

## 第4回ゲノム編集専門部会

日時 令和元年5月27日(月)

14:00～16:00

場所 PMDA会議室21～24(14階)

5

<開会>

○山口部会長　それでは定刻となりましたので、第4回ゲノム編集専門部会を開催いたします。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についてお願いします。

<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。当専門部会は13名の委員のうち、本日は全員御出席いただいております。親委員会からは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に京都大学iPS細胞研究所の堀田秋津先生にお越し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、資料が1から5までありまして、資料2と資料3は枝番が1と2それぞれ付いております。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。資料は内容に応じて、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2-1と資料3-1を除きまして全て取扱注意になっておりますので、御注意願います。事務局からは以上でございます。

<ゲノム編集に関するご講演と意見交換：Ex vivoおよびin vivoゲノム編集治療でのオフターゲット変異リスクをどう考えるべきか？

(京都大学iPS細胞研究所(CiRA)臨床応用研究部門堀田秋津特定拠点講師)>

○山口部会長　それでは早速議題に入りたいと思います。先ほど事務局から御紹介がありましたが、本日は京都大学のiPS研究所(CiRA)の堀田秋津先生に御講演いただくということでお願いしております。堀田先生はCRISPR-Cas9のゲノム編集技術を用いて、他家移植の際の免疫拒絶のリスクの少ないiPSを作るという開発を行われており、また、筋ジストロフィーに関するゲノム治療法の開発なども行っておられると聞いております。まず堀田先生に御講演いただき、ゲノム編集のオフターゲット作用と安全性の評価について御講演の内容に沿った形で議論をさせていただければと思っております。それでは、堀田先生から30分程度で御講演をお願いできればと思います。よろしく願いいたします。

○堀田氏　よろしく願いいたします。本日は皆様お忙しい中、貴重な講演の時間をいただきまして、誠にありがとうございます。先ほど御紹介ありましたとおり、私どもの研究室では、iPS細胞を使った再生医療において、

iPS 細胞をより高度に高機能化するというところにゲノム編集を用いています。これは分類で言うと、ex vivo ゲノム編集治療と言えなくもないかと思えます。おそらく我々の感触では、こちらが国内においては一番早く臨床に入る段階に行くのではないかと見ておりますので、本日はまず iPS 細胞を用いた再生医療の話を中心に時間を割いてお話させていただきたいと思えます。もう1つは、我々は筋ジストロフィーに対する in vivo のゲノム編集治療の開発も行っていて、ただ、こちらはまだ研究開発段階ですが、実際に臨床でどういう形でいけるのかということはまだ固まっておられません。ですので、そこは議論のところではフォローアップさせていただければと思えます。

まず、最初のところですが、iPS 細胞は皆様御存じのとおり、患者又は健常なドナーから樹立可能です。いろいろな分化細胞へ用いることができるので、最終的には細胞製剤が患者に移植されるものということに再生医療の場合はなります。ここにおいてゲノム編集を iPS 細胞の段階で施すことによって、今まで iPS 細胞が持っていなかった機能を付加する、あるいは iPS 細胞をより多くのドナーに使えるようにするといったような高機能化がゲノム編集を用いることによってできる。これによって将来的な ex vivo 細胞治療というところにつながるのではないかと考えております。

もう一点は、ゲノム編集を直接難病の患者にデリバリーすることによって患者の遺伝子変異をゲノム編集で治せないかということも研究を進めておりますので、こちらにも最後に触れさせていただきたいと思えます。まずは健常者由来の iPS 細胞を用いて何らかの疾患患者に移植するという、細胞治療の ex vivo のスキームから御説明させていただきます。

まず、iPS 細胞においては、今、一番最初に国内で始まった高橋政代先生の加齢黄斑変性の場合には自家 iPS 細胞、要するに患者自身の iPS 細胞を樹立して、それを網膜上皮に分化させて移植するという形を取られました。

2例目のほうでは、他人由来の HLA 型を合わせた iPS 細胞を網膜上皮に分化させて移植するという形を行いました。こういう形の再生医療が進行しつつあるのですが、一般的に他人由来の iPS 細胞を使う場合、細胞表面に出ている HLA の型が不一致ですと、それによって宿主側の T 細胞又は NK 細胞の攻撃を受けてしまう。免疫拒絶を受けるとせっかく移植した細胞が拒絶されてしまうということになるので、HLA 型は合わせていくというのが基本かと思えます。

我々は最近ここにゲノム編集を施すことによって、HLA の遺伝子の要ら

ない所を削ってやるという考え方によって、HLA を一部だけ欠失した細胞というものを作り出しました。この削り方が味噌なのですが、HLA-A と B という遺伝子が一番多型も多く、かつ免疫拒絶に一番大きな働きをしている HLA 遺伝子になりますので、まずはそれを削っておいて、HLA-C を残しておくということによって NK 細胞の活性化を抑えることができるというのが我々の方法の要になります。この方法によって実際に T 細胞と NK 細胞の攻撃を *in vitro* の血球混合試験等で防ぐことができるということ最近、論文報告させていただきました。

この論文におきまして、我々は CRISPR-Cas9、これは Cas9 タンパク質とガイド RNA を iPS 細胞にエレクトロポレーション(電気穿孔法)によって導入するという形で HLA 遺伝子の破壊を行いました。ゲノム編集の方式としては、HLA 標識遺伝子の所を CRISPR-Cas9 で切って、いわゆる NHEJ で修復される過程で欠損を誘導するという方法になります。それによりまして HLA 遺伝子のタンパク質コーディング領域にアウトオブフレームを誘導することによって、HLA タンパク質をできなくするということが基本的なゲノム編集の使い方になります。ただ、ほかの先行類似研究と違うところとしては、HLA-A と HLA-B を完全に欠損させる。HLA-C の場合は、片アレルずつ違う型の場合はより合わせやすくするために、もう片アレルを潰して片アレルだけ残しておく。あとは、クラス 2 という HLA のほうも潰すためにまた違う CIITA という遺伝子も潰しているの、合計最大 7 アレルを iPS 細胞で破壊することを行うことによって、我々の目的とする HLA 改変 iPS 細胞というものを作り出すことになります。

ゲノム編集を使われている方は御存じかと思いますが、Cas9 は確かに高効率ですけども、1 か所切る効率が仮に 50% だとすると、合計 7 か所切ろうとすると、50% の 7 乗の効率なので、実は 1% 未満、要するに全て 7 か所同時に切れる細胞集団というのは理論的には 1% 未満なので、こちらは非常に樹立が大変だったのです。ですので、なかなかこのような多重遺伝子領域を同時に切るといのは今まで難しかったのですが、我々は色々な技術的な工夫を加えることによってこれに成功しました。

いくつかコツはあるのですが、1 つは、きちんとゲノム編集が起こっている集団だけをソーティングすることを行っています。これによって、もともとゲノム編集効率が 50% ぐらいだったものから HLA が欠失した細胞をソートすることにより、欠失挿入が入った株が 100% になっている。オレンジ色のゲノム編集が起こっていないところがない状態ということをソートすることによって作り出すことができます。

ここでちょっと面白いのが、HLA というのがパターナル(父親由来)、マ

ターナル(母親由来)で配列が少し違う所があります。それを片方のアレの特異的なガイドRNAでターゲットしたところ、ターゲットアレルのA\*02という方はきれいにインデルが入っているのですが、ターゲットアレルでないほう、いわゆるオフターゲットにおいては3か所のミスマッチがある限り一切インデルが入っていないということが確認できましたので、少なくともこれぐらいミスマッチを入れておけば、十分アレル特異性が出せるほどCas9は特異性が高いということが分かったわけです。

このような形でHLA-A\*02アレル、B\*02アレル、Cの片アレル、CIITAという遺伝子の7か所を壊したiPS細胞はこちらになります。2株作成して確認しているのですが、CD8陽性のキラーT細胞、CD4陽性のヘルパーT細胞、そして、CD56陽性のNK細胞において、いずれも免疫反応の活性化が起こっていない。ここで免疫細胞が活性化すると増殖して、CFSEがネガティブな所に出てくるはずですが、出てきていないということで、このようにちゃんとT/NK細胞の攻撃を避けられるiPS細胞ができたということです。

このようなiPS細胞は、将来的には我々の京都大学CiRAでこのiPS細胞を作製して、京都大学あるいは連携機関のほうで計画されている各種再生医療のほうに将来的に使っていただけたらいいなと考えております。

もう一点は、我々が実際にin vivoで患者の体内でゲノム編集を行えないかというところでターゲットにしているのがDuchenne型筋ジストロフィーという疾患になります。筋ジストロフィー全体が指定難病に登録されているのですが、Duchenne型はその中でも重症のタイプに分類されます。徐々に運動機能が低下して行って、10代の頃には自力歩行ができなくなって電動車椅子の生活になるということです。更には30代、40代になると、今度は呼吸筋、心筋もやられてしまうので、その結果、平均寿命が40歳にいくかいかないぐらいという、かなり重篤な疾患です。こちらはX染色体上にあるジストロフィン遺伝子の欠失によってタンパク質ができないことが原因であることが昔から分かっています。我々は、もともとアンチセンス核酸の研究で行われていたエクソンスキッピングという手法にヒントを得て、こちらをゲノム編集でできないかということで、少し前になるのですが、患者由来のiPS細胞を樹立しまして、実際にCRISPR-Cas9を用いてゲノムレベルでエクソンスキッピングを誘導してやることに成功しました。どういうことかと言いますと、もともと患者は、とあるエクソンが欠失しているせいでアウトオブフレームになっていて、プレマチュア(未成熟)ストップコドンができていたのですが、こういうプレマチュアストップコドンができていたエクソンをゲノム編集で削っ

てやると、ちゃんとインフレームでメッセンジャーRNAがつながってジストロフィンタンパク質が最後まで翻訳されることになります。その結果、ちゃんと機能性のジストロフィンタンパク質が発現してくるということを証明した訳です。

この方法は、この当時はiPS細胞だけだったのですが、その後、世界中でin vivoゲノム編集治療法開発に向けて熾烈な研究、開発競争が進んでいます。in vivoがなぜ難しいかということも1枚のスライドでまとめています。先ほど申し上げたとおり、Duchenne型の患者は全身の骨格筋が侵されます。骨格筋は基本的に成人男性の場合、大体、体重の4割が骨格筋です。ですので、およそ14兆の細胞が骨格筋で、この全身の遺伝子変異を一度に治してやることは難しいと考えられます。

欧米の多くのグループから最近出ている論文では、様々なモデルマウスとか、最近ではイヌモデルも使われているのですが、どのようにCRISPR-Cas9を筋組織に送達するかということでは、多くのグループがAAVベクターというものをを用いてCRISPR-Cas9とガイドRNAをデリバリーしています。AAVベクター自体は遺伝子治療の分野で実績のあるベクターなので、研究としてはこれで大丈夫かなと思います。本当にこれで臨床は大丈夫なのかという懸念もあります。

AAVベクターを患者に投与すると、これは骨格筋に注入しているのですが、AAVベクターの発現が10年、15年残ることが既に臨床で報告されており、治療用の遺伝子であれば10年、15年続いてくれたほうが良いのですが、CRISPR-Cas9をAAVに搭載して10年、15年発現し続けるということは、オフターゲット切断リスクを高めるだけだと思いますので、そういったリスクは十分考える必要があるかということです。

実際に最近、デューク大学のグループが『Nature Medicine』に発表した論文になるのですが、CRISPR-Cas9をAAVでデリバリーした場合に、インデルのほかにAAVベクターのゲノムの断片が、切った部位あるいはオフターゲット部位に挿入されていることが、想定以上の頻度で起こっていることを報告しています。ですので、AAVを用いたCRISPR-Cas9のデリバリーというのは、特に注意が必要になるのではないかと考えています。そうなってくると、AAV以外の一過性の送達技術として、CRISPR-Cas9を一過性に筋組織に届けて、一時的にCas9が働いてくれるが、ターゲットサイトを切った後には消えてくれるというような新しいタイプの送達技術が、これは絶対に必要になってくると思います。これはオフターゲットを減らすという意味でも非常に大事でして、数々の論文でも示されています。例えばCas9の発現量、どんどんPlasmid DNAの量を増やしてい

くと、オンターゲットの切断活性は上がりますが、同時にオフターゲットの切断リスクというのも増えていくということなので、やはり最適なドース(用量)、つまりオンターゲットはしっかり切れるけれども、オフターゲットはあまり切れないというようなドースのコントロールというのが大切になってきます。導入する形によっても、これは Plasmid と Cas9 タンパクの比較ですが、当然タンパク質だけですと一過性に働いて、あとは細胞内から分解されて消えていきます。一方、Plasmid DNA の場合は、こちらのドットのラインになりますが、このように遅れて発現してきて、だらだらと細胞の中で発現が持続するという形になります。ですので、できれば前者のような一過性の発現ピークのタイプが望ましいのではないかと考えます。

ここまでを踏まえて、我々の考えるゲノム編集のオフターゲットについてポイントを整理してみました。考えれば考えるほど非常に難しいなと思いますので、是非、皆様の御意見を賜りたいと思います。まず、ゲノム編集のオフターゲットといった場合に、よくオフターゲット変異とオフターゲット効果あるいはそれ以外のものというのがごっちゃになっているかと思うので、今日、議論をしやすくするために整理させていただきたいと思います。

ゲノム編集はまず CRISPR-Cas9 がターゲットの DNA に結合します。結合した後、DNA に切断を入れるのですが、切断された DNA がきれいに修復されて戻ることもあり得ます。そうすると、Cas9 が離れた後も配列としてはあたかも変わっていないように見えるのです。ただ、DNA 損傷は確かに入っているはずなので、DNA 切断すること自体で細胞の DNA 損傷パスウェイが働いた結果、細胞周期が止まったり、遅れたり、あるいはアポトーシスが誘導されたりということは起こり得ます。ですので、オフターゲットで切断すること自体も広い意味ではオフターゲット効果に入ってくるのかなと思います。一方、一度 DNA 切断が修復されたとしても、何回も Cas9 は切り続けることができます。その場合に一定の確率で、例えば NHEJ のような DNA 修復が起こった際、結果的にインサクションやデリクションといった塩基変異が起こる。そうするとやはりガイド RNA が結合できないので、DNA 切断はそれ以上起こりませんが、ゲノム DNA を見ると塩基配列変異が残って見えます。これが多分、一般的に皆さんが危惧されている、例えばがん化といったものにつながり得るリスクに結びつくのではないかなと思います。最後に、オフターゲット効果といった場合には、こちらの上で起こる全ての現象(結合、切断、変異)を合わせた上でその細胞なり個体なりに何が起こるのかという形で理解すべきかなと思

います。

では、オフターゲット切断とオフターゲット変異のところはどのような検出方法があるかということに関して、これも非常に多くの研究論文が出ていまして、全てカバーできているとは言いませんが、いわゆる網羅的に見るような方法が多くあります。ただ、そういった報告は基本的にがん細胞株(293T)のような、いわゆるセルラインを用いてアッセイをされています。がん細胞はもともとDNA修復機構がおかしくなって、293Tに至っては核型もぼろぼろになっています。このような細胞で当然ゲノムのインテグリティ(完全性)のテストが完璧にできるわけではないので、アッセイの一貫としては有益かなとは思いますが、これだけで臨床への外挿性をディスカッションするのはちょっとナンセンスかなと思います。

一方で、我々も含めてESとか、iPS細胞を用いてゲノム編集をやっているグループがたくさんあります。こちらは網羅的な解析がなかなか難しいのですが、例えばゲノム全体のエクソームを読むとか、ホールゲノムを読むといったことでオフターゲットの変異がないかなというところを見ていったときに、これらの論文、我々の論文も含まれているのですが、基本的に大きな変異というものは今のところ見つかっておりません。マウスを用いた例でも見つからなかったという報告と、たくさんオフターゲットが見つかったという論文(この論文はすでに撤回されています)の両方が出ていますが、見つかったという論文をよくよく見てみると、CRISPRをPlasmidで入れていたりとか、マウスの系統を揃えていないなど、少し変なことをやっているもので、そういった実験の方法にもかなり注意する必要があるのかと思います。

ほかにいただいていた宿題として、どのように特異性の高い標的配列の設計を行うかというところで、ガイドRNAの設計に関しては既に、非常にたくさんのWebツールやソフトウェアというものが開発されて、報告されています。ただ、基本的にはどれだけオフターゲットの予想サイト数があるかないかというものを基準とするものが多いです。それぞれ使い勝手に差があるのですが、我々は以前、数あるソフトからある程度、横断的にどれがいいのかを試してみたくて、同じ13種類のガイドを用意して、それをそれぞれ違うCRISPRガイドRNAデザインツール、ここでは4種類ですが、これに当ててみて、実際にどれだけオフターゲットが検出されるかという実験を行ってみました。また、ゲノム上で似た配列を探すというのは、これは昔からコンピューターソフトウェアの業界にある相同配列サーチの問題になりますので、同時比較として右側にはBLASTとか、Bowtieとか、あと内藤先生が開発されたGGGenomeといったような既存の



類似配列を探すプログラムというものも並べて、実際にどれぐらい似た配列を探す検出力があるかということを検証してみました。一応基準として、当時一番よく使われていた MIT ブロードの開発した CRISPR Design というものを基準に 13 種類のガイドを並べてみると、大体傾向としてはそろっているかなと言いつつも、違うプログラムによって検出されるオフターゲットの絶対数とか、傾向が違っていることが明らかになりました。ですので、この中でどれが一番ベストですかというのは、結局我々も答えは出せませんでした。おそらくこれは何を基準に見るかによっても変わってきますし、ここら辺のアルゴリズムがちょっと違うだけでもどんどん変わってきてしまうということで、なかなか一義的な答えを出すのは難しいところかなと思います。ただ、これを人の目で全てやるのは絶対に不可能ですので、いいガイド RNA を作ろうと思ったら、少なくとも 1 つ以上のこういうソフトを併用して、標的配列と全く同じ配列がゲノムの他の所にあつたらそこも確実に切ってしまうので、そういったものは極力省く必要があると思います。また、オフターゲットの数は選べるのであれば、少ない方が無難であろうと。これはコンセンサスとして間違いないかなと思います。

ただ一方で、我々は患者の治療を目指しての遺伝子変異部位を修復するというような研究を多く基礎研究で行っているのですが、変異の部位というのがある特定の場所にしかないケース、あるいは遺伝子変異を治すためにはここしかないというケースが非常に多々ありまして、その場合、ガイド RNA の選択肢がそもそもないケースというのもあります。こういった場合に、では、オフターゲットリスクが増えるから、治療効果が落ちても遠い所に設計しようかということになるかということ、私は今の段階では、やはり治療効果をまず最大化するようなガイドを設計して、その課程でオフターゲット変異や効果のリスクを検証していくのが、現時点ではそういう方向になるのではないかと考えます。

あとは、オフターゲット切断、変異の検出方法に関してです。こちらも釈迦に説法かもしれませんが、様々な方法が報告されています。細胞を使う方法ですが、ダブルストランドブレイク (二本鎖 DNA 切断) 部位にタグを挿入する GUIDE-seq、染色体の転座を検出する HTGTS、あと、ダブルストランドブレイクの DNA 損傷をラベルする BLESS、あとは *in vitro* で裸のゲノム DNA と Cas9 タンパクと gRNA を作用させて生化学的にどこを切るかを見る Digenome-seq 又は CIRCLE-seq という方法になります。これも先ほどと同じ議論で、どれがいいどれが悪いというのもなかなか難しいところで、目的によってケース・バイ・ケースかと思えます。

使える細胞においてはこういったものを用いる形もありえると思うのですが、例えば iPS 細胞ですと、そもそもタグのトランスフェクション自体が難しかったりするので、なかなか感度良く GUIDE-seq を iPS 細胞で行うというのは難しいところもあります。その点、裸のゲノムと Cas9 を混ぜ合わせる方法というのは、そのガイドが生化学的に酵素としてどこを切り得るかというところを抽出するという意味ではかなりリーズナブルな方法かなと思いますが、ただ、これも決して万能ではありません。

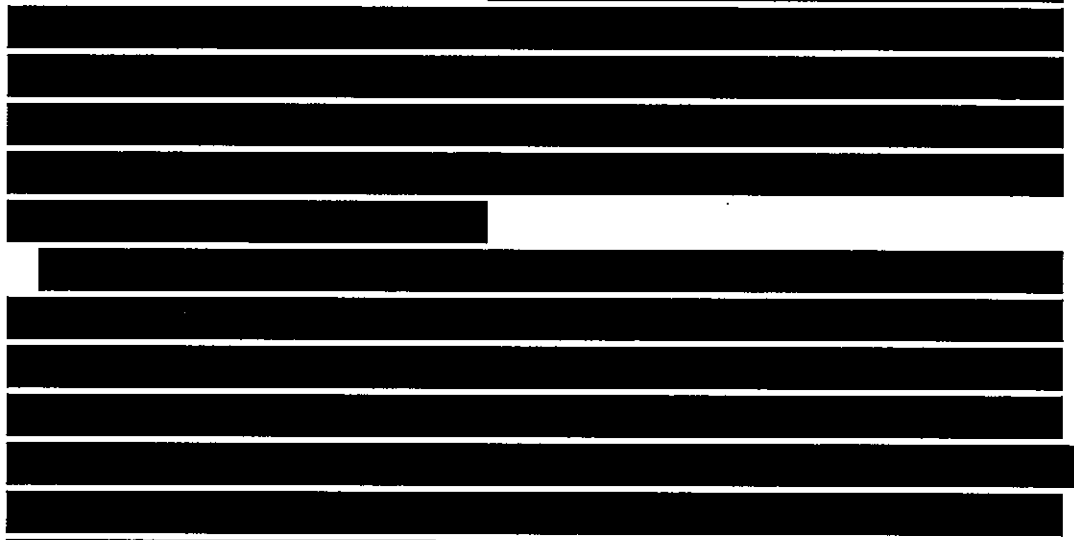
では、変異をどう見ていくのがいいかというと、結局 iPS 細胞の場合はプロダクトベースで考えていくしかないかなと考えております。変異があるなしの検出方法についても、皆様、おそらく次世代シーケンサーを用いたホールゲノムシーケンシングという方法が真っ先に思い浮かぶかと思いますが、これをやれば全てのゲノム変異を検出できるかということ、実はそうではありません。例えば、難病で診断の付いていない患者のホールゲノムを読んだとしても、原因遺伝子が見つかる割合というのは大体 3 割ぐらいだと言われております。要するに 7 割の場合は、そもそも病気という明らかなフェノタイプが出ているのに、ゲノムのどこに傷があるせいでそういうことが起こっているかというのを今の科学では解明できないということになります。さらに、1 塩基レベルでの小さな変異というのは比較的検出が得意なのですが、染色体レベルでの組換えというのはまだまだクラシカルな核型解析 (G-band) とかのほうが得意ですので、やはり両方を組み合わせていく必要があるのではないかと思います。

これは、実際にとあるガイド RNA を用いてどの程度オフターゲットのリスクを評価し得るのかということを我々のほうで実験してみました。まず、ナンバー・オブ・ミスマッチです。ミスマッチの数を 1 塩基、2 塩基、3 塩基とだんだん増やしていくと、指数関数的に類似配列というのは増えていきます。当然 9 ベースのミスマッチを許すというのは 23 ベース分の 9 ベースミスマッチなので、かなりたくさんの領域がゲノム上に似たような配列がどこかしら見つかるということになります。

そこで Cas9 がどこに結合しているのですかということで、これは Cas9 に対する ChIP-seq のデータを拾ってきまして、どこに結合しているのかと見てみると、結構 6~8 ベースミスマッチのサイトのかなりミスマッチが多いところに Cas9 が張り付いていることが見えてきます。一方で、GUIDE-seq でダブルストランドブレイクが起こった場所というのは、大体 3、4 ベースミスマッチのサイトに多く出てくるということで、そもそも Cas9 が結合する場所と切断する場所が根本的に違うということになります。更に言えば、MIT の作った CRISPR Design のような予測ツールという

のは、そもそもミスマッチの数は増やしていけば増やしていくほどオフターゲットかもしれないサイトというのが飛躍的に増えてしまうのです。研究者は結局、こんな何十万サイトと出てきても、全て調べることは不可能なので、大体 3、4 ベースぐらいまでのミスマッチしかソフトウェアの仕様として調べられないということになっています。そうなってくると当然ここまでしか見えないので、こうやって出てきたオフターゲット予測サイトが本当に実際の切断部位と相関するののかというのが、次にスライドを出しますが、大事なところになってきます。

こちらは最近流行の機械学習とかを使ってオフターゲットを探すという研究で、これは実は ChIP-seq のデータを基に学習させているので、この予測データとこの ChIP-seq データは似たような相関になっているということになります。では、この結果が実際にどの程度相関しているのかというのがこちらの図になります。



です。ですので、今のところ、どのオフターゲット予測ツールを使っても、これなら大丈夫というものは残念ながら無い。これが残念ながら現状の技術的限界かなと思います。ですので、我々のほうはプロダクトベースの解析というのを一生懸命やっています。こちらは先ほどのように HLA のところを 5 か所、6 か所、7 か所を切断した iPS 細胞において、場合によっては 2 回に分けてゲノム編集をやっている株もあります。7 か所同時に 1 度に破壊するのは難しいので、まず 4 か所ぐらい破壊してから残りの 3 か所を 2 回目にやるということもやっています。ちょっと複雑ですけども、トータルで 15 ライン、ゲノム編集を経た iPS 細胞の核型解析を行いまして、基本的にかなり高精度の Q-band 解析を行ったのですが、非常にきれいな核型でした。1 株だけ、クローナルに変な染色体異常があった株もあるのですが、これは実際に一部転座が起こっ

ているということを確認しています。ただ、この転座が起こったであろうローカス、M-band で絞り込んで、そこにオフターゲット切断部位がないのかなと探したのですが、残念ながら原因と言える類似配列を特定することはできませんでした。これがゲノム編集のせいなのかそうではないのか、今の段階では我々は結論することはできないという状態です。ただ、iPS 細胞を培養してサブクローニングするだけでこういう核型異常がまれに出てくるといえるのは、ゲノム編集以外の実験でも我々は経験しているのです、やはり iPS 細胞を臨床に使うときには、核型の解析でちゃんと正常核型であるということ調べるのは大事かなと考えております。

こちらはタンパク質コード領域をエクソームシーケンスで網羅的に解析しました。こちらでもデプス 100 ぐらいの、かなり深読みをして、1 塩基置換とか、インデルの検出を行いました。我々はゲノム編集を行う前の株をリファレンスとして、そこからどれぐらい増えているかを見ていますが、数個とか、数十個というのは普通に iPS 細胞をサブクローンするだけでも出てくる数です。ただ、その欠失挿入が起こった場所が問題でして、例えばここに赤字で示しているのは、PMDA のほうでがん関連遺伝子としてリストされている遺伝子でして、こういうがん関連遺伝子に欠失挿入の入ったクローンがまれに引っ掛かってくるものがあります。こういった株というのはやはりリスクが高いと考えられるので、外していくべきかなと考えます。

これが本当に培養のせいなのか、あるいはゲノム編集のオフターゲットのせいなのかということも非常に大事なポイントかなと思って、我々はそこも一生懸命解析を行いました。こちらが我々が使ったガイド RNA で、それぞれのガイド RNA について最大で 9 ベースのミスマッチまで許容して、ゲノム上にある似た配列を全て抽出しました。ここまで数があると、実はゲノムの大体 1 キロベースごとに 1 か所はそういう配列があるという計算になります。ですので、9 ベースまでミスマッチを許して探すというのは相当厳しい目で見ている状態になります。こちらが実際にその 1 例になります。お手元の資料には入れていませんけれども、

この黄色が実際に我々がオンターゲットとして使ったガイド RNA になります。分かりにくいかもしれませんが、ここはちょっと削れていますけれども、コノ字に削れている所がオンターゲットで、片アレルだけ削った領域になります。上のクローンも片アレルだけ削れているのですが、これは大きなデリションなので、こういう形でここにデリションが起こっています。それ以外の株というの

は、違うガイド RNA を使っているのだからここでは切れていないということになります。目のいい方は、色が2種類あるかと思いますが、これはパターナルとマターナルの SNP が両方あるということで、2 アレルがインタクトであるということが確認できます。

一方で、ほかの赤で示したものが、これが先ほど言った最大9ベースまでミスマッチを許したときのガイド RNA の類似配列ということになります。これだけ沢山ある中で、では、どれがオフターゲットなのかということを見ていかなければいけない訳です。ここを注目していただきたいのですが、ここもちょっとへこんでいる塩基欠失があります。これは全ての株で欠失があるので、これはもともと iPS 細胞のドナーが持っていたものだというように考えられます。ただ、こういった所というのは、ガイドの類似配列が真上にならないということで、この2つの情報から、ここはおそらくゲノム編集のせいではないのだと言えるのかなということになります。ホールゲノムシーケンスをやってこういうインデルがある度に、こういう解析やって初めてそれがゲノム編集のせいなのか、そうではないのかということが推定できることを御理解いただければと思います。人の目で1個1個やっていくと大変なので、網羅的な解析も行いました。全ての9ベース以下のミスマッチのサイトをセンターに持ってきて、見つけたインデルの場所がどこに分布しているかというのを見ています。

緑色の線はオンターゲットを含んでいまして、HLA のローカスで切れた箇所というのが含まれています。そうすると、ガイド RNA の PAM の3ベース上流ですが、ちょうど Cas9 が切断する所のちょうど真上に非常にきれいなピークが出ています。要するに、オンターゲットのインデルというのが我々のホールエキソーム解析でしっかり検出されていて、Cas9 の切断部位に出てくるときには必ずここで検出できるということが確認できました。その上で、オンターゲットの HLA 遺伝子のインデルは全て除去して、残りのインデルの分布を見たところがオレンジのラインになります。オレンジのラインもベースにこのようになっているのですが、Cas9 の切る所にはほとんどピークがない。かつ、これ(紫色のライン)はランダムにインデルの位置をコンピューターでソフトでシミュレーションしたものです。それとほとんど差がないということで、基本的にほとんどのインデルというのは iPS 細胞が培養の段階でランダムに獲得したものだということと言えるかと思います。

臨床用 iPS 細胞の場合、我々は今のところ、このスライドに示すような検査項目を経て iPS 細胞の出荷を行っております。赤字の所がいわゆる出荷試験ということで、試験で一定の基準を満たしていない場合は我々は

出荷をしないという試験項目になります。黒字で書いてあるものは、ゲノムの解析とかも含まれるのですが、これを我々は参考試験と位置付けておりまして、解析してちゃんとデータも開示するのですけれども、その結果でノー又はゴーを必ずしも判断しないというのが参考試験になります。ここに核型解析とか、先ほどのホールゲノムの解析というのは実は入ってきています。これは要するに、もともと我々、人間一人一人のゲノムがばらばらすぎて、どこにどういう傷があったらこの株は駄目だ、いや大丈夫だというのが、まだ科学的に断言して言える段階ではないのですね。がん関連遺伝子、例えば p53 とかに傷があった場合は、それはさすがに出荷しないけれども、それ以外のところに関しては、慎重に様子を見ながら進めていきたいと思いますというスタンスです。

実際に COSMIC Census の遺伝子リスト、柴田リストというのが次のスライドになりますが、こちらは iPS 細胞の安全性の議論のところ、だいぶ以前からどういう形で iPS 細胞のゲノム安定性を評価するのかという議論から出てきたリストになります。1 つ、ゲノム編集のオフターゲットで、こういうところに変異があったらいけないだろうというときの基準のリスト、参考にはなるのかなと考えています。

最後のスライドです。iPS 細胞の場合は先ほど述べたような形として、では今度、in vivo ゲノム編集の場合はどうするのかということです。まずは in silico でデザインしたガイドの安全性というのはなるべくしっかり確認する必要がある。全くのど素人が適当にデザインしたガイドというのはやはりリスクがあると思います。それをまず細胞レベルでの確認というのが大事かと思えます。患者に使うガイドというのは、ヒトのゲノムに結合するガイドになります。ですので、ヒトの細胞を用いてオンターゲットが切れるか、細胞に変なことが起こらないか、オフターゲット候補領域に変なことが起こらないかというような検査は行うべきではないかなと我々は考えます。難しいのが in vivo の試験です。これは本当に皆様と是非議論したいところですが、ヒトのゲノムに結合する gRNA をマウスでそのままでは評価できないのです。では、配列を変えてマウスで評価するのか、あるいはマウスのゲノムのターゲットをヒト化して評価するのかといったことが考えられます。もちろんコストも時間も掛かるので結構大変な評価になります。そういった切る切らないは置いておいて、とりあえず製剤として毒性がないというのを評価するのも、これもまた別に大事な観点かなと思うので、そういった試験が考えられるかということです。

最終的に患者でこれをどうやっていくのかというのは非常に難しい問題

で、我々は基本的に筋注というか、筋肉でのゲノム編集を目指しています。打った後にそもそも治療効果があるのかということを確認するために、もちろん筋力の測定とかも行うのですが、最終的にモレキュラーレベルで治ったかどうかというのは、患部の筋肉を筋生検で取り出して検査するしかありません。当然、ターゲットにしているジストロフィンが治っているかというのが一番クリティカルな、メジャークリティカルアウトカムになるわけなのですが、オフターゲットで見るために例えば経時的にゲノムを採取するとか、違う部位をあっちこちで採るというのは、見ていただいて分かる通り、非常に侵襲性の高い手技なので、例えば10歳の男児にこれを5か所やらせてくれというのはナンセンスなのです。ですので、vivoで本当にオフターゲットのリスクを確認するのは非常に難しい問題なので、そこも踏まえてどのような形でガイドライン等が出てくるかなというのは、私たちとしても非常に興味を持っているところですので、是非、議論させていただければと思います。すみません、時間がオーバーしてしまいましたが、一応、文字で書いてあるもののまとめは以上となります。御清聴、どうもありがとうございました。

○山口部会長

堀田先生、ありがとうございます。非常に、我々が作っておりますコンセプトペーパーに参考になるお話をいただいたように思います。それではまず、堀田先生の御講演の中で様々な課題についてお話をいただいたように思いますので、それを踏まえた形で御質問をいただければと思います。その後にコンセプトペーパーの議論をしたいと思います。

○谷委員

ゲノム編集に関する詳細な研究のご成果を發表いただき、大変ありがとうございました。5枚目か6枚目のHLA関連スライドで、ゲノム編集はアレル特異的で、別のアレルではインデルがなかったとおっしゃったと思いますが、このような高いフェデリティが得られたのはHLA遺伝子特異的なもののでしょうか、それとも他の遺伝子でも先生方の方法では同様に可能なのでしょうか。

○堀田氏

ありがとうございます。アレル特異的に切るというアプリケーションに関しては、HLA以外で我々自身はやっていないのですが、例えば実験動物で真下先生のグループをはじめ、1塩基でも違いがあれば切り分けられるという論文報告が複数のグループによってされております。あと、我々はオフターゲットのほうは結構しっかり見ていまして、2ベース、3ベース以内の、いわゆるすごくよく似た配列というのは毎回見るようにはしているのですが、一般的に今までiPS細胞でほとんど変異導入は見られません。我々が見た中で1回だけオフターゲットが切れているというのを1つの株で見たことがあるのですが、それ以外では1回も似た配列で切れた

ことがないので、かなり私たちの感覚としてはフェデリティが高いのではないかと考えています。

- 谷委員 繰り返しになりますが、HLA 遺伝子を対象としているからではなくて、ほかの遺伝子を狙っていても同じということですね。
- 堀田氏 そうですね。違う所、ゲノムのほかの所にも同じように言えるかと思えます。
- 谷委員 ありがとうございます。
- 水口委員 分かりやすいお話をありがとうございました。同じ所なのですが、理想的に再生医療がうまくいったとすると、ある臓器、あるいは組織の所で、HLA がない細胞がマジョリティになってしまうことによって何が起こるかとかと思いながら考えていました。質問は、HLA に実はスニップが入っていてストップコドンが入っているような人というのは、結構いるのですか。
- 堀田氏 ありがとうございます。実は結構いらっしゃるのです。HLA ヌルアレルというタイプになるのです。タンパク質が出ていないアレルをお持ちの方は結構いらっしゃいます。ですので、数個ない程度では大きな問題はないと考えられます。あともう一つ言いますと、先天性の免疫疾患で HLA クラス 1 欠損症というのがあります。その患者さんは比較的軽度の免疫不全なのですが、それ以外は基本的に正常ということが知られております。もちろん、抗原提示ができなくなることによる免疫不全なので、移植した細胞の HLA が欠失していると、感染症とか、あるいは腫瘍化したときの抗原提示能力が落ちることは考えられます。ただ、完全にすべての HLA を欠損しているわけではないので、一部 HLA-C とかほかの HLA を残していることで少しは抗原提示能力は残っているはずなのですが、その点は検証が必要なところかと思えます。
- 島田委員 同じような質問なのです。これ、では C を 1 個だけ残しておけば拒絶はされないのですか。
- 堀田氏 HLA-C については型を合わせるのが前提になります。
- 島田委員 ですから、先ほどのデータは細胞レベルのデータですよ。in vivo の移植でそれは拒絶されないのですか。
- 堀田氏 すみません、今日、スライドを持って来ていないのですが、HLA を改変した iPS 細胞をマウスモデルに移植した実験も論文の中で行っています。マウスでヒト細胞の免疫拒絶を見るは難しいですが、マウスに HLA を認識するヒトの T 細胞とか NK 細胞を後から移植するような人為的な実験系で見えますが、HLA-C の型さえ合っているヒト T 細胞、NK 細胞を移植する限りは攻撃を受けないことを確認しています。HLA-C の型は、10 種類ぐら



いそろえれば大体、日本人の95%をカバーできるという計算なので、こういうiPS細胞を10種類ぐらい作製すれば日本人の95%をカバーできるという試算になります。

○山口部会長 私から、そこで今、7種類ローカスを切るという話になります。この場合、ちょっと気になるのは、先ほど染色体解析の話にもありましたが、同時に切る、2回に分けられる場合もあるというお話でしたが、染色体の逆位とかそういうことも起き得る、それは検出され得るものなのでしょうか。それともそれほど起きないのでしょうか。

○堀田氏 ありがとうございます。御存じかと思うのですが、HLA座というのは、6番染色体の短腕のほうにクラスターを作っておりまして、特に、例えばBとCは結構近くてAはちょっと離れているのですが、これを同時に切ったときに、たまにその間で、例えばラージデリションのようなものが起こったものが、実際、我々もこの株を取ってくる段階で検出されています。ただ、マジョリティは結構、各個別の遺伝子の所が壊れたケースが多くて、大きな転座とかそういったものはやはり核型解析をしないといけないので、なので一生懸命核型解析もやったのですが、15株調べた中で14株は正常であった。1株だけ異常があったけれども6番染色体ではなかったというところで、それが我々が持っているデータになります。

○山口部会長 ありがとうございます。

○小澤(敬)副部会長 HLA-Cを残すというのは、NK対策として非常に面白いアプローチかと思いますが、HLA-Eを使うアプローチと比較して、メリット、デメリットはどうなのですか。

○堀田氏 ありがとうございます。HLA-Eを使うアプローチは、トランスジーンとして発現させるアメリカのグループが報告している方法で、ユニバーサル・セルズ社のβ2Mを潰した上でHLA-Eを強制発現させるという方法等が最近どんどん出てきています。御存じのとおり、HLA-EはNKを抑える機能はあります。ただ、HLA-CとEは違うNKレセプターを抑えています。HLA-CはKIRレセプターの2DL1、2というレセプターを抑えているのですが、HLA-Eのほうは、CD94/NKG2Aというまた違うレセプターでNKを抑えているのです。我々の検討では、HLA-EだけではまだNKを完全に抑えるには不十分で、やはりHLA-EとHLA-C両方残っていたほうがよりベターにNKを抑えられる。我々は、ここで示している通り、HLA-EとFとGとCを残すという形で、よりNKから攻撃されにくい形のものを作っていることになります。

○小澤(敬)副部会長 あと、HLAをいろいろ工夫するアプローチでは完全には免疫原性はなくならないでしょうか、やはり免疫抑制剤を減らす形になるという

ことですか。

- 堀田氏 おっしゃるとおりです。マイナー抗原との不一致というのは必ず起こりますから、そこに関しては、やはり低レベルの免疫抑制剤の併用は必要になってくるかと思います。
- 島田委員 先生のプロトコールだと、これは先の話なのでしょうが、では例えば、免疫的に排除されないようなユニバーサルの細胞ができたときに、これを移植するので、デュシャンヌを治療できるというプロトコールは考えられるのですか。
- 堀田氏 デュシャンヌ型筋ジストロフィーを細胞移植で治すのはかなりハードルが高いかと考えています。というのは、もう 30 年ぐらい昔から健常人由来の筋芽細胞の移植試験というのは非常に多く行われていた時代があったのです。筋肉というのは、筋線維がきれいに融合して初めて構造組織体を作るのですが、なかなか外から入れた筋芽細胞というのは筋線維に機能的な融合ができないのです。ですので、入れた細胞は細胞塊としてそこにいるのですが、筋機能の回復まではなかなかいかないと思うので、筋芽細胞という形での細胞移植は非常に難しいかと思います。ただ、例えば岡田先生などがやられていますが、間葉系幹細胞等を移植して、例えば炎症を下げるとかそういったアプローチはもしかしたらできるかもしれません。現時点では、iPS 細胞を介した細胞移植という形ではデュシャンヌ型治療はちょっと難しいかと考えています。
- 小澤(敬)副部会長 *in vivo*法でこの AAV ベクターを使うのはかなり一般的になっているようですが、そうすると、この CRISPR 等のゲノム編集ツールの発現期間がやはり長いのではないかという考え方もあると思うのですが、その辺、将来的な対策、工夫、何かありますでしょうか。
- 堀田氏 AAV ベクター自体は私自身は専門ではないのですが、例えば、アメリカのグループは、AAV ベクターから出た Cas9 が AAV ベクター自身を自分で切断するという自己不活性型の AAV ベクターを開発して、それで AAV が残る期間を短くしようとするような研究報告があることは存じ上げております。ただそれが、実際にどの程度効果的なのかといった辺は、ちょっと私は把握していません。
- 小澤(敬)副部会長 そうですか、では大丈夫です。
- 三谷委員 先ほどのがん関連遺伝子のリストをお示しになり、実際に HLA ノックアウトの細胞でその遺伝子に変異が見つかったということですが、ホールエクソームの結果なのでしょう。
- 堀田氏 おっしゃるとおりです。
- 三谷委員 ということは、クローニングした後に変異が見つかったものがあるとい

うことかと思えます。変異検出の感度はどれくらいでしょうか。要は変異はクローン中の100%に近い細胞に入っているのか、例えば、クローンを増やしている過程で10%の細胞に変異が入ったものは、検出されずにまだ落ちているかもしれないということなのですか。

○堀田氏

ありがとうございます。そこは非常に重要な所です。まず、これはおっしゃるとおりiPS細胞クローンの解析です。ですので、iPS細胞をゲノム編集して、バルク状態から数継代した後にシングルセルクローン化しているので、ゲノム編集の段階で、例えば数パーセントの変異が入っていて、たまたまそれをピックアップしたクローンというのもおそらく含まれていると思えますし、逆に、数パーセントの変異がピックアップしたクローンの中に含まれておらず、この中には出てこないケースもあると思えます。そういった意味で、感度というのは、今、ここでは全部で15株ぐらい見ているのですが、この15株で見れる範囲ということで、感度という意味では決して高い方法ではないかと思えます。

ただし、この15株において、この株が使えるかどうかについては、我々は、平均100ぐらいのデプスでシーケンスを読んでいて、エキソームの領域に関してのカバー率はほぼ100%に近い最新のキットを使っていますので、タンパク質のコード領域に傷がないことに関しての確からしさは相当高い検出方法であると言えるのかと思えます。ですので、我々としては、やはりプロダクトベースでできたiPS細胞、アイソレーターiPS細胞がちゃんと患者さんに使えるかどうかという判断をやはりしていくしかないかと思えます。

○三谷委員

あと、このミュートーションの見つかった細胞で、変異遺伝子のRNA発現への影響を御覧になりましたか。

○堀田氏

すみません、ちょっとそこまでは解析できていないです。

○三谷委員

ありがとうございます。

○岡田委員

今の質問と関係があるのですが、核型に関しては、直接、因果関係があるかどうか分からないということだったのですが、例えば転座とかで離れた所にあるエンハンサーが働く、機能しなくなるとかそういうことはあり得ると思うのです。どういう時期に細胞ごとによってどういう遺伝子発現が違うかというのはいろいろな事情が、タイミングでも違うし、場所によっても異なるのですが、そういうのを治療した後に追跡する方法はあるのですか。

○堀田氏

追跡は何を追跡するということですか。

○岡田委員

今のRNAとかもそうなのですが、エンハンサーが効果を、機能を失ってしまうことが、核型で遺伝子の所で潰れるというリスクは低いにしても、

エンハンサーに異常があったときに、そういったところを予想するようなツールというのはあるのですか。

○堀田氏 制御領域の機能異常を予測するツール、しかも臨床グレードの検査方法は私はすぐには思い付かないです。

○谷委員 ガイド RNA のデザインを目的として多くのソフトウェアがあるということですが、理論的には多分同じ事実からスタートしているのだと思うのですが、なぜそのようなバリエーションがソフトウェアに生じたのかというと、実験に使った細胞株が違ふとか、先生が先ほどおっしゃった、細胞株によっては非常に変異を有していることなど関係しているのでしょうか。

○堀田氏 まず、とある配列があったときに、その類似配列を探す方法というアルゴリズムが1つではないのです。違うアルゴリズムだと、例えば感度が違って来たりします。そういった意味で、まず違うソフトウェアによって違うアルゴリズムを使っているというのが1点と、あと、ガイド RNA の場合、PAM に近い側がシード配列と呼ばれていまして、より結合特異性が高く、PAM から遠い側はよりちょっと特異性が落ちることも実験ベースで知られているのです。そこの重み付けとかがソフトウェアごとによって違ひまして、そこをどこまで考慮するか、パラメータの設定の仕方とかでそれぞれ違う観点から評価していることになります。ですので、そういった意味で、どれか1個ベストのものがある訳ではなく、いろいろそれぞれが違ふことを御理解いただければと思います。

○谷委員 今後、非常に重要なソフトウェアの重要性はさらに増すと思うのですが、WHO で新たな検査方法の標準化がなされてきたように、コンソーシアム等が中心になってソフトウェアを標準化するような動きというのはあるのでしょうか。

○堀田氏 すみません、私はその辺りは全く、動きがあるかどうかも存じ上げていないです。

○山口部会長 先ほどの COSMIC Census、柴田リストの話をちょっとお伺いしたいのです。多分これを解析されるのは2つのステップがあるかと思うのです。iPS を樹立された、先ほど水口先生が議論されていた、iPS を樹立するときに選択基準としての考え方が1つあります。そういうものの傷のないものを選択する。それともう1つは、多分、iPS そのものを使うことはなくて、iPS から分化させた目的細胞にして、そのときにもう一度、先ほどの出荷判定ではないのだけれど、出荷のときに測定するという話かとは思いますが。そのときに、それぞれの、特に福井班でやっていたときのリストの全てが、お話があるように、必ずそれで起きた、がんになる、

造腫瘍性が起きるという話ではないという判断がまずあるかと思うのです。あともう1つは、クロナリティがあるかどうかというのをプラスアルファされるかと思うのですが、その辺は出荷判定のときにそういうクロナリティがなく、あるいは、実際には本当にがんとは直接あまり関係がないとかという、そのような情報があればそれはOKとするような判断になるのか、その辺は今、どのように考えておられるのですか。

○堀田氏

まず、非常に大事なポイントが私の説明では抜けていたので、御質問ありがとうございます。私が先ほどプレゼンの中で申し上げたのは未分化のiPS細胞を出荷する段階での検査項目として、実際に患者さんに投与するときは、当然、適切な分化細胞に分化させて増殖が止まった状態、未分化の細胞がいなくなった状態で移植を行います。未分化のiPS細胞自体がもともとテラトーマを形成する性質があるので、いくらiPS細胞でゲノムが大丈夫でもそのまま移植してしまったら奇形種ができてしまいます。COSMIC Census、柴田リストに関しては、個々の変異について、それが本当に大丈夫なのか大丈夫ではないのかという議論が当然あり得るかと思うのですが、今のところ我々はちょっとそこまで手が回らないと言いますか、なかなかそれを証明する術も持っていないので、もしこのリストに引っ掛かってきたクローンについては基本的に出荷しないというスタンスを取っています。もちろんその中には、安全サイドを取って、本当は影響のない変異も混ざっている可能性は十分あるのですが、その検証はできていないことが正直なところです。

○山口部会長

将来的に、これはアディティブに情報が入ってくる可能性はありますよね。要するに、その時点ではそれにヒットしなかったのだけれども、後からこれもリストが追加されていきますから、そのときの考え方というのは今、何かございますか。

○堀田氏

おそらく検査をやるときのベストプラクティカルでやるしかないことになるかと思います。この遺伝子リストは2013年のものなので、もう6年前になります。ですので、当然アップデートはあり得るかと思います。ただ、ここは基本的にはがんドライバー遺伝子を集めているので、これが将来には倍になっているというようなことは無いかと思います。ただ、もし例えばPMDAで新しいリストをアップデートしていただいたら、我々としてはそれを取り入れる準備はできているかと思います。

○山口部会長

あとその辺り、しつこくて申し訳ないですが、これは、基本的にはiPSを樹立、分化誘導させたときの、多分2ステップで測られるという話になると、それを今度は普通の体細胞のときに適用していくときの考え方がたいなのはございますか。

- 堀田氏 非常に難しいところかと思えます。本当にこのリストで体細胞全ての細胞で OK なのかというのは、私自身もがんの専門家ではないので答えを持ち合わせていないところで、そこは是非、多くの専門家の皆様とも一緒に議論をさせていただければというところかと思えます。
- 山口部会長 ありがとうございます。ほかに。
- 真下委員 論文がたくさん出ていると思うのですが、その中で、検出しやすいものと非検出という形で分けられていて、どういった形で、やはり感覚的には、オンターゲットしやすいものはオフターゲットが出やすいとかそういう形なのかという理解でいいのかというところと、そのときに体細胞の、それから *ex vivo* でやるような治療のときの細胞はどういう分類で考えればいいのか、あるいは受精卵とかはどう考えればいいのか、その辺をちょっと教えていただけますでしょうか。
- 堀田氏 まず、gRNA のデザインによってオフターゲットの出やすさが変わるといのは、これは間違いございません。左側の、オフターゲット切断が検出されたと言われている報告に限って言うと、例えばシード領域外に mismatches がある特異性の低いガイド RNA を使い、実際にオフターゲットが見つかりましたと言っているケースが多々あります。我々は、例えば治療用の、治療用と言うと語弊がありますね、なるべく注意してデザインをした良い gRNA でオフターゲットを見に行くと、逆にオフターゲットが切れている所を見つけるのが非常に大変でなかなか見つからないのです。我々がデザインした gRNA は今まで、先ほど申し上げましたように、オフターゲット変異は 1 クローンに 1 か所しかまだ見つかっていない一方、ここの左側の論文での gRNA を使うと簡単にオフターゲットが切れて見えることを確認しています。ですので、オフターゲットが出やすい gRNA というのは確かに存在します。ただ、今申し上げたシード、ノンシードの変異は非常に分かりやすいケースなのですが、それ以外でもおそらく条件がありますので、それが実際にどこまで定量的に言えるかというのは、ちょっと我々としても完全な答えは持ち合わせていません。
- 2 つ目の御質問は、*ex vivo* の細胞を臨床で使う場合ですか。
- 真下委員 血液細胞とかでもいいのですが、そういったものは入りにくいというか、どういうイメージですか。
- 堀田氏 そうですね、一般的に、やはり Cas9 の導入が難しい細胞はそもそもオンターゲットの切断効率も上がらないですし、オンターゲットで切れないときにはオフターゲットはまず切れないので、そういった細胞は、例えば造血幹細胞とかをターゲットにする時はそういうこと(オフターゲット変異が入りにくいということ)になろうかと思えます。iPS 細胞も比較的

ゲノム編集は難しかったのですが、最近、Cas9 タンパク質をエレクトロポレーションで導入することで、だいぶ効率が上がってきたので、そこから辺は逆にバランスをうまく取っていく必要があります。要するに、オンターゲットはしっかり切れて十分目的の細胞は取れるのだけれども、あまり不要な強い活性は避けて、オフターゲットがなるべく切れないようにするようなプロトコルを探っていく必要があるかと思います。

○山口部会長 最後のスライドで示していただいた in vivo ゲノム編集の場合に、なかなか解析が、特に動物実験などではほとんど解析が難しいというお話があって、そのときに、最初に細胞レベルというか、外挿できるような細胞で解析をするという話があったかと思うのですが、もしそういうときに、基本的には、例えば CRISPR-Cas なり何なりを入れやすい、あるいはディストリビューションしやすい部分の細胞をターゲットにして、それを解析をするという考えでよろしいでしょうか。

○堀田氏 それも1つの考え方になり得るかと思うのですが、一方で、例えば我々が筋肉を治療ターゲットにしているのに肝臓の細胞を使ってオフターゲット変異を調べる形でいいのかとか、293T みたいに腎臓の細胞を使っていいのかというのは、これは多分議論の分かれるところで、何を重視するかによってケース・バイ・ケースかと思います。ただ一方で、先ほど申し上げたとおり、例えばがん細胞、HepG2 とか 293T みたいな細胞を使ってオフターゲット変異が出たからといって、ちょっと外挿性は難しいかと思うので、核型正常で培養できるヒト細胞というのと、かなり限られてきてしまうかと。iPS 細胞は1つ候補になり得るかと思うのですが、我々自身も培養とか扱いやすさの難しさは十分分かっていますし、これを例えば、ゲノム編集で治療を目指している人は全て iPS 細胞を使って検査しなさいというように義務化したほうがいいのかということ、それも結局、使っている iPS 細胞の質とか、あるいは未分化状態でいいのか、目的細胞に分化させてから検査するのかといった問題があります。iPS 細胞を分化させるのも、これは決して簡単ではないので、そこまでのコスト、時間を掛ける意味が本当にあるのかということところはやはり議論すべきところかと思います。

○山口部会長 ありがとうございます。

○島田委員 これは先生の仕事ではないのですが、AAV ベクターが問題があるのではないかという先生の発表でベクターが、ゲノムに挿入されているケースがあるという論文があるようですが、これは一般に最近よく言われていることなのですか。

○堀田氏 いえ、違います。すみません、誤解を与えていたら申し訳ないのですが、

AAV ベクター自体は、基本的にインテグレーターは今まではほとんど報告はありません。

○島田委員           そうですね。

○堀田氏            遺伝子治療で治療用遺伝子を発現させるだけでしたら、AAV ベクターは基本的にエピソーマルとして核の中に10年、15年留まっている。ゲノムに入りません。天然の AAV ウイルス自体は AAVS1 ローカスという12番染色体の一部に入り込むことは知られているのですが、これは入ったとしても何も症状も出ないニュートラルな挿入だということも知られています。基本的に無害なベクターとされています。

○島田委員           ではこの論文は、エディティングに使った時に、本来はほとんど挿入されないのに挿入されていたという話ですね。

○堀田氏            おっしゃるとおりです。

○島田委員           これは比較的新しい研究みたいですが。

○堀田氏            そうです、はい。

○島田委員           ほかにもあるような話なのですか。

○堀田氏            ですから、この論文が初めて報告した内容になります。

○島田委員           だとすると、やはり普通の使い方をしていない分には起こらないのだけれど、エディティングで、ダブルストランドブレイクを入れてしまうと組み込みが起りやすいということがもし一般的にあるのだとすると、今、ほとんど AAV でみんなエディティングを、特に *in vivo* をやろうとしているのに、これはリスクとしては問題ですよ。

○堀田氏            そうですね。AAV の場合は、もともと1本鎖ゲノム DNA を持っているのですが、細胞に入ったときに、複製の過程で2本鎖 DNA になって、エピソームとして核の中に留まるという生活環を持っています。その状態で Cas9 が発現してゲノムにダブルストランドブレイクを誘導すると、当然 DNA 修復機構を呼んできます。その際、もともと AAV というのは実験の分野では相同組換え効率が高いことも知られていますので、おそらく AAV ゲノムが鋳型となってゲノムのダブルストランドブレイクの部位に入り込むのではないかと推測されます。ただ、これはまだ1グループが報告しているだけで、何かしら彼らの手技的な原因というのもあり得るので、今後のフォローアップが待たれるところではあります。ただ、我々としてはなるべく AAV は使わない方法でゲノム編集はやりたいと考えています。

○三谷委員           今のディスカッションに補足しますと、昔から、David Russell が、例えばゲノムを切ったらそこに AAV が効率良く入るというのも『Nature Genetics』に報告していました。

○島田委員           だから切れたときはですね。



- 三谷委員 切ったときです。
- 島田委員 というのは、切れた所に入りやすいというのは前から言われているけれども、だとするとそういうことですかね。
- 三谷委員 そういうことではないですか。
- 島田委員 だとするとやはり問題です。
- 三谷委員 それがたまたまオフターゲット部位があると、オフターゲットにも入る。
- 島田委員 AAV をこの目的に使うというのは、そのリスクを考えなければ駄目だということになりますね。
- 三谷委員 多分、それはもう AAVに限らず、ダブルストランド DNA であれば、アデノウイルスベクターでもプラスミド DNA でも、ある頻度では入る。おそらく AAV はその効率が低いような印象がありますが、やはり入ると思います。あとは頻度の問題だと思います。
- 山口部会長 ほかに。三谷先生、今のお話は、もう本当に AAV でなくても、先ほど言ったプラスミドで入れようが、要するにブレイクが入った所には、やはり相同時にあれば入りやすいという一般的な考え方でいいというふうには。
- 三谷委員 そう私は理解しています。DNA が切れたらそこをリペアしようとする活性が出ます。そこでたまたまエピソーマルに DNA があつたら、それを間違っ取り込むというのは自然にある活性ではないかと思ひます。
- 堀田氏 1 点だけ。一応、おっしゃるとおりだと思います。ただ、我々は例えば、iPS 細胞で、プラスミド DNA で Cas9 ガイドを強制発現させるときに、オンターゲットにプラスミドが挿入されて、すごく大きなインサクションが入ったケースというのはなかなか見つからないので、頻度の問題だというのはおっしゃるとおりだと思います。ですが、細胞中でプラスミドは 1-2 週間で消えていくので、ゲノムに入り込む前に消えてしまうケースも多くあるかと。一方で、AAV というのは 5 年、10 年、核にエピソーマルとして留まるので、そこら辺のハーフライフ (半減期) の違いということも大きく効いてくるのではないかとと思ひます。
- 山口部会長 ありがとうございます。
- 内田委員 今の話の補足なのですが、衛研の小野先生の研究では、iPS 細胞でプラスミドを使って CRISPR-Cas9 で切断をしたときに、プラスミドが入っていることを確認しており、(目的外の大きな DNA 配列が) 一定の頻度で入ること、マウスの受精卵だと 10% 程度、iPS 細胞でも数%の細胞で入るということを報告しております。挿入されるものはプラスミドに限らないのですが、やはり DNA で導入すると切断部位に入ることにはあるようです。
- 山口部会長 iPS と受精卵が結構高いですよ。入りやすさというか、トランスポゾ

ンが入ったりするという小野先生の。やはりそれは、体細胞とそういう細胞の違いということもあり得るということですか。

○内田委員　　ちょっとそこまでは分からないのですが、少なくともマウスの受精卵に関しては、逆転写酵素活性が強く、メッセンジャーRNAも、それを逆転写したものが入るとか、あと、トランスポゾンなどが切断された所に入っていることが確認されるということ報告しています。

<第2回WG及び第3回WGについて並びにコンセプトペーパーの検討>

○山口部会長　　ありがとうございます。非常に活発な議論ができて、非常に参考になるかと思えます。今、我々もコンセプトペーパーの中に書き込んでいる話で、多分いくつか参考にさせていただくことになるのではないかなと思えます。ほかによろしいでしょうか。ありがとうございます。それでは後半のところ、堀田先生にももし議論の中に加わっていただければまたそれは幸いですので、よろしく願いいたします。

今の堀田先生の講演も踏まえて、オフターゲットハイリスクの観点についても議論させていただきたいと思えますけれども、その辺りはコンセプトペーパーについて残りの時間で議論をさせていただければと思えます。

前回、2月26日に第3回専門部会を開催した後に、WG、要するにエディティンググループですけれども、2回開催しています。実際には、むしろメールベースで文章をエディティングしています。

その中に資料を添付していますけれども、資料2-1、2-2、3-1、3-2にこの議論の内容は示させていただいています。本日はこれを適宜議論のときに参考にさせていただきたいのですけれども、主な議論としては資料4のゲノム編集技術を用いて治療製品の品質、安全性等の考慮事項についての案という、これがWGからの現時点でのアウトプットです。

最終的に、今日はライン・トゥ・ラインでやるのはちょっと難しいかと思えますので、これまでのWGで議論した内容を踏まえて、記載できるところを入れ込んではいりますのですけれども、この素案についての骨子を議論していただきたいと思います。

資料4のコンセプトペーパー案の骨子の部分だけを抜き出したのが資料5のパワーポイントファイルになります。これが今まで議論してきた中で、それぞれの章、イントロとか、あるいはそれぞれの技術ごととか、そういうものに分類しています。

それぞれこういう議論をしましたということですので、これについて議論をしていただければ、この議論で出てきた内容をコンセプトペーパー

の中に入れて込んで、この会議が終わった後、1、2週間でエディティングして皆さんにまた配らせていただきたいと思います。それについて今度はライン・バイ・ラインで御意見をいただければ幸いです。

今日は資料5を説明させていただきますので、同時に必要であれば資料4も見ながら、お聞きいただければと思います。まず、「資料4からの論点抽出」という文章です。その下のページに当たる所が適用範囲と、これはゲノム編集でその遺伝子治療的な考えを適用するのはどこまでの範囲にするかというのをまず議論しました。

ここに書いてあるように、ダブルストランドブレイクがあって、ノックアウトとか、そういうことが行われること、あるいは相同組換えを引き起こしたり、あるいは DeadCas の非切断、後は DNA のメチル化ということも開発がされていると。この辺までが全て染色体を修飾するというか、ゲノムを修飾する作用になっています。一方で、ターゲットには結合するのだけれども、染色体そのものは変えたりしない、あるいはその周りのヒストンはアセチル化したりとかという作用は、ゲノムそのものに触っていないので、一応ここまではその下のほうは対象外として、上を対象内とすればいいのではないかと。ただし技術的には非常に進歩するので、今この時点でこうやって決め付けるのではなく、基本的にはこういう考えで書いたほうが分かりやすいであろうと。その場合、もし必要であれば将来的な検討課題であると考えています。

もう1つは2番目として、RNA編集もこの頃、論文等が結構あります。RNA編集に関しても、似たような技術を用いているところもあるのですが、これは対象外に今のところしていいのではないかと。ゲノム編集の定義としては今申しましたように、目的遺伝子の改変、標的遺伝子の改変とか、まずそういうことをまずターゲットに考えるべきではないかと。それぞれ使う技術、ジンクフィンガー、TALEN、CRISPR など、そのバリエーションがあるけれども、その品質安全性については、全て細かいところまではコンセプトペーパーの中で言及できないのではないかと。むしろ概要的なところにとどめておいてもいいのかなという気がしています。それぞれの特徴を書いて、考慮すべき点までは記載しておくほうが良いのではないかと考えています。

ページをめくっていただきまして、現時点で FDA、EMA、それから日本は今 PMDA がやっているということになりますので、PMDA の考え方はまだこれから出すということで入れていません。日本は臨床研究と、薬事開発というか薬機法の開発というのは2つに分かれています。臨床研究のほ

うは大臣指針が出ていますので、それを比較する形で書いています。それぞれ、それほど世界的に大きく差異があるわけではないと思います。ただ、例えばそれぞれのリスクの考え方などは、いくつかFDAなどもわりと明確に出していて、ゲノム編集についてはレトロとレンチというような、そういうゲノムそのものを改変する技術と同等のレベルで考えるべきではないかと。要するに改変のリスクからいったときに、それと同等のリスクがあるのではないかという考え方をしています。

いくつかの中で出てくるのは、例えば全ての細胞は同等ではない。要するに同じ改変が起きても、造血幹細胞と体細胞、あるいは分化した細胞ではおそらくリスクの程度が違うので、その辺のところは実際には書き分けることは難しいのですけれども、そういう観点で書いたほうがいいのではないかという感じです。

ツールの導入方法で1つあるのは、ウイルスベクターを使ったり、プラスミドを使ったりするのは、従来の遺伝子治療と同じような考え方が適用できるだろうと。先ほど議論になりましたけれども、切ったときにはやはりウイルスベクターを使った場合、あるいはプラスミドを使った場合、むしろそういうものが入ってしまうようなリスクも入ってくる。当然、昔の造腫瘍性のときにも出てきたのは、プロモーターが入ってしまう。そういったことがあったわけで、そういう考え方と一緒にあろうと。

次の5ページの所でタンパク質を用いた場合とか、メッセンジャーRNAを用いた場合。タンパク質を用いた場合は、タンパク質そのものの評価として、いわゆる ICH-Q5 シリーズというのは適用できるだろうと。そういうことをやればいいのではないかと。ただ、CRISPR を使う場合、ガイドRNAを使いますけれども、ガイドRNAを修飾する場合があります。こういう場合は、修飾した場合によっては修飾の仕方。もう1つはメッセンジャーRNAで入れるケースもあるかと思うのですけれども、メッセンジャーRNAでも修飾型のケースがある。そういう場合はプラスアルファの評価が必要になってくるのではないかということ、考えていったほうがいいのではないか。

非臨床試験に関しては、ex vivo 遺伝子治療ではいろいろ解析技術もあり、それぞれ今日のお話もいただきましたけれども、オフターゲット作用、初めは効果と書いていたのですけれども、作用とできるだけ限定して書いています。それで作用とそのin silico解析と、実際にどういう細胞で起きているのか。細胞の中でどういうことが起きているのか。その検出限界の問題とかも記載するべきではないか。

ただもう1つ、非常に難しいと先ほどの話がありました、in vivo ゲノ

ム編集の非臨床試験というのは、非常に難しいのではないかとということで、実際にモデル動物を用いてヒト遺伝子をターゲットとしては、あまり意味のある結果が得られないだろうと。ただ、1つの指標として、ヒトと相同な動物を用いた目的タンパク質のゲノム編集が、定性的なオフターゲット効果とか、オンターゲットの評価というのはできるかもしれない。

その辺については、かなり限定的な話であって、場合によっては細胞レベルでの評価も必要になるのではないかと。あとは分裂細胞を対象としたゲノム編集についての記載というもの。もう1つはその場合に CRISPR なりゲノム編集酵素が長期にわたって維持されるというか、そういうときの目的外の作用。これもオフターゲット作用と言っていいと思いますけれども、その辺についての評価が必要になるであろう。ですから臨床試験や承認後の試験として、特にゲノム改変を行うというスタンスから見たときに、長期フォローアップの必要性というのは非常に高いであろうと。ゲノム編集のリスクをどう考えるべきかということで、下の表を見ながらで結構ですけども、いわゆるゲノムを改変するリスク、挿入変異のリスクとかそういう考え方から見たときに、もともとはレトロとかアデノとか、センダイウイルスというものが、それぞれリスクが大きく異なっているだろうという考え方があったわけで、それに近いゲノムの改変という意味では、レトロ・レンチに近いということもあるだろう。ただし、もともとレトロ・レンチで大きな造腫瘍性が起きたのは、プロモーター部位の入っているというところなので、そこは少し違ってきているのだろうと考えられる。もう1つの考え方としては、ゲノム編集は遺伝子そのものを永続的に改変する技術という意味で、そういったレトロ・レンチというものに類似した特性がある。造血幹細胞に関する場合は、そのリスクの高さから長期のフォローアップが必要だということも書かれているということになります。そういうことをコンセプトペーパーの中に、今のところ書かせていただいています。ゲノム編集に伴うリスクについて、今日の話にもありましたけれども、P53 のノックアウト・ノックダウン、染色体レベルの大きな変異とか、オンターゲット部位で別のものが入ってしまう。それからオフターゲット作用、そういうものをどう評価していくかというのが、長期フォローアップの中で必要になってくるだろう。

あとは *in vivo* ゲノム編集の場合には、*in vivo* で投与した場合に生殖細胞への改変リスク。特に先天性小児疾患などの場合に、もしゲノム編集をすることによって、生殖細胞を改変したりリスクについて、やはり記

載しておく必要があるのではないか。

ex vivo、in vivo ゲノム編集についてのリスクと、患者適用を考慮したリスク・ベネフィットバランスについても、少し書いたら良いのではないか。もともと生殖細胞の改変リスクの議論のときにも、ICH-Q 見解案で出ていますけれども、例えば、がんの末期の症状などの場合に、そういう評価が必要ない。要するに余命があまりない場合には、そこまでの評価は不要ではないかという考え方です。その辺についても、少し記載してもいいのかなど。その辺について ICH 見解の記載を参考に、記載をしていくことを考えています。この辺については、今申しましたようなところを、全体的にはこのコンセプトペーパーを資料 5 の中で出しています。

今までの所が、WG で編集した資料 4 です。資料 4 については、中身的に気が付いたところは御意見をいただいてもいいのですけれども、この論点から御意見をいただいたほうが分かりやすいと思っています。いかがでしょうか。

- 小野寺委員 非常に表が分かりやすいのですけれども、8 ページのところセンダイウイルスで造血幹細胞を安全性を「低」にした理由は何ですか。効率の問題でしょうか。
- 山口部会長 これは ICH で議論をしていたとき、例のエクスキットでがんが起きたときに挿入変異のリスクをちゃんと ICH で FDA と EMA と、Health Canada などと一緒に議論したときに、こういう表を作りました。センダイウイルスだと、もしセンダイウイルスでやったとしたら、挿入変異の場合はほとんど考えなくていいだろうという考え方です。センダイウイルスを使っているいろいろとやったほうがいいという意味ではないわけです。
- 小野寺委員 結局、ゲノム編集というのが基本的に染色体を改変するとなると、たとえセンダイウイルスを使用したしても、基本的にゲノム編集が起こる訳で、安全性が「低」ではないのではと思った次第です。
- 山口部会長 リスク表というのは、左のウイルスベクターごとのリスク表なので、これでゲノム編集をかけたとき、この表とはパラレルにならないことになってしまうのです。いわゆる従来型の遺伝子導入タイプでは、こういう評価でいいのだらうけれども、ゲノム編集の場合、むしろレトロ・レンチと同じところになってしまうだろうと。
- 小野寺委員 分かりました。
- 山口部会長 リスク・ベネフィット論のところでもしありましたら。
- 真下委員 考え方でちょっと議論があればと思って質問させていただきたいです。RNA 編集は対象外と、これはゲノム編集というくくりの中でいくと、それはものすごく理解できるのです。そのときに、今 DNA 編集あるいは DNA を

変えようとしていく中で、最近出た論文だとベースエディターなどで、DNAを変えようとしてRNAも変わってしまうみたいなことがあったときに、そのリスクをどう考えるのかというところが。すみません、難しいことを言っています。

○山口部会長 非常に難しい。正直言いまして、答えは今のところ持っていません。ただ、RNAを外すというのはRNA編集を目的としたときは、遺伝子治療的な考え方はまだ不要だろうと。むしろRNAそのものが遺伝子治療等製品には入っていますので、その中で評価をできるのだろうと思っているのです。例えばゲノムをエディティングするような遺伝子治療とか、そういうのとは区別して考えられるだろうと思っています。いかがですか、その辺は。

むしろメッセンジャーを使う場合、いわゆる天然型のメッセンジャーを使う場合は、ほとんどリスクはないだろうと思っています。むしろ改変したメッセンジャーというか、キャップも改変しましたし、ですから側鎖も改変するというようなケースにおいては、そのリスクの方をむしろ強化しなければいけないのかなという気がするのです。

○那須委員 臨床家の立場からなのですけれども、資料4の11ページの4番、やはり長期フォローのことですが、最後のところに、定期検査を含め長期フォローアップの計画を設定することが望ましいということですが、先ほど堀田先生の話の聞いていると、最後の方で筋生検の話が出てきて、私は大体この手のものは血液でできるのかと思っていたのですけれども。結局、今後いろいろな議論の末に定期フォローアップの検査方法、手法が出たときに、やはり被験者への負担というのを少し考慮して考えるべきかなと。筋生検というのはかなり大変なことです。

○山口部会長 実質、長期フォローアップができるのは、血液細胞というか造血幹細胞をしたときぐらいだろうと思っています。逆に言うと、長期フォローアップでもっとリスクの高いのは、やはり造血幹細胞での遺伝子治療かなという気がするのです。その場合、それについては、定期的に検査をする必要があるのだろうと。ただそれを、期間をどこまで実際にやるかはまた別問題です。FDAなどは、最初の5年間は1年に数回検査をして、5年以降は年に1度という体制を取っています。

○那須委員 そうですね。

○山口部会長 今のところ、ゲノム編集もそういうことをやらせようとしているかと思っています。ただFDAがどう考えるかというのと、我々がどう考えるかはまた別だと思うのです。わりとゲノムを改変するという意味では、リスクはそういう近いところかなという気がするのです。先ほどの先生のお話で

すが、筋生検はなかなか難しいかと思うのです。

- 那須委員      ちょっとそれは思っていました。
- 山口部会長      心臓移植などですと、心臓は移植すると年に何回ずつバイオペシーをやら  
ないといけないわけです。もしそういうものがある場合、そのついで  
というのはあり得るかもしれないなという気がするのです。
- 谷委員          将来的に例えば末梢血に循環している細胞を用いた検出などは可能なの  
でしょうか。
- 堀田氏          どういうデリバリーでどれぐらいの範囲でゲノム編集を起こすか、起こ  
せるかによろと思います。今我々が開発中のものというのは、局所筋注  
で筋線維、筋組織のゲノムを狙う方法を開発していて、この場合は血球  
にはあまり入らないと思いますし、もし入ったとしても、いわゆる末梢  
分化した細胞なので、数か月後にはいなくなるので、長期フォローアッ  
プで検出というのは無理で、長期フォローアップで診られるとしたら、  
造血幹細胞でゲノム編集したときぐらい、血液で見られるのはそういう  
ケースに限定されるかなと思います。
- 谷委員          失礼いたしました。遺伝子導入ではなくて、ゲノム編集された細胞は局  
所もしくは血流を循環中に変性、分解されていくと思うのですが、循環  
がん細胞ではなく、循環ゲノム編集細胞として検出できたというような  
報告はあるのでしょうか。
- 堀田氏          論文報告ベースで、そういうものが検出できたという話を私は存じ上げ  
ていません。筋肉細胞は一般的に融合しているので、なかなか血球に筋  
細胞自体がふわふわと出てくることというのは、あまりないかなと認識  
しています。
- 谷委員          ありがとうございます。
- 久米委員          堀田先生からは、デュシャンヌみたいな疾患を対象にした場合には、筋  
注が主になるだろうというお話だったのですが、例えばこの間の  
ASGCT とかの風潮を見ていると、基本的には、神経だろうが筋肉だろう  
が、製品として考えた場合には簡単なやり方ということで、ほぼシステ  
ミックにやる方向に進むのではないかと、私は考えています。対象ある  
いはターゲットが、筋肉だったり肝臓だったりしても、結局のところや  
はり全身へディストリビューションしてしまう。意図しないにしろです  
ね。そこは考えておいたほうがいいのではないかと思います。
- 山口部会長      システミックに投与するという事は、先ほどあった例えば生殖細胞に  
入るリスクもあるし、逆に言うとそれを投与したときに、目的としては  
造血幹細胞、血球系には入れてないのだけれども、血球系に持続的に入  
ってしまうこともあり得るということになります。



- 久米委員 投与方法によるリスクのアセスメントを、最初からしておかないといけない。そこを義務付けるというか、考えてもらう必要があると思うのです。
- 山口部会長 ありがとうございます。ほかにありませんか。
- 堀田氏 すみません、初めて参加させていただくので、既出の議論でしたら申し訳ないですけれども、DNA のメチル化もこの遺伝子治療の中に含めるという議論のところ、ちょっとどう考えればいいのかというところで。ゲノムは基本的にインリバーシブル(不可逆)で、一旦変わってしまったらもう戻せないのですが、DNA メチル化の場合は確かにゲノムには触っているのですけれども、薬剤とか環境によってまた戻り得るものかなと思います。
- 一方、抗がん剤などで、5azC などはメチル化状態が結構変わりますから、そういった化合物もゲノム編集と同じ分類に含める、同じようリスクとして考えるのかということ、結構難しい話になってくるのかなと思ったのですけれども、その点どういう議論があったのか、もしよろしければ。
- 山口部会長 確かにリバーシブルのものは外すという考え方もあったのですけれども、先生のおっしゃるとおり本当にリバーシブルの可能性が高いです。ただもう1つあるのは、オンターゲットの話だけで済むのか、オフターゲットにもそういうメチル化が起きて、そういうときにどういう応答性があるのかということも、やっぱり考えるべきではないかということで、絶対でないといけないというよりも、それを入れておいて議論したほうがいいのではないかという考え方で、今進めています。
- 本当にそのところは、技術的な改変がどんどん変わってくる可能性もありますので、その辺はそこでまた考え直す必要はあるのかなという気がしています。
- 小野寺委員 今のことですが、確かに先生が仰るようがん治療薬に関しては多分その考えで正しいかと思いますが、小児科の分野でメチル化が原因で発症する病気が比較的多くあります。たとえば、プラダー・ウィリ症候群とかアンジェルマン症候群とかです。そうなると、その治療はやはりゲノム編集かと思います。
- あと、定義の問題ですが、今はこの定義でも良いと思いますが、ここで使われる技術は将来どのように展開する分らないので、かなり参考の意味合いを含めて記載しておいてもよいと思っています。
- 山口部会長 おっしゃるとおりで、臨床研究のときの改正でも、これはものすごく技術革新が激しいので、やはり見直しが必要だろうと。ですからわりと固定した概念では見ていないと思っています。ただ、現時点ではそう考え

たほうが、整理はしやすいだろうという感覚ではあります。

○堀田氏

あと、最近ニュースでキムリアの話が非常ににぎわしていますが、あれは実はレンチウイルスを用いて CAR 遺伝子を T 細胞のゲノムに入れて、患者さんに戻すというアプローチです。ただ T 細胞は培養が難しいので、レンチウイルスベクターがゲノムのどこに入ったかは、患者さんごとの確認はおそらくされていないのではないかと思います。私の認識は合ってますでしょうか。

○山口部会長

それを求めるかどうかですね。要するにいわゆるキムリアで入れたレトロにしろレンチにしろ、問題になるのはクロナリティだと思うのです。アディティブな遺伝子治療なのでどこに入ったかということ自体は明らかにできないというか、むしろランダムに入る可能性が高いので、多分求めてはいないのだと思うのですけれども。実際には PMDA で審査されていますので。

よろしいでしょうか。それでは、先ほど簡単をお願いをしましたけれども、資料 5 が資料 4 のコンセプトペーパーの論点なのですけれども、もちろん今説明したような内容を書いているつもりです。それ以外にも今日の話にもありましたし、実際にはインデル、柴田リストとかそういうことまでは、事細かには書いていません。こんなことも書いておいたほうがいいのではないかと御意見がありましたら、御意見をいただければと思っています。

実際には、資料 4、5 に関して、御意見がいただければ、それを踏まえた上で改正案を配布させていただきます。来月 WG をまた開催しますので、そこでいただいた意見を含めて、できるだけ最終案に近いものを作っていきたいと思っています。

次回までに、改正した案をもう一度ディストリビューションさせていただきますので、まずこの 1、2 週間で御意見をいただければ、その後それをインクルードした形でまた議論をした上で、最終案に近いものを配布させていただきたいと思います。

よろしいでしょうか。本日の議論としてはここまでにしたいと思います。事務局から何かありますでしょうか。

<その他>

○事務局(下川) 次回の専門部会は、7月18日木曜日14時から16時の開催を予定(※開催後の部会長との調整により、延期することとなった)しております。詳細については追って御連絡いたします。

<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。