

第2回ゲノム編集専門部会

日時 平成30年12月25日(火)

14:00~16:00

場所 PMDA会議室21~24(14階)

<開会～出席状況確認及び配付資料確認>

○事務局(下川) それでは、第2回ゲノム編集専門部会を始めます。本日はお忙しい中、お集まりいただきありがとうございます。委員の出欠状況を申し上げます。13名の委員全員に御出席いただいておりますので、本部会の議決定足数を満たしていることを御報告いたします。また、親委員会から今泉委員、小澤正吾委員にも御出席いただいております。

配布資料の確認をいたします。座席表のほか、議事次第、資料取扱区分表、資料1～3までです。不足な資料があれば、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。本日の配布資料は、資料1が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いただきますようお願いいたします。資料1以外は全てその他に該当しており、委員各自で適切に保管、管理、廃棄をお願いいたします。それでは山口部会長、議事の進行をお願いいたします。

<委員からの講演：ゲノム編集における安全性の確認について(高橋委員)>

○山口部会長 早速議題に入りたいと思います。前回と同様、今回も2名の専門家の先生に、この専門部会のメンバーではあるのですが、ゲノム編集に関する御講演をいただいて、それに関する質疑応答をして、その結果などを将来のコンセプトペーパーの中に取り入れていくという方針で進めさせていただければと思っております。本日は今申しましたように、ゲノム編集における安全性、品質も含めてですが、それらの観点に関して、高橋委員、内田委員から御講演をいただきたいと思っております。

まず初めに、高橋委員に、ゲノム編集における安全性の観点について、御講演いただきたいと思っております。高橋委員は筑波大学で生命科学動物資源センターを兼任されているということで、実際に遺伝子改変マウスを作製した御経験、実績をお持ちで、それに基づいてゲノム編集の *in vivo* ゲノム編集を中心にした安全性評価等についてコメントをいただけるのではないかとと思っております。それでは高橋先生、よろしく申し上げます。

○高橋委員 山口先生、御紹介ありがとうございます。筑波大学の高橋でございます。前回の専門部会の際に真下委員と三谷委員から技術的なお話があったと思うのですが、私のほうから安全性評価ということで、今、御紹介がありましたように、供給をしている立場としてどんなところをチェックしているかを具体例を挙げて御説明できればと思っております。

お手元に資料をお配りしておりますが、2枚目です。やはりゲノム編集

ができるようになって、我々は以前 ES 細胞を使ってマウスの内在性の遺伝子を書き換えることをしていたのですが、どんなに早いケースでもやはり1年くらい掛かっていたのです。それがゲノム編集で、マウスの受精卵を使うことによって最も早いケースですと約4か月。単純に Null やポイントミュートーションを入れる場合ですと、かなりの確率でホモが取れますので、実際の場合には1か月以内に表現型が見えたりする場合もあります。最近の依頼としては、論文のリバイス時にそのノックアウトの表現型を見たいとか、あるいはヒトで見つかったポイントミュートーションを入れて、実際にマウスでも再現できるかどうか見てほしいという依頼が、かなり多く来ています。

実際に一応我々が完全にフォローできている部分の2013年5月くらいから今までの297件の作製について、今年5月の時点でフォローできていたものについての結果をまとめたものです。遺伝子を除くだけですと、マイクロインジェクションでもエレクトロポレーションでも基本的にはうまくいくのですが、効率としては後でお話するように、マイクロインジェクションよりはエレクトロポレーションのほうが効率が良くなっています。n 数がちょっと少ないのですが、一番大きく除いたのは、実はマウスのゲノム上から2.3メガベースを除くことができている、致死にならなければかなり大きく削ることができます。

それから、ポイントミュートーションを入れる、例えば、患者様で見つかった新たなポイントミュートーションをマウスの相同遺伝子に入れたい場合には、それもマイクロインジェクションあるいはエレクトロポレーションで入れることができます。それから例えば、フラグタグを入れたいとか、HA タグを入れて抗体を作るよりも早くディテクションしたいという場合はタグを入れることをしており、短いフラグメントは、基本的にはマイクロインジェクションよりはエレクトロポレーションのほうが効率が良くなっています。更に、長いフラグメントを入れたい、例えば、マウスの内在性の遺伝子を欠損させて、ヒトの cDNA と置き換えて、ヒトのタンパク質を出したいみたいなときはこの形になるわけです。あるいは、内在性の遺伝子の後ろに内在性の遺伝子を壊さない形で Cre を発現させたい、内在性のプロモーターに従って Cre を発現させたい場合は、これを使うのです。この場合もかなり効率が良く、実際には9.5キロベースくらいのところまで入れることができます。

最後は、依然としてフロックスにして、コンディショナルにしたいというのもフラグメントドナー、フロックスされたフラグメントをそのままはめ込む形でやっていて、1回のインジェクションで入れているのですが、

これも可能になっています。ただ、もちろん非常に難しい遺伝子もあって、100%でないところは相変わらずデメリットとしてあるかと思います。

実際にオフターゲットを供給するマウスのときに調べることをするわけですが、やはりいろいろな論文や我々の経験からすると、最初に良いガイド RNA、特異的なガイド RNA を作るのがオフターゲットを防ぐためにはかなり重要です。我々のほうでは CRISPRdirect と CRISPOR の組合せをマウスを供給するときには使っています。内田先生のプレゼンの中にもありますが、Cas-OFFinder やその他のツールを使って、なるべくオフターゲットが少ないようなデザインをするのは非常に重要なポイントでありまして、これは一番最初にしなければいけないことになると思います。

その後、実際にできた、我々の場合ですとマウスですが、それをどういうふうにして調べていくかです。後で詳細をお話しますが、我々はプラスミドドナーを使って遺伝子を入れているので、そのプラスミドの部分がオフターゲットのサイトにはまるような形になるのです。ですので、実はそれをベースにして GUIDE-seq まではいかないのですが、プラスミドのバックボーンがどれくらい挿入されているかで、他のところ（オフターゲットサイト）に入っている可能性をディテクションしています。実際には、DNA を取り出してきて、そこで vitro で、Cas9 とガイド RNA を混ぜたもので、ダイジェスションが起こるかどうかを見る Digenome-seq であるとか、あるいはゲノムを最初から環状にしておいて、そこについて切断されたりニアになったものだけを拾うような方法とか、あるいはこの CIRCLE-seq と in vivo の解析を組み合わせるようなものを使う方法があることが、いろいろな報告から出ています。今日は CRISPRdirect の話と、Guide-seq と、VIVO の話をして、それから我々の実際の具体的に供給しているマウスの確認の方法をお話したいと思います。

これは皆さんよく御存じだと思うのですが、CRISPRdirect は日本の研究者の方が作られたものです。我々は初期からこれを使っていて、非常に良いツールです。ここに配列を入れて、それから PAM シークエンスを入れて、それからどの生物種かを入れると、非常に特異的なガイド RNA の配列候補が出てきますし、それからピュータティブなオフターゲットサイトがゲノム上のどこにあるかを全部出してくれるような形になっています。これと、それから CRISPOR を組み合わせることによって、まずマウスの作製方法をデザインしています。

そうやって作ったデザインの下で、実際にインジェクションしてマウスができた場合に、どのようにして解析していくかです。こちらは Guide-seq についての論文からそのまま取ってきたものです。DNA の 2 本鎖切断

が起きたところに、ダブルストランドのオリゴ DNA のタグを入れる。このタグを足がかりにして、入っている近傍の遺伝子を増幅をかけ、それについてシーケンスを行う形なので、タグがきちんと入ることが1つ必要になります。このタグが入るのが、本当にランダムに入るかはなかなか議論があって、この方法で全てのオフターゲットが見られるかというのはまだ少し議論があるところだとは思いますが、実際には切れているところにはまる形なので、比較的良い方法の1つということにはなっています。

次は CIRCLE-seq と、その CIRCLE-seq で出てきたものを実際のマウスの中で調べたものです。これは今年の『Nature』に載ったものです。実際に、まずガイド RNA を設計して、そのガイド RNA を作ります。またゲノム配列を環状に、試験管の中でしておきます。そこに Cas9 とガイド RNA を入れると、オフターゲットサイトで切れる活性がある所では切れて、リニアになります。リニアになったものだけを集めてきて、それをシーケンスしておいて、そのガイド RNA のオフターゲットサイトの可能性のあるサイトをゲノム上でリストを作っておく形になります。その後、この実験ではアデノウイルスをマウスに入れて、肝臓でその Cas9 とガイド RNA で切ったものを、肝臓から DNA を取ってきて、このカタログで可能性があったものについて増幅するような形で、どれくらい実際に in vivo で切れているかを確認しています。

これは『Natureasia』のサイトから、そのまま転載してきたものです。実際にこの VIVO 法では最初にオフターゲット変異が生じる可能性がある部位を突き止めた上で、ゲノム編集後に変異した部位はないかどうかの確認が行われるということです。マウスの肝臓を用いてマウスの Pcsk9 の遺伝子を標的とする異なるガイド RNA を設計し、比較的特異性のない、見境のないガイド RNA を、つまり多くの部位を標的にできるガイド RNA 及び特異性の高いガイド RNA を設計して、このシステムを精度検証しています。そして見境のないガイド RNA が引き起こしたオフターゲット変異、発生頻度が 0.13% 以上の変異が VIVO によって数 10 個検出されただけでなく、非常に特異性の高いように設計したものについては、少なくともこの方法ではマウスの肝臓の中でオフターゲットの変異がなかったことを明らかにして、この論文からも、最初の設計がやはり重要なのですということを行っている形になります。

では、実際に我々のほうで遺伝子改変マウスを供給しているときにどうしているかということ、先ほどもお話したように、CRISPRdirect 及び CRISPOR を用いて、ターゲット配列を決定します。やはり複数のものを使

ってやったほうがより正確なので、少なくともスタンダードとしてはこの2つを使っています。

それから CRISPR ベクターを作製する、若しくはガイド RNA や Cas9 タンパク質を準備して、導入する形になります。そのガイド RNA を設計した後に卵に打つ前に、まず細胞ベースで Reporter ベクターと、そのデザインしたガイド RNA を入れて、実際に細胞の中でどれくらい DNA の切断活性があるかを一応確認してから卵に入れていきます。それから変異の導入のドナーオリゴ DNA やプラスミドを作製して、実際にマウスの卵にインジェクションしたり、エレクトロポレーションしたりする形になります。それで、実際に操作した卵を仮親に移して出産してきて、離乳後にジェノタイプするのですが、まずジェノタイプする遺伝子型の判定としては、狙っている遺伝子がまず入っているかを確認した後、それが目的のゲノムの位置に挿入されているかを両側の PCR を使って確認し、最終的にはサザンで確認する形になります。

Flox マウスの場合は、実はアームが3つあるので、片側の loxP サイトが欠ける場合があるので、両側の loxP サイトが残っているかどうかを確認します。

その後に、実は CRISPR をベクターで入れている場合とか、ドナーの変異を入れるものをベクターで入れている場合がありますので、それらがランダムインテグレーションしている場合ですと、プラスミドが丸ごと入ってしまうことが普通ですので、その変異を入れるドナーのものについては Amp について、それから、その CRISPR のシステム自体のプラスミドのランダムインテグレーションについては Cas9 の PCR で確認する形になります。

先ほどの Guide-seq みたいにプラスミドが入ってしまうと、これが入りますので、それを足がかりにして確認し、最終的にはこれらが余計なプラスミドが入っていない、目的の挿入遺伝子だけがきちんと目的の場所に入っているマウスを出している形になるわけです。フロックスのマウスだと結構大変なので、分かりやすい例としてフラグメントをノックインする場合をお話します。フラグメントをノックインする場合はその長い配列、例えば5キロベースとかという場合ですと、やはり結構入れるのは大変になってしまうので、環状になったドナープラスミドとガイド RNA と Cas9 を発現するようなプラスミドをマイクロインジェクションする形になります。この場合は内因性の遺伝子の後ろに内因性の遺伝子を壊さない形で、P2A でバイシストロニックに遺伝子を入れるような形にしているのですが、このような形ではめ込むことをしています。この場合は、

入るものとしては Cas9 のプラスミドがランダムインテグレーションする可能性がありますし、このノックインのドナーベクターがランダムインテグレーションする場合があります。Cas9 が入った場合は Cas9 の PCR でディテクションできます。こちらのドナーのほうがランダムインテグレーションした場合は、Amp の耐性の遺伝子が検出できる形になります。

こうして打ち終わったものについて、実際にこれがスクリーニングの結果で、まず Cre をノックインしているので、Cre が入っているマウスを PCR でディテクションします。マルのものは、ゲノム上に Cre が入っているものです。これらマルのものについて、5' 側と、3' 側のベクターの内側と、それからアームの外側の、マウスの内在性の配列との間で PCR をして、5' 側がうまく入っていて、3' 側もきちんと入っているものをまず見つけます。そうすると、このポジティブの中で実際に 5' も 3' も両方とも OK になったものはこういう形になります。その後、入っているもののシーケンスを確認して OK になった場合は、更に Cas9 がランダムインテグレーションしていないかを、Cas9 に対するプライマーで確認します。その後、Amp が入っているかどうかを確認して、これがネガティブなので一番良い候補になるわけです。きちんとその場所に挿入されていて、なおかついろいろなベクターが入っていないものを選び出します。この場合は、Amp のものがポジティブになっているものが実は 2 つあるので、この場合はその近傍に入っているか、他の染色体にランダムインテグレーションしているかという可能性があるのですが、マウスの場合は交配するとその染色体が分かれていきますので、これも研究者の方にとってはひょっとしたら使えるマウスになる可能性があります。このようにして、Guide-seq のような方法を使って一応確認する形になります。

このスライドは、最近行った 18 件の作製についてです。ノックインの効率と、それから現実には Amp ポジティブが見つかった確率ということになるのですが、実は切れた場所に丸ごとベクターが入っているものも含んでいるので、なかなかランダムインテグレーションの評価としては難しいところはあるのです。ノックインの効率が良くなると、やはりランダムインテグレーションを誘導するような可能性も少し高くなるようなデータになっています。一方で、少なくとも我々の方法では、インサート長とノックイン効率の相関はなくて、長くても短くても一応その場所には入れられる形になっています。

これがまとめのスライドになります。今お話したのですが、マウスの場合、交配するという奥の手があるので、実は他に余計なものが入っていても使える可能性は結構多くて、オフターゲット編集が非常に大きな問

題になるのは比較的少ないというのは元々あります。ただ、受精卵にプラスミドを導入した場合はランダムインテグレーションが確認されるのですが、挿入効率に比例してランダムインテグレーションが増える傾向にありました。それから、受精卵に短いドナーDNAを挿入する場合は、実はガイドRNAとシングルドナーDNAとCas9タンパク質をエレクトロポレーションしたほうが、少なくとも我々の手ではプラスミドインジェクションよりも作製効率はかなり良いです。

それから、受精卵に長いドナーDNAを挿入する場合は、真下委員の発表のときに、なかなか長いものを入れるのは大変だというお話があったと思うのですが、エレクトロポレーションよりは前核へのプラスミドインジェクションのほうが効率が良く、考えてみれば、ドナーDNAの濃度がインジェクションしたほうが当然高いですし、外からエレクトロポレーションで入れる場合は、長いDNAが核に行くのはなかなか難しいことは容易に想像できますので、当たり前といえば当たり前だと思います。それから受精卵でゲノムの2か所を切断してドナーDNAを挿入する場合、挿入よりも欠損個体が多く取られるのは実は正しくて、以前の論文で、2か所同時に切ってオリゴDNAをはめ込むみたいな論文があったのですが、実際やってみるとなかなか難しいことが分かっています。最後、受精卵を用いて遺伝子改変をする場合は、特にプラスミドを使った場合はモザイクが得られる確率が高いことが明らかになっています。

付け足しですが、実は我々の所で卵を使ってやっていると、今頻繁に使われている通常のCas9のSV40の核移行シグナルが付いているものは、卵では核に集積しないのが分かりまして、これは2-Cellで見ているのですが、1個卵に割球があって、こちらにも割球があって、ここに核があるのです。通常のものですと、細胞でもHEK293Tでもあまり核に行っていないですし、卵でも核に行ってなくて、XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX通常の細胞では核に行くのですが、マウスの卵ではやはりあまり行かなくて、XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX実は核集積性が非常に良くなって、これによって通常のCas9ですと改変マウスが取れない場合でも実際に、例えば2.2メガベースを除いたり、72キロベース除いたりするときに、編集効率が削除する場合も高くなります。それからロックインする場合、例えばROSAにあるものをロックインしたいとか、Prdm14のところをフロックスにしたいという場合でも、通常のCas9ですと取れないものが、我々の作ったXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXなのです。実は、編集する細胞種によって、その編集のものがきちんと核に行くかどうかはかなり重要な問題です。例えば、臨床応用としてT細胞でやりたいとか、

あるいは肝臓でやりたいという場合は、核移行性はやはり見ておいたほうが、効率という意味ではかなり重要なのではないかという気がいたします。私の発表は以上です。どうもありがとうございます。

○山口部会長 高橋先生、ありがとうございました。今の御発表に関して御質問をお願いしたいと思いますが、いかがでしょうか。

○小野寺委員 教えていただきたいのですが、ガイド RNA と Cas をタンパクとしてトランスフェクションする方がプラスミドをフェクションするより効率が良いということですよ。当然、プラスミドを使用すると別の領域にインテグレーションするわけで、安全性から考えても、ガイド RNA + タンパクのほうが良いと思うのですが、これが普及しない理由は何ですか。値段とかの問題ですか。

○高橋委員 普及していないというわけではなくて、やはりマウスでやっている方が結構増えていて、真下先生なども言われていると思うのですが。ただ、長いものはやはり結構難しく、この間、真下先生のお話があったと思うのですが、シングルストランドにしておいて、2 キロベースまでだと入るのですが、それより大きなものになるとエレクトロポレーションで核まで届けるといのは結構難しいので、短いもの、あるいはただの Null を作る場合は、エレクトロポレーションのほうは絶対いいです。少なくとも我々の手ではそうです。

○小野寺委員 Cas タンパクは先生の所でリコンビナントとして製造されているのですか。

○高橋委員 うちでは、今、市販されているものを使っています。それで十分いけます。真下先生はどうされていますか。

○真下委員 やっています。同じです。

○山口部会長 今の話に関連してですけれども、プラスミドの細胞の中で Cas9 とガイド RNA を構築させるといものと、外でタンパクとガイド RNA を構築させて入れるという、この2つ、あるいはメッセージで入れるケースもありますよね。そういうのでオフターゲットの比率そのものは、それぞれで違ってくるので、それはあまり変わりはないのでしょうか。

○高橋委員 そこについては詳細には解析していないのですが、先ほどのプラスミドのランダムインテグレーションを調べたことがあって、その場合はタンパクに入れてもプラスミドに入れても、メッセージに入れても、それほど大きな変化はないような印象であるのですが、ただ、正確に統計処理したようなデータではないので。

○山口部会長 ありがとうございます。

○島田委員 ゲノム編集して生まれたマウスで、特に問題があった、例えば奇形があ

るとか、がん化しているとか、そういう問題というのは今まで起こったことがありますか。

- 高橋委員 それも非常によく聞かれる御質問ですが、致死性があるような遺伝子をいじると、やはり生まれてくる数は激減します。例えばホモになってしまうと死ぬみたいなもので、Null にすると編集効率は非常に高いので、生まれてくるのはかなり減ってしまいます。
- ただ、これまでそういう異常がないような遺伝子をブロックにしてほしいという御依頼も多くて、今までゲノム編集でマウスを作製したのは、多分、400件ぐらいあるのですけれども、異常な表現型が見られたというのは基本的にはなくて、それほど大きな異常が見られるという印象は我々は持っていません。
- 島田委員 正常に見えるマウスでも、オフターゲットがものすごくあったという例はあるのですか。
- 高橋委員 それも実際に調べればいいのですけれども、具体的に先ほどのプラスミドのレベルでの確認をして、それで問題なければ出してしまうので、その後、ホールゲノムシーケンズなどは、ちょっと我々のレベルではあまりしないので、実際には確認はしたことはないのです。なので、それについてはデータを持っていないというところが正直なところですが、ただ、多くの先生方に使っていただいているのですが、とても変なことがあるという報告はいただいていなくて、少なくとも先生方で交配してどんどんライン化していく中で、何か異常は見つかっているということはお聞きしていません。
- 岡田委員 ちょっと教えていただきたいのですけれども、今の質問とも関係するのですが、そのとき特に表現型に出てこなくても、セカンドヒットが加わることでリスクが高まって、長期的に見ると発がん性などいろいろなことが関わってくるという可能性はいかがでしょうか。
- 高橋委員 それは基本的には否定できないと思うのですが、ただ、実験動物の場合ですと、やはり野性型とまず1回掛けて、ライン化するような形になってしまうのです。そうすると、基本的には正常の遺伝子が入ってきてオフターゲット変異が薄まるような形で、普通、育種はするので、いきなり操作したものの同士をホモでしたりするというのは、基本的にはあまりないのです。なので、セカンドヒットがどうかというのを調べるような実験系を組まれている方というのはなかなかなくて、現実問題としてはデータが上がってこないと思うのですけれども。
- 小澤(敬)副部会長 7枚目のスライドの横の説明文の所に、オフターゲット変異が0.13%という数字が出てきますけれども、この数字の出し方や意味するとこ

ろについて、もう少し教えていただければ。

- 高橋委員 私もはっきり覚えていないのですが、次世代シーケンサーか何かで調べたときにディテクションのレベルがどうのこうのというのがあって、それを超えるようなものがちゃんと見つかるというお話だったと思うのですけれども。
- 小澤(敬)副部長 検出限界なのですか。
- 高橋委員 はい。それでよろしかったですか。
- 小澤(敬)副部長 本当はどのぐらいの検出限界を期待したいのですか。
- 高橋委員 それは次世代シーケンサーをされている先生方のほうが詳しいかと思うのですけれども。すみません、私のほうではあまり経験がありません。
- 小澤(敬)副部長 もう1ついいですか。最後の所で、こういう受精卵などとは違って、リンパ球や肝臓の細胞など成熟した細胞の場合には、核移行の効率とか言われましたけれども、そのほかクロマチンストラクチャーとか、いろいろなゲノム構造も含めて、何かそれとの関連でオフターゲットの入り方が変わってくるとかはありますか。
- 高橋委員 それは非常に我々も、最初、Cas9 はもともと細菌のものなので、ゲノムの高次構造は動かさないというのが普通に考えるとそうなのです。ただ、実際にダウドナ博士が日本に来られたときにお話を聞いたのですが、ゲノムの高次構造をあまり気にしないのです。実際に我々はいろいろな先生方から御依頼を受けて、ほとんどランダムにいろいろなターゲットを改変していますけれども、変異体が取れない所は比較的なくて、かえって ES 細胞でベクターを使ってターゲッティングしているよりは、あまり構造を嫌わないのです。
- 小澤(敬)副部長 終末分化した細胞でも構わないということですか。
- 三谷委員 これまでの質問に少し関係しているのですが、今のお話というのは、CRISPRの標的配列を、CRISPRdirect、若しくはCRISPORでスクリーニングして、それで一番安全そうというか、オフターゲット部位が少ないものをまずターゲットにするということですよ。実際にマウスを作られた後は、特にそのオフターゲットを調べられたことがなくて、あとはドナーDNAやCas9プラスミドDNAの染色体インテグレーションの話がされたと思ったのですがいかがでしょうか。あらかじめ予想されたCRISPRのオフターゲット部位へ、実際変異が入ったかどうかというのは御覧になったことはあるのですか。
- 高橋委員 我々のほうではやったことはないのですが、共同研究者の方がいくつかに調べられていて、それほど大きくは入らないというようなことは論文化されています。

- 谷委員 [REDACTED] の Cas9 の核内移行局在性のスライドがあります。これはヒトでも使えるのですか。それともやはり、これはマウス特異的なのですか。
- 高橋委員 ヒトでは試したことはなくて、今、共同研究で大型の動物でも同じような編集効率が出るかというのは検査中です。なので、種を超えてどこまで使えるかというのは、近々データが出る予定です。
- 谷委員 ありがとうございます。
- 内田委員 すみません、ランダムインテグレーションがプラスミドで確認されるということなのですが、そのサイトというのは、やはりオフターゲットサイトとして検索されるようなサイトに入っているという感じなのでしょうか。
- 高橋委員 それも実際には Guide-seq で調べればいいのですけれども、確認したことはなくて、我々としては入っていないと、それで基本的には OK という形なので、それでお返ししているといえますか、出荷しているという形になっています。
- 山口部会長 あと、13枚目のスライドの所で、2か所切るという、例の論文にもなっているかと思いますが、これは *in vivo* のときに、例えば転座や逆位、欠失などをマウスレベルで調べられるということはできるのでしょうか。それとも、なかなかその辺はハードルが高いということになりますか。
- 高橋委員 実際には、私たちが転座を起こさせようと思って積極的に実験したことがあるのですが、受精卵レベルは結構難しかったです。それから、実際には2か所入れるというのは、マウスの場合ですとフロックスを2か所入れたいということなので、比較的数キロベース以内の感じになるのですけれども、その場合はそこが数キロ抜けて、くっ付いてしまうような形になることが多くて、その抜けたものを PCR でディテクションすると、かなり高頻度で出ますので、そこが優先的に起きて、転座というのは、少なくとも積極的に狙っても結構できないという感じでした。
- 山口部会長 それは例えば解析方法として、出てきた F1 でもいいのですが、そこで M フィッシュなどを掛けてみるとか、そういうことまではしておられないのですか。
- 高橋委員 実は BCR-ABL を作ろうと思ってやったことがあって、それで F0 でやって駄目で、F1 になったら何とかかなるかなと思ったのですけれども、それもやはり検出できなかったです。
- 山口部会長 そうですか。
- 高橋委員 ただ、それは今の効率のいいバージョンではなくて、前の通常の Cas9 を使っているのです。ただ、そのときは結構しつこく調べたのですが、難

しかったです。

- 山口部会長 分かりました。ありがとうございました。
- 小野寺委員 先生のスライドの11枚目ですが、最終的に3匹中2匹にランダムインテグレーションが起こっているということですよ。
- 高橋委員 はい。
- 小野寺委員 ということは、この方法でも基本的にはランダムインテグレーションは起こると考えて良いですか。
- 高橋委員 はい。ただ、このAmpポジティブというのは、オンターゲットサイトにそのまま丸ごと入ってしまっている場合も含んでいるので、要は相同組換えが起きて、ベクターの部分は切り取られずに、切れた所にそのままプラスミドが丸ごと入ってしまっている可能性も否定できないのです。
- 小野寺委員 基本的に定義の問題になってしまいますが、要は、今の定義として「外来遺伝子がなければ遺伝子組換え生物ではなく、存在すると遺伝子組換え生物になる」訳ですから、「遺伝子組換え生物」であるかないかを判断するには全配列をシーケンスする必要があるわけですね。それともクローン化を行うことで外来遺伝子がないものを探すかというのがありますが。
- 高橋委員 はい。
- 小野寺委員 では、これは遺伝子組換え生物ではないと考えますか。
- 高橋委員 そういことですか。この場合はどちらにしてもノックインしてしまっているのです。
- 小野寺委員 確かにこの場合は「遺伝子組換え生物」が良いと思いますが、一般的なゲノム編集での遺伝子破壊（NHEJ等）では外来遺伝子が組込まれる可能性はないでしょうか。
- 高橋委員 それは例えば、潰すだけだとタンパクとメッセンジャーRNAだけのほうが効率がいいので、エレクトロポレーションに入れた場合は、ですので、そういう場合は全く問題にならないと思うのですけれども、プラスミドを使っている場合は、少なくともそのエレメントがあるかないかの確認はどうしても必要になりますよね、そう思います。
- 小野寺委員 分かりました。

<委員からの講演：ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療に関する海外の規制状況（内田委員）>

- 山口部会長 ありがとうございました。おそらく、内田委員のご講演後でも、また議論ができるかと思えます。内田委員には、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療に関する海外の規制状況について、FDA、EMAの状況について御講演いただきたいと思えます。先生、どうぞよろしく願いいたします。

○内田委員

国立医薬品食品衛生研究所の内田です。私に与えられたテーマは、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療に関する欧米の規制状況ということですが、実は昨年5月に厚生労働省の厚生科学審議会「遺伝子治療等臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会」でも、欧米の状況について報告しているのですが、その時点ではまだ遺伝子治療ガイドラインにゲノム編集の取込みというものは、欧米ともに行われておりませんでした。ただ、その後、欧米とも今年に入りまして、ゲノム編集技術に対応するような形でガイドラインの改正案が発出されてきておりますので、それについて御紹介したいと思います。

(スライド 3) ゲノム編集は、ゲノム上の特定の配列に遺伝子を挿入、除去、改変が可能な技術という形で定義をされているところです。ヨーロッパでは EC 指令が法律になるのですが、欧州の EC 指令では、次のように遺伝子治療用医薬品が定義されております。

すなわち有効成分として、リコンビナントの核酸を含むものであって、遺伝子配列の調節や修復、置換、挿入、欠失の目的でヒトに投与される製品で、治療・予防・診断に用いられ、感染症予防用のワクチンは含まない、という定義になっています。すなわち、ベクターを用いたゲノム編集は EU の遺伝子治療の定義には入っておりますが、ヌクレアーゼタンパク質を用いたゲノム編集については、遺伝子治療の定義からは外れている形になります。

(スライド 4) こちらは EMA、欧州医薬品庁のガイドラインですが、EMA からは遺伝子治療関連のガイドラインが多数発出されているのですが、その基本となるのが、この *in vivo* 遺伝子治療用製品のガイドラインと、それから *ex vivo* に当たる遺伝子改変細胞製品のガイドラインということになります。

このうち、*in vivo* のほうのガイドラインは、今年3月に改正されているのですが、この改正自体もゲノム編集を考慮したものとはなっておりますが、やはり遺伝子治療の定義が、「リコンビナント核酸を含むもの」と書かれておりますので、ゲノム編集ツールとしてタンパク質を用いた場合には指針の適用外ということになります。

ただし、EU の規制上の遺伝子治療用医薬品の定義から外れるゲノム編集ツールもあるが、それに対しても遺伝子治療としての考え方が適用できる、ということが書かれております。なお、この指針は、定義上ゲノム編集が含まれるということにはなっておりますけれども、品質、非臨床、臨床の考慮事項として、ゲノム編集独自の内容というものは、特に記載されていないものです。

一方、遺伝子改変細胞製品のガイドラインは、今年の7月に改正案が出されています。これはゲノム編集とCAR-T/TCR-Tの発展を考慮して発出された改正案ですけれども、こちらの場合遺伝子改変法はウイルスベクターだけではなくて、ゲノム編集ツールも含まれるということで、これはタンパク質でのゲノム編集についても含まれているということになります。

また、品質、非臨床、臨床での考慮事項にもゲノム編集の場合の考え方が、かなり詳しく示されているものになります。これについては、欧州遺伝子細胞治療学会で、ポール・エーリッヒ研究所のDr. Rennerという方が、EUのゲノム編集の規制について紹介したスライドを入手しております。そちらを紹介してほしいということでしたので、そちらのスライドを翻訳して紹介いたしますが、翻訳の誤りがあったり、作成者の意図を十分に理解できていない所もあるかと思しますので、御了承いただきたいと思ます。

(スライド5) まず、*ex vivo*と*in vivo*のゲノム編集の違いですが、有効成分として*ex vivo*は改変された細胞で、*in vivo*の場合はゲノム編集に用いるツールやターゲット組織に導入するためのDDSシステムということになります。*ex vivo*ではゲノム編集の結果を製品レベルで解析することが可能ですし、また、望ましくない改変細胞を投与前にチェックするということも、一応原理的には可能となります。

しかし、*in vivo*の場合には、ゲノム編集ツールを投与後に、どのような改変が行われたかを直接解析することはできませんし、また、ゲノム編集用ツールの消長の解析というものも困難で、有害事象が起こっても、その改変細胞の除去は難しいということになりますので、*ex vivo*よりも*in vivo*は、かなりリスクが高いものと考えられます。

(スライド6) 出発原料、*starting material*については、*ex vivo*ゲノム編集の場合には、ゲノム編集に用いる改変用酵素をコードするベクターやメッセンジャーRNA、改変用タンパク質そのもの、それから、ゲノム編集に用いられるガイドRNAのような核酸、ノックインの場合には核酸のテンプレート、あとは改変を行うための細胞になります。これらのものは、セルバンクシステムで、例えば酵素タンパク質やベクターなどを作っていくこととなりますが、そのようなバンクシステムから製造までは、GMPの基準に従うこととなります。一方、*in vivo*のゲノム編集の場合には、これらのベクターやタンパク質、核酸といったものが出発原料ではなくて、それそのものが最終製品という形になります。

ここでスライドを訂正いただきたいのですが、出発原料としては、「他

の遺伝子治療用ベクターや核酸医薬品、タンパク質医薬品と同様」になります。

(スライド 7) ゲノム編集医薬品の特性解析と品質管理についてですが、確認試験、純度試験、力価、安全性の観点からは、基本的には他の *ex vivo* 遺伝子改変細胞、*in vivo* 投与を行うウイルスベクターやタンパク質と同様ということになります。

ただ、ゲノム編集医薬品特有の事項ということで挙げられているのが、先ほどから挙がっておりますが、オンターゲットサイトでの改変効率や製品に含まれるゲノム編集細胞の比率、オフターゲットサイトの解析、ゲノム編集用ツールの持続性の確認で、望ましいのは投与時には消失していること、などがガイドラインには書かれています。あとはオンターゲットサイトの特性解析などが挙げられています。

(スライド 8) ゲノム編集医薬品解析の重要課題としては、ゲノム編集用ツールの設計の適切性、ゲノム編集の酵素ですとかガイド RNA の特異性の確認といったことかと思うのですが、あとはオンターゲット効果とオフターゲット変異の解析ということで、どのような変異が起こるのか、どの程度の変異が起こるのか。あとはオフターゲット変異でどのような結果が起こり得るのかということ等の解析が必要であるといったこと、また遺伝子改変された結果と提案されている治療効果との相関性、などいろいろあります。安全性試験としては、オンターゲット効果やオフターゲット効果の同定、ゲノム編集ツールの投与経路を考慮した一般毒性試験が必要であることとか、免疫原性なども挙げられているところです。

(スライド 9) オフターゲットサイトの解析法ということで、ここには先ほども挙がっていたような方法が例として記載されておりますが、実際のガイドラインには、具体的な評価方法までは記載されてはおりません。書かれている内容としては、*in-silico* での相同配列検索によってオフターゲット候補部位を予測するだけでなく、細胞レベル、あるいはセルフフリーで、ゲノムワイドに偏りのない手法を用いてオフターゲットの切断可能部位を評価して、それらの方法を合わせてオフターゲット部位を評価する必要があるということがガイダンス案には記載されております。

(スライド 10) オフターゲットの評価では、Indel、挿入欠失が自然変異でも生じる可能性がありますので、ゲノム編集ツールで得られた Indel から、未処理細胞の Indel を差し引いて検討する必要があるということになります。検出法の感度ですとか、ゲノム編集の様式や編集された遺伝

子改変のサイズの決定、この辺は先ほどと一緒にですが、オフターゲットゲノム編集で引き起こされる事象の評価などが必要とされています。その他に、更に染色体の転座や大きな欠失といったことも起こり得るので、それらの解析も必要になります。

(スライド 11) 全体を通じてのリスク・ベネフィットとして、特にキーポイントとなるのが品質及び非臨床のデータセットと、それから対象疾患の重篤性ですとか対象患者のポピュレーションとか、他の治療法があるかどうかといったこともリスク・ベネフィットの考慮には非常に重要になってくるということです。用いるゲノム編集技術には、それぞれにリスクがあるわけですがけれども、その用いる方法と対象疾患等を考えて、ケースバイケースで判断していく必要があるというようなことが書かれています。

(スライド 12) EU の規制の要約と結論ですが、ゲノム編集は非常に新しい技術で、急速に改良されていく可能性が高いものであり、迅速な開発が見込まれるとともに、早期の治験開始が期待されていることから、やはり製品開発に伴って新たな規制的要求事項を設定していく必要があるということで、従来のガイドラインでもカバーできている所は、ある程度はありますが、やはりゲノム編集製品に特有の規制的要件については、従来のガイドラインではカバーし切れていないということで、新たなゲノム編集の開発状況を十分に開発者と規制当局で連絡を取って、情報交換していくことが必要であるということが、まとめとして挙げられています。

(スライド 14) 一方、米国の状況として、遺伝子治療の定義ですが、1998年に基本となる遺伝子治療の Somatic Cell Therapy and Gene Therapy のガイダンスが出されており、これは古いものですので、「遺伝物質を送達するための組換え DNA 物質」が遺伝子治療製品と定義されておりました。一方、今年になって遺伝子治療の CMC に関するガイダンスの案が出されておりまして、こちらを見ますと、「導入した遺伝物質の転写、翻訳により効果を示すもの又はヒトの遺伝子配列に特異的な変化をもたらすことにより効果を示すもの」を遺伝子治療製品としており、ゲノム編集用のヌクレアーゼも遺伝子治療製品と定義されています。米国の場合には、法律上では、このような遺伝子治療のベクター製品であっても、ゲノム編集のヌクレアーゼタンパク質の場合でも、いずれも Biological product、生物製剤に該当するということになるようです。

(スライド 15) 米国でもこの夏にガイダンスの改正案がいくつか発出されています。1つは、先ほどの CMC に関するガイダンスの改正案ですが、

これもゲノム編集を考慮したものでもあるのですが、ゲノム編集製品の特有の記載はほとんどありません。

もう1つ、遺伝子治療製品投与後の長期フォローアップに関するガイダンスの改正案が出されております。これは遺伝子治療では、レトロウイルスベクターの挿入変異によって白血病が発症したように、投与から長期間経過した後で副作用が発現するという場合があることから、患者を長期間フォローアップすることで安全性を確保することが必要になるのですが、ゲノム編集はオフターゲット変異による未知のリスクがあるということから、長期フォローアップが必要とされており、ゲノム編集についての詳細な記載が、このガイダンス案にありますので、それについて紹介したいと思います。

(スライド 16) ゲノム編集による遅発性有害事象のリスク要因ですが、やはりゲノム編集は宿主ゲノムに永続的な変化を与えることが大きなリスク要因となります。目的外のゲノム改変によって遺伝子発現の異常や染色体の転座、悪性腫瘍の誘導などをもたらす可能性がありますし、免疫原性の問題もあります。

非臨床安全性評価で考慮すべき事項として挙げられているのが、ゲノム編集にどのような技術を用いるかということとか、*ex vivo*でどのような細胞を改変するのか、コンポーネントのデリバリーにどのようなベクターを用いるのか、用いないのか、あとは臨床での投与経路などが挙げられています。

(スライド 17) 臨床での考慮事項ですが、このガイダンス案ではゲノム編集のフォローアップ期間が15年間とされておりまして、これはレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターといった組込型のベクターと同じ長期間のフォローアップが求められているものです。このフォローアップのモニタリング計画で考慮すべき事項ということで、オフターゲット活性について非臨床で実施される、*in vivo*とか*in vitro*、*in vivo*とは細胞レベルということなのですが、細胞レベルや、ゲノムを抽出したものをを用いた試験や、*in-silico*等の解析結果に基づいて、有害事象のモニタリング計画を立案すること、とありまして、例として書かれているのが、例えば標的が肝細胞であって、がん抑制遺伝子に影響することが分かった場合には、フォローアップ観察では肝がん発生の評価のモニタリング計画を組み込むといったことまでも書かれております。

それから、ゲノム編集の標的組織に特異的な有害事象をモニタリングすること。脳のようにゲノム編集の標的組織を直接モニタリングすることが難しい場合には、代替案を提案することですとか、オフターゲット活

性とオンターゲット活性の発現の比率というものを求めておいて、オンターゲット効果については、測定ができるでしょうから、オンターゲット効果の測定値から、オフターゲット活性を予測して、それについてフォローアップ計画を立てること、また、ゲノム編集製品の全身投与の場合では、標的組織・臓器でのオフターゲット作用だけでなく、他の組織・臓器でのオフターゲット作用についても調べるといったことが書かれておりました。長期フォローアップに関するガイダンス案ですが、ゲノム編集の非臨床で評価すべきことも含めて、かなり具体的な内容が示されたものとなっております。

(スライド 18) 私からは以上ですが、一応まとめということで、欧米は共にゲノム編集技術を考慮したガイドラインの改正案を今年になって公表しています。ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療も、基本的には遺伝子治療の従来の考え方が適用されますが、ゲノム編集特有の考慮事項もあるとしており、欧州では遺伝子改変細胞製品のガイドライン改正案に、かなり詳しいことが書かれておりますし、米国では長期フォローアップガイダンス案で、ゲノム編集はかなりリスクが高いものということで、挿入型ウイルスベクターを用いた遺伝子治療と同様の15年間のフォローアップを求めています。以上です。どうもありがとうございました。

○山口部会長

ありがとうございます。これは、久米先生がESCGTに行かれたときに情報を共有してきていただいて、それを参考にさせていただいているかとは思っております。今の御発表で、規制的要件なのでなかなか全部の答えを内田委員が用意できるかどうか分からないのですが、将来の目的であるコンセプトペーパーを作るときに、こういうのを前提にどのように考えて行ったらいいかというところも少し議論をしていただけると有り難いと思います。

○久米委員

先ほど高橋委員からも、プラスミドのインジェクションみたいなときには、そのシーケンスを使ってピックアップというか検出することは可能なだけどもというお話があったのですが、例えば、ガイドRNAと酵素だけ、あるいはメッセンジャーRNAだけ入れたとき、Indelに関しては、例えば細胞レベルでのディープシーケンシングくらいしかちょっと思い浮かばないのです。そういったものをvivoでということまでは求められていないのですね。

○内田委員

ヨーロッパのガイドラインは、基本的には遺伝子改変細胞製品のものということで、in vivoについては書かれてはいないのでそこまでのものはないのですが。

○岡田委員

少し定義のことで教えていただきたいのです。ヨーロッパではゲノム

DNA と書いてあって、アメリカはゲノムと書いてありますが、遺伝子治療という意味では RNA 編集とか、最近、いろいろな遺伝子編集技術が出てるのでそういったものも出てくると思うのですが、先日の環境省の通達の、いわゆるゲノム編集で遺伝子改変細胞になるかどうかという議論の中には、ゲノム DNA しかターゲットとして想定されていないのです。実際にはリスクは低いと思うのですが、RNA をターゲットにしても、例えば、トランスポゾンの転移に伴ってシュードジーンが再活性化するとか、そういったことを言い出したら切りがないのですが、そういうこともないとは言えないと思うのです。その辺、治療という観点での議論では、RNA 編集もゲノム編集の定義に含まれるのではないのでしょうか。

○内田委員

正確かどうか分からないのですが、アメリカでは、少なくとも転写・翻訳といったことが書かれております。メッセンジャーRNA そのものも遺伝子治療という形に、今までは違ったと思うのですが、そういうものも入っていて、組換え核酸からなる場合、それが DNA だけなのか、RNA の場合も含まれるのか、ちょっと正確には分からないのですが、かなりいろいろなものが含まれてきてはいると思うのです。ただ、今回のガイドラインの改正案ということでも、まだ二本鎖を切断するようなゲノム編集への対応という形だと思いますので、そのほかのゲノム編集技術がどんどん進化してきているわけですが、どこまでを含むものなのかは分からないのです。ただ、なるべくできる限りのものを遺伝子治療と考えようとしているところはあるのかとは思いますが、ちょっと正確ではないかもしれません。

○山口部会長

ICH の議論をしていたときに、2008 年頃ですが、EU でメッセンジャー RNA も入れるべきではないかと、遺伝子治療の定義の中に入れるべきと、何か EU の中で議論をしていたようです。ただ、FDA はもちろんそのときは反対で、Health Canada は入れるようなことも言っていました。ただ、その直後にはまだ答えは出なかったのですが、今でも結論は出ていないと私は思うのです。ひょっとしたら将来的には入ってくるのかもしれないという気はするのですが。ここで議論をしていただきたいと思っているのは、メッセンジャーRNA ゲノム編集というのも最近いくつか言われているようで、そういうのをどう取り扱うかというのは少し御意見をいただけるといいと思っているのです。

○三谷委員

少し戻った話で申し訳ございませんが、今、御説明になったのは、基本的には臨床でゲノム編集を用いた後の安全性評価のお話が主だったのですか。それとも、その前の臨床試験を認める前に審査をする際の安全性の話と両方だったのか、どちらだったのでしょうか。

○山口部会長　　今の話、多分、議論になるのは、おそらく挿入変異のリスクの問題が結構大きな部分かという気がするのです。これは、リスク分類で考えたときに、FDA が言っているように、リスク分類としては、彼らは挿入変異に関してはほとんどレトロ、レンチと同じレベルと考えているのであろうとは思っています。前回の議論の中で少しあったのは、あと、挿入変異の有無だけがリスクファクターなのか、ターゲットの細胞のリスクファクターももちろん考えないといけないのかという、その辺が少しあるかなという気がするのです。島田先生、その辺のターゲットの差等を踏んでから、本当の挿入変異の変異と、多分これは掛合せになるのではないかとはい思うのですが、いかがでしょうか。

○島田委員　　内田委員の話聞いても、まだ世界的に整理されていないなという気がします。例えば、*in vivo*と*ex vivo*を同時に議論することは不可能です。

しかし、あの例も含めて今、クラシカルな遺伝子治療でも、*in vivo*で大量のウイルスベクターを血中に投与してしまうというプロトコルがたくさん始まってしまっていますよね。そうすると、今言っているような組込みの危険性とか、特に生殖細胞が一番問題ですが、そういうものがほとんど議論なしで行われている。やったら今のところ大丈夫そうだというだけで話が進んでしまっているのは非常に危険だと思います。一方においては、このような議論をしても、中国ではもうやってしまったという話になっているので、何と言いますか、ちぐはぐで、どこで何の議論をすべきなのかというのも全く決まっていない状況です。2年前ですよ、アメリカで、アシロマ会議の真似をして、ゲノム編集の会議をやりましたよね。あれは守られなかったわけですよ。受精卵はやめようと言ったのに勝手にやっちゃっているわけですから。その辺を、どこから議論をしていけばいいのかというので、ちょっと私もまだまとまっていないのです。

それから1つ、先ほどサルの話が出ましたけれど、あれは昔からあんなのです。ヨーロッパは、サルの実験は、動物愛護の観点からできるだけやらないという考えなのですが、アメリカは、とにかくサルをやらないとヒトにはやらせないという考え方があるので、そういう違いもあると思うのです。

＜今後の専門部会の進め方＞

○山口部会長　ありがとうございます。ほかに。今回はお二人の先生に講演をいただきましたが、それ以外を含めて、ゲノム編集のコンセプトペーパーを作っていく上でトータル4人の先生に今まで講演をいただいているわけですが、その中で、例えば、今言ったようなリスクファクターの話とかそういうものをどう書き込んでいくかという話について、今の時点でももちろん結構です。これは次回以降もまだ議論を続けて、来年の早いところでエディティングをスタートさせたいと思っております。

前回の議事録について、もう皆さんには見ていただいております。それで、前回の最後のほうでも非常に議論をさせていただいた内容を、コンセプトペーパーの中に取り込んでいければと思っております。そういうものを作って、最終的なコンセプトペーパーに行ければと思っております。その点も含めまして、今のこの時点で何かコメントございますか、全体も含めて。

もし、全体なければ、前回11月8日の第1回専門部会で、エディティングを行うメンバーを考えたいということで御了承を得ました。それで、資料3にエディティングのメンバーを書いております。もう既に見ておられるかと思いますが、資料3に書かせていただきましたこれらの委員の方には、大変御迷惑をお掛けしますが、御協力をいただければと思っております。このエディティングのメンバーと、それとこの専門部会と両方合わせて、エディティングのメンバーにまず素案を作ってこちらに出していただく。出していただいた上で、ここでまたもう一度議論をしてフィードバックしていくような形で運用をさせていただければと思っております。この辺について、何かコメントございますでしょうか。ありがとうございます。それで御了解をいただければ、こういうメンバーで進めさせていただきますので、よろしく申し上げます。

本日の議論はここまでなのですが、何かもし追加でコメント等がありましたら。次回の専門部会の前に、エディティングのメンバーのWGを開催して、どのような議論をしたかについては、ここに御報告できるかとは思っております。本日の議事は以上なのですが、事務局から何かございますでしょうか。

＜その他＞

○事務局(下川)　次回の専門部会ですが、2月26日火曜日の14時から16時の開催を予定しております。詳細等につきましては追って御連絡いたします。

<閉会>

○山口部会長　　本日は専門部会に御参集いただきましてありがとうございます。どうもありがとうございました。