

「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ついて(案)」の概要

ゲノム編集専門部会

ゲノム編集専門部会 委員名簿

- 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
- 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
- 小澤 敬也 自治医科大学 名誉教授／客員教授
- 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
- 久米 晃啓 自治医科大学 臨床研究支援センター 教授
- 島田 隆 日本医科大学 名誉教授
- 高橋 智 筑波大学 医学医療系 教授・トランスボーダー医学研究センター長
- 谷 憲三郎 東京大学 医科学研究所 特任教授／九州大学名誉教授
- 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
- 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
- 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
- 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
- ◎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)

検討経過

会議の開催	主な議題
第1回専門部会 (11月8日)	<ul style="list-style-type: none">● 検討方針とスケジュール● 最新技術、安全性
第2回専門部会 (12月25日)	<ul style="list-style-type: none">● 安全性・海外の規制状況
WG (1月29日)	<ul style="list-style-type: none">● 報告書イメージ
第3回専門部会 (2月26日)	<ul style="list-style-type: none">● 切らないゲノム編集
WG (3月12日、4月15日)	<ul style="list-style-type: none">● 報告書案
第4回専門部会 (5月27日)	<ul style="list-style-type: none">● オフターゲット変異リスク
WG (6月17日、7月18日、9月10日)	<ul style="list-style-type: none">● 報告書案
第5回専門部会 (10月29日)	<ul style="list-style-type: none">● 報告書案

本専門部会の目的

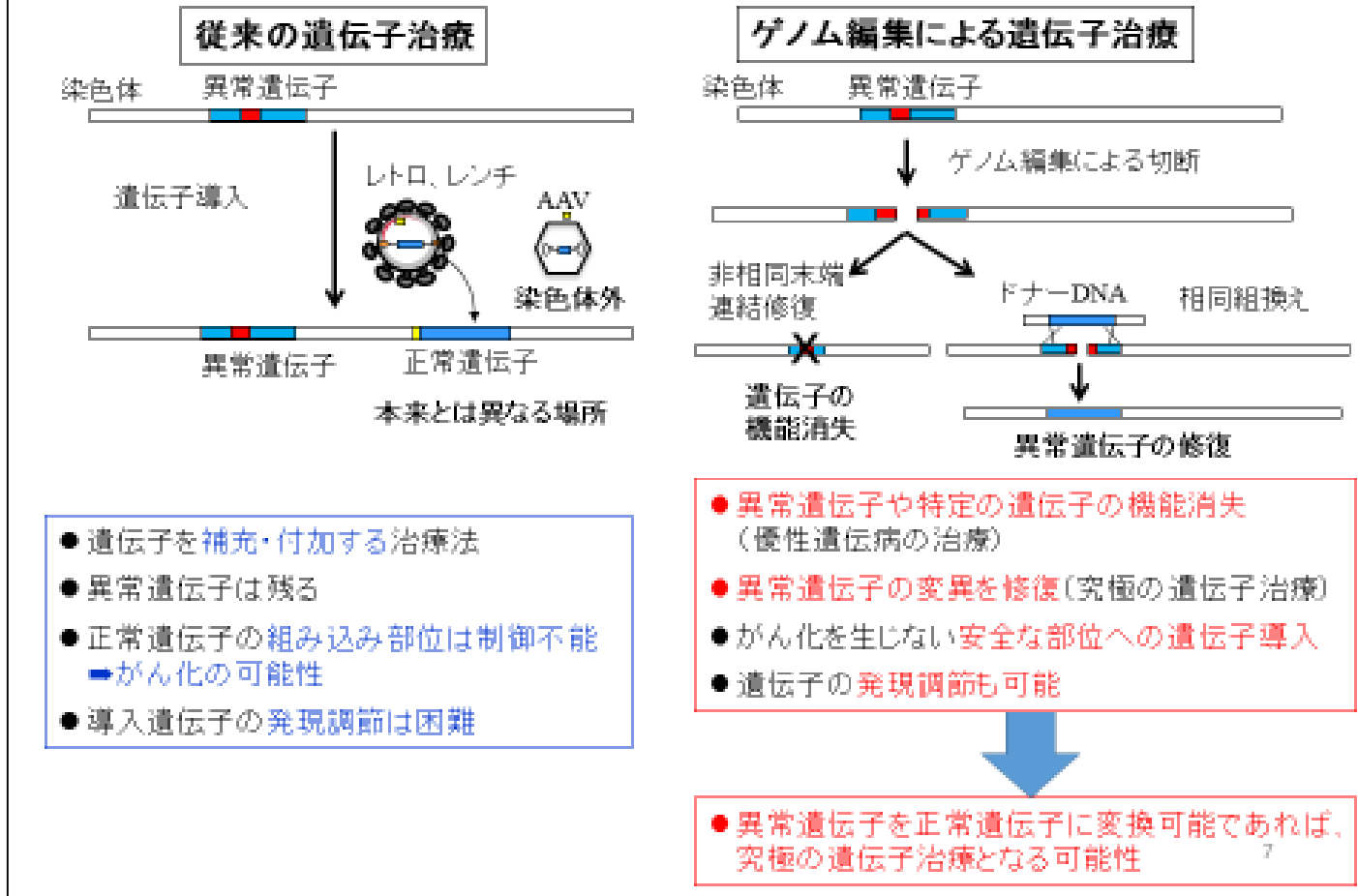
今後の承認審査や治験相談に活用するため、現状のゲノム編集技術について俯瞰し、それを応用して製造される遺伝子治療用製品の全体像及び包含するリスクを整理した上で、品質及び安全性等の評価、さらに臨床における長期のフォローアップに関する考慮事項について科学的観点からとりまとめる。

報告書構成

1. 序論
2. 定義
3. ゲノム編集技術特有の課題
4. ゲノム編集技術の分類とその品質特性に関する課題
5. 安全性評価の考え方
6. 治験において留意すべき事項（長期フォローアップ等）
7. おわりに

1. 序論

遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い



- ゲノム編集は、DNAの特定の部位への二重鎖切断(DSB)の導入と細胞のもつ修復機構を利用し、特定の遺伝子の特異的に切断、改変、編集する画期的な技術である。

- 海外では臨床試験が実施され、今後、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、ゲノム編集技術に特有の課題を提示し、次にその手法と細胞内・体内導入技術（ツール）、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。
- 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。

2. 定義

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品

(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

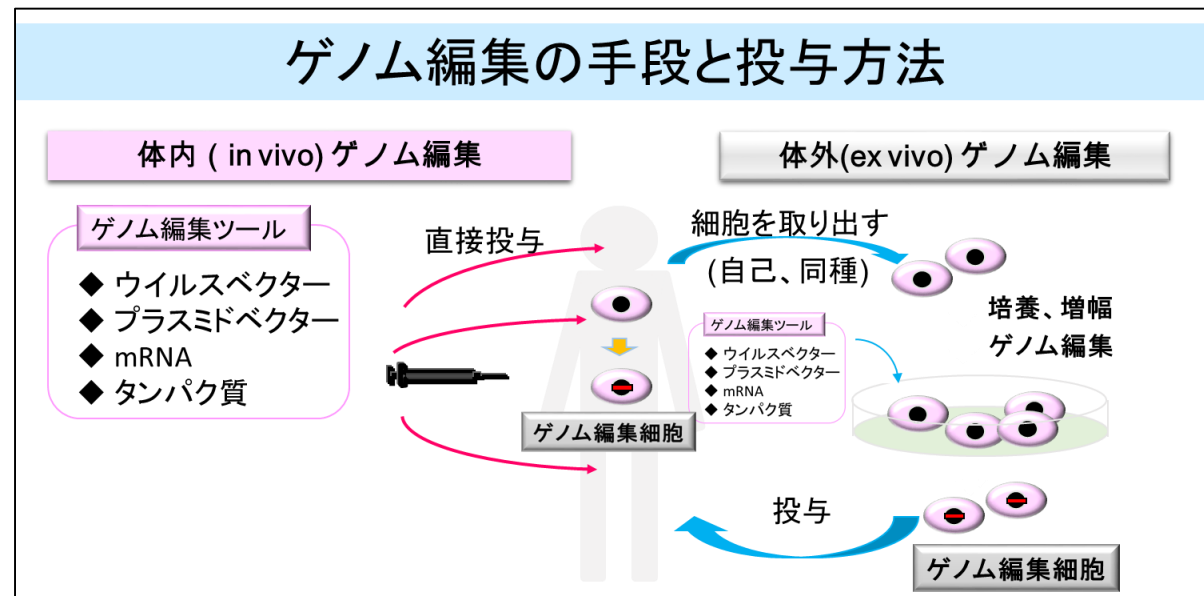
: ゲノム編集酵素を主成分とする製品 (sgRNAを含む場合もある)

(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



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リスク

- 編集目的の遺伝子と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結果として特に懸念されるのが、細胞のがん化である。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。
- DSBの誘導により、染色体切断に伴うゲノムの不安定化や、従来の評価法では検出できない染色体の大規模欠損、切断部位への目的外配列の挿入の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も、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、次世代への遺伝的な影響を十分に検討する必要がある。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は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 (zinc-finger nuclease)

TALEN (transcription activator-like effector nuclease)

- ZFN、TALENともに、1か所の二重鎖切断に必要な認識塩基配列数は18～40塩基程度となる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。
- 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。

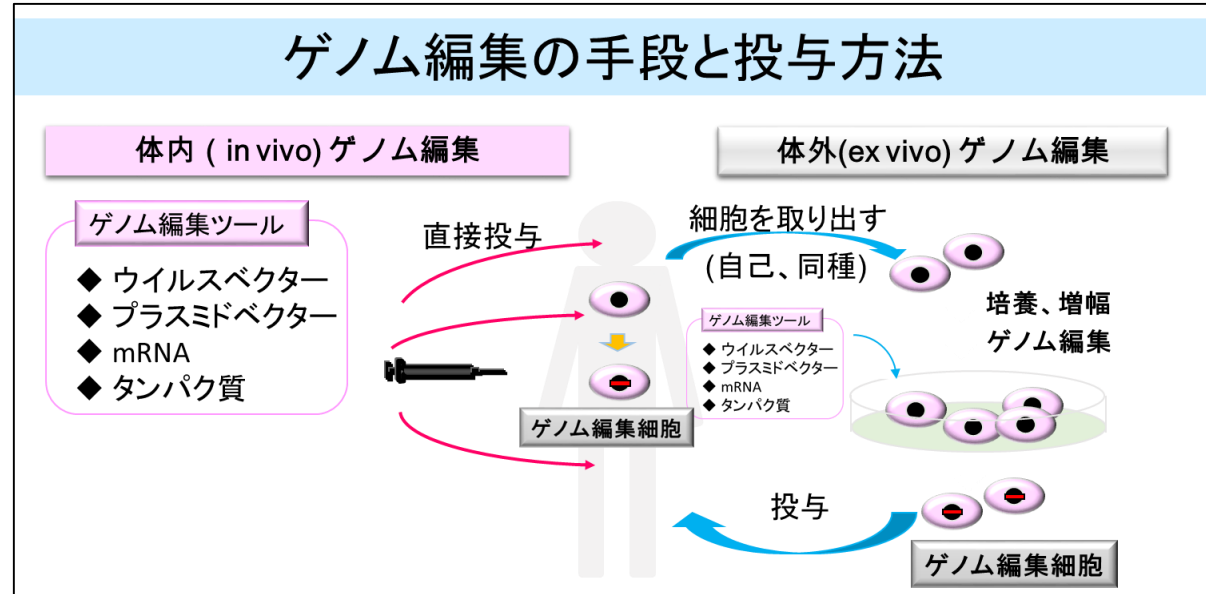
2) CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) / Cas (CRISPR associated proteins)

- CRISPR/Casは、標的となるDNA配列と相補的なsgRNAと、DNA二重鎖切断酵素であるCas9の複合体である。
- sgRNAは最大5個のミスマッチがあっても結合し、オフターゲット作用の可能性が高くなる。一方、オフターゲット作用の頻度に関する論文が数多くあるが、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の正確な評価は難しいとされている。
- オフターゲット作用の低減化のための技術は十分に確立していないため、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

- 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



1) ウイルスベクター、 プラスミドベクター

- ゲノム編集酵素遺伝子搭載ベクターを用いる場合、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特性解析、非臨床安全性等について、従来の遺伝子治療用製品と同様の評価が必要である。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。
- 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及び目的外の細胞での遺伝子改変の程度及び頻度についての解析、安全性の観点からゲノム編集酵素の発現持続性の解析をしておく必要がある。

2) mRNA

- Cas、TALEN、ZFN等のタンパク質発現を、mRNAの細胞内導入により行う方法が報告されている。mRNAは薬機法の「遺伝子発現治療製品」に含まれるが、「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。
- 現時点において、国内外で製造販売承認されたmRNA製品はなく、今後、製法や品質管理の評価法の明確化が必要である。特にメチル化Cap等の化学修飾を加える場合には、品質管理や安全性評価について規制当局との十分な相談が求められる。
- mRNA製品の製造方法が、化学合成の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、*in vitro*転写の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

- ゲノム編集タンパク質製品においても、目的外の遺伝子改変の危険性が懸念されるため、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。
- ZFNやTALENなど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ガイドラインが参考となる。
- 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」が参考となる。さらに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

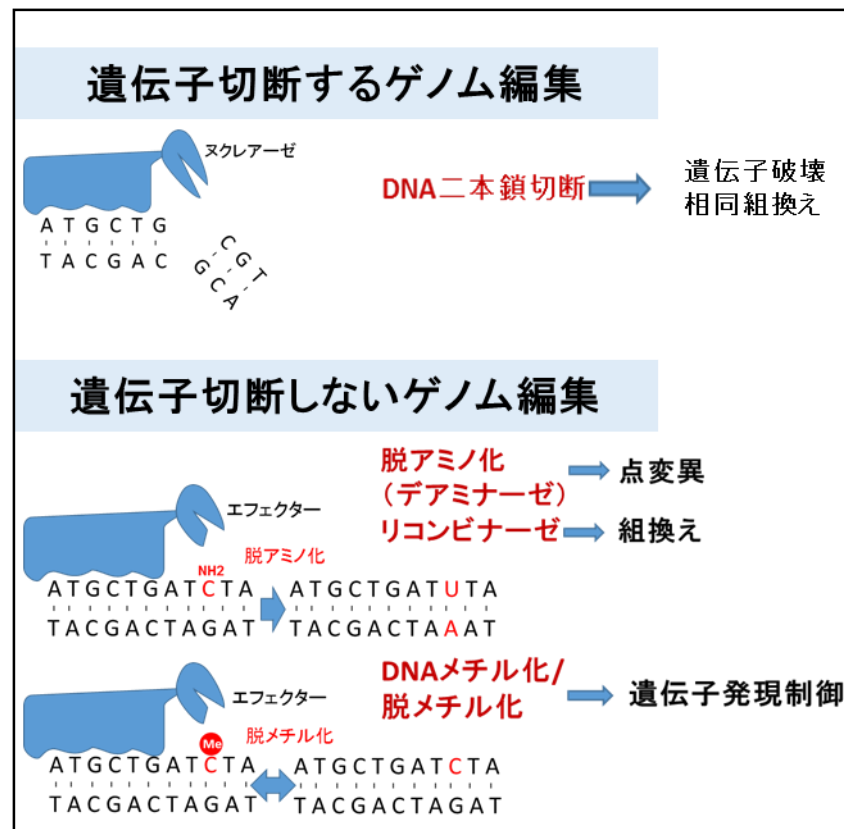
- ゲノム編集細胞加工製品の品質に関しては、従来の遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品と同様の考え方が適用できる。ベクターを用いる場合には、その製造に関する品質管理と特性解析並びにセルバンクシステムの構築とその特性解析等は従来の製品と同様の評価を適用するべきである。
- ゲノム編集細胞加工製品の投与に際しても従来型の遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品と同様の非臨床安全性評価が必要と考えられる。

(3) ゲノム編集の目的による分類

1) 遺伝子破壊及び相同組換え

- 遺伝子破壊 (KO) の場合は、目的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の評価が必要である。
- HDR の場合も、用いる細胞によって効率が極めて低い場合があることに留意し、組換えの頻度の評価が必要である。遺伝子改変した細胞の選別・純化を行う場合には手法の適切性を示す必要がある。組換え効率についてゲノム長の影響も含めて評価しておく必要がある。

- 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。



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(base-editing)、DNAメチル化・脱メチル化)

- 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をふまえ、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。
- DSBを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り、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 の共通事項

1) オフターゲット作用

カテゴリー	方法	例	長所	短所
全ゲノムシーケンス	Hi-seq など		正確?	高価 低感度
コンピューター予測	DNA配列の 相同性など		容易	不正確
細胞内	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	一部の細胞種でのみ 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

- *In silico*解析に加え、GUIDE-seq、DIGENOME-seq、CIRCLE-seq、SITE-seq等の実験的手法を用いたヒトゲノム全体のオフターゲット候補サイトの解析が必要である。そこでの実際の切断や欠失の有無の確認手法として、ゲノム編集を実施した細胞の全ゲノムシーケンス(WGS)の確認や、amplicon sequence等が想定されるが、次世代シーケンシング技術(next-generation sequencing : NGS)のエラーの頻度のために、0.1%以下の頻度で起こるオフターゲット作用の検出は極めて困難である。

1) オフターゲット作用(続き)

- CRISPR/Casのオフターゲット作用の低減化には、*in silico*解析によるsgRNAの設計に加え、*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頻度・影響の評価が有用である。
- ゲノム配列の種差のため動物での評価は困難。ヒト細胞を用いた*in vitro*特性解析の一環として、オフターゲット編集の発生頻度やそこでの配列の詳細な解析が必要である。
- *ex vivo*ゲノム編集の場合、特性解析結果から、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への影響を評価し、必要に応じて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。
- *in vivo*ゲノム編集の場合、株化細胞ではなく初代細胞を用いた*in vitro*解析を考慮することが望ましく、iPS細胞やES細胞由来細胞の利用も有用と考えられる。

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の修復過程での欠失や遺伝子断片の挿入、逆位の発生、また、使用したウイルスベクターのゲノムDNAの挿入(オンターゲット変異)も報告されているため、標的遺伝子近傍のゲノム配列の状態を詳細に解析しておく必要がある。
- Gバンド解析やQバンド解析、疑似カラーを用いたmFISH、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)等の解析法について限界と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。
- 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関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
- 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。
- 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

人工制限酵素の免疫原性

- 65%に抗spCas9抗体、79%に抗SaCas9抗体、46%に抗SaCas9 T細胞 (Charlesworth et al., *BioRxiv*, 2018)
- 2.5%に抗spCas9抗体、10%に抗SaCas9抗体 (ELISA) (Simhadri et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018)
- AAV-CRISPRのマウス骨格筋投与後、Cas9に対する液性・細胞性免疫応答 (Chew et al., *Nature Methods*, 2016)
- 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、etc.

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。

- 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。

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、ゲノム編集酵素の生体内分布及び組織・細胞での持続性を評価する必要がある。
- 特に、生殖細胞への分布が認められた場合には、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」を参考に非臨床試験での評価が求められる。
- *In vivo*ゲノム編集では、HITI法、AAV等の編集効率を高める技術は、作用持続によるリスク増加の懸念や、目的外のゲノム編集が起きても排除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、ゲノム配列が異なる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
- *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
- *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)

- ゲノム編集では、従来の遺伝子治療用製品と同様のリスク、相同組換えによるp53等のゲノム修復遺伝子の変異リスクや、DSBによる染色体転座のリスクを評価する長期フォローアップが必要である。
- 必要なフォローアップ期間は、使用するゲノム編集技術、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。特に造血幹細胞が対象の場合、有害事象の発現リスクが高いと想定され、定期検査を含めた長期フォローアップ計画の設定が望ましい。
- *in vivo*ゲノム編集では目的外の組織・細胞への導入リスクを考慮し、特に、生殖細胞において遺伝子改変の可能性がある場合、適切な避妊期間を設定する等の対応が必要である。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(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、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し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て考え方を適宜見直していくことが必要であると考えます。