

令和 2 年 2 月 7 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
理事長 藤原 康弘 殿

科学委員会
委員長 井上 純一郎

科学委員会では、今般、下記について科学的見地からの議論をまとめました。
独立行政法人医薬品医療機器総合機構における通常業務にご活用ください。

記

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の
品質・安全性等の考慮事項に関する報告書

以上

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の品質・安全性等の考慮事項に関する報告書

**令和2年2月7日
科学委員会**

【目次】

1.	序論.....	1
2.	定義.....	2
3.	ゲノム編集技術特有の課題.....	3
	(1) 遺伝子改変細胞のがん化等のリスク.....	3
	(2) 生殖細胞における意図しない遺伝子改変リスク.....	3
4.	ゲノム編集技術の分類とその品質特性に関する課題.....	3
	(1) ゲノム編集ツールによる分類とその留意事項.....	3
	(2) ゲノム編集ツール及び遺伝子改変した細胞における留意事項.....	4
	(3) ゲノム編集の目的による分類.....	6
5.	安全性評価の考え方.....	8
	(1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の共通事項.....	8
	(2) <i>in vivo</i> ゲノム編集.....	11
6.	治験において留意すべき事項（長期フォローアップ等）.....	12
7.	おわりに.....	13

1. 序論

特定の遺伝子を特異的に切断、改変、編集できる画期的な技術としてゲノム編集技術[1, 2]の開発が精力的に進められ、新たな遺伝子治療法として、その実用化が期待されている。

この技術が特に注目される理由は、これまでの遺伝子治療は新たな遺伝子を付加することで疾患を治療するのに対し、ゲノム編集は、特定の遺伝子の機能を失わせたり、疾患の原因となっている遺伝子異常を修正したりすることが可能なため、究極の遺伝子治療技術となる可能性があることによる。

ゲノム編集技術の基本は、DNAの特定の部位への二重鎖切断(double strand break: DSB)の導入と細胞のもつ修復機構の利用である。DSBの修復機構としては非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)と、相同組換え(homologous recombination: HR)を利用した修復(homology-directed repair: HDR)がある。NHEJによる修復は細胞周期を通して起こる応急処置的な反応で、

結合時に末端で数塩基の挿入や欠失を伴う場合があるため遺伝子破壊に利用できる(図1)。一方、主として細胞周期のS/G2期に起きるHR[3]では相同配列との組換えによる修復が起こり、正常遺伝子配列を持つテンプレートDNAを導入してHDRを起こすことにより疾患の原因となっている遺伝子異常の正常化も可能

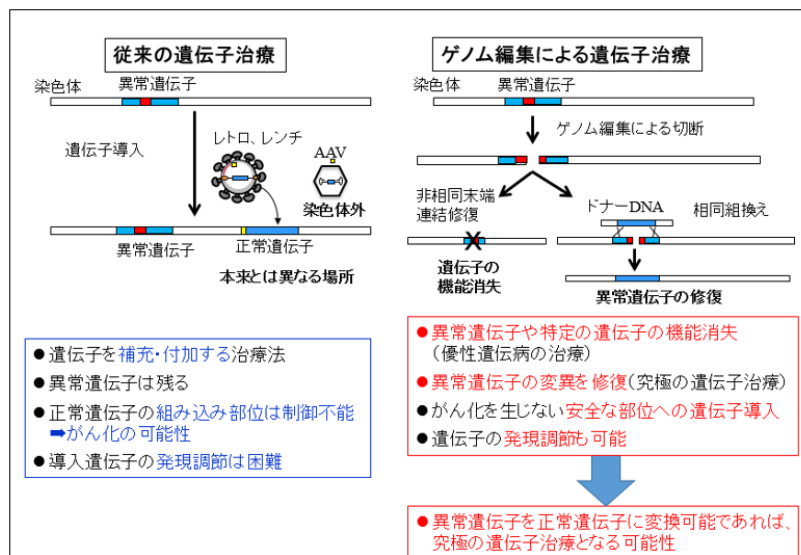


図1 遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い

となる。また、HDRを利用して特定のゲノム部位に目的とする遺伝子を導入・置換するようなゲノム編集も試みられている。

特定の塩基配列特異的にDSBを導入できる人工ヌクレアーゼとして初期に開発されたのがzinc-finger nuclease (ZFN) [4]とtranscription activator-like effector nuclease (TALEN) [1]である。しかしながら、これら人工ヌクレアーゼは特定の塩基配列の認識をタンパク質によって行うため、その作製に高度の技術と時間を要し、莫大な費用もかかる。一方、近年開発されたclustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated proteins (Cas) [2]では、目的遺伝子の塩基配列認識を一本鎖ガイドRNA (single-guide RNA; sgRNA) により行うため、その設計は容易で、費用も安価であることから、汎用性の高い遺伝子改変技術として急速に発展した[5]。事実、海外では感染症やがん、単一遺伝子疾患等を対象にゲノム編集を用いた遺

伝子治療臨床試験が実施されており、数年以内にこれら遺伝子治療用製品等の製造販売承認申請が行われる可能性がある。そして、これを受け、国内においても治験が始まる可能性が高く、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の品質及び安全性に関する考え方を整理しておく必要があると思われる。

本文書は、始めに、現在開発中のゲノム編集技術に特有の課題を提示し、次にその手法とそれを細胞内や体内に導入するための技術（ツール）並びにゲノム編集の目的によって分類し、それぞれの特性を整理すると共に、ゲノム編集技術の特性を踏まえた品質や安全性評価及び臨床における長期フォローアップに関する考慮事項をまとめたものである。なお、ゲノム編集に伴うリスクに対する考え方は対象疾患の種類や重篤度によって異なると考えられ、その臨床応用に関してはリスクベネフィットを考慮した個別の評価が必要になる。さらに、ゲノム編集技術は現在急速に進歩しているため、本考慮事項に関しても、適宜見直しを行うことが必要である。

2. 定義

本文書では、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等を以下のとおり定義する（図2）。

(1) *in vivo*ゲノム編集製品（直接、体内に投与して体内でゲノム編集を行うための製品）

①ゲノム編集遺伝子治療用製品（ゲノム編集に用いる酵素タンパク質（以下、「ゲノム編集酵素」という。）を発

現させるウイルスベクター又はプラスミドベクターを主成分とする製品）

②ゲノム編集 mRNA 製品（ゲノム編集酵素を発現させる mRNA を主成分とする製品）

③ゲノム編集タンパク質製品（ゲノム編集酵素を主成分とする製品（sgRNAを含む場合もある））

(2) *ex vivo*ゲノム編集製品（ゲノム編集ツールにより体外で遺伝子改変した細胞であり、体内に投与するための製品）

①ゲノム編集細胞加工製品（ゲノム編集ツールにより体外で遺伝子改変したヒト細胞加工製品）

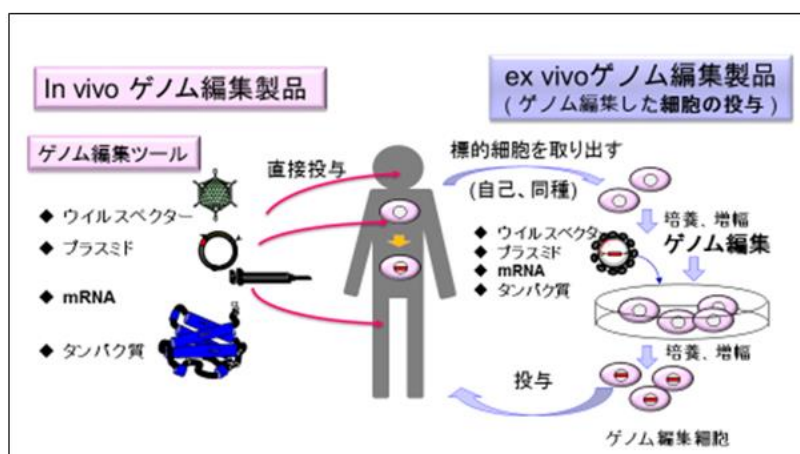


図2 ゲノム編集製品と投与方法

3. ゲノム編集技術特有の課題

(1) 遺伝子改変細胞のがん化等のリスク

ゲノム編集技術は細胞の特定の遺伝子を塩基配列特異的に切断、改変、編集できる技術であるが、同時に類似の塩基配列をもつ目的外の遺伝子の編集リスク、すなわちオフターゲット作用のリスクが存在する。このオフターゲット作用による結果として特に懸念されるのが、細胞のがん化である。オフターゲット作用により、直接がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化が起こる可能性があり、またゲノム編集の遺伝子改変は永続的な効果をもたらすため、その危険性は増大する。

また、DSBを誘導するゲノム編集技術では染色体切断に伴いゲノムが不安定化したり、従来の評価法では検出できない染色体の大規模欠損や切断部位への目的外配列の挿入が起きたりするリスクも報告されていることから、染色体異常によるがん化のリスクについても検討する必要がある。

(2) 生殖細胞における意図しない遺伝子改変リスク

*in vivo*ゲノム編集では、標的細胞以外でのゲノム編集や、目的遺伝子以外の遺伝子改変が生じて、それらを確認したり排除したりすることは困難である。

特に、小児や生殖可能年齢の患者を対象とする *in vivo*ゲノム編集では生殖細胞への影響が懸念され、最近ではゲノム切断に伴う染色体異常等のリスクを避けるために、ゲノム切断を介することなく遺伝子改変を行う新たな技術も開発されているが、次世代への遺伝的な影響を十分に検討する必要がある。

4. ゲノム編集技術の分類とその品質特性に関する課題

(1) ゲノム編集ツールによる分類とその留意事項

1) ZFN[4]、TALEN[1]

ZFNは、特定の3塩基配列を認識する zinc-finger タンパク質モチーフを3~6個有し、目的とする塩基配列に結合するドメインと、DNA切断酵素である *Fok I* nuclease を連結させた人工ヌクレアーゼであり、このDNA結合タンパク質の設計には高度な技術が要求される。一方、ZFNの複雑さを改良したTALENは、植物由来の転写因子であるTALの34アミノ酸からなるモジュールが1塩基を認識することを利用しており、A、G、C、Tの各塩基をそれぞれ認識する4種類のTALモジュールを連結することで目的塩基配列を認識し、特定の塩基配列を切断する。TALENではTALモジュールを15~20結合させることで15~20個の塩基を認識するように設計される場合が多い。

ZFNもTALENも *Fok I* が二本鎖DNAのうち一方のDNA鎖しか切断しないため、目的とする切断部位を挟んで上流と下流の塩基配列を認識する2つの人工酵素を設計する必要がある。1か所のDSBに必要な認識塩基配列は一つの人工酵素が認識する配列の2倍となり、その数は18~40塩基程度となる。このため塩基配列の認識特異性は高く、オフターゲット作用が起こる頻度はCRISPR/Cas9より低いとされている[1]。ZFNやTALENにおけるオフターゲット作用はCRISPR/Cas9ほど報告されていないが、現時点で十分な情報が得られていないことから、慎重

に評価する必要がある。

2) CRISPR/Cas [2]

CRISPR/Cas における特定の塩基配列の認識は、ZFN や TALEN と異なり、標的となる DNA 配列と相補的な sgRNA が担っている。すなわち、sgRNA は染色体 DNA 上の標的となる 20 塩基と相補的に結合するガイド配列と、その標的配列に隣接する PAM (proto-spacer adjacent motif: プロトスペーサー隣接モチーフ) と呼ばれる配列を持つ必要がある。この sgRNA と DNA 二重鎖切断酵素である Cas9 が複合体を形成し、sgRNA が認識する塩基配列を有する遺伝子を切断する。一方、この CRISPR/Cas システムでは、sgRNA が最大 5 個のミスマッチ (A:T または、G:C 以外) があっても結合することが知られ、目的外遺伝子の切断とそれに伴う目的外配列の挿入や欠損が起きるオフターゲット作用の可能性は高くなる [6]。一方、これまでにオフターゲット作用が起こる頻度に関する論文が数多くあるが [7-9]、その評価、特に少数の細胞で起こる低頻度のオフターゲット作用を正確に評価することは難しいとされている。

CRISPR/Cas のオフターゲット作用を低減化するための取組みとして、ガイド RNA の長さや目的とする配列の立体構造等の影響が検討されているが、現時点では十分な技術が確立している状況ではない。したがって、随時刷新される新たな知見をもとに、sgRNA を設計し、オフターゲット作用の頻度を評価する必要がある。

3) ゲノム切断を行わないゲノム編集 [10, 11]

DSB に伴うゲノムの不安定化を低減させるため、ゲノム切断を行わないゲノム編集 (デアミナーゼによる 1 塩基編集) 等の様々なゲノム編集技術が開発されている。このような新規ゲノム編集技術を適用する場合でも、どのような機序においてオフターゲット作用が低減できるのかを、評価法を含め、説明する必要がある。

(2) ゲノム編集ツール及び遺伝子改変した細胞における留意事項 (図 2)

1) ウイルスベクター、プラスミドベクター

ゲノム編集に用いる ZFN や CRISPR/Cas を細胞内に導入するためにアデノウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) 等のウイルスベクターを用いた臨床試験が実施されている [12, 13]。このように、ゲノム編集酵素遺伝子を搭載したウイルスベクターやプラスミドベクター [14] を用いる場合、その品質管理に関しては従来の遺伝子治療用製品と同様の考え方が適用可能であり、ベクター製造に関する品質管理と特性解析並びにセルバンクシステムの構築とその特性解析等は従来の遺伝子治療用製品と同様の評価を適用するべきである。

一方、従来の遺伝子治療用製品では、目的タンパク質の効率的な発現のためにウイルスプロモーターが搭載される場合が多く、このプロモーターががん関連遺伝子近傍に挿入されることでがん化も起こりうることが報告されている [8]。ゲノム編集において ZFN・TALEN・Cas9/sgRNA を発現させるため同様のプロモ-

ターが用いられる場合もあるが、現時点ではプロモーター等の挿入発がんの報告はない。一方で、導入したプラスミドが DSB 部位に組み込まれた例も報告されていることから、ゲノム編集遺伝子治療用製品においても従来の遺伝子治療用製品と同様の非臨床安全性評価が必要と考えられる。また、細胞や組織指向性については、生体内分布を含めた評価が重要である。

ゲノム編集ツールの細胞内への導入法としてウイルスベクターを用いる場合、感染性や細胞指向性の観点から「目的とする細胞での遺伝子改変の程度及び頻度」と「目的としない細胞での遺伝子改変の程度及び頻度」について解析する必要がある。さらに、ゲノム編集酵素の発現が持続するとオフターゲット作用の危険性が増加することも留意すべきである。特に、ウイルスベクターを用いた場合には長期にわたって持続的にゲノム編集酵素が発現する可能性があり、安全性の観点からもゲノム編集酵素の発現持続性を解析しておく必要がある。

2) mRNA

細胞内で Cas、TALEN、ZFN 等のタンパク質を発現するために、これらタンパク質をコードする mRNA の細胞内導入にて行う方法が報告されている [13, 15, 16]。「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬機法）」の上では、mRNA は遺伝子治療用製品の中の「遺伝子発現治療製品」に含まれているが、「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」には mRNA の品質や安全性に関する記載はない。現状としては、ゲノム編集の分野以外でも mRNA を用いた製品が開発されているが、現時点において、国内外でいまだ製造販売承認されたものはなく、今後、mRNA 製品の製法や品質管理についての評価法を明確にしていく必要がある。特に、細胞内での安定性を確保するためにメチル化 Cap 等の天然型にない化学修飾を加えた mRNA を利用する場合には当該修飾に関する安全性評価も必要と考えられることから、mRNA の品質管理や安全性評価について開発初期から規制当局と十分な相談を行うことが求められる。mRNA 製品を化学合成によって製造する場合は核酸医薬品に準じた製品管理の手法が適用できるが、プラスミドや PCR 産物を鋳型として *in vitro* 転写により合成する場合には、追加の製造工程由来の不純物について安全性評価が必要となる。

3) タンパク質、ガイド RNA

ZFN や TALEN によるゲノム編集技術では、人工ヌクレアーゼタンパク質を直接細胞内に導入することで目的の遺伝子改変が可能である [17, 18]。また、CRISPR/Cas では、標的 DNA 配列に相補的な sgRNA と Cas9 タンパク質との複合体 (ribonucleoprotein; RNP) をあらかじめ形成し、細胞に導入する方法も報告されている [19, 20]。このようなゲノム編集タンパク質製品による遺伝子治療は、「細胞内や生体に遺伝子導入する」という従来の遺伝子治療の定義には当てはまらない。しかしながら、遺伝子を導入する遺伝子治療と同様、目的外の遺伝子を改変する危険性やそれに伴う有害事象の発現が懸念されるため、遺伝子を使用する遺伝子治療用製品と同様の安全対策が必要である。したがって、ゲノム編

集タンパク質製品も標的遺伝子の改変を目的として用いられることから、従来の遺伝子治療用技術の視点を踏まえて、同様の品質・安全性評価を行う必要がある。なお、平成 31 年 2 月 28 日付けで改正された「遺伝子治療等臨床研究に関する指針（平成 27 年厚生労働省告示第 344 号）」ではこのようなタンパク質を用いたゲノム編集技術も遺伝子治療等として定義している。

ZFN や TALEN などの人工ヌクレアーゼタンパク質の品質評価については、バイオ医薬品の細胞バンク評価や品質管理に関する ICH ガイドライン（Q5A, Q5B, Q5D, Q6B）が参考となる。また、標的 DNA 配列に相補的な sgRNA の品質評価については、「核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について」（平成 30 年 9 月 27 日付薬生薬審発 0927 第 3 号）が参考となる。さらに細胞内に導入されたゲノム編集酵素について、細胞内での活性の持続性や動態等の評価も必要となる。

4) ゲノム編集ツールを用いて加工したヒト細胞加工製品

ex vivo でゲノム編集した細胞からなるヒト細胞加工製品の場合、その品質に関しては従来の遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品と同様の考え方が適用できる。ベクターを用いる場合には、その製造に関する品質管理と特性解析並びにセルバンクシステムの構築とその特性解析等は従来の製品と同様の評価を適用すべきである。ゲノム編集細胞加工製品の投与に際しても従来型の遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品と同様の非臨床安全性評価が必要と考えられる。

(3) ゲノム編集の目的による分類

1) 遺伝子破壊[21-26]及び相同組換え[7, 27, 28]

遺伝子破壊を目的とする場合は、目的とする細胞での遺伝子破壊の頻度や目的遺伝子改変の不均一性について評価する必要がある。例えば、CRISPR/Cas を用いる場合は、sgRNA の設計の適切性を説明する際に、このような遺伝子改変の効率や不均一性についてどのような検討がなされたかを含める必要がある。相同組換えを目的とする場合も、細胞の DSB 修復機構を利用する反応であるため、その活性が高い ES 細胞等では高効率で組換えが起こる[29]が、細胞によってはその効率が極めて低い場合があることに留意すべきである。また、相同組換えの頻度を評価する必要があり、場合によっては相同組換えが起きた細胞のみを選択し、治療に用いることも想定される。このように遺伝子改変した細胞の選別・純化を行う場合にはその手法の適切性を示す必要がある。

HDR の場合には遺伝子組換え用ドナー DNA を導入する必要があるが、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) のような短い DNA の改変[30] では、切断した配列の上流及び下流の両方に相同な配列を持つ一本鎖 DNA (single-strand DNA: ssDNA) を導入することで相同組換えが可能である。一方、タンパク質をコードする遺伝子全体を HDR で置換する場合は、供与するテンプレート DNA としてプラスミドを用いる場合が多い。この場合は切断部位の上流及び下流にわたって数百塩基の相同配列を持つドナー DNA を導入する必要があるが、その

際にはドナーDNAの設計と相同組換えの効率の評価が重要になる。また、これまでに相同組換え可能なDNA長について、DNA長と組換え効率には相関がないとの報告もあるが、相同組換えの効率についてはゲノム長の影響も含めて評価しておく必要がある。

なお、複数の遺伝子を同時に破壊したり、あるいは相同組換えをより効率的に引き起こすためにDSBを2箇所に入れたりすることも試みられているが、DSBを2箇所以上入れた場合には染色体の転座や欠失等の大きな染色体異常が発現しやすいとされており、特に染色体異常について検討を考慮するべきである[31]。

2) ゲノム切断を伴わない遺伝子改変 (Dead Cas9 やデアミナーゼ等による非切断改変、DNAメチル化・脱メチル化)

ゲノム編集による染色体切断や転座・大規模欠失を防ぐ手法として、DSBを起こさないゲノム編集技術の開発が行われており、標的DNA配列の一方の鎖のみを切断する反応や、デアミナーゼによるC→T変換やA→G変換、さらにはDNAのメチル化等のエピジェネティック変異の導入等が試みられている(図3)。しかしながら、

これらのDSBを起こさないゲノム編集技術についても、その持続性やオフターゲット作用による有害事象の可能性があり、遺伝子治療用製品としての品質や安全性評価が必要と考えられる。この場合、DSBを引き起こすゲノム編集の場合と同様に、細胞ごとにゲノムの改変の効率や特異性が変わり得ること、場合により改変された細胞の選別・純化等も必要になることを前提に品質評価を行う必要がある、さらに各遺伝子改変技術の内容に応じた最適な解析手法を用いて、使用する技術の妥当性を説明しなければならない。

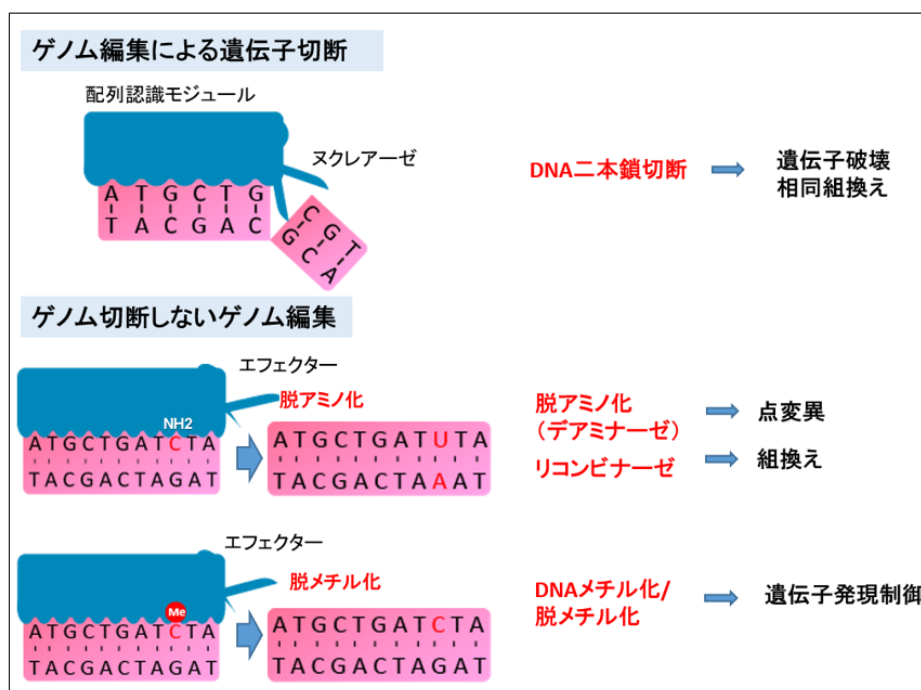


図3 ゲノム編集による遺伝子切断とゲノム切断しないゲノム編集

場合と同様に、細胞ごとにゲノムの改変の効率や特異性が変わり得ること、場合により改変された細胞の選別・純化等も必要になることを前提に品質評価を行う必要がある、さらに各遺伝子改変技術の内容に応じた最適な解析手法を用いて、使用する技術の妥当性を説明しなければならない。

5. 安全性評価の考え方

(1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の共通事項

1) オフターゲット作用

ゲノム編集技術を用いた製品によるオフターゲット作用の特性を把握するために、標的とする遺伝子配列に類似した配列の存在を *in silico* 解析により予測するだけでなく、実験的手法を用いてヒトゲノム全体にわたりオフターゲット候補サイトを解析することが必要である[32-35]。実験的手法でオフターゲット候補サイトを検索する方法としては、ゲノム編集の際、切断部位に合成 DNA のタグを導入し、タグの取込みをゲノム全体にわたって塩基配列解析する方法 (GUIDE-seq) [36] や、細胞から抽出したゲノムを用いてゲノム編集酵素による切断可能部位を探索する DIGENOME-seq[37, 38]、CIRCLE-seq[39]、SITE-seq[40] 等の方法がある。これらの解析では、例えば、がん関連遺伝子[41]の SNV (single nucleotide variant: 一塩基亜型) /Indel (insertion and deletion: 挿入や欠失) やコピー数異常 (copy number variant: CNV) 等の変異を確認すること等が考えられる。*In silico* 解析及び実験的手法により検出されたオフターゲット候補サイトにおいて、実際に切断や欠失が起こっているか否かを確認する手法としては、ゲノム編集を実施した細胞の全ゲノムシーケンス (whole genome sequence: WGS) の確認[33, 35] や、候補サイトを PCR 増幅しディープシーケンスする amplicon sequence 等[42] が想定される。これらの解析では、塩基配列をどの程度深く読むかによって検出感度が左右されるが、次世代シーケンシング技術 (next-generation sequencing: NGS) のエラー頻度のために、0.1% 以下の頻度で起こるオフターゲット作用を検出することは極めて困難である (表 1)。

表 1 オフターゲット作用の検出方法

カテゴリー	方法	例	長所	短所
全ゲノムシー クエンス	Hi-seq など		正確性	高価 低感度
<i>in silico</i>	DNA 配列の相 同性など		容易	不正確
細胞内 (<i>in vitro</i>)	DNA 二本鎖切 断を同定	BLESS, BLISS, GUIDE-seq	実際の細胞内 での二本鎖切 断	一部の細胞腫 でのみ可能
試験管内	酵素反応	Digenome- seq, CIRCLE- seq	高感度 SNP も区別	細胞内反応で はない

CRISPR/Cas のオフターゲット作用を可能な限り低減化するためには、sgRNA の設計が最も重要であり、*in silico* 解析により他のゲノム領域に相同配列の少

ない塩基配列を選ぶことが重要である。しかし、*in silico*解析では全てのオフターゲット候補部位を予測できない可能性もあるため、これに加えて *in vitro*解析を組み合わせたオフターゲット候補部位の検索やオフターゲット作用の生じる頻度とその影響をできるだけ評価しておくことが有用である。ただし *in vitro*解析では、培養中に細胞に自然発生的な遺伝子の変異が起こる可能性があるため、このようなバックグラウンド変異も考えられ、場合によってはバックグラウンド変異を差し引いてゲノム編集操作によって起こる遺伝子の変異を評価する必要もある。

ゲノムの塩基配列にはヒトと動物で種差が存在することから、ゲノム編集におけるオフターゲット作用について動物で評価することは困難と考えられる。このため、特性解析の一環として、ヒト細胞を用いた *in vitro*試験の中でオフターゲット編集の発生頻度やオフターゲット編集が起きた塩基配列を詳細に解析する必要がある。*ex vivo*ゲノム編集の場合、ゲノム編集した製品の特性解析の結果からオフターゲット作用が確認された際には、オフターゲット作用によるがん化のリスク等、当該遺伝子治療自体の安全性にどこまで影響を与えるかを評価し、必要に応じてその遺伝子改変細胞のクローナリティー解析が必要な場合もある。一方、*in vivo*ゲノム編集の場合、多くの変異を持つ株化細胞を用いた *in vitro*解析では有用なデータが得られない可能性もあり、初代細胞を用いた解析を考慮することが望ましい。このためヒトでの *in vivo*ゲノム編集のオフターゲット作用を評価するために iPS 細胞や ES 細胞由来細胞を用いることも有用と考えられる。iPS 細胞や ES 細胞由来細胞は、ヒト初代培養細胞の入手が困難な細胞に対する作用を評価する場合に有用なツールになる可能性が高い。

2) ゲノム欠失・目的外配列の挿入、染色体の転座、逆位

ゲノム編集では DSB の修復過程で数 kb にわたる大きな欠失や遺伝子断片の挿入、逆位が生じることが報告されている [43]。また、ゲノム編集に使用したウイルスベクターのゲノム DNA がその部位に挿入されている例も報告されている [44, 45]。これはゲノム編集による遺伝子改変が、DSB により誘導される細胞のゲノム修復機構に依存しているためで、どのようにゲノムを編集するのかの指向性（修復指向性）が定まっていないことによる [43]。したがって、ゲノム編集により編集された標的遺伝子近傍のゲノム配列の状態を、できるだけ実際の標的に近い細胞・組織を用いて詳細に解析しておく必要がある。先に述べたように、DSB に続いて染色体転座や欠失等を引き起こすリスクが指摘されており、特に、ゲノム上 2 カ所に DSB を導入する場合は有意に染色体転座の危険性が增大することが報告されている [46-48]。そのため、G バンド解析や Q バンド解析、疑似カラーを用いた multicolor fluorescent *in situ* hybridization (mFISH)、さらには比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization : CGH) 等を利用して、染色体異常を解析する必要がある。ただし、これらの解析には一定の限界があることも理解しておく必要がある。例えば、G バンド解析や mFISH ではメタフェーズ（分裂中期）にある細胞しか解析できない。また、G バンド解析は多数の細胞を一度に解析することは困難で、染色体異常を有するご

く少数の細胞集団を検出することは難しい。一方、mFISHは異なる染色体間での転座の検出や染色体の大きな欠失を検出するには適しているが、同じ染色体内での逆位等は検出できない。さらにCGHでは異常な遺伝子の増幅や欠失が多くの細胞に起きている場合には検出可能であるが、細胞ごとに不均一性がある場合や一部の細胞でのみ生じた異常を検出できる感度は有していない。これら解析法の特性を十分考慮した上で、ゲノム編集による染色体異常のリスクを評価する必要がある。

3) ゲノム編集細胞における p53 等のゲノム修復遺伝子の変異リスク

相同組換え修復を利用したゲノム編集により遺伝子改変された細胞でがん抑制遺伝子 p53 の変異が検出され、さらに p53 遺伝子をノックアウトした細胞では HDR の効率が上昇するとの報告がある [49, 50]。これは、p53 変異を持つ方が細胞死の誘導がされにくいことなどがその大きな要因と考えられている。従って、相同組換えによる遺伝子導入では p53 をはじめとするゲノム修復に關与する因子に関する遺伝子変異の有無を確認する必要がある。

4) 標的細胞によるがん化リスクの違い

ゲノム編集におけるオフターゲット作用の影響は、遺伝子そのものを改変するという点において、従来のレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター等の染色体組込み型ベクターによるリスクと同様とも想定される。遺伝子治療開発が始まった当時から、染色体組込み型ベクターのリスクとして、挿入変異による細胞のがん化は最大の懸念として挙げられ、実際、X-SCID (X連鎖重症複合免疫不全症) や WAS (Wiskott-Aldrich 症候群) 等の造血幹細胞を用いた遺伝子治療においてレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入では白血病が発症 [8] したため、これらの遺伝子治療では長期にわたるフォローアップが必須とされている。一方、同じ染色体組込み型ベクターを用いた遺伝子治療であっても、造血幹細胞以外の細胞への遺伝子導入ではがん化は報告されていない。

造血幹細胞遺伝子治療における腫瘍化のメカニズムは、ウイルス由来プロモーター/エンハンサーを持つベクターが染色体上のがん関連遺伝子近傍へ挿入 [51] されたためと考えられており、プロモーターやエンハンサーを用いないゲノム編集では、このような挿入変異による細胞増殖促進が起こることは考えられない。一方、前述のようにゲノム編集では、染色体の転座や欠失等は起こり得るため、染色体転座による Bcr-abl のようながんキメラタンパク質が生じる懸念や、がん抑制遺伝子が破壊されること等がリスクとして考えられる [52]。また相同組換えを目指すゲノム編集では、前述のように p53 のようながん抑制遺伝子に変異が生じた細胞が増加する懸念がある。ゲノム編集における染色体異常やがん抑制遺伝子の破壊等によるがん化リスクについては、現時点で十分に評価されているとは言えないが、遺伝子付加型の従来の遺伝子治療での経験を踏まえると、各細胞種におけるがん化リスクは必ずしも同等と考えるべきではなく、分化した細胞でのリスクは、増殖能を持つ未分化な細胞に比べてより低いと考えられる。逆に、iPS/ES 細胞や造血幹細胞では、造血幹細胞以外の体細胞等

に比べてリスクが高いと想定される。

5) ゲノム編集酵素の免疫原性

Cas タンパク質等のゲノム編集に用いられる DNA 切断酵素は細菌由来タンパク質であり、*ex vivo* 遺伝子治療であっても、ゲノム編集された細胞がゲノム編集酵素を発現する場合には生体内で異種抗原として認識される可能性がある（表 2）。動物試験ではヒトでの免疫原性を予測することは困難であるため、ゲノム編集酵素に対する免疫反応により臨床効果の減弱やアナフィラキシー等の免疫毒性が生じる可能性を考慮して、臨床試験を計画する必要がある。

(2) *in vivo* ゲノム編集

1) 標的遺伝子の改変に関する安全性評価

改変された標的遺伝子の作用について何らかの安全性上の懸念がある場合には、同じ標的遺伝子を改変した動物を用いた POC 試験において、効力又は性能を裏付ける成績等と共に標的遺伝子の改変に関連した体内動態や安全性に関する情報が得られる可能性がある（表 2）。

表 2 ゲノム編集に用いられる DNA 切断酵素の免疫原性

-
- AAV-CRISPR のマウス骨格筋投与後、Cas9 に対する液性及び細胞性免疫応答を解析
(Chew et al., Nature Methods, 2016) [53]
 - ヒト血清を用いて 2 つの Cas9 に対する抗体保有率を解析；65%に抗 spCas9 抗体、79%に抗 SaCas9 抗体、46%に抗 SaCas9 応答性 T 細胞を確認
(Charlesworth et al., BioRxiv, 2018) [54]
 - ヒトが細菌由来の Cas9 に対する抗体をどの程度保有しているのかを血清を対象として ELISA で測定；2.5%に抗 spCas9 抗体、10%に抗 SaCas9 抗体
(Simhadri et al., Mol Ther Methods Clin Dev, 2018) [55]
-

免疫原性の決定因子：ベクターの血清型、投与経路、投与量、プロモーター特異性、宿主等

2) ゲノム編集酵素のターゲティングと改変効率

In vivo ゲノム編集では改変する組織・細胞へのターゲティングが重要 [56] であり、どのようなゲノム編集ツールを用いるにせよ、ゲノム編集酵素の生体内分布の評価を行い、目的とする細胞や組織への分布だけでなく、目的としない部位への分布を評価しておく必要がある。また、ゲノム編集酵素の組織・細胞での持続性についても評価しておく必要がある。特に、生体内分布試験で生殖細胞への

分布が認められた場合には、生殖細胞の遺伝子改変のリスクについて、ICH 見解「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」[57]を参考に非臨床試験での評価が求められる。

また、*in vivo*ゲノム編集では、目的とする細胞や組織でのゲノム編集効率が低いことから十分な効果を発揮しない可能性があり、ゲノム編集効率を高めるための様々な技術開発が行われている。例えば、homology-independent targeted integration (HITI)法は、ゲノムの切断部位と同じ配列をドナーベクターに逆向きに入れることにより、ゲノムとドナーベクターが同時に切断され、*in vivo*でも高い効率でのゲノム編集が可能とされている[58]。これに対応してCRISPR/Casを長期にわたって発現させる目的でAAVを用いてこれらの遺伝子を導入すると、非分裂細胞でも高い効率でゲノム編集が可能であると報告されている[59]。一方、長期にわたってCRISPR/Casが発現し続けるということは標的以外へのオフターゲット作用や他の望ましくない標的部位での遺伝子改変リスクも高くなるという懸念がある。また*in vivo*ゲノム編集では、*ex vivo*ゲノム編集と異なり、目的外のゲノム編集が起きてもそれを排除することが困難であることに留意すべきである。

3) その他

*In vivo*ゲノム編集については、動物を用いた試験を実施してもオフターゲット作用に関する有用な情報が得られる可能性は低いが、*in silico*解析やヒト細胞を用いた*in vitro*解析での検討により、限定的ではあるものの、一定の意義ある情報が得られる可能性がある。したがって、*in vivo*ゲノム編集の開発ではこれらの方法を用いて潜在的なリスクを評価した上で、適用疾患での期待される有用性も踏まえて慎重に臨床開発を進める必要がある。

6. 治験において留意すべき事項（長期フォローアップ等）

ゲノム編集技術は目的とする遺伝子を改変する技術であり、その観点から染色体組込み型ベクターを用いた従来の遺伝子治療用製品と同様のリスク評価を想定した患者の長期フォローアップが必要である。一方、ゲノム編集は遺伝子の特定部位の欠失や遺伝子挿入を目指した技術であるため、オフターゲット作用による安全性上の懸念がなければ、遺伝子組込み部位がランダムな従来の遺伝子治療よりも安全な技術と考えられる。その一方で、ゲノム編集においては相同組換えによりp53等のゲノム修復遺伝子の変異リスクが高まることや、DSBによる染色体転座のリスクが指摘されていることから、これらに起因する有害事象を確認するフォローアップ期間を設定する必要がある[60] (FDA LTF guideline)。

なお、どの程度の期間フォローアップが必要とされるかは、使用するゲノム編集技術（例えば、タンパク質等を直接導入することによる改変やウイルスベクターを用いた導入・改変等の違い）、ターゲットとなる細胞種、標的とする遺伝子等によって異なると考えられる。従来の遺伝子治療用製品での経験も踏まえると、特に造血幹細胞を対象としたゲノム編集では有害事象の発現リスクが高い[30]と想定され、定期検査を含めた長期フォローアップ計画を設定することが

望ましい。

また、*in vivo*ゲノム編集では目的外の組織・細胞、特に生殖細胞に導入されるリスクを十分に考慮する必要があり、特に、生殖細胞において遺伝子改変の可能性がある場合には、次世代への影響を回避するために、適切な避妊期間を設定する等の対応をとる必要がある。その際には、遺伝毒性を持つ抗悪性腫瘍薬でのリスク管理の手法も参考にできるであろう[61] (FDA Guidance for Industry)。また生殖細胞や受精卵の遺伝子に変異がないことを調べることは困難であることから、その影響については慎重な長期フォローアップが必要である。

7. おわりに

本文書は現時点で日本の遺伝子治療研究やゲノム編集の専門家の議論を結集し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の開発において道標となるべく作成された成果物である。それらを開発している企業や研究者、また、それらの審査を行う審査官にも参考にさせていただくことを期待する。しかしながら、ゲノム編集技術の開発は、日々、急速に進歩しており、同時に、その適用範囲も拡大し、様々な評価技術の開発も進んでいる。最近ではRNAゲノム編集技術も展開しており、このような新たな製品に対しても本文書に示した考え方は適用可能な部分もあると思われるが、その開発動向に合わせ考え方を適宜見直していくことが必要であると考えられる。

1. Bogdanove, A.J. and D.F. Voytas, TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011. 333(6051): p. 1843–6.
2. Mali, P., et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013. 339(6121): p. 823–6.
3. Szostak, J.W., et al., The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 1983. 33(1): p. 25–35.
4. Carroll, D., Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011. 188(4): p. 773–82.
5. You, L., et al., Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019. 13: p. 359–370.
6. Fu, Y., et al., High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(9): p. 822–6.
7. Li, J.F., et al., Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(8): p. 688–91.
8. Yang, L., et al., Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(19): p. 9049–61.
9. Wang, T., et al., Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014. 343(6166): p. 80–4.
10. Chen, F., et al., Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat Commun*, 2017. 8: p. 14958.
11. Lei, Y., Y.H. Huang, and M.A. Goodell, DNA methylation and de-methylation using hybrid site-targeting proteins. *Genome Biol*, 2018. 19(1): p. 187.
12. Epstein, B.E. and D.V. Schaffer, Combining Engineered Nucleases with Adeno-associated Viral Vectors for Therapeutic Gene Editing. *Adv Exp Med Biol*, 2017. 1016: p. 29–42.
13. Hoban, M.D., et al., Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2015. 125(17): p. 2597–604.
14. Kim, H.J., et al., Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res*, 2009. 19(7): p. 1279–88.
15. Mock, U., et al., mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(11): p. 5560–71.
16. Hoban, M.D., et al., CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the Sickle Mutation in Human CD34+ cells. *Mol Ther*, 2016. 24(9): p. 1561–9.
17. Gaj, T., et al., Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat Methods*, 2012. 9(8): p. 805–7.
18. Liu, J., et al., Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e85755.
19. Gomes-Silva, D., et al., CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood*, 2017. 130(3): p. 285–296.
20. Zuris, J.A., et al., Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*,

2015. 33(1): p. 73–80.
21. Bauer, D.E., et al., An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*, 2013. 342(6155): p. 253–7.
 22. Canver, M.C., et al., BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature*, 2015. 527(7577): p. 192–7.
 23. Lee, H.J., E. Kim, and J.S. Kim, Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2010. 20(1): p. 81–9.
 24. Gupta, A., et al., Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome Res*, 2013. 23(6): p. 1008–17.
 25. Xiao, A., et al., Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(14): p. e141.
 26. Canver, M.C., et al., Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2014. 289(31): p. 21312–24.
 27. Cox, D.B., R.J. Platt, and F. Zhang, Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015. 21(2): p. 121–31.
 28. Carroll, D., Genome editing: progress and challenges for medical applications. *Genome Med*, 2016. 8(1): p. 120.
 29. Oji, A., et al., CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 31666.
 30. Booth, C., H.B. Gaspar, and A.J. Thrasher, Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. *Trends Mol Med*, 2016. 22(4): p. 317–327.
 31. Abe, S., et al., Modification of single-nucleotide polymorphism in a fully humanized CYP3A mouse by genome editing technology. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 15189.
 32. Smith, C., et al., Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014. 15(1): p. 12–3.
 33. Veres, A., et al., Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 2014. 15(1): p. 27–30.
 34. Hendel, A., et al., Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*, 2015. 33(9): p. 985–989.
 35. Suzuki, K., et al., Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014. 15(1): p. 31–6.
 36. Tsai, S.Q., et al., GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015. 33(2): p. 187–197.
 37. Kim, D., et al., Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res*, 2016. 26(3): p. 406–15.
 38. Kim, D., et al., Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*, 2015. 12(3): p. 237–43, 1 p following 243.
 39. Tsai, S.Q., et al., CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for

- genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods*, 2017. 14(6): p. 607-614.
40. Cameron, P., et al., Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage. *Nat Methods*, 2017. 14(6): p. 600-606.
 41. Sondka, Z., et al., The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2018. 18(11): p. 696-705.
 42. Zischewski, J., R. Fischer, and L. Bortesi, Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv*, 2017. 35(1): p. 95-104.
 43. Kosicki, M., K. Tomberg, and A. Bradley, Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 2018. 36(8): p. 765-771.
 44. Ono, R., et al., Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 12281.
 45. Hanlon, K.S., et al., High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 4439.
 46. Torres, R., et al., Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 3964.
 47. Chen, X., et al., Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2015. 201(4): p. 1295-306.
 48. Ferguson, D.O. and F.W. Alt, DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene*, 2001. 20(40): p. 5572-9.
 49. Ihry, R.J., et al., p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2018. 24(7): p. 939-946.
 50. Haapaniemi, E., et al., CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018. 24(7): p. 927-930.
 51. Hacein-Bey-Abina, S., et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003. 302(5644): p. 415-9.
 52. Breese, E.H., et al., Use of Genome Engineering to Create Patient Specific MLL Translocations in Primary Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *PLoS One*, 2015. 10(9): p. e0136644.
 53. Chew, W.L., et al., A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods*, 2016. 13(10): p. 868-74.
 54. Carsten T, C., et al., Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. *bioRxiv*, 2018.
 55. Simhadri, V.L., et al., Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018. 10: p. 105-112.
 56. Hannah A. Grunwald, V.M.G., Gunnar Poplawski, Xiang-ru S. Xu, Ethan Bier, Kimberly L. Cooper, Super-Mendelian inheritance mediated by

- CRISPR/Cas9 in the female mouse germline. bioRxiv, 2018.
57. 平成 27 年 6 月 23 日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課 厚生労働省医薬食品局医療機器・再生医療等製品担当参事官室 事務連絡「ICH 見解 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方について」<https://www.pmda.go.jp/files/000206061.pdf>.
 58. Suzuki, K., et al., In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016. 540(7631): p. 144-149.
 59. Yin, H., et al., Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat Biotechnol*, 2017. 35(12): p. 1179-1187.
 60. FDA Guidelines, Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products. 2018.
 61. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Oncology Pharmaceuticals: Reproductive Toxicity Testing and Labeling Recommendations Guidance for Industry. 2019.

ゲノム編集専門部会 委員名簿

- うちだ えりに
内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長
- おかだ たかし
岡田 尚巳 東京大学 医科学研究所 遺伝子・細胞治療センター 分子遺伝医学分野 教授
- おざわ けいや
小澤 敬也 自治医科大学 名誉教授／客員教授
- おのであ まさみ
小野寺 雅史 国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
- くめ あきひろ
久米 晃啓 自治医科大学 臨床研究支援センター 教授
- しまだ たかし
島田 隆 日本医科大学 名誉教授
- たかはし きとる
高橋 智 筑波大学 医学医療系 教授・トランスポーター医学研究センター長
- たに けんざぶろう
谷 憲三朗 東京大学 医科学研究所 特任教授／九州大学名誉教授
- なす やすとも
那須 保友 岡山大学 理事（研究担当）・副学長／医歯薬学総合研究科 教授
- ましもと し
真下 知士 東京大学 医科学研究所 実験動物研究施設 施設長／先進動物ゲノム分野・ゲノム編集研究分野 教授
- みずぐち ひろゆき
水口 裕之 大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野 教授
- みたに こうのすけ
三谷 幸之介 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長・教授
- ◎ やまぐち てるひで
山口 照英 日本薬科大学 薬学部 客員教授

◎部会長、○副部会長
(五十音順)