

# ゲノム編集技術の安全性

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター

遺伝子治療部門

三谷 幸之介

[mitani@saitama-med.ac.jp](mailto:mitani@saitama-med.ac.jp)

# ゲノム編集の医療応用の問題点

## 1. 従来の遺伝子治療の問題

- (主に) ベクターの免疫原性、細胞毒性
- ベクターの遺伝毒性 (レトロウイルス、レンチウイルス)

遺伝子治療の研究 = delivery, 安全性, 免疫の研究

## 2. ゲノム編集に固有の問題

- 人工制限酵素 (細菌由来!) の免疫原性、細胞毒性
- 人工制限酵素の遺伝毒性 (オフターゲット変異)

# 問題その1：人工制限酵素の免疫原性

- 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.*
  - *ex vivo vs. in vivo*、タンパクで導入
  - 患者スクリーニング
- 免疫抑制？
- 本当に遺伝子付加治療よりも有利か？
- 遺伝子（付加）治療も大型動物への移行が困難だった

## 問題その2：オフターゲット変異

- 潜在的オフターゲット部位のスクリーニング法

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

- 候補部位の同定 → ゲノム編集 → targeted deep sequencing
- WGSは非現実的
- 転座? large deletion?
- NGS : 0.1%の検出限界
- base editing への対応
- 治療を施した細胞での unbiased whole-genome 法

## 問題その2：オフターゲット以外のDNA変異

	変異/バリエーション	細胞あたりの頻度	
頻度	酵素の オフターゲット変異	<0.001 (0.1%)?	• 検出法 • 転座、large deletion?
	ドナーDNAのランダム ム部位への組み込み	~0.05 (5%)?	• 相同組換え修復 • 検出困難 • dsDNA
	DNA 複製エラー	>10 (1→10 <sup>8</sup> 細胞として)	• iPS細胞
	個人間の DNAバリエーション	>10 <sup>6</sup>	• オフターゲット変異 との区別

- 外来DNAが残らない → 変異を見つけにくい
- *in vivo*法： オフターゲット変異の蓄積  
使用する動物とヒトゲノムとの違い  
→ オフターゲット配列が予測不可

変異は必ず生じる → がん化に係る変異か？

# 安全性の評価法

- プロモータ挿入変異とは異なる → がん抑制遺伝子、転座
- これまでにがん抑制遺伝子の中にオフターゲット変異が見つかった例はない？
- 慎重にデザインした人工制限酵素を用いればオフターゲット変異の問題はほとんどない



- より適切にゲノム編集の遺伝毒性を評価する系の必要性
- 安全性の基準をいかに設定するか

# 臨床応用に向けての現状

- 全くリスクフリーの先端治療はない
- 遺伝子付加治療法や既存の治療法との比較 (eg. SCID-X1)
- ゲノム編集でなければ治せない疾患か？

臨床に近いプロトコールは？

- 安全性：ex vivoの方が確認しやすい → 血液細胞
- リスクベネフィット：がん、感染症 > 遺伝病
- 効率：遺伝子ノックアウト > 遺伝子修復
- 遺伝子ノックアウトは遺伝子付加治療では不可能
- 優性遺伝病