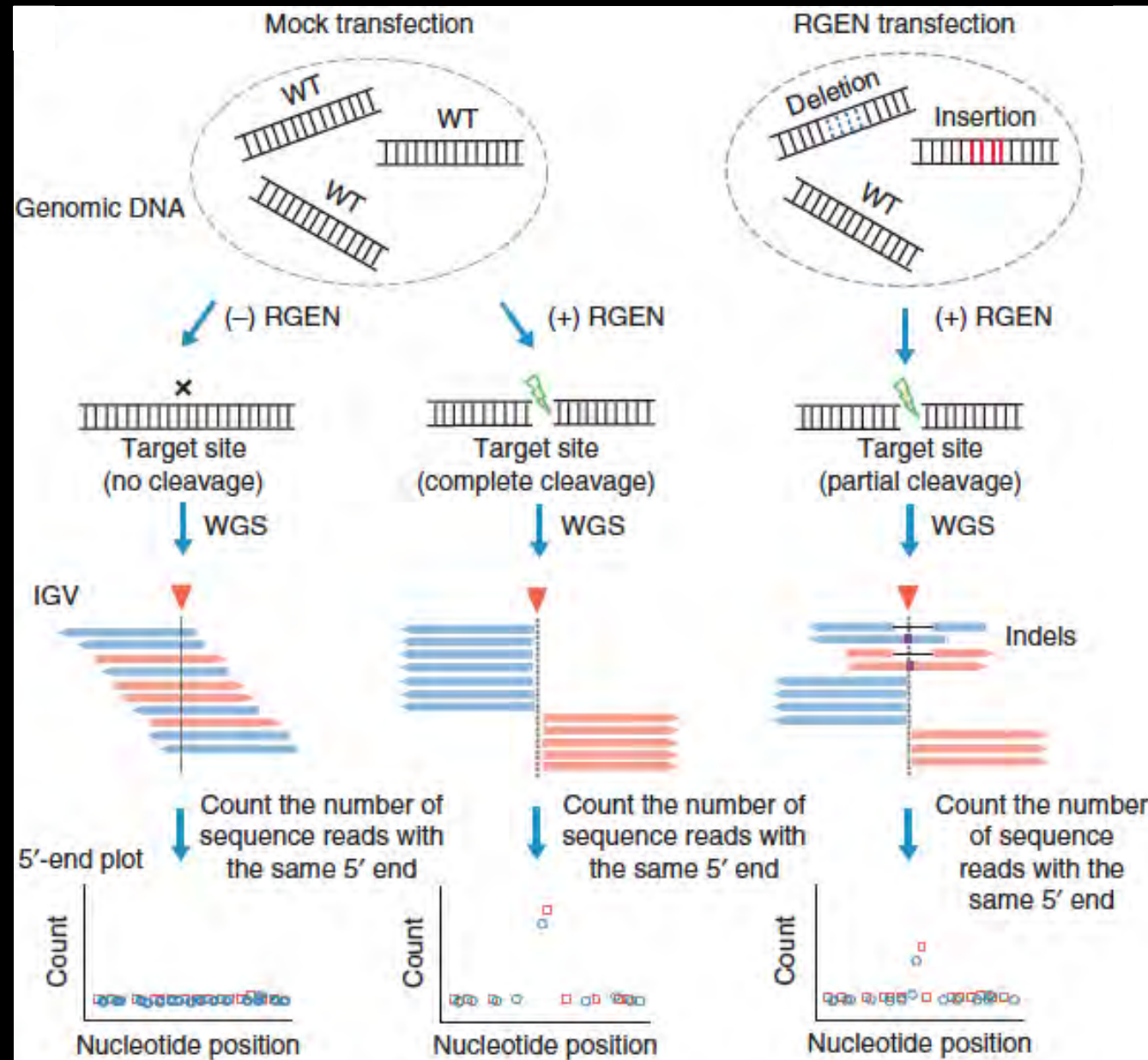
AGG**GTAG**GGG¹⁸

二層のゲノム編集の正確性

レベル1: ゲノムの狙った箇所だけを編集する

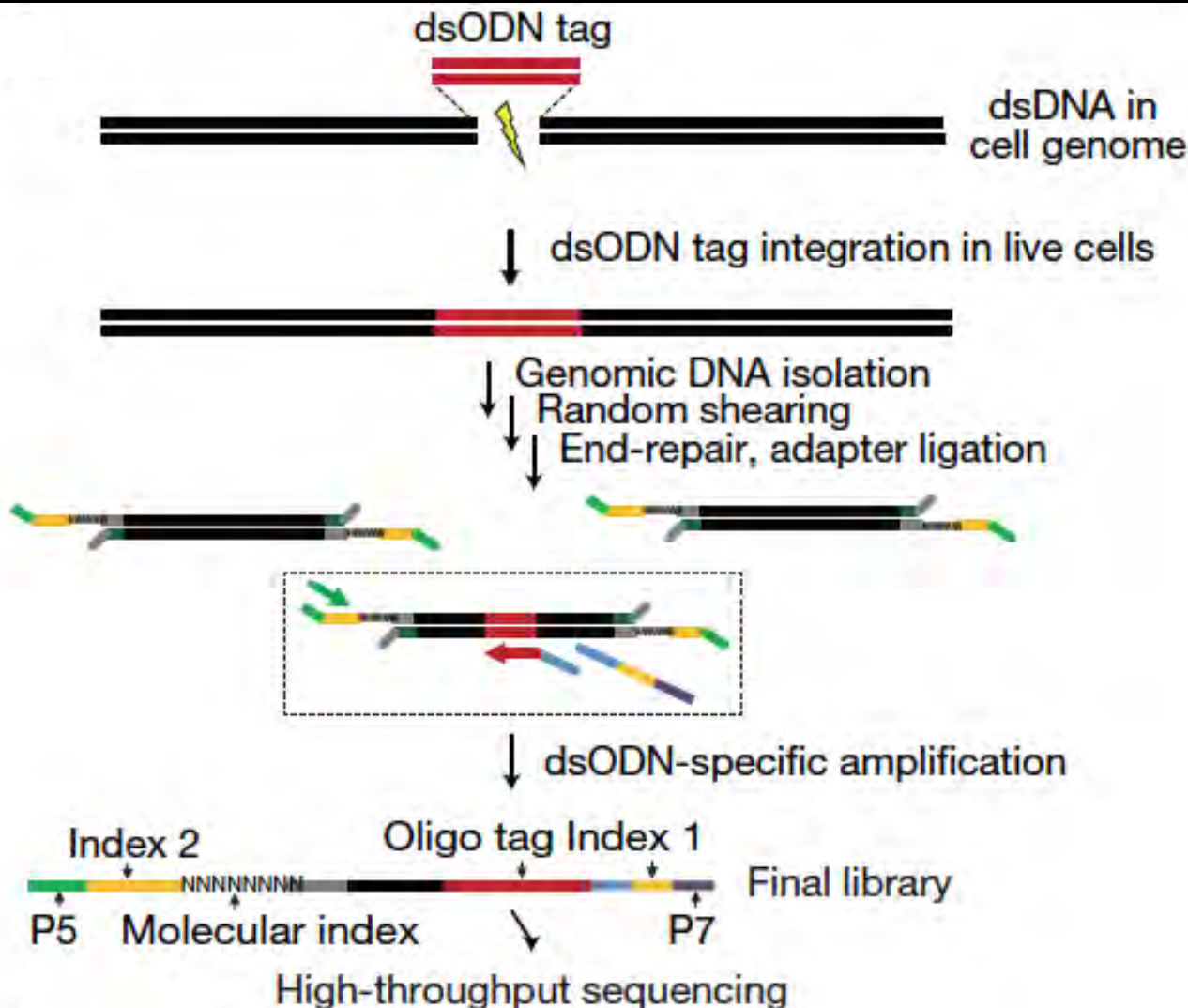
[illegible]

レベル1の検討法 : Digenome-Seq



オフターゲット変異の検出限界 ~0.1%

レベル1の検討法 : GUIDE-Seq

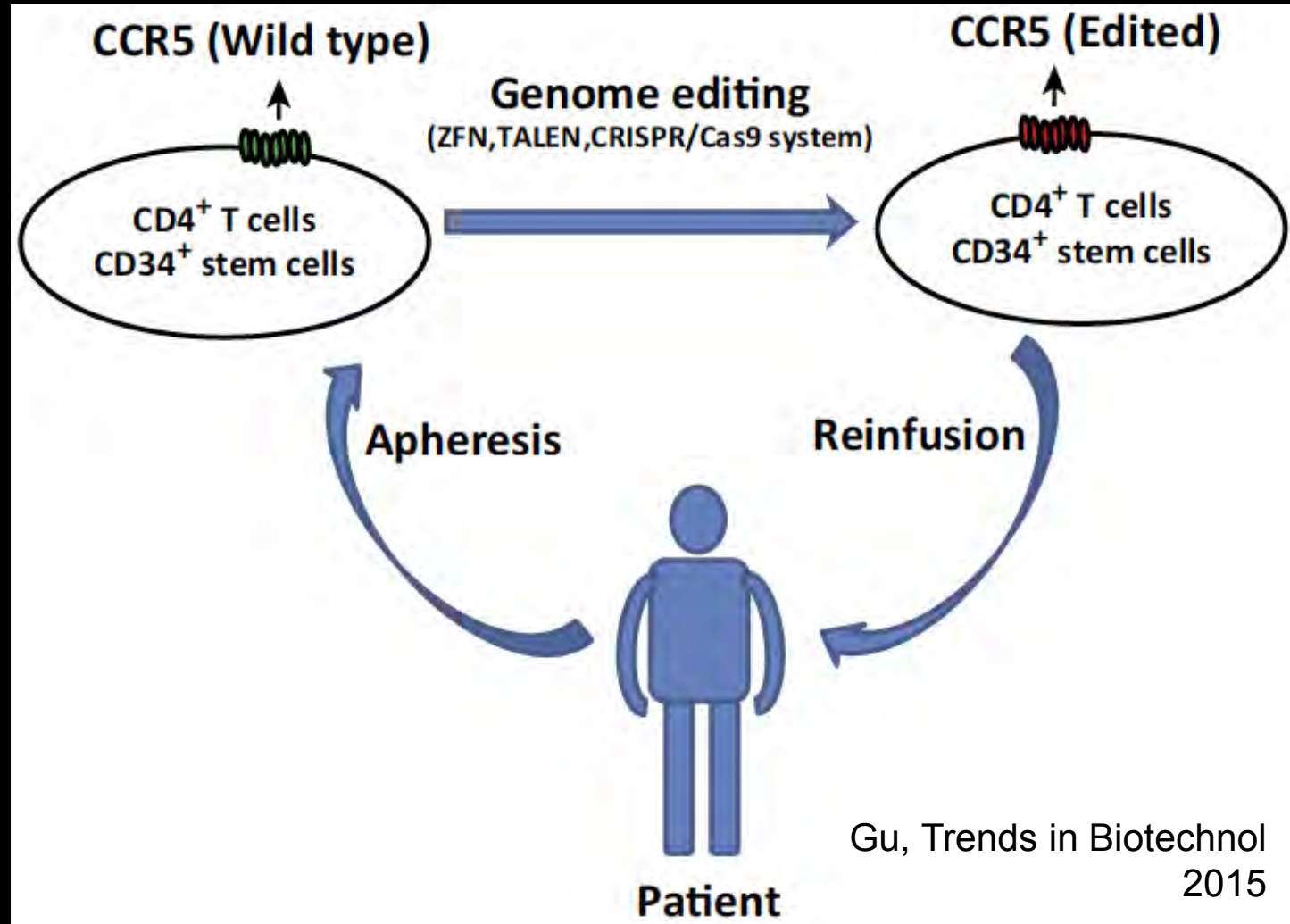


オフターゲット変異の検
出限界 ~0.1%

Tsai, Nature Biotech
2015

先行例：ZFNによるT細胞内CCR5破壊

Sangamo BioSciences社のZFNでHIVがT細胞侵入に使うCCR5を破壊する生体外ゲノム編集治療(米国Phase II Clinical Trial)



二層のゲノム編集の正確性

レベル2: 狙った編集だけを導入する

元の配列

AGGGC CGGG



望んだ置換

AGGGTCTGGG

望んでいない置換

AGG **A** C GGG

欠失

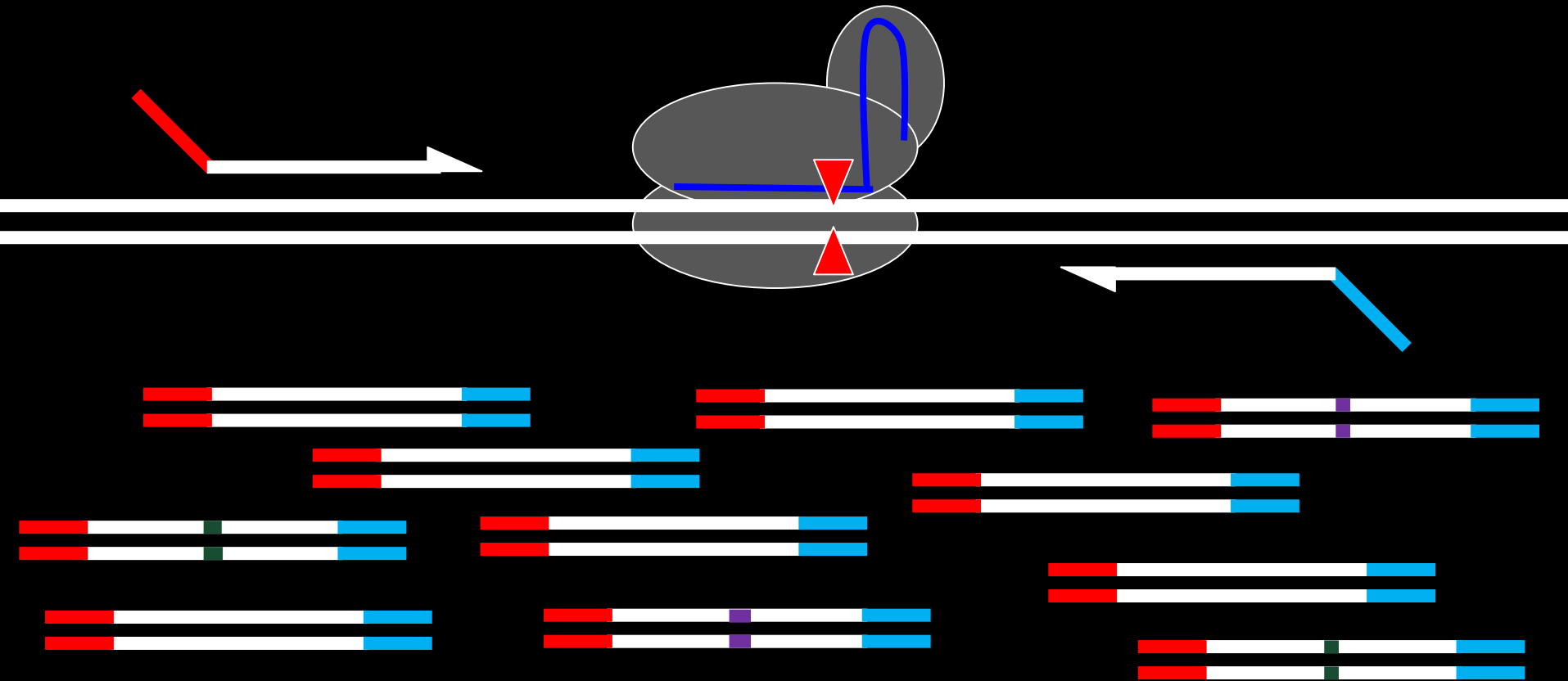
AGGGGGGG

插入

AGG**TAG**GGG²³

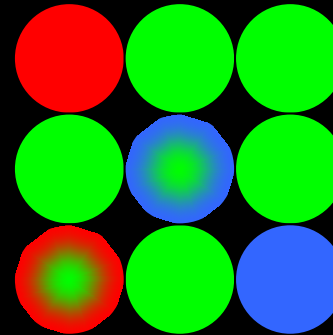
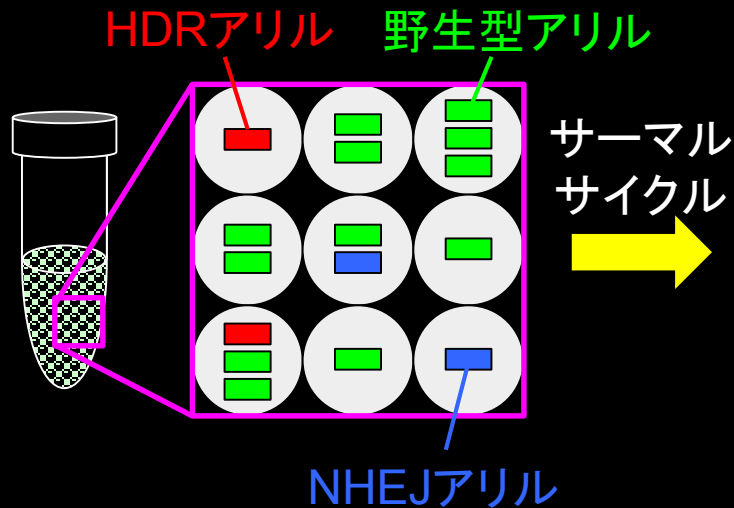
[illegible]

レベル2の検討法：Amplicon-Seq

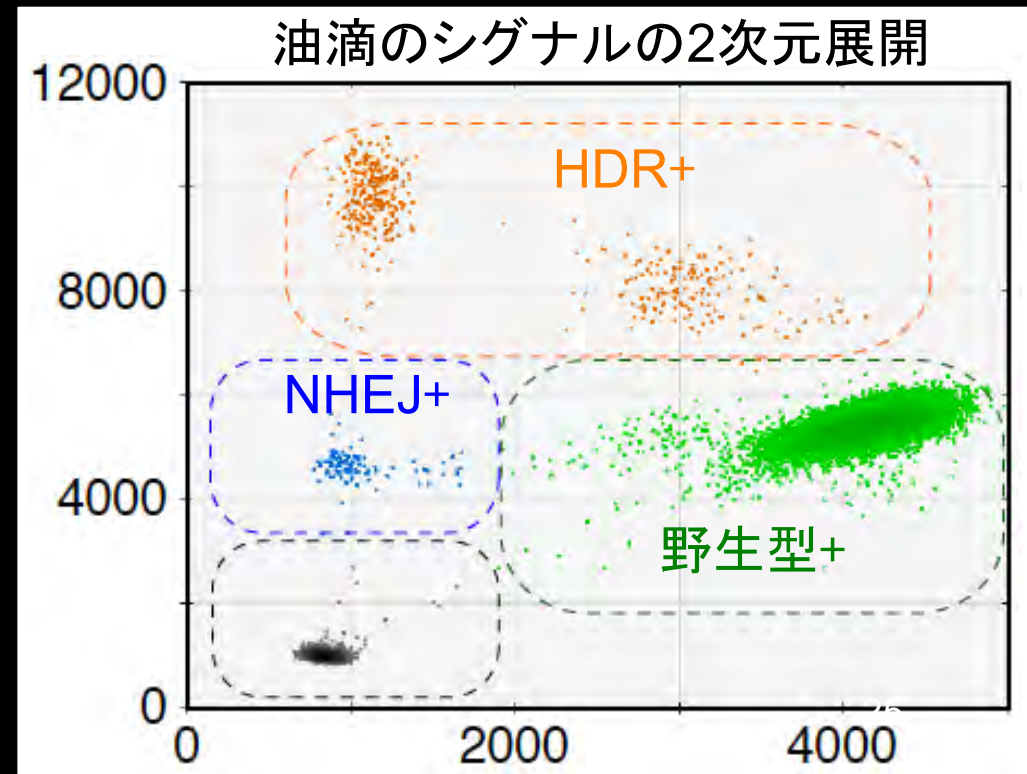
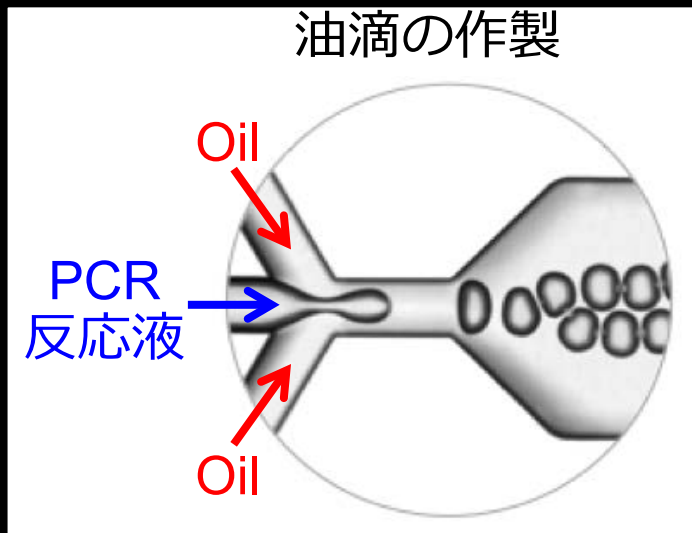


Deep sequencing

レベル2の検討法：デジタルPCR



油滴中のアリル特異的な
シグナルの増幅



Miyaoka, Nat Methods 2014
Miyaoka, Sci Rep 2016

まとめ

単一細胞株を用いる際には全ゲノム配列解析

細胞集団を用いる際には二層の正確性を評価

ゲノムの狙った箇所だけを編集するための正確性の評価にはDigenome-seqやGUIDE-seqなどのdeep sequencingが有効

狙った編集だけを導入する正確性の評価にはAmplicon-seqやデジタルPCRなどが有効

謝辞

Conklin Lab, Gladstone Institutes



Bio-Rad Laboratories

Jennifer Berman
Samantha Cooper
Bin Zhang
George
Karlin-Neumann

日本学術振興会
上原記念財団
CIRM

公益財団法人 東京都医学総合研究所

許 絲茵
加藤 朋子

内藤記念科学振興財団
上原記念生命科学財団
ノバルティス科学振興財団
先進医薬研究振興財団
持田記念医学薬学振興財団

