

第3回ゲノム編集専門部会

日時 平成31年2月26日(火)

14:00~16:00

場所 PMDA会議室21~24(14階)

<開会>

○山口部会長 定刻となりましたので、「第3回ゲノム編集専門部会」を開催させていただきたいと思っております。本日はお忙しい中、御出席いただきましてありがとうございます。

まず、事務局から委員の出席状況と資料の確認をお願いいたします。

<出席状況確認及び配付資料確認>

○事務局(下川) 委員の出席状況を申し上げます。専門部会 13名の委員のうち、本日は12名に御出席いただいております。また、親委員会から今泉委員に御出席いただいております。また、本日は有識者として御講演いただくため、東京大学大学院理学系研究科の濡木理先生にお越しいただくことになっておりますが、急な事情により少し遅れていらっしゃるという御連絡をいただいております。

次に配布資料の確認をさせていただきます。座席表、議事次第、資料取扱区分表のほかに資料1。資料2は枝番号として資料2-1と資料2-2の2つに分かれております。それから資料3。資料4と資料5はA3の横長の資料になっております。資料5までで全てとなっております。資料に不足がありましたら事務局までお願いいたします。

次に資料取扱区分表を御覧ください。資料は内容に応じ、取扱いとして厳重管理・取扱注意・その他に分類しておりますけれども、本日の配布資料は資料1、資料2-2、資料3は取扱注意のため厳重に保管し、コピー等の複製、第三者への開示は御遠慮くださいますようお願いいたします。それ以外は全てその他に該当しておりますので、委員各自で適切に保管・管理・廃棄をお願いいたします。事務局からは以上です。

<第1回WGについて>

○山口部会長 ありがとうございます。まだ濡木先生が遅れられているようですので、先に第1回WG、いわゆるコンセプトペーパーを作るためのエディティングのメンバーとして、12月25日の第2回専門部会で承認いただきましたWGの概要報告をさせていただきたいと思っております。途中、もし濡木先生がお越しになられましたらその時点から講演いただき、WGのディスカッションは、できれば濡木先生の講演の後にさせていただきたいと思っております。

専門部会でWGのメンバーを御了承いただきましたが、今申しましたように1月29日に第1回のWGを開催いたしました。関連する資料としては資料2-1、資料2-2を御覧ください。資料2-1はワーディングのためのメ

ンバーでございます。私とともに副部会長の小澤敬也先生、内田先生、小野寺先生、久米先生、島田先生に入らせていただいております。資料 2-1 がそういうメンバーで議論をしているというところで、資料 2-1 に関しましては 1 月 29 日に報告書のイメージを示すような図を示した上でブレインストーミングを行いました。議論された内容を基に後日、私のほうから報告書のイメージを示す文書を修正して WG に配布して修正案を作成、最終的にはワーディングのためのコンセプトペーパーの素案といいますか、素案までなかなかならないと思いますけれども、それを作るということにしました。

関連する資料としましては、実際にコンセプトペーパーが最終的に作り上がったときには報告書とともに外部、要するに論文とか、そういう形で報告をさせていただきたいと思っております。この報告書そのものは PMDA のホームページに掲載されますけれども、それ以外にどこに投稿するかはまだ決めておりませんが、専門的な学術誌にこの議論の経緯を踏まえた形で、できたら海外の FDA や EMA の考え方と比較するような形で報告書を作成することを考えております。

そのことに関連しまして、実際に NIH の ClinicalTrials.gov に掲載されているような、ゲノム編集を用いた Clinical Trials の内容、それともう一つは今申しましたように論文化するというのも踏まえ、論文を作成するときの参考文献を整備するという形での資料整備を行っております。その辺がまず第 1 回の WG で議論したことになります。

資料 2-2 は実際に WG で議論しました内容です。資料 3 がその後に来るのですが、これは議論を紹介するよりも資料 3 を紹介するほうが本当はいいのかなと考えております。

(濡木氏到着)

<ゲノム編集に関するご講演と意見交換：切るゲノム編集と切らないゲノム編集

(東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 濡木 理教授)>

○山口部会長　それでは、コンセプトペーパーの議論やどのような内容かを紹介するのは後のほうにさせていただきます。濡木先生が御到着されましたので、濡木先生の御講演のほうを先にさせていただければと思います。

御準備ができるまで、折角ですので資料 2-2 のほうを少しだけ概略を説明させていただきます。大きく 3 つぐらいに分けて議論しております。1 つは品質特性に関して、使っている技術に関する分類とそれぞれの特徴を解析すること、2 つ目は非臨床について、御存じのようにオフターゲット

トとか、そういうものを含めて、非臨床についてのコンセプトペーパーについての議論を行いました。もう1つは、治験に入るときにどのようなコンサーンがあるのか、治験の間にどういうことに注意すべきかとか、そういうことについても議論を行いました。特に長期フォローアップとか germline インテグレーション、germline への挿入変異とか、そういう問題についても議論を行っております。そのほかにいくつか、ゲノム編集特有のリスクについても議論を行っております。

最初に濡木先生の御紹介だけさせていただきます。先ほど事務局から紹介がありました東京大学大学院理学系研究科の濡木先生です。濡木先生は御存じのように、御高名なタンパク質構造解析の大家でございます。タンパク質構造解析の成果から来る CRISPR 酵素を改良して、ゲノムを切らない編集技術というものを開発したり、あるいは酵素を小さくすることによっていろいろなところでターゲティングするような技術を開発されております。こういう技術について御紹介いただくことによって、ゲノムを切らない編集技術についてどのようにコンセプトペーパーに取り込むかという議論の参考にさせていただければと考えております。よろしく願いいたします。

○濡木氏

よろしく願います。昨日まで、カナダのキーストンシンポジウムでゲノム編集の関係がありまして、色々と遅くなって申し訳ありません。

今日は切るゲノム編集と切らないゲノム編集にフォーカスしてお話させていただきたいと思います。皆さん御専門だと思いますので、イントロダクションのほうは省かせていただきましてお話いたします。Cas9、皆さん御存じのように2つのノンコーディング RNA、CRISPR RNA、トレーサー RNA を使ってゲノムを、二重螺旋ですが、これをほどいて1本鎖の部分で RuvC、あるいは HNH というヌクレアーゼのドメインが切断することによって2本鎖切断を起こすという酵素であります。

2つのガイド RNA はテトラループという人工的な4塩基でつなげてしまってシングルガイド RNA にしても同じように働くということが Jennifer A. Doudna、Emmanuelle Charpentier によって示されています。

これを使いますと遺伝子治療ができるわけで、核の中にあります染色体をほどいていきますとヌクレオソーム構造から二重螺旋構造になりますが、こういうところ、例えば GG という、ちょっと言い忘れましたが PAM 配列というものが、PAM 配列がありますとこれをきっかけにして、ガイド RNA が Cas9 をこの部分に連れてきます。そしてここに切断を入れます。Cas9 がやるのはここまででありまして、この後は細胞が自発的に修復を起こすと。その修復には2通りあります。単に切れた DNA をつなげる

という、ノンホモロガスエンドジョイニング、これによりますと切れた DNA というのは非常に末端が不安定ですから、デリーションが起きたりインサーションが入ったりとかしまして、ここに遺伝子がありますれば、そこはフレームシフトが起きて遺伝子がノックアウトされてしまう。

もう1つは、ホモロガスリコンビネーションで、よく似た配列が両端にありますと、ここがインテグレーションしてノックインが起こる。大体こっちが99%、こちらが1%ぐらいしか起きない現象ですが、こういったようにしてゲノム編集が起きるわけであります。

このゲノム編集で日本は出遅れていると一昨年、日経新聞に書かれています。なぜかと言いますと、基本特許が UC バークレーの Jennifer A. Doudna、それから MIT のブロード研究所の Feng Zhang、Emmanuelle Charpentier によって握られている。その特許紛争はまだ続いている。だけど欧米の企業、特にボストンなどですと、毎週1つずつぐらい新しいベンチャーが立ち上がって、どんどん基礎研究から医療開発までやっているわけです。

ですので、日本の大手企業も政府もこの基本特許を非常に危惧しており、参入を躊躇している。ただ、我々はベンチャーを立ち上げ、エディージョンというのですが、その CEO の森田さんは、基本特許だけで事業に終止符を打てるわけではないというように言っております。なぜかと言いますと、この Cas9 はまだまだ未熟である。それからデリバリーの問題、例えば運搬が肝臓や脳神経には比較的ターゲティングできるのですが、ほかの所には難しい。あるいは、先ほど申し上げましたようにノックインというのは非常に効率が悪い。こういった問題がまだまだたくさんあって医療応用、産業応用は難しいわけです。

そんな中、私はこの Feng Zhang と 2009 年以來の共同研究者であり、その前はチャネルロドプシンと言いまして、光が当たると神経細胞を活性化するようなニューロサイエンスのツールの構造解析をしました。

2012 年、彼が独立しましてゲノム編集、CRISPR をやろうということで共同研究を持ち掛け、私の准教授の西増君が主にこれを率いてくれました。この白いのが Cas9 ですがけれども、黄色いのがゲノムのターゲット DNA です。赤いのがガイド RNA、Cas9 をゲノムに案内する RNA です。この複合体を 2014 年、初めて世に発表しました。その構造というのは、大きく分けると2つのローブと申しますか、固まりからできておりまして、上の固まりは DNA あるいは RNA を認識するレコグニションローブ (REC ローブ) と言います。下の固まりはここに HNH というヌクレアーゼドメイン、ここに RuvC というヌクレアーゼドメインがありまして、ヌクレアーゼのロー

ブである NUC ロープであることになります。このところにある黄色いのは PAM インタラクティブドメインと言いまして、実は PAM は RNA とくっつく相補鎖ではなくて、非相補鎖の DNA に乗っているとされていましたので、この辺りに PAM がある、それを認識しているドメインであることが分かりました。

詳細な構造は半年後、チューリッヒ大学の Martin Jinek が『NATURE』に発表しました。これは SpCas9 という一番よく使われている Cas9、化膿性連鎖球菌の Cas9 ですが、切れるところから数えて N、GG と 2 つのグアニンを認識しています。その 2 つのグアニンは、このように 2 つのア르기ニンという非常にポジティブな、長い側鎖を持った残基が 2 つずつの水素結合という、全部で 4 本の力を使って非常に強く認識しております。

我々はこの Cas9 が DNA にくっついて切る様子を可視化することに成功しました。ここに HNH ドメインが、今、暗くなったと思うのですが、中に引っ込んでクリベージしているのですけれども、ここで切れて、ここで切れるというようなことを世界で初めて可視化をしました。したがって、Cas9 は DNA を切るわけですが、切らないゲノム編集というものもあります。

どうするかというと、もちろん先ほどのヌクレアーゼドメイン、RuvC ドメインとか HNH ドメインの触媒残基をアスパラギン酸からアラニンなどに変えてしまう。そうしますと、もう切らない Cas9 になります。こういうのを dCas9 と言います。この dCas9 に例えば転写活性化ドメイン、こういうものを付けますと、RNA ポリメラーゼを呼んできて、下流の遺伝子の発現を活性化するとか、あるいは、これは例えばヒストンのメチル化酵素みたいなものを呼んできますと、ヒストンの後ろがヘテロクロマチン構造を取りまして転写が抑えられるということで、遺伝子のオン・オフツール、ジーンモジュレーションのツールがまずできる。これが 1 つのゲノム編集の方法です。

もう 1 つ切らないゲノム編集というものがあります。それは dCas9 にデアミナーゼ、例えばシチジンをチミンに、C を T に変える、あるいは A を G に変えるといったような、ベースを塩基置換する、ベースエディティングというツールがあります。これを使うと、後ろの遺伝子を切らずして置換する、塩基を変換することができることになります。これが切らないゲノム編集です。近年、この 2 つの切らないゲノム編集というのは非常に注目されております。

例えば、この転写活性化ツールに関しましては、例えば遺伝子のオン・オフツールに関しては、我々が構造決定した SpCas9 とターゲット DNA、

ガイド RNA、複合体ですが、例えばガイド RNA に着目しますと、最初のループ、このループは Cas9 によって認識をされています。このループは認識されていないんですね。このループは β シート構造によって認識されている。ですから、このループ、この 2 番目のループというのも外にむき出ているので認識されていない、Cas9 で認識されていないわけです。

ですから、ここにどんな RNA の配列を持ってきてもいいわけで、例えばここに MS2 というファージのコートタンパク、これに結合するアプタマーの配列をここに埋め込んでやりますと、そこに MS2 をおびき寄せることができます。その MS2 に例えば P65 であるとか HSF1 といった転写活性化ドメイン、これをつなげてやりますと、こういうガイド RNA に転写活性化ドメインをいっぱい呼び込んでくることができます。

それからまた、Cas9 に RNA ポリメラーゼをまた呼び込んでくる VP64 というドメインをくっ付けてやりますと、非常に高確率で RNA ポリメラーゼを呼んできて下流の遺伝子の発現をオンにすることができると。どのぐらいオンにすることができるかといいますと、例えば最初のステムに転写活性化ドメインをくっつけたものでは大体 10 倍ぐらい、2 番目に付けると 20 倍ぐらい、両方に付けると 40 倍ぐらいと上がります。更に VP64 を Cas9 の C 末端に結合しますと、例えば 600 倍であるとか 300 倍であるとか数百倍になり、良いものですと 1,000 倍ぐらい上がる。普通の細胞で発現しているものに比べ 1,000 倍ぐらい RNA が転写できてくるということになります。

これを使ってゲノムワイドなスクリーニングということを我々はやりました。どういうことかと言いますと、例えばメラノーマという非常に悪性の皮膚がんの細胞でありますけれども、これの抗がん剤耐性を付与する遺伝子を見つけようということです。どういうことかと言いますと、このメラノーマの細胞に、大体、人の遺伝子は 2 万 3,000 ありますから、1 つの遺伝子当たり 3 種類のガイド RNA を場所を変えて作りまして、7 万のガイド RNA を合成し、これと Cas9 をそれぞれ入れてやる。クローン化して入れるわけです。

そうすると、それぞれの細胞でどれか 1 つの遺伝子が数百倍から 1,000 倍ぐらい転写が活性化して、発現が向上している。そういう状態において、抗がん剤の入ったプレートで撒いてみますと、ほとんど死ぬのですが、生き残っている細胞があります。そこからガイド RNA をシーケンスしてやりますと、どの遺伝子が活性化していて、それによって抗がん剤耐性を獲得したかというのが分かるわけです。その結果を見てみますと EGF レセプターであるとか、あるいは ERK であるとか、そういった下位に

ある、下流にある遺伝子が出てきたという、非常に全うな結果が出たということになります。これが転写活性化ツールです。

もう1つは塩基置換ツールです。これはヒトの遺伝病、大体58%はポイントミューテーション、いわゆるSNPsで起きている。ほかはデリションとかいろいろあるわけです。この58%に着目してみますと、どういう置換になっているかと言いますと、例えばATがGCであるとかATがCGであるとかいろいろあるわけです。例えば、ATをGCにしたりCGをTAにする、今のベースエディティングで直せる変異ですけども、こういったものが大体61%あります。ですから、60%×61%で大体35%の遺伝子疾患というのはベースエディティング、切らないゲノム編集の塩基置換で治るということになります。これが非常に脚光を浴びているわけですけども、このようにガイドRNAによってdCas9が連れてこられて、後ろに例えばCをTに変えるCデアミナーゼが付いています。

これがこの非相補鎖のほうにくっ付かして、ここのCをUに変え、これも後々Tになりまして相手側もAに変わる。このようなベースエディターは今、たくさん見つかりまして、Cas9を使ったものであるとかCas12という、これはまた違った、CPF1というタイプVのCRISPRですが、これを使ったものであるとか、デアミナーゼドメインもAPOBEC1を使ったり、あるいはこのCDA1を使ったりPADを使ったりいろいろある。これらは全部CからTの変異ですけども、どこを変えるかというの、ここにPAMがありますと、ちょうどそこから大体、これですと12から16塩基上流、一番よく使われているTarget-AIDというのは日本の西田先生が見つけた、ヤツメウナギのシチジンデアミナーゼです。大体、PAMから17から19塩基上流、ここを塩基置換するということになります。

このように大体3、4塩基のウィンドウを持っています。したがって、逆に言えば、そのウィンドウから17から19塩基上流にPAMがないといけない。PAMがないと塩基置換できない、これは非常に重要な点です。これが制限になっているわけですが、これをもうちょっと構造に基づいてうまく設計しようということで、Cas9にシチジンデアミナーゼをくっつけたコンストラクトを作りまして、ゲル濾過を使って、その部分を精製していきます。これはベースエディターですが、ガイドRNA、DNAの複合体を、最近東大に入りましたクライオ電顕で構造解析しました。まだ途中なのですが、先ほどのX線と同じような構造が出てきて、この辺、ちょっと余った密度がありますので、おそらくベースエディターがこの辺に出てくると思います。こういった構造に基づいて、もっと理論的にベースエディターを設計できるということになります。

ですが、先ほど申し上げたように、この SpCas9 というのはいくつも問題があります。例えばオフターゲット、間違いが多い。それから大き過ぎて、1,351 残基もありますので DNA で 4Kb もある。そうするとウイルス、例えば AAV (アデノ随伴ウイルス) ですと大体外から入れられる遺伝子の大きさが 4.5Kb ですからほぼ SpCas9 の遺伝子を入れるとそれで終わってしまう。ですから、細胞への導入効率が非常に低いということになります。

もう1つは SpCas9 が非常に PAM を、NGG を厳密に認識しているために、自由にゲノム編集できないという欠点があります。特にベースエディティングの場合はこれが非常にクリティカルであります。これについてちょっとお話しすると、では PAM を単純化すればいいではないかということになります。PAM を単純化、例えば GG を G の1文字にするとどういうことができるかということ、まずもちろん編集の自由度が上がります。GG でしかゲノム編集できなかった、ガイド RNA に付いて Cas9 に付いて切ってゲノム編集するわけですけども、これでは十分ではない。だけど、G を認識するような Cas9 があれば、G のところにもガイド RNA が Cas9 を連れてきて編集できる、自由度が上がる。これはもちろんのことです。

もう1つは、最近見つかったのが大きな欠失で、オンターゲットで切断を起こしますと、ここにデリージョンが入る。これは 2018 年、去年、『Nature Biotechnology』にオンターゲットで切断を起こしますと予期しない、非常に長い DNA の欠失が起きることが報告されて、一時期いろいろなベンチャーの株が下がったわけです。

これはどういうことかと言いますと、これはガイド RNA の設計によるものでありまして、例えばガイド RNA を GG ではなく G を認識するような Cas9 を使って、ちょっとずらして作ってやりますと、そのデリージョンは起きないということになります。それからまた塩基置換、例えばベースエディティングしたいウィンドウの 17 か 19 塩基上流に GG がなければいけないところを G で済めば、もっと簡単にベースエディティングが自由にできまして、C から T、A から G のベースエディティングができるということになります。もう1つは遺伝子のスイッチオン・オフですが、これに関しまして、ガイド RNA をずらしてやりますと、ホットスポットというものがあり、非常に効率的にこうやって遺伝子のスイッチオン・オフができるようになります。このようにアドバンテージが非常に大きいわけです。

どうやって GG を G に変えるかということですが、SpCas9 の G の認識は先ほど申し上げたようにアルギニン 2 つが認識しているのですが、2 番目のアルギニンをアラニンに変えてしまう。もちろん PAM 配列は G になりま

すけれども、これでは二重螺旋をほどき始めるヘリカーゼ活性が弱くなってしまって、全くゲノム編集活性がなくなってしまう。そこで、例えばアルギニンという残基をここに導入しまして、リン酸バックボーンを認識する、これによってDNAを引きはがす力を付けてやります。そうしますと、例えばワイルドタイプですと、このようにちゃんと切れるのですが、2番目のアルギニンをアラニンに変えてしまうと全く切れないのですが、そこにこのようなアルギニンを導入していきまると、少し切れるようになる。全部コンバインすると、こんなによく切れるようになる。これで十分かと言いますと、まだまだワイルドタイプには足りない、どうすればいいかと言いますと、立体構造を見ますと、ここがアラニンになっていたわけですが、アラニンですとここにいろいろな空間ができてしまうので、バリンとかにしたほうが、もうちょっとかさ高い残基にしたほうがよりパッキングにいいだろう。それから、1番目のアルギニンを支えているグルタミン酸があるのですが、それをフェニルアラニンに変えてやると、ちょうどこのフェニルアラニンと1番目のGのリボースがファンデルワールス相互作用、疎水結合のような結合でくっ付きまして、DNAをはがす力を与えてくれる。このような疎水性残基を導入することにより、例えばここだったものが、例えばバリンを1個導入してここに上がる。更にフェニルアラニンを導入してここに上がる。更にアラニンをバリン化してここに上がるという感じで、ほぼワイルドタイプに近い活性を持つように *in vitro* ではなるようにしています。

ワイルドタイプですと、GG という PAM だけ認識して切るのですが、GAとかGT、GCでは切らないのですが、我々のGのミュータントではGAでもGTでもGGでもGCでも切れるようになる。これは切るゲノム編集でありませんが、PAM ディスカバリーをちゃんとやりますとワイルドタイプはGG、ミュータントはほぼGということになります。ではHEK細胞、ヒトの細胞の中でゲノム編集活性を見てもみますと、GGだけではなく、この灰色はワイルドタイプですが、ワイルドタイプはほぼGA、GT、GCではゲノム編集を起こしていないのですが、GAやGT、GCでもちゃんとゲノム編集が起きていることが分かります。

今度は先ほどの切らないゲノム編集をやろうということで、我々のミュータントに Target-AID、シチジンデアミナーゼを付けています。そしてベースエディティングをやってやりますと、これはワイルドタイプですが、ワイルドタイプはGGというPAMの17か19塩基上流でベースエディティングするだけであり、GAとかGT、GCではほぼしないわけですが、我々のミュータントはどのGA、GT、GG、GCのPAMに関してもベースエディ

ティングをしてくれる。こちらはハーバード大学の David Liu という教授が作った xCas9 というミュータントです。これはまだ活性化が低いということで、我々のものが今のところ一番いいベースエディティングのツールになっていることとなります。

ということで、我々はオフターゲットが少なく、いろいろな所が自由にゲノム編集できて、小型のスーパーCas9 というものを開発しようとしております。それはボストンに研究室を持っているベンチャー、エディジャーが我々が作ったツールを使って医療開発をしているということになります。これはメンバーです、これが CEO の森田さんです。

[Redacted text block]

少しだけ医療応用についてお話いたします。

[Redacted text block]

[Redacted text block]

もう1つ、ちょっとお話したいのはエピゲノムの編集です。これは群馬大学の畑田先生と共同研究をやっておりまして、エピゲノムというのは非常にいろいろな病気と関わっている。例えばがんとか肥満、糖尿病、自閉症、たくさんの疾患に関わっているのですが、これをどう編集したらいいかと言うと、やはり dCas にエピゲノム編集するような酵素、例えば DNA のメチル化、脱メチル化するような酵素を付けてやればいい。

例えば TET というのは脱メチル化酵素なのですが、これをリンカーを付けてやって、そこに GCN4 とその先端の抗体に TET を付けてやって、タンデムにいっぱい付けてやる。そうすると、リンカーの長さをいろいろ変えてやりますと、リンカーが短いと活性が低いのですが、リンカーが長いとほぼ 100% 脱メチル化するということが分かりました。

これを使ってホールゲノムをシークエンスしますと、上がガイド RNA でちゃんとゲノム編集したのですが、メチル化が低いということが分か

ります。特異的にメチル化が下がっていることが分かります。

これを使って、畑田先生はシルバーラッセルシンドロームという発育不全の病気の治療を試みました。これはどういうことかと言いますと、その野生型では成長因子の下流に H19 という遺伝子があって、ここに CTCF という転写因子がくっ付いているのですが、これがパターナルなゲノムでは、ここにメチル化が入って、これが付かないためにエンハンサーがここに飛んで成長因子が発現する。だから成長するわけですが、この病気にかかるとメチル化が起こらないために、こののところに CTCF がくっ付いて H19 しか発現しない。つまり成長因子が発現しない。それで発育不全になるということになります。

これをマウスでやってみました。マウスでどうしたらいいかと言うと、この SRS のマウスに対して、この所にメチル化を入れるように、エピゲノム編集でメチル化酵素を導入してやる。こういう形にしてやれば、こちらにエンハンサーが飛んで成長因子ができてくるだろう。やってみますと、確かにこのようにメチレーションの度合に応じて体重も増えてきて、発育不全が改善されているという結果が得られました。確かにエピゲノム編集で病気も治るのではないかということになりました。

我々のメンバーです。西増君がうちの准教授で、うちのゲノム編集のチームを率いてくれています。我々は Feng Zhang と長い間共同研究をしてまいりました。以上になります、どうもありがとうございました。

○山口部会長

濡木先生、ありがとうございました。非常に面白い研究発表と、我々のコンセプトペーパーを作るときに、いろいろと参考になる情報があったかと思えます。濡木先生の御発表について、御質問がございましたらよろしく願いいたします。

では最初に私から、いくつか最後のほうに多分、臨床応用にまでいけるような話を御紹介いただいたのですが、そこはほとんど切るほうと理解してよろしいのですか。ゲノム編集の適応に関する最後のほうの。

○濡木氏

そうですね、最後は2つお話しして、最初は切るほうで、ノックインで入れているのですけれども、もう1つは切らないゲノム編集ですね。どちらもいけると思うのですが、安全面を考えると今のところ、やはり切らないゲノム編集のほうが先に治験に入るのではないかとされておりま

○山口部会長

はい、分かりました。

○内田委員

『Nature Biotechnology』で発表された、オンターゲット切断で長い DNA が欠失されるというところで、ガイド RNA の設計でそういうのが防げるというようなお話をされたかと思うのですが、そのところがどういふことなのかがちょっとよく分からなかったのです。

- 濡木氏 DNA がどうしてもループを作る所がありまして、ループを作った所のちょうど根本の所に切れ目が入ると、そこが相同組換えみたいな機構でループが取れてしまい、デリションが起きると言われているのです。だからそこではなくて、ちょっとずらして作ってやれば、そこを切ってもループが取れないので、ループがデリションされないで、デリションは起きないのではないかと。ガイド RNA ディペンデントに起こる現象ということも言われていますので、そういう利点があるかと思っています。
- 内田委員 それは何か論文が出ているということですか。
- 濡木氏 これに関してはそういう機構でというのはまだ示唆されている段階でありまして、おそらくそういう大きなデリションが入るということは、例えば大きなループアウトをして、相同組換え的にそこが切れるということだろうと言われているので、それは多分間違いないとは思われますけれども。
- 谷委員 すばらしいお話ありがとうございます。このように PAM を単純化することでオフターゲット現象が多く発生するということはないのでしょうか。
- 濡木氏 あります。より多くの部分をアタックできますので、4 倍とはいかなくても 3 倍ぐらいオフターゲットの活性は上がるのですが、今ではオフターゲットを下げる変異というのがもう見つかっており、4 種類そういうセットがありまして、それでやるとワイルドタイプよりも低いオフターゲット活性になりますので、おそらくそういうのを組み合わせれば、ほぼほぼ問題ないレベルには下がると思います。
- 真下委員 Target-AID というかデアミネーゼされたもので、西田先生などがされている中で、ニッケースを使ったほうがやはり効率が断然に上がると。先生の場合もそれを使われる。
- 濡木氏 はい、そうですね。我々も、実はお話したかったのですが、ニッケースを使っています。ニッケースを使えば非相補鎖のほうに変換を入れるわけですけど、相補鎖側にニックが入っていると、そのところの反対側の鎖、例えば C が T に変わったときに、G が A に変わりやすいということがありまして、効率はやはりニッケースを使ったほうがいいようです。
- 真下委員 はい。あとすみません、関係ない話になるかもしれませんが、Jennifer のほうの話は御存じですか。dCas の知財というのですか、Cas9 の知財はいろいろされていると思うのですが。dCas の知財は何か Jennifer のほうが、それはちょっと不確かな情報ですけども。

- 濡木氏 それはちょっと私も聞いていません。Jennifer たちが Feng たちに比べてアドバンテージを持っているのはガイド RNA に関する部分というようには聞いているのですけれども、dCas に関してはちょっと聞いたことがないです。
- 水口委員 今ノックインするためには HDR がいいのか、あるいは HITI みたいなシステムがいいのか、あるいは dCas9 を使わなくて、ほかのものを使ったらいいのか、その辺はどのようになってきているのですか。
- 濡木氏 もちろん HITI は使ったほうが挿入する方法がそろいますので、これは必須だと思うのですが、その上で、
[redacted]
[redacted] 花園先生が見つけられたように、
[redacted]
[redacted] 工夫次第で、非常にノックインは上げられるかと思っております。
- 水口委員 [redacted]
- 濡木氏 [redacted]
- 久米委員 知財の話に戻りますが、大体こういうときはかなり包括的な知財を出願することが多いと思うのですが、例えば Cas に関して言えば、今まで使われている SpCas についてはかなりがんじがらめになっていると思いますけれども、SaCas とか新しい Cas についてもやはりかなり取られているということでしょうか。
- 濡木氏 そうですね。Cas9 というくくりで知財になっていますので、Sp だろうが Sa だろうが、基本的には RuvC ドメインや HNH ドメインをもって DNA を切るといふ、RNA に導かれて切るといふものは全てそれを包含されていますので、なかなかそれを抜けるのは難しいと思うのです。ただ、Cas9 ライクな分子を自分で作ってしまったり、あるいはまだもしかするとそれに近いものがあるのではないかというのを見つけてくれば可能性はあります。
- 例えば Jennifer などがやろうとしていたのは、今回もキーストンで発表したのですが、カスケードというクラス 1 の CRISPR があるのですが、普通の Cas9 はクラス 2 だったのですけれども、クラス 1 の非常に長いカスケードはいろいろなタンパク質の複合体なのですが、そこに HOC1 という制限酵素を付けて、大きさは 5Kb で大きくなるのですが、それで特許抜けをしようとか、いろいろ苦戦をしているようです。その Cas9 を使ってしまうとやはりかかってしまうと思います。
- 久米委員 ありがとうございます。
- 三谷委員 後半に話された切らない方のゲノム編集で、そのオフターゲット変異

を高いセンシティブリティで解析しようと思ったときには、どのようなアッセイをされているのでしょうか。

○濡木氏

例えば先ほどのジーンモジュレーションであれば、RNA-seq をしますと、例えばオンターゲット以外の RNA でアクティベートされたものがあれば、それはオフターゲットとして区別されると。見つけられることはあるのですが。ベースエディティングで言うと、なかなかこれは本当に全ゲノムシーケンスでもしない限りは分からないかなと思っています。ただ、その辺はまだベースエディティングに対するオフターゲットの評価があまり進んでおりませんので、[REDACTED]それを開発しようとしているところです。

○水口委員

Cpf1 の PAM 制限をもう少し減らす研究は進んでいるのですか。

○濡木氏

そうですね、キースジョンの所で最近『Nature Biotechnology』に出たのですが、TTT を TTC とか TAT とか、かなりバリエーションを変えたミュータントが取れておりまして、それは構造に基づいてというよりは、欧米の人が非常によくやるのですが、人工進化を使ってランダムにミューテーションを入れてそういうものを取ってくるという方法でいくつか取れておりまして、実は我々、その共同研究で構造解析して、なぜそうなるかを見つけているのですが、短縮されたところまでは行ってないのですが、バリエーションはもうできています。

○山口部会長

ジーンアクティベーションというのは、要するに DNA の部分は変えてないわけですよね。

○濡木氏

そうです。DNA は変えてないです。

○山口部会長

要するに何をお聞きしたいのかというと、そういうところまで議論になっているのが、遺伝子治療に含めるかどうかということですね。その辺の先生の解釈みたいなものがもしあれば、その変化というのがどの程度まで続き、どの程度のインパクトを持っているか、もしよろしければお考えを。

○濡木氏

ジーンモジュレーションは遺伝子を変えてないので、遺伝子治療ではないですね。単に RNA の転写を上げたり下げたりしているだけなので、それで結構治る病気もあります。[REDACTED]

[REDACTED]いろいろな病気は大体遺伝子の発現がおかしくなって起きることが多いので、それで遺伝病以外の病気も治せることが結構あ

るのですね。ですので、遺伝子治療には一番引っ掛からないけれども、効果は結構あると。ただ、1つ問題は、Cas9がどうしてもずっと細胞の中に残りますので、そこだけちょっと問題です。だから抗原性の問題であるとか、そこだけがちょっと問題になると思います。

○山口部会長 あと持続性というか、どのぐらいの期間、効果を発現させようとしたら持続させないといけないし、その辺の関連はどうなのでしょう。

○濡木氏 ジーンモジュレーションですと、ずっとありますから、オフターゲットは高いと別の遺伝子が発現向上してしまうわけですけども、ただ、ミュータント遺伝子が発現するわけではないので、多くの場合はそれほど重篤な疾患というか、がんになるとか、そういうことはあまりないとは思いますが、オフターゲットをなるべく下げておくことに越したことはないと思います。

○山口部会長 ありがとうございます。ほかにありますか。

○島田委員 少し違う話題ですけども、デリバリーに関しては最近どのような進歩があるのでしょうか。

○濡木氏 やはりどこのベンチャーも今使っているのは、肝臓に AAV8 を使って、アデノ随伴ウイルスの 8 を使って肝臓にデリバリーしたり、脳神経ですと AAV の 2 を使ったり、あるいは筋肉なんかですと AAV9 を使ったり、ある程度特定の組織には特異的にデリバリーできるのですが、まだどこの臓器にもスペシフィックに行けるといえるようにはいかないで、その辺はこれからウイルス工学というか、その部分でやっていかなければいけないことだと思っております。まだなかなか進んでないと思います。

○島田委員 その辺に関してはクラシカルな遺伝子治療と同じようなレベルの問題だと思うのですが、ただ、この場合は要するに *in vivo* でやってしまうと、オフターゲットにしる何にしる、チェックのしようが全くないですよ。

○濡木氏 はい、そうですね。

○島田委員 それに対してゲノム編集の研究者たちはどういう考えを持っているのですか。

○濡木氏 *vivo* に対して、確かにゲノム編集のオフターゲット効果がどうであるかは数年経たないと分からないわけです。一応、*vivo* でゲノム編集をした場合にも細胞で、例えば、今回、Jennifer ではないけれど、UC バークレーのグループが発表していたのは、ディテクターセックという新しい方法で、生きた細胞のオフターゲットを評価するという方法を見つけました。

それは、いわゆるチップセックです。MR11 とかいうタンパク質に対するチップ解析をして、どこにオンターゲット、オフターゲットがあるか

ということを調べる方法があり、細胞あるいは個体の評価ができます。基本的に最初に認可されるのは、外に取り出してきて体外でゲノム編集をして、うまくいったものを入れるということかと思います。いずれ体の中に入れて体の中でゲノム編集をしなければいけないと思います。肝臓、神経、筋肉等、表面の臓器だけではないので、おそらく、カテーテルを使ったり内視鏡を使って注入してウイルスを入れるとか、そういうことでゲノム編集をしていくようなことも将来出てくるのではないかと思います。その場合、臓器を取り出してきてオフターゲットの評価をするということが必要になると思います。

○山口部会長 よろしいでしょうか。ありがとうございました。

○濡木氏 ありがとうございました。

<コンセプトペーパーの検討>

○山口部会長 濡木先生、この後もまだ居ていただくことは可能でしょうか。

○濡木氏 3時半くらいまでであれば。

○山口部会長 今、確認させていただいたのは、今日、これからコンセプトペーパーを含めて議論をさせていただきたいと思っており、もし切らないゲノム編集の議論が出てきた場合、濡木先生にも御意見をいただければと思っております。

先ほど少し議論していたように、WGで文書作成をしております。その点について、先ほどの説明の続きをいたします。資料3~5までが、本日の資料です。最初に資料の説明を行い、その後、資料3を使って論点の、まだそこまでの文書になっておりませんので、これ全部をライン・バイ・ラインでやるつもりは全くありません。資料3に関しては、コンセプトペーパーの素案と受け取っていただければと思います。今、これをWGで回しており、ここ2、3週間の間に素案になるような形に持っていければと思っております。

もう1つは資料4です。先ほどそれぞれについて説明しましたが、コンセプトペーパーのそれぞれの項目に当たる所に、どういう文献が、あるいは別途情報として提供されているかということで文献リストを作っております。これを作ることにより、最終的に報告書が出来上がったときに論文化と併せてこういうことができるであろうということで、論文リストを作っております。これは全部出来上がっておらず、エディティングの中でそういう議論を続けていくと同時に追加の論文をいろいろ寄せていただいております。それを含めて最終的に、いわゆるエンドノートに入れて普通の論文と同じように論文を作成するような形に持っていき

たいと思っております。

資料5は、NIHのClinicalTrials.govに登録されているゲノム編集を用いた、少し重複しているような所もあるような気もするのですが、ゲノム編集の臨床研究プロトコルです。欧米のものに関して言えば、具体的に使っている評価方法等、プライマリーエンドポイントでどこに取っているかということも含めて書かれております。中国で行われているゲノム編集が結構あります。ただし、それに関して言えば、実際にどういうものを使っているかという情報は非常に薄くて分かりにくいところがあります。その辺りが少し課題かと思っております。

資料としては、資料3、資料4、資料5です。資料3に関してのみ、概略を簡単に説明いたします。何度も申し上げますがライン・パイ・ラインでやるつもりは全くなく、そういう内容の文書ではありません。ただ、どういうコンセプトでやっているかということと、この説明をした後に少し議論のポイントを挙げますので、そのポイントについて議論をさせていただければと思います。

資料3の1枚目は序論ですので、この辺りは、いわゆるレビューとそれほど変わらないようになっております。2ページです。真ん中から下に、本文書ではという所があります。ここは、こういう文書で作っていますということを記載しようとしている所で、ゲノム編集を導入するに当たり、技術ごとに分類してゲノム編集の特性を踏まえた安全性について考慮事項をまとめるということです。プラスとして、臨床試験のゲノム編集特有の事項についても考慮するというようにしております。

その下の2ポツから、Zinc-finger、TALEN、CRISPR/Casについての概略を示しております。ここでのポイントは1つだけです。それぞれのCRISPR/Cas、Zinc-finger、TALENと付いて、CRISPR/Casは先ほど御講演いただきましたように、シングルガイドRNAを使って、もちろん、これは切るということを大体前提に書いておりますが、TALEN、Zinc-fingerと比べて2つの配列を認識するのではなく、1つの配列を認識することから、CRISPR/Casのほうがオフターゲットが高いところを記載しております。

4ページです。上の所に、従来型ベクターとゲノム編集との違いを簡単に書いております。その下のほうです。ここからはタンパク質、従来のウイルスベクターやプラスミドを使った場合は、コンサーンの差異はあまりないであろう。ところが、その下に、タンパク質、あるいは次のページのメッセンジャーRNAを書いた所は、4ページの下から10行目くらいから、今までタンパク質やメッセンジャーRNA、これはタンパク質のこ

とを書いています。タンパク質を使う場合は、遺伝子治療に該当しないということになるわけですが、実際にゲノムそのものを改変するという技術において高いリスクがあるということから、これも遺伝子治療として入れるべきではないかという提案をしております。

5 ページです。今まではメッセンジャーRNA 単独では遺伝子治療をしていなかったものについて、遺伝子治療として包含すべきではないかという提案をしております。その次は、ゲノム編集の目的による分類です。遺伝子破壊、ノックアウトとか、今の相同組換えというところの改変の種類による分類と議論ということを入れております。その中では、用いることによって、切るだけなのか相同組換えすることによる場合でそれぞれリスクが変わるであろうと。

次のページです。今日、お話がありました dead Cas やベースエディティングの話で、こういうところは切るという操作がないことによりリスクが大きく違ってくるであろうと、その辺りのコメントを載せております。

6 ページです。真ん中の 2 ポツとして、非臨床の所で、まず、ex vivo のゲノム編集と in vivo のゲノム編集に大きく分けて記載しております。ex vivo のゲノム編集に関しては、これは in vivo でも同じことが言えるところが多いのですが、オフターゲット、想定外のゲノムの欠失や挿入、P53 の変異、これは、もちろん相同組換えの場合に、有名な、つい最近論文で出された話、染色体変異のリスクが挙げられるであろうということ を解説しております。

8 ページの④です。細胞によるリスクの違いについて、三谷委員の御講演のときにも少しその辺りを示唆するお話をいただいたかと思えます。ゲノム編集の切るほうに関して言えば、少なくとも染色体の切断を起こして改変を導入するということから、言わば、従来のゲノムへのインテグラーゼを持ったレトロレンチと同じような種類の、ウイルスベクターに近いところがあるだろうと。

ただし、従来の遺伝子治療のレトロレンチについては、今までの造腫瘍性変異は大概プロモーターが入って起きているという、ところが、タンパクやメッセンジャーを使った場合にはプロモーターそのものは入りませんので、多分、リスクの性質が違うであろうということを記載しております。おそらく、もう 1 つ考えられるのは、P53 のこともありますが、先ほどの染色体の変異で、転座とかによる融合タンパクなどの変異が考えられる。それから、もう 1 つは、細胞によって違うのではないかと。要するに、造血幹細胞のリスクの高さと体細胞のリスクの高さの違い。これ

は、従来の遺伝子治療でもこういう議論がされていたところですが、その辺りの分類を記載しております。

in vivo のゲノム編集は9ページに記載しております。in vivo のゲノム編集に関しては、もともと in vivo ではなかなか改変効率が悪いので、ゲノム改変の効率を上げるために、先ほども少しお話がありましたガイド RNA の設計の工夫とか様々な効率の上昇ということがあります。1つは、長期にわたって CRISPR/Cas が発現することのリスクが挙げられる。それから、HITI のような新しい技術がどのように捉えられるかという点について記載しております。

10ページです。治験において留意する事項として、2つほどメインに記載しております。先ほど申し上げたように、造血幹細胞のリスクは非常に高いのではないかとということで、ここでも少し議論し情報提供していただき、3番目のケースを含めて、多分、造血幹細胞のリスクの高さは非常に注意していくべきことであろうと。もう1つは、in vivo をやる場合には、体内のディストリビューションによっては生殖細胞へのリスクがあり、挿入リスク、改変リスクに考慮してやっていく必要があるということに記載しております。概略として説明した内容はまだまだ変わる可能性があります、そういうポイントで記載していると理解していただければと思います。

もう1つは、資料3、資料4、資料5に基づいて本日議論していただきたいことがあります。今までは、普通、コンセプトペーパーは、よく ICH でも最初にプレフェイスの後にどういうターゲット、フォーカスがあり、その後、品質、非臨床の考慮事項を書くという形です。比較的短くまとめる形が多いのですが、それ以上に少し書くようなつもりで書いてきております。その内容でよければこのまま進めさせていただきたいと思えますし、もう少し簡単にするという方向もあるかと思えます。ただ、論文文化するときには、欧米との比較も含めて議論させていただければと思っております。

遺伝子治療の対象範囲として、ゲノム編集のターゲットとしては DNA の修飾が1つあります。もちろん、エピゲノムまでを含めてです。もう1つは、ヒストンの修飾をどこまで含めるべきか。提案としては、ツールとしてのタンパク質やメッセンジャーRNA は遺伝子治療に含めるという形で、今、記載しております。その方向性で良いかどうかの確認だけはさせていただきたいと思っております。論点として、細胞種によるリスクの違いはいろいろあるかと思えます。その辺りの論点について御議論していただければと思っております。よろしいでしょうか。概略としての説明

は以上です。

○岡田委員 少し質問をさせていただいたかと思うのですが、対象として例えばアメリカとヨーロッパでゲノムに対する定義の考え方が違っていたと。要は、RNA編集のようなものも含めるかどうかということもあると思うのです。今後、治療技術という意味では、もしかしたら、そういうものもどんどん出てくるのではないかと思います。

○山口部会長 岡田先生がおっしゃるように、RNA編集を入れるべきかどうかは、多分論点になってくるかと思うのです。御存じのように、今までも臨床研究のほうでは議論していたのですが、RNA編集に関しては議論はしていません。あまり入れるつもりではなかったものですから。ただ最近、それが結構いくつかの所で言われているのは存じ上げておりますので、ひょっとしたらそこも俎上に乗せて議論していただければと思います。何か御意見等がありますか。

○佐藤審議役 先生、いろいろとまとめをいただき、ありがとうございます。規制の側から今の整理について、留意点というか、先生方に考えていただきたいところがあります。何かといいますと、今の医薬品医療機器法(薬機法)の中で、遺伝子治療がどのように書かれているかです。これは、「体内で発現する遺伝子を含有させたもの」が、実は遺伝子治療の定義になっています。この定義からいいますと、もちろんDNAを直接入れるような従来型の遺伝子治療もそうなのですが、一応メッセンジャーRNAまではこの遺伝子治療の定義に含まれると、我々は従前から解釈をしているところです。ただ、この定義は、体内で発現する遺伝子を含有させたものですから、タンパク質はこの定義には含まれていないことになります。最終的な法律の改正までには更に5年の月日が必要になってくるのです。ただ、今の段階では、サイエンティフィックに見たときに、遺伝子治療の外縁はどこまでなのかということも含めて、科学的な立場からいろいろと御議論の整理をいただければと思っております。一応、規制はこういう状況ですということは、最初に御報告をさせていただこうと思っております。

○久米委員 そのことは佐藤審議役がおっしゃるのではないかと考えていたのですが、ちょうどメッセンジャーRNAをどこに含めるかで揉めたことがあります。今、回覧中の文書にも書いてあるので、メッセンジャーRNAに関しては少なくとも物ベースで考えたときには、含めることは可能だろうとは思っています。

それから、目的がゲノムをいじることではなくても、例えばRNAを編集するといった何かを変えらるということについても、そこは含めることは

可能なのだろうなと思っています。あとは、タンパクをどのように捉えるかは、考えられていなかったことがあります。遺伝子を発現するものを、遺伝子の発現をする、若しくは発現を変えるということで、多少の拡大解釈でも可能なのではないかという気はしています。

○山口部会長 多分、臨床研究では、もともとはメッセンジャーは入れていなかったのですね。最初のほうにしましたので、もちろんその話はきちんと耳には入っています。臨床研究の指針の中の最初の第12条までは、全てに掛かるという所があります。そこでは、もちろんメッセンジャーを用いたゲノム編集が入るような形で書いていますので、多分、今度は臨床研究だけから言うと読めるようになってきていると。もともと薬機法の中で、メッセンジャー、あるいは遺伝子を発現するので、もう遺伝子治療の中という話かと思えます。多分、ワクチンのほうだけは入っていないという理解でいいのですよね。

○佐藤審議役 はい、そのとおりです。

○山口部会長 ありがとうございます。今の所は、今日はプレインストーミング的にやらせていただいたほうが良いと思っています。あと2、3週間して出来上がるであろう次のときに、それを土台として議論させていただければと思っております。ですから、先ほどの3つのポイント以外にも、今、審議役から話がありましたメッセンジャーRNAが、もともとは薬機法上は入っているという話と、タンパクを入れるという話です。それで、タンパクを入れるという話は、制度として入れるには最終的には薬機法を変えないといけないという話だと思うのです。

○佐藤審議役 ここで、そういう議論をしてはいけないということではなくて、将来的に制度は技術の進歩に伴って変えていかなければならないものです。やはり、制度を作るベースの議論にもなりますので、是非ここでは現行制度はこうだからということではなくて、御議論いただければと思っておりますので、よろしくお願いいたします。

○山口部会長 分かりました。

○小澤(敬)副部会長 従来の遺伝子治療の枠組みでいきますと、AAVベクターのように直接体内に投与する場合は、本来の遺伝子治療で、体外で細胞を遺伝子操作して戻す場合は、cell-basedの遺伝子治療で、細胞治療、再生医療の扱いに入ってしまう、何となく同じ遺伝子治療が引き裂かれたような、ややこしい感じになっています。今回のゲノム編集治療は、もう包括的に引き裂かれないようにex vivoのゲノム編集治療と、in vivoのゲノム編集治療を統合的に議論するという理解でよろしいわけですね。

○山口部会長 佐藤審議役のほうがいいと思うのですが、多分、臨床研究と薬機法上の

ものが、かなり扱いが違っているということですね。

○佐藤審議役　そうですね。再生医療等の臨床研究は、細胞に入る ex vivo は入っているのですが、体内に in vivo で入れるものは入っていないという整理をしています。薬機法の再生医療等製品は両方含まれて、一体で遺伝子治療、細胞治療という形になっていますので、そこは制度上、両者で違いが若干あるのです。ここはサイエンスの場合ですので、あまりそこを区別せずに御議論いただいて構わないかと思えます。

○山口部会長　指名してしまっていていいですか。島田先生が先ほどいろいろ議論されて、多分、コンサーンがたくさんな germ line インテグレーションの話だと思うのですが。

○島田委員　だから、本当は遺伝子操作なのですよ。物というよりも、ゲノムの改変。タンパクでも Cas9 みたいに DNA に直接アタックしてしまうようなもので何かを治療しようとする、それはゲノム編集のくくりに入れないと、それだけを別にするというのは難しいというか、おかしいのではないかと思います。

もう1つ、先ほども言っていましたが、是非議論に入れていただきたいのは、germ line の話です。先ほども濡木先生が言われたように、今の段階ではデリバリーの問題は遺伝子治療と全く同じで、これまで議論されてきたことが、いまだに問題になっています。ですから、私もオフターゲットの危険性はあまりないのではないかと考えているのですが、唯一の問題は、germ line をいじってしまうかどうかです。ゲノム編集の問題というより、実は遺伝子治療で本来はもっと議論すべきなのに、現状はその部分をほとんど議論しないで、進められてしまっていることが問題ですね。

○山口部会長　多分、今、島田先生がおっしゃられたような話を、本当は普通のウイルスベクターのときでもきちんと議論しなければいけないという御指摘かなと思います。しかし、ここでそういうことを含めてずっと議論をしておけばいいのかなと。ターゲティングをどこに in vivo で導入するかというときの話としても、特に最後の臨床でのコンサーンをどう捉えるかという話かなと理解しているのですが。

○谷委員　今、島田先生がおっしゃったオフターゲット、レトロウイルスの開発の段階での問題は、複製可能か不可能かといった問題から始まったと思うのです。実際にブレイクスルーは転写因子の所にレトロが入る、近傍にレンチは入らないというところで、具体的な特殊例が出てきたと言われています。ですから、科学が進むまで結局 20 年ぐらいかかったのだと思うのですが、オフターゲットがランダムに起こっているのか、それとも

何らかの法則性。先ほど造血幹細胞ですとオフターゲットに入りやすいとか、それは結局、増殖性の問題とも関わります。ですから、そういった規則性というか、科学的な背景や基礎知識がもう少し増えないと、多分難しいと。ですから、審議役がおっしゃったように、時代とともに、科学の推進とともに変えていかないといけない余地を残しながら、デフィニションを決めていかなければいけないと思います。実際は、まだオフターゲットは結局ランダムに起こっているという認識でよろしいのでしょうか。それから、細胞によってオフターゲットは変わるのかどうか。

○山口部会長

濡木先生、もし何かあれば。

○濡木氏

今回キーストンに出てそういう話もあったのですが、基本的には細胞の増殖が早いものはDNAがほどけている状態が多いので、ゲノム編集をするチャンスが多いと。そういうものに関してはオフターゲットなり、あるいは先ほどのデリベーションも起こる率が高いと言われていています。ですから、増殖性幹細胞などは高いのだと思います。そこは、Cas9のフィデリティを上げることで、ある程度カバーはできるのかなとは思いますが。

○谷委員

染色体転座は遺伝子異常としては、非常に大規模なもので、御承知のように固形腫瘍はあまり見られないですが、造血器腫瘍にはかなり認められることから、造血器腫瘍の診断マーカーとしても頻用されてきました。造血器腫瘍細胞と固形腫瘍細胞を標的にした場合は、やはりオフターゲット現象には相違がでてくるのでしょうか。

○濡木氏

そうですね。細胞ごとに比べたのは、ちょっと私もあまり見たことがないのです。Cas9によってオフターゲットがどこに入るかでももちろん変わるとは思います。ですが、*in vitro*で使えるとすればSpか、体内で使うならSaしか使いようがないのです。それに関して言うと、多分細胞ごとにユークロマチンになっているとか、細胞分裂が激しい所に関してはオフターゲットが入りやすいので、細胞によってオフターゲットが入る率や場所も変わってくるのではないかと私は思いますが。

○島田委員

オフターゲットが原因で、何か起こったことはありますか。

○濡木氏

そういう報告は聞いたことはないのですが、実際、動物実験などでもゲノム編集で治療などをしていても、オフターゲットでがんになったとか病気になったというのはあまり聞いたことがないので、問題にならないのではないかという感覚はつかんでいるのですが。

○島田委員

レトロウイルスのときも、最初はそれを期待して、ランダムだから大丈夫だろうと言っていたのだけれども、実はそうではないというのが分かりました。ですから、おそらく今度の場合も本当にランダムだとして、しかも頻度がそれほど高くないとすれば、それこそナチュラルなミュー

テーションと大して変わらないという。

- 濡木氏 そうですね、放射能とか紫外線のミューテーションとあまり変わらないかということで、それより低いのではないかと思うのです。
- 島田委員 逆に、もう1つは、それを本当に調べられるかということ、完全には調べられないでしょう。
- 濡木氏 そうですね。オフターゲットの活性は、調べるのが非常に難しかったのですが、最近は *in vitro* の方法や *in vivo* の方法でも、いろいろな方法がオフターゲットの解析に出てきます。先ほどのチップ解析に使った方法もあれば、*in vitro* でも CIRCLE-seq とか Change-seq というような、新しい非常に簡便な方法が出てきて、また簡単にオフターゲットの活性測定ができるようになってきました。その辺りは、この1年とか半年ぐらいの間で、細胞ごとにこういうケースはどうかというデータが出てくると思うのです。それによって、頻度や、どのぐらい重要な所に入ってしまうのか、本当に放射線や紫外線と同じレベルなのかということも、多分分かってくると思うのです。
- 島田委員 その新しい方法というのはホールゲノムを繰り返すというよりも、もっと感度のいいような方法なのですか。
- 濡木氏 そうですね。今、一番言われているのは、GUIDE-seq という、とにかくオンターゲットもオフターゲットも切れ目が入ると、そこにノックインのタグみたいなものが入って、それを基にホールゲノムを解析すると、そこに切れ目が入ったというのが分かるような解析なのですが。
- 島田委員 では、ブレイクが入った場合のことですね。
- 濡木氏 そうです。
- 島田委員 そうすると、例えば先ほどおっしゃっていた塩基の置換みたいなものは、そういう方法では無理ですよ。
- 濡木氏 そうですね。ですから、ジーンモジュレーションであれば RNA-seq として、どんな RNA の転写が活性化しているかを見て異常になっていたら、おそらくそこにオフターゲットがあったのではないかというのが見られたり。
- 島田委員 間接的な。
- 濡木氏 間接的なものですね。そういう方法でも、今は盛んに技術開発されてきていますので、その辺りはこの半年ぐらいで治験が出てくると思います。
- 山口部会長 最初に説明させていただきました2つの点だけは御意見をいただいていたほうが、今後エディティングがしやすいとか、多分それで合意できるだろうと思って言っているのですが。タンパク質を用いてゲノム編集をする場合、いわゆるエピジェネティックも含めてですが、一応遺伝

子治療の範囲として考えて書いていくということで、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それから、もう1つは、コンセプトペーパーの形は少し長めになっていますが、一応意図としては今のままの進め方をさせていただいていきたいと思っております。少し短くするという手もあるのですが、できれば今の状況でいろいろな情報を入れても構わないのかなとは思っております。その辺りについては御了承をいただければいいかなとは思いますが、

○小野寺委員 多分、今回の場合はゲノム編集の概略・概要を出すべきかと思えます。より詳しい内容、たとえば品質や非臨床試験に関しては、先生が言われるように新たにコンセプトペーパーで加えていくものかと思えます。つまり、最初は詳細を示すコンセプトペーパーよりもまずは全体像を俯瞰できるガイダンスを作られたほうが良いと思えます。

○山口部会長 それから多分ヒストンの修飾に関しては、なかなか結論がすぐには出ないと思っております。いわゆる遺伝子そのものはいじっておりませんので、臨床研究でもグレーゾーンにして、そのままにしております。ですから、どこまで範囲を広げてしまうかというところもあるのですが、少なくとも遺伝子を触っていないところに関しては、今のところは入れられないという議論もしていないというような感じで留めておきたいなどは思っておりますが、いかがですか。では、そのような形にさせていただければと思えます。

全体を通して御議論いただいた上で、多分この第1部をもう少しやるようになってから議論をしたほうが良いかと思っております。全体を通して、御意見等がありましたら、それを受けて、最初から何度も申しておりますが、WGでそれも受けた形で修文をさせていただきたいと思っております。

○濡木氏 議論と外れるかもしれないのですが、日本である程度指針を決めて規制をしたとしても、例えばアメリカのFDAなどはかなりアクティブにどんどん進めています。今回、少しFDAに勤める方とお話をしたのですが、FDAがどうして早く進むかという、製薬会社などが結構FDAに対してお金を入れているらしいのです。それによって、何かFDAのアクティビティがある程度、製薬会社に握られている部分があって、それである程度早くしなければいけないというのもあるらしいのです。

もう1つは、患者さんが治る権利というか、このまま死んでしまうのならば、どんな治療も受けたいというものをある程度尊重するというのもあって、中国などはあまり範疇に入れていいかは分からないのですが、アメリカなどはどんどん進めていくと思うのです。そして、オフターゲット

ットの方法、影響がないということになって、どんどん向こうが進んでしまっていて、細胞治療が輸入超過になってしまうと、日本は後手後手になってしまうなというのが懸念されるところです。その辺りは、どうしたらいいのかなと思っているのですが。

○佐藤審議役

先生、御指摘ありがとうございます。PMDA も我々の審査部門は、90%はメーカーからのユーザーフィーで動いている組織です。実はFDAのほうで予算に占めるユーザーフィーの率は低い状況ではあります。ただユーザーフィーをもらっているから PMDA がメーカーに肩入れした行政を行うということでは、必ずしもありません。ただ、やはり先生がおっしゃるように、患者さんが待っている状況の中で、最善の有効性、安全性が確認されたものを早く届けていくという姿勢は、FDA も PMDA も同じなのだろうと思っています。

こういった科学委員会という場もできて、今ようやく7、8年という状況です。やはり先生がおっしゃるように、言ってみれば、これから製品開発に用いられるであろう要素技術を早めに汲み取って、それに対して製品が出てくる前からある程度規制の考え方を用意しておこうということです。ここで指針を作るとか、サイエンティフィックな考え方をまとめていただくのはまさに科学委員会という場ですので、日本もそういう意味ではアメリカに遅れをとらずに、こういった技術の実用化に対して様々な支援をしていこうということです。その点は御理解をいただければと思っております。

○山口部会長

ありがとうございます。多分規制というのが、むしろエンハンスをするという側面を持っていると思うのです。こういうガイドラインを作って、こういう形で出してくれば議論はしやすいですよという話かとは思っております。

○三谷委員

資料3を拝見した感想です。安全性だけを考えた場合、先ほどからお話に出ているように、メッセンジャーであろうがプロテインであろうがそれほど関係なく、おそらくゲノムを改変するかしないかがリスクを考える上でのポイントだと思います。また、ゲノムを変える場合も、バイオリジカルに言うと、おそらく NHEJ によるのか HDR かという話になるのでしょう。しかし、リスクを考えた場合には、例えば NHEJ でも HITI みたいにドナーを導入する場合にはリスクが高くなるわけです。ですから、ゲノムを切るだけなのか、そこに外からドナーDNAを入れるかどうかで随分リスクが変わってくるという考え方もあるのではないかと思います。それよりも一番大きなポイントは、ex vivo、in vivo だとは思っています。しかし、安全性に焦点を置いた場合には、今までのようなバイオリジカル

な観点からの分類と、少し違うのではないかと思います。

○今泉委員

今までの科学委員会の全部の報告書を知っているわけでもないのですが、必ずしも規制の基になる文書を作るという委員会ではなくて、先ほど瀧木先生からもありましたが、技術の発展性、将来性も含めた展望を示すようなところも、今までやってきたつもりだと思うのです。ですので、いわゆる規制の基になる指針を作るというのは、必ずしも科学委員会の役割ではないのではないかと今までは理解していました。ただ、毎回の専門部会、期で違うと思うのです。多分、新井レギュラトリーサイエンスセンター長のお考えもあると思うのですが、科学委員会というのは、エリアでの科学の進展をしっかりと押さえて、将来性と危険性、安全性を担保する方向の注意を掲示するという両面を出すべきものだろうと思うので、また違うのではないかという気は個人的にはしているのですが。

○新井レギュラトリーサイエンスセンター長

先生のおっしゃるとおりなのですが、各テーマごとに、もちろん展望で終わるといいますか、展望を示すような委員会の終わり方もあります。しかし、今回の場合は、ゲノム編集も中国で現実に使われてしまったりということもありました。そういう意味では、かなりの現実的なところまできていて、我々としてもある程度規制も意識した報告書にしないと、意味がないかなというのが1つです。瀧木先生がおっしゃったように、おそらくまだ技術はどんどん進歩して、出来上がった頃には、もしかしたらそれが全然役に立たない過去の議論になってしまう可能性も秘めているような気がします。こういった基本的な技術の基にある治療に使う上での根本的な注意点は、どうしても入れなければいけないかなと今回のケースに関しては考えています。

○島田委員

ずれていますね。これは points to consider を作るのではないのですか。だから、規制ではないのですよ。縛るというのではなくて、何を考慮するかというものを作ろうという専門部会ですよね。ですから、私はこの方向でいいと思いますが。

○小野寺委員

私もそう思っています。ただ、今、in vivo 遺伝子治療遺伝子の臨床研究や再生新法に基づく ex vivo 遺伝子治療でゲノム編集の定義や規制が各指針や法律で改訂されています。ですから、先生がおっしゃるように、これをベースに活かしていかないとどうしても齟齬が生じてしまいます。ここは、points to consider の形で科学委員会親委員会に提出し、それを各指針のなかで改訂や法律の改定で取り込んでもらえればと私は思っています。

○小澤(敬)副部会長

前も発言したことがありますし、どこかにいろいろ書いてあるのかもしれませんが、やはり対象疾患によってリスクの考え方は大きく違っ

てくると思います。遺伝性疾患の場合にはかなり細かいことを要求されるでしょうし、一方でがんを対象にするには、今のテクノロジーでもある程度のリスクがあっても許容されるという方向もあるでしょうから、対象疾患によってこのリスクの考え方がかなり違うというようなことも、序論のどこかで少し触れてあるかもしれませんが、しっかり書いておいたほうがいいかなと思います。

○山口部会長 多分その辺りも重要なポイントかなと思います。X-SCID のときでも、海外でも臨床試験そのものは止めなかったですね。やはりベネフィットが非常に高い場合には止めないでいくという、ベネフィットとのバランスを考えていかないといけないと思います。その辺りは、ひょっとしたら最後の治験に対する考慮事項にも入ってくると。そういう場合には、長期フォローアップなどを考慮してくださいという話を、きちんと書かないといけないのかなとは思っております。

○久米委員 先ほど今泉先生からもお話があったと思うのですが、多分この科学委員会は扱っているものがいろいろと違って、発展段階があります。例えば、医薬品などの場合は、評価の方法や考え方に長い歴史があり、ある程度確立したところに新たな倫理的な問題やそういうものが出てきたので、これをどのように入れていくかという科学の考え方が前面に出てくるでしょう。例えば、その科学委員会の中でも、多分 ES や iPS といったものときには、どうしても物自体のフィールドがまだ未成熟というか新しいので、それがどんどん変わっている状況の中では、やはりどのようなどころを考えなければいけないかということまで入ってくると捉えているのですが。

○山口部会長 ありがとうございます。よろしいでしょうか。濡木先生、この前オフターゲットの効果で、「効果」が議論になったことがあります。効果の訳がエフェクトになっていますが、効果というのはエフィシエンシーにも聞こえてしまいますので。日本語の訳として、オフターゲットエフェクトですよね。

○小澤(敬)副部会長 オフターゲット作用がいいのか、オフターゲット変異がいいのか、効果というとあまりにもポジティブな作用みたいなので。

○濡木氏 そうですね。中庸で言えばオフターゲット活性なのかもしれませんが、作用なのか。

○山口部会長 ありがとうございます。お忙しいところ申し訳ございません。ほかに、よろしいでしょうか。資料3そのものがまだマチュレーションしていませんので、議論が深められなかったところもあるかと思えます。今後、今日説明いたしました内容について、第1部のことではなくて文書上の修正

というよりも、例えば先ほど小澤先生からの御指摘がありましたような、リスクベネフィットの議論などを追加したほうが良いというようなコメントをいただくと、WG ではその辺りをきちんと含めた上で、文書を修正させていただければと思っています。2、3週間ほどで素案をもう一度作り、皆さんに先に送付させていただくことになるかと思えます。それを踏まえて、次回 WG でも議論しますし、この場でも再度議論をさせていただければと思っております。本日の議論は、ここまでといたします。最後に、事務局から何かありますか。

<その他>

○事務局(下川) 次回の専門部会は、5月27日(月)14時から16時の開催を予定しております。詳細については、追って御連絡をいたします。

<閉会>

○山口部会長 本日はお忙しい中、ありがとうございました。